

Aus dem Bereich Strukturbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Optimierung der Reinigung und
Charakterisierung von heterolog
produzierten CYBASC-Proteinen aus
Arabidopsis thaliana

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2012

vorgelegt von Manuela Busch
geboren am 02. August 1983 in Leipzig

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden am Lehrstuhl der Strukturbiologie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Wissenschaftlicher Betreuer: Prof. Dr. C. Roy D. Lancaster
Wissenschaftlicher Begleiter: Prof. Dr. Richard Zimmermann

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Homburg, den

Unterschrift

*für
meine Eltern,
Elena, Verena & Nadine
& Chris*

INHALTSVERZEICHNIS

I	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	x
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	xii
III	TABELLENVERZEICHNIS	xv
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY: OPTIMIZATION OF THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HETEROLOGOUSLY PRODUCED CYBASC-PROTEINS FROM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	4
3	EINLEITUNG	7
3.1	Der Elektronentransfer über die eukaryotische Membran	7
3.2	L-Ascorbat - ein wichtiges Antioxidans in tierischen und pflanzlichen Organismen	7
3.3	Das Element Eisen	8
3.4	CYBASC-Proteinfamilie: Funktion und Strukturvorhersage	9
3.4.1	Model-Cytochrom b_{561} : <i>BCytb₅₆₁</i> -CG aus <i>Bos taurus</i>	14
3.4.2	Cytochrom b_{561} -Proteine aus <i>Homo sapiens</i> und <i>Mus musculus</i>	15
3.4.3	Cytochrom b_{561} aus Pflanzen	16
3.4.4	CYBASC-Mitglieder aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
3.5	Arbeiten von Lucia Cenacchi (2007) zur Charakterisierung von heterolog produzierten CYBASC-Proteinen	20
3.6	Das Expressionssystem <i>E. coli</i> und die Produktionsvektoren	21
3.7	Ziele dieser Arbeit	23
4	MATERIAL	24
4.1	Verwendete Bakterienstämme	24
4.2	Kulturmedien	24
4.3	Plasmide und Oligodesoxynukleotide	24
4.4	Puffer und Lösungen	26
4.5	Proteine und Standards	28
4.6	Molekularbiologische Kits und Kristallisationsassays	28
4.7	Chromatographiesäulen und <i>Batch</i> -Resin	29
4.8	Chemikalien	29
4.9	Redoxmediatoren	31
4.10	Detergenzien	31
4.11	Geräte	32

4.12	Verbrauchsmaterial	33
4.13	Computer-Programme	34
5	METHODEN	36
5.1	Molekularbiologische Methoden	36
5.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese	36
5.1.2	Herstellung neuer pPIC3.5K-Expressionskonstrukte für den A-Paralog	37
5.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
5.1.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	39
5.1.5	Sequenzierung der Plasmide und Verifizierung des Kodonaustausches	39
5.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> und CYBASC-Produktion	39
5.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> K12 (modifiziert nach Cohen et al., 1972)	39
5.2.2	Zellanzucht	40
5.2.3	Herstellung von Dauerkulturen	40
5.2.4	Bestimmung der Zelldichte	40
5.2.5	Zellanzucht und Proteinproduktion im analytischen Maßstab	40
5.2.6	Zellanzucht und Proteinproduktion im präparativen Maßstab	41
5.3	Zellyse und Membranpräparation	41
5.4	Solubilisierung der heterolog produzierten CYBASC-Proteine	42
5.4.1	Solubilisierung des Membranpellets im analytischen Maßstab	42
5.4.2	Solubilisierung des Membranpellets im präparativen Maßstab	42
5.5	Reinigungsstrategien	42
5.5.1	Ionenaustauschchromatographie	43
5.5.2	Immobilisierte Ni ²⁺ -Affinitäts-Chromatographie (IMAC) mit dem Äkta Purifier FPLC-System	43
5.5.3	Affinitätsreinigung mittels Streptavidin-Affinitätsanhängsel mit dem Äkta Purifier FPLC-System	44
5.5.4	Reinigung im <i>Batch</i> -Verfahren	44
5.5.5	Gravitationsfluss-Affinitätsreinigung mittels Streptavidin-Affinitätsanhängsel	44
5.5.6	Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie im analytischen Maßstab	44
5.5.7	Größenausschlusschromatographie im analytischen Maßstab	46
5.5.8	Größenausschlusschromatographie im präparativen Maßstab	47
5.6	Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford, 1976	47
5.7	Elektrophoretische Techniken und Färbemethoden	47

5.7.1	DNA-Agarosegelelektrophorese	47
5.7.2	Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Gelen	47
5.7.3	Diskontinuierliche SDS-Gele im Tris-Glycin Laufpuffer	48
5.7.4	Diskontinuierliche SDS-Gele im MES Laufpuffer.	48
5.7.5	Coomassie-Färbung der aufgetrennten Proteine in SDS-Gelen	48
5.7.6	Silber-Färbung von SDS-Gelen	48
5.7.7	Elektrotransfer und Detektion der Cytochrom <i>b</i> ₅₆₁ -Proteine	48
5.8	Proteinidentifizierung mittels MS/MS Experimenten	49
5.9	DEPC-Inkubation der heterolog produzierten CYBASC-Paraloge	50
5.10	Ascorbat-Inkubation der CYBASC-Paraloge	50
5.11	Bestimmung des Protein- und Hämgehalts	50
5.11.1	Bestimmung nach Liu et al., 2005	50
5.11.2	Bestimmung mit der Alkalische Pyridin-Fe(II)-Methode	51
5.12	Aktivitätsbestimmung	52
5.12.1	Spektroskopie der Ascorbat-abhängigen Reduzierbarkeit und der Eisen-abhängigen-Oxidation	52
5.12.2	Direkter Aktivitätstest zur Bestimmung der Ascorbat-abhängigen-CYBASC-Umsetzungsrate	52
5.12.3	Direkter Aktivitätstest zur Bestimmung der Eisenchelat-abhängigen-CYBASC-Umsetzungsrate	53
5.13	Bestimmung der Häm-Mittelpunkts-Potentiale (E_M -Werte) durch Reduktion/Oxidation-Titration	53
5.14	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	54
5.15	Kristallisationsansätze mittels Dampfdiffusionsmethode mit „sitzenden Tropfen“ (Sitting Drops)	54
6	ERGEBNISSE	55
6.1	Optimierung der heterologen Produktion des A-Paralogs in <i>E. coli</i>	55
6.2	Optimierung der Produktion des B-Paralogs in <i>E. coli</i>	57
6.3	Mass Fingerprint Identifikation der CYBASC-Paraloge	59
6.4	Reproduktion der Reinigungsstrategie von L. Cenacchi (2007)	60
6.5	Neue Solubilisierungsstrategie	62
6.6	Langzeit-Stabilität des B-Paralogs in dem Detergenz LDAO	63
6.7	Neue Reinigungsstrategien für den B-Paralog	65

6.7.1	Neues Puffersystem für die etablierte Ni ²⁺ -IMAC-Chromatographie	65
6.7.2	Reinigung des B-Paralogs mittels Ionenaustauschchromatographie	66
6.7.3	Initiale Reinigungsversuche mit Hilfe von Gravitationsfluss-Strep-Tactin-Säulen	67
6.7.4	Präparative Affinitätsreinigung mittels Streptavidin-Anhängsel	68
6.8	Präparative Größenausschlusschromatographie des A-Paralogs als letzter Reinigungsschritt	70
6.9	Initiale Kristallisationsansätze des A-Paralogs	71
6.10	Analyse der CYBASC-Wildtyp-Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen	73
6.10.1	Thermodynamische Untersuchung der Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit beider Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen	73
6.10.2	Kinetische Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit beider CYBASC-Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen	74
6.10.3	Abbau des B-Paralogs in der DM Detergenz-Mizelle	75
6.10.4	Größenermittlung der Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen mittels Größenausschlusschromatographie	76
6.11	Eisenchelat-Reduktion durch CYBASC-Paraloge	78
6.11.1	Thermodynamische Eisenchelat-abhängigen-Oxidation der CYBASC-Paraloge	78
6.11.2	Kinetische Eisenchelat-abhängigen-Oxidation der CYBASC-Paraloge	79
6.12	Bestimmung der E _M -Werte-der CYBASC-Proteine	80
6.13	Charakterisierung der CYBASC-Paraloge durch DEPC-Modifikation	81
6.13.1	Effekte auf die Reduzierbarkeit der DEPC-modifizierten-Paraloge	81
6.13.2	Kinetische Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit der DEPC-modifizierten-CYBASC- Paraloge	83
6.13.3	Bestimmung der E _M -Werte der DEPC modifizierten CYBASC-Paraloge	84
6.13.4	Untersuchung der Sekundärstrukturelemente des A-Paralogs durch CD-Spektroskopie	85
6.14	Charakterisierung von B-Paralog-Varianten	86
6.14.1	Thermodynamische Bestimmung der Ascorbat abhängigen Reduzierbarkeit der B-Paralog-Varianten	86
6.14.2	Bestimmung der kinetischen Aktivität der Ascorbatumsetzung durch die B-Paralog- Varianten	88
6.14.3	Bestimmung der E _M -Werte der Varianten	88
6.14.4	Bestimmung des Hämgehalts	89
6.15	Herstellung neuer Konstrukte für das Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i>	90

7	DISKUSSION	91
7.1	Heterologe Produktion dihämhaltiger CYBASC-Paraloge im Expressionssystem <i>E. coli</i>	91
7.2	Optimierte Solubilisierung mit LDAO	92
7.3	Reinigungsstrategien für den B-Paralog im Vergleich	94
7.3.1	Die Verwendung von Ionenaustauscher-Chromatographien erhöht nicht den Reinheitsgrad des B-Paralogs	94
7.3.2	Optimierung der etablierten 1-Schritt-Ni ²⁺ -IMAC-Reinigung	94
7.3.3	Etablierung einer 1-Schritt- Streptavidin-Affinitätsreinigung	95
7.4	Größenausschlusschromatographie und initiale Kristallisationsansätze des A-Paralogs	97
7.5	Etablierung eines direkten Aktivitätstests für die Charakterisierung der CYBASC-Paraloge	98
7.6	Charakterisierung der Wildtyp-Paraloge	99
7.6.1	Unterschiede in der thermodynamischen und kinetischen Ascorbat-Reduzierbarkeit bei Verwendung verschiedener Detergenzien	99
7.6.2	Bestimmung des Oligomerisierungszustandes beider Paraloge in 0,1 % LDAO und 0,01 % β -LM	100
7.6.3	Identifikation zweier titrierbarer Häm <i>b</i> -Gruppen	101
7.6.4	Reduktion von Fe ³⁺ -Chelaten	101
7.7	Verwendung von DEPC zur Lokalisation des Hoch- und Niedrig-Potential-Häms	102
7.7.1	Inkubation mit DEPC inhibiert die Ascorbat-abhängige Reduktion: thermodynamisch und kinetisch	103
7.7.2	Effekt der DEPC-Modifikation auf die E _M -Werte	103
7.7.3	Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente	105
7.8	Schlüsselfunktion der Aminosäure B-K81	106
7.9	Funktion der Histidinreste an den Positionen 46 und 157	108
7.10	Ausblick	109
8	LITERATURVERZEICHNIS	112
8.1	Eigene Publikationen	125
9	DANKSAGUNG	126
10	LEBENS LAUF	128
11	ANHANG	XVII

11.1	Proteinsequenz-Homologie	xvii
11.2	Strukturvorhersage der CYBASC-Paraloge	xviii
11.3	Vergleichsanalysen des Kodongebrauchs zwischen <i>E. coli</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	xix
11.4	Zeitabhängige Absorptionsänderung zur Bestimmung der Umsetzungsrate von Ascorbat	xxi
11.5	Zeitabhängige Absorptionsänderung zur Bestimmung der Umsetzungsrate von Eisenchelaten	xxii
11.7	Berechnung der E_M -Werte	xxiii
11.8	Reduziert zu oxidiert Titrationen zur Bestimmung der E_M -Werte	xxiv
11.9	Auswertung der analytischen Größenausschlusschromatographie durch SDS-PAGE	xxvii
11.10	CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Schmelzpunktes T_M	xxviii
11.11	Auswertung der CD-Spektren mit der Provencher & Glockner-Methode und K2D-Methode	xxviii
11.12	Röntgenbeugungsaufnahme	xxix
11.13	DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide	xxx

I VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>araC</i>	Gen-Name des regulatorischen Proteins des Arabinose Promotors
AS	Aminosäure
BCA	Bichinonsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
b_H	Hoch-Potential Häm <i>b</i>
b_L	Niedrig-Potential Häm <i>b</i>
BSA	Bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CG	chromaffine Vesikel (<i>chromaffin granula</i>)
CYBASC	Ascorbat-reduzierbares Cytochrom b_{561} (<i>cytochrome b ascorbate reducible</i>)
D	Deutschland
DCPIP	2,6-Dichlor- <i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)- 1,4-benzochinonimin-natriumsalz
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Dehydroascorbat
DM	<i>n</i> -Decyl- β -maltosid
DNAse	Deoxyribonuclease
DoH	Dopamin β -Hydroxylase
E, Glu	1- und 3-Buchstaben-Kennzahl der Aminosäure Glutamat nach der IUPAC-IUB JCBN
e^-	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E'_0	Standard-Redoxpotential bei pH 7
E_M -Wert	Mittelpunkts-Potential einer Häm-Gruppe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
EPR	Elektronenspinresonanz (<i>electron paramagnetic resonance</i>)
Fe^{2+}/Fe^{3+}	Zweiwertiges Eisen Kation/ Dreiwertiges Eisen Kation
Fos 12	Fos Cholin-12 (<i>n</i> -Dodecylphosphocholin)
Fw	Vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gramm
h	Stunde
H, His	1- und 3-Buchstaben-Kennzahl der Aminosäure Histidin nach der IUPAC-IUB JCBN
H^+	Proton
His ₁₀	Deca-Histidin
IMAC	Immobilisierte Metal-Affinitätschromatographie (<i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JWGU	Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
K, Lys	1- und 3-Buchstaben-Kennzahl der Aminosäure Lysin nach der IUPAC-IUB JCBN
kDa	Kilodalton
Konz	Konzentration
L	Liter
LDAO	Lauryldimethylamin- <i>N</i> -oxid
LDS	Lithium-Dodecylsulfat

Fortsetzung des Abkürzungsverzeichnisses

Abkürzung	Bedeutung
M	Mol
M, Met	1- und 3-Buchstaben-Kennzahl der Aminosäure Methionin nach der IUPAC-IUB JCBN
mA	Milli-Ampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>)
MCS	Sequenzabschnitt mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen (<i>multiple cloning site</i>)
MDHA	Monodehydroascorbat
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
min	Minute
MPI	Max-Planck Institut
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MWCO	Ausschlussgrenze in kDa (<i>molecular weight cut off</i>)
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium
Ni-NTA	Nickel- Nitrilotriessigsäure (<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>)
NZYM	<i>E. coli</i> Nährmedium
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pI	Isoelektrischer Punkt
pK _a	Negativer, dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q, Gln	1- und 3-Buchstaben-Kennzahl der Aminosäure Glutamin nach der IUPAC-IUB JCBN
QFR	Quinol:Fumarat-Reduktase
Rev	Rückwärts (<i>reverse</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDM	ortsgerichtete Mutagenese (<i>site directed mutagenesis</i>)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde
Strep	Streptavidin-Affinitätsanhängsel mit der Aminosäuresequenz S A W R H P Q F G G
StrII	Streptavidin-Affinitätsanhängsel II mit der Aminosäuresequenz W S H P Q F E L
TAIR	<i>Arabidopsis</i> -Datenbank (<i>The Arabidopsis Information Resource database</i>)
TEV	Tabak-Virus (<i>tobacco etch virus</i>)
ToF	Flugdauer (<i>time of flight</i>)
TSF	Tumor-Suppressor Faktor
UKS	Universitäts-Klinikum des Saarlandes
ÜN	über Nacht
ÜT	über Tag
V	Volt
β-LM	n-Lauryl-β-D-maltopyranosid (n-Dodecyl-β-D-maltopyranosid)
ΔE _{M,bH}	Differenz zweier E _M -Werte des Häms b _H
ΔE _{M,bL}	Differenz zweier E _M -Werte des Häms b _L
ΔR	Differenz zwischen Ascorbat-abhängigen Reduzierbarkeiten verschiedener Proben
ε	Extinktionskoeffizient

II ABILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.1: Oxidation von Ascorbat in wässriger Lösung.	8
Abbildung 3.2: Absorptionsspektrum des BCy <i>t</i> ₅₆₁ -CG aus <i>Bos taurus</i> .	9
Abbildung 3.3: Phylogenetischer Stammbaum der Cytochrom <i>b</i> ₅₆₁ -Proteinen aus verschiedenen Spezies (modifiziert nach Tsubaki et al., 2005).	10
Abbildung 3.4: Protein-Sequenzvergleich 6 verschiedener CYBASC-Proteine.	12
Abbildung 3.5: Topologie-Modell des B-Paralogs aus <i>A. thaliana</i> mit funktionellen Aminosäuren in Homologie zum Modell für BCy <i>t</i> ₅₆₁ -CG (Okuyama et al., 1998).	13
Abbildung 3.6: Funktion von BCy <i>t</i> ₅₆₁ -CG in chromaffinen Zellen der Nebenniere.	14
Abbildung 3.7: Kovalente DEPC-Modifikation am Beispiel eines Histidinrestes (Nakanishi et al., 2009a).	15
Abbildung 3.8: Intron-Exon-Struktur der CYBASC-ORFs <i>artb561-a</i> und <i>artb561-b</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (modifiziert nach Asard et al., 2000).	18
Abbildung 3.9: Vergleich der α -Bande des A- und B-Paralogs.	21
Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide für die heterologe Produktion im Expressionssystem <i>E. coli</i> .	22
Abbildung 5.1: Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie Säule Superdex 200 5/ 150.	46
Abbildung 6.1: Western Blot Analyse der Produktionsbedingungen bei 33 °C und 37 °C für Top10/pBADA ₂ -A mit dem Induktor Arabinose.	55
Abbildung 6.2: Analyse der Arabinose induzierten A-Paralog Produktion in den <i>E. coli</i> -Stämme Top 10 und Rosetta (DE3) via SDS-PAGE.	56
Abbildung 6.3: Western Blot Analyse der Produktionsbedingungen bei 30 °C und 33 °C für C43 (DE3)/pTTQC-B mit dem Induktor IPTG.	58
Abbildung 6.4: LC-MS/MS-Chromatogramm des A-Paralog Peptids LTFLENGGLDK und dessen Fragmente. .	59
Abbildung 6.5: LC-MS/MS-Chromatogramm des Peptids L Q V N Q V I T R Y des B-Paralogs.	60
Abbildung 6.6: Äkta-Chromatogramm einer Ni ²⁺ -IMAC-Reinigung (1 ml HisTrap Chelating, GE Healthcare (D))am Beispiel des B-Paralogs.	61
Abbildung 6.7: Western Blot Analyse der Solubilisation des B-Paralogs durch verschiedene Detergenzien.	62
Abbildung 6.8: Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren des solubilisierten B-Paralogs in 1% LDAO zu verschiedenen Zeitpunkten (t_0 : 0 h, t_1 : 24 h, t_2 : 48 h und t_3 : 144 h).	64
Abbildung 6.9: Analyse der optimierten Ni ²⁺ -IMAC-Reinigung des B-Paralogs mittels SDS-PAGE (12 %).	65
Abbildung 6.10: Reinigungsprofil der Kationenaustauschchromatographie (Äkta Chromatogramm jeweils einer 1 ml Säule).	66

Abbildung 6.12: SDS-PAGE mit Silberfärbung zur Auswertung einer analytischen Reinigung mittels "1 ml-Gravity Flow Strep-Tactin® Sepharose®".	68
Abbildung 6.13: Reinigung des B-Paralogs (WT) über eine 5 ml-Streptactin-Sepharose-Säule (IBA, Göttingen (D)).	69
Abbildung 6.14: Äkta-Chromatogramm (a) und Ausschnitt eines SDS-Gels (b) der präparativen Größenausschlusschromatographie (16/60 Superdex 200, GE Healthcare) des A-Paralogs.	70
Abbildung 6.15: Kristalline Formen bei verschiedenen Bedingungen (a – f) im MemGold HT-96 Screen.	72
Abbildung 6.16: Reduzierbarkeit des A-Paralog (a) und B-Paralog (b) in unterschiedlichen Detergenz-Mizellen durch verschiedene Ascorbatkonzentrationen.	73
Abbildung 6.17: Direkter Aktivitätstests zur Bestimmung der Ascorbat-Umsetzungsraten (U/mg) der Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen.	74
Abbildung 6.18: Analyse des Proteinabbaus in 0,1 % DM via SDS-PAGE (12 %).	75
Abbildung 6.19: Elutionschromatogramme des A-Paralogs in verschiedenen Detergenz-Mizellen (Superdex 200 15/30).	77
Abbildung 6.20: Oxidation des A-Paralogs am Beispiel verschiedener Fe ³⁺ -EDTA-Konzentrationen.	78
Abbildung 6.21: Umsetzungsrate der Fe ³⁺ -Chelate durch beide Paraloge.	79
Abbildung 6.25: Vergleich der E _M -Werte der nicht-modifizierten Paraloge.	84
Abbildung 6.26: CD-Spektren (grün) und deren rekonstruierte Spektren (rot: Contin; blau: K2D) des A-Paralogs (a), des DEPC-modifizierten A-Paralogs (b) sowie des DEPC und Ascorbat-modifizierten Paralogs (c).	85
Abbildung 6.27: Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit der B-Paralog-Varianten B-H46M (hellgrün), B-K81E (Türkis) und B-H157Q (Dunkelgrün) im Vergleich zum Wildtyp (Blau).	87
Abbildung 6.28: Ascorbat-Umsetzungsrate (U/mg) der Varianten B-K81E (Türkis), B-H157Q (Dunkelgrün) und B-H46M (Hellgrün) im Vergleich zum Wildtypenzym (Dunkelblau).	88
Abbildung 6.29: Vergleich der E _M -Werte der Varianten B-H46M (in Hellgrün), B-K81E (in Türkis) und der Variante B-H157Q (in Dunkelgrün) mit dem Wildtyp (in Blau).	89
Abbildung 6.30: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung der neuen Konstrukte via <i>whole cell</i> -PCR mit den Oligodesoxynukleotiden 5' AOX1 und 3' AOX1.	90
Abbildung 7.1: Optimierte Produktions- und Reinigungsstrategien (b - e) im Vergleich zur ursprünglichen Reinigungsstrategie (a).	96
Abbildung 11.1: Vergleichsanalysen des Kodongebrauchs zwischen dem Expressionssystem und <i>Arabidopsis thaliana</i> für den A-Paralog.	xix
Abbildung 11.2: Vergleichsanalysen des Kodongebrauchs zwischen dem Expressionssystem und <i>Arabidopsis thaliana</i> für den B-Paralog.	xx

Abbildung 11.3: Zeitabhängige Absorptionsänderung ($\Delta A_{561-575}$) zur Bestimmung der Ascorbat-abhängigen-Aktivität U/mg am Beispiel des B-Paralogs.	xxi
Abbildung 11.4: Zeitabhängige Absorptionsänderung ($\Delta A_{561-575}$) zur Bestimmung der Eisenchelat-abhängigen-Aktivität U/mg am Beispiel des DEPC-modifizierten A-Paralogs.	xxii
Abbildung 11.5: Redoxtitrationskurven des A- und B-Paralogs.	xxiv
Abbildung 11.6: Redoxtitration der B-Paralog-Variante B-K81E.	xxv
Abbildung 11.7: Redoxtitration der B-Paralog-Variante B-H46M.	xxvi
Abbildung 11.8: Redoxtitration der B-Paralog-Variante B-H157Q.	xxvi
Abbildung 11.9: Auswertung der analytischen Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) des A-Paralog in 0,01 % β -LM.	xxvii
Abbildung 11.10: Bestimmung der Schmelzpunkte des A-Paralogs (Lila), des DEPC-modifizierten A-Paralogs (Hellgrün) und des DEPC und Ascorbat-modifizierten A-Paralogs.	xxviii
Abbildung 11.11: Röntgenbeugungsaufnahme eines Salzkristall.	xxix
Abbildung 11.12: Sequenzierung des Plasmids pBADA ₂ -A mit dem Oligonukleotid pBAD-1SeqFor.	xxx
Abbildung 11.13: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.	xxx
Abbildung 11.14: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B-K81E mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.	xxxi
Abbildung 11.15: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B-H46M mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.	xxxi
Abbildung 11.16: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B-H157Q mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.	xxxii

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Übersicht über die vier hochkonservierten Histidinreste und deren Häm- <i>b</i> -Koordination in verschiedenen CYBASC-Spezies.	11
Tabelle 3.2: Spezies mit CYBASC-Proteinen in verschiedenen Geweben (modifiziert nach Asard et al., 2001).	16
Tabelle 3.3: CYBASC-Gene/-Proteine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	17
Tabelle 3.4: Hergestellte Produktionskonstrukte für die Expressionssysteme <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> (Cenacchi, 2007).	20
Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Stämme.	24
Tabelle 4.2: Verwendete Nährmedien und Zusatzlösungen für <i>E. coli</i> (K12) Stämme.	24
Tabelle 4.3: Zusammenstellung der verwendeten Plasmide die Produktion der CYBASC-Proteine für das Expressionssystem <i>E. coli</i> K12.	24
Tabelle 4.4: Zusammenstellung der durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten Expressionsplasmide zur Produktion von ACy t ₅₆₁ -B-Varianten in <i>E. coli</i> C43 (DE3).	25
Tabelle 4.5: Verwendete Plasmide für die Herstellung neuer Plasmide für das Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i> .	25
Tabelle 4.6: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide zur Sequenzierung.	25
Tabelle 4.7: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide zur Generierung von Varianten durch ortsgerichtete Mutagenese.	26
Tabelle 4.8: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide zu Generierung von Vektorkonstrukte für das Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i> .	26
Tabelle 4.9: Puffer und Lösungen, die für die Reinigungen der Wildtyp-und Varianten verwendete wurden.	26
Tabelle 4.10: Puffer und Lösungen für die Elektrophoretische Methoden und Western-Blot.	27
Tabelle 4.11: Verwendete Proteine und Standards.	28
Tabelle 4.12: Verwendete molekularbiologische Kits und Kristallisationsassys.	28
Tabelle 4.13: Verwendete Säulen und <i>Batch</i> -Resin.	29
Tabelle 4.14: Verwendete Chemikalien.	29
Tabelle 4.15: Auflistung der verwendeten Redoxmediatoren, deren Lösungsmittel und deren E _M -Werte (gegen die Ag/AgCl-Elektrode).	31
Tabelle 4.16: Verwendete Detergenzien.	31
Tabelle 4.17: Verwendete Geräte.	32
Tabelle 4.18: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterial.	33
Tabelle 4.19: Verwendete Web-basierende Datenbanken, Programme und Server.	34
Tabelle 4.20: Verwendete Computer-Programme.	35
Tabelle 5.1: 50 µl Reaktionsansatz für die ortsgerichtete Mutagenese von pTTQC-B mit jeweils einem Oligodesoxynukleotide.	36

Tabelle 5.2: PCR-Protokoll (SDM I) der ortsgerichteten Mutagenese von pTTC-B mit jeweils einem Oligodesoxynukleotide.	37
Tabelle 5.3: PCR-Protokoll (SDM II) der ortsgerichteten Mutagenese von pTTC-B mit beiden Oligodesoxy-nukleotiden.	37
Tabelle 5.4: 50 µl Reaktionsansatz zur Amplifikation des Cytochrom b_{561} -A-DNA-Fragments inklusive Affinitäts-anhängsel aus den pBAD-Vektoren.	37
Tabelle 5.5: PCR-Protokoll zur Amplifikation des Cytochrom b_{561} -A-DNA-Fragments inklusive Affinitäts-anhängsel aus den pBAD-Vektoren.	37
Tabelle 5.6: 20 µl Ligationsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Insert zu Zielplasmid.	38
Tabelle 5.7: Reaktionsansatz für <i>whole-cell</i> -Analyse im 50 µl-Maßstab.	38
Tabelle 5.8: <i>whole-cell</i> -PCR-Protokoll zur Herstellung neuer pPIC3.5K-Derivate.	38
Tabelle 5.9: Auflistung der untersuchten Produktionsbedingungen im Expressionssystem <i>E. coli</i> .	41
Tabelle 5.11: Zusammenfassung der Arbeitsschritte bei Behandlung mit DEPC.	50
Tabelle 6.1: Auflistung der Molekulargewichte der CYBASC-Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen.	76
Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Reduktion von Fe^{3+} -EDTA und Fe^{3+} -Citrat durch die CYBASC-Paraloge.	78
Tabelle 6.3: Zusammenstellung der ermittelten Sekundärstrukturelemente durch die Programme Contin und K2D als gemittelte Werte (Wallace et al., 2003).	86
Tabelle 7.1: Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse zur Modifikation durch DEPC und DEPC und Ascorbat beider Paraloge.	106
Tabelle 7.2: Zusammenfassung zur Lokalisierung des Häms b_H und des Häms b_L .	111
Tabelle 11.1: Proteinsequenz-Homologie verschiedener CYBASC-Proteine.	xvii
Tabelle 11.2: Strukturvorhersage und Orientierung beider Paraloge durch den Server TMHMM (Krogh et al., 2001).	xviii
Tabelle 11.3: Zusammenstellung der ermittelten Sekundärstrukturelemente durch die Provencher & Glockner und K2D-Methode.	xxviii

1 ZUSAMMENFASSUNG

Cytochrom b_{561} -Proteine sind di- b -Häm-haltige Membranproteine, welche in Pflanzen, Vertebraten, Insekten und Pilzen vorkommen. Sie transferieren Elektronen von einem Elektronendonator über die Membran auf einen Elektronenakzeptor. Cytochrom b_{561} -Proteine, welche durch Ascorbat reduzierbar sind, werden in der CYBASC-Proteinfamilie (CYtochrome B ASCorbate reducible) zusammengefasst. Als Elektronenakzeptoren dienen sowohl Monodehydroascorbat (MDHA) als auch Fe^{3+} -Chelate. CYBASC-Proteine werden aus diesem Grund mit dem *Recycling* von Ascorbat und der Regulation des Eisen-Haushaltes in Verbindung gebracht. Der genaue Mechanismus auf atomarer Ebene ist jedoch nicht bekannt. Für dessen Aufklärung ist die Bestimmung der experimentellen dreidimensionalen CYBASC-Struktur vonnöten. Für die Ermittlung der dreidimensionalen Röntgenstruktur und der biochemischen Funktionsweise von CYBASC-Proteinen werden große Mengen reines Protein benötigt, welche mit Hilfe der heterologen Produktion und der Proteinreinigung mittels Affinitätsanhängsel bereitgestellt werden können.

In *Arabidopsis thaliana* konnten zwei offene Leseraster für putative CYBASC-Paraloge identifiziert werden: *artb561-a* (A-Paralog) und *artb561-b* (B-Paralog). Beide offene Leseraster wurden im Rahmen der Dissertation von Lucia Cenacchi (Heterologous Production and Characterization of Two Distinct Di-Heme Containing Membrane Integral Cytochrome b_{561} Enzymes from *Arabidopsis thaliana*. Cenacchi, L., 2007. Dissertation (Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main)) in Vektoren für das Expressionssystem *Escherichia coli* kloniert und heterolog produziert. Zur Erleichterung der Detektion und der Reinigung der CYBASC-Paraloge wurden diese mit verschiedenen Affinitätsanhängsel exprimiert. Die Reinigung erfolgte über eine immobilisierte Ni^{2+} -Affinitäts-Chromatographie (IMAC) im Einschnitt-Verfahren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die heterologe Produktion des A-Paralogs durch die Verwendung des Stammes Rosetta (DE3) und neue Produktionsbedingungen (0,2 % Arabinose, 5 Stunden Produktionsdauer, 37 °C) optimiert. Für den B-Paralog konnte nur eine minimale Verbesserung der heterologen Produktion durch Verwendung neuer Induktionsbedingungen (250 μM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, 3 Stunden Produktionsdauer, 33 °C) gewonnen werden. Für den B-Paralog konnte im Rahmen dieser Arbeit eine neue Solubilisierung durch Verwendung von 1 % Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) etabliert werden, so dass die Menge an solubilisierten Protein auf ~ 100 % erhöht wurde. Langzeit-Studien zeigten, dass der B-Paralog über 144 h stabil war. Die von L. Cenacchi (2007) etablierte Ni^{2+} -Affinitäts-Chromatographie (Ni^{2+} -IMAC) konnte durch die Verwendung eines neuen Elutionspuffers, basierend auf 500 mM Histidin und einem pH-Wert von 5,5 optimiert werden. Des Weiteren wurde eine Reinigung mit dem Streptavidin-Affinitätsanhängsel und einem Elutionspuffer bestehend aus 2,5 mM Desthiobiotin für den B-Paralog etabliert (Strep-

Reinigung). Durch die Erneuerungen der Produktions-, Solubilisierungs- und Reinigungsbedingungen konnten die Menge an gereinigtem CYBASC-Paralog von $\sim 0,042$ mg/L Zellkultur auf $\sim 0,3$ mg/L Zellkultur (Ni^{2+} -IMAC) sowie auf $\sim 0,27$ mg/L Zellkultur (Strep-Reinigung) erhöht werden.

Zur Bestimmung der Funktionalität des produzierten Materials wurde eine Reihe von Charakterisierungen vorgenommen. Die gereinigten CYBASC-Paraloge in 0,1 % Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO), sowie 0,01 % n-Dodecyl- β -Maltosid (β -LM) wurden mittels Größenausschlusschromatographie, thermodynamischer Ascorbat-abhängigen Reduktion und einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Aktivitätstest zur Bestimmung der kinetischen Umsatzrate charakterisiert. Beide Paraloge besaßen in 0,01 % β -LM die höchste kinetische Aktivität (A-Paralog 4,1 U/mg und B-Paralog 2,9 U/mg) und lagen sowohl als Dimer als auch als Monomer vor. Im Gegensatz dazu lagen beide Paraloge in 0,1 % LDAO nur als Dimer (A-Paralog) bzw. als Tetramer (B-Paralog) vor. Die spezifische Aktivität des A-Paralogs betrug hier 2,6 U/mg und die des B-Paralogs lag bei 1,6 U/mg. Neben der Reduzierbarkeit durch Ascorbat wurde auch die Oxidation durch Fe^{3+} -Citrat und Fe^{3+} -Ethyldinitrilotetraessigsäure (EDTA) untersucht. Für beide Paraloge in 0,01 % β -LM konnte thermodynamisch und kinetisch die Oxidationsrate bestimmt werden. Die spezifische Aktivität lag für den DEPC-modifizierte A-Paraloge bei 1,2 U/mg (Fe^{3+} -EDTA) sowie 0,05 U/mg (Fe^{3+} -Citrat) und für den B-Paralog bei 0,6 U/mg (Fe^{3+} -EDTA) sowie 0,1 U/mg (Fe^{3+} -Citrat). Die Bestimmungen der Häm-Mittelpunkts-Potentiale (E_M -Werte) ergaben ein Hoch-Potential-Häm (Häm b_H) und ein Niedrig-Potential-Häm (Häm b_L) identifiziert werden. Die E_M -Werte des A-Paralogs waren 36 mV (Häm b_L) und 187 mV (Häm b_H) sowie -22 mV (Häm b_L) und 85 mV (Häm b_H) für den B-Paralog.

Analog zu *Bcytb*₅₆₁-CG war die Ascorbat-abhängige Reduktion nach Inkubation mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) beider Paraloge thermodynamisch als auch kinetisch deutlich inhibiert. Redox-titrationen zeigten, dass die E_M -Werte des Häms b_L des A-Paralogs sowie die E_M -Werte des Häms b_L und b_H des B-Paralogs deutlich vermindert waren. Eine Inkubation mit DEPC und Ascorbat ergab gleichartige E_M -Werte in Bezug auf die E_M -Werte der unmodifizierten Paraloge. Die Ascorbat-abhängige Reduktion war weiterhin inhibiert. Die Bestimmungen der E_M -Werte erlauben den Schluss, dass die Ascorbat-Bindestelle in nächster Nähe zum Häm b_L liegt. Bei Inkubation mit DEPC und Ascorbat erfahren die Häm b_L -koordinierenden Histidinreste einen Schutz durch Ascorbat, so dass eine DEPC-Modifikation unterbunden wird. Die verminderte Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit jedoch lässt sich nur durch eine weitere DEPC-Modifikation erklären. Für *Bcytb*₅₆₁-CG und *Zmb*₅₆₁ wurde gezeigt, dass ein konservierter Lysinrest (A-Paralog K80, B-Paralog K81), welches in direkter Nähe zum Häm b_L lokalisiert und in die initiale Bindung von Ascorbat involviert ist, auch durch DEPC modifiziert wird. Aus diesem Grund wurde mittels ortsgerechter Mutagenese die B-Paralog-Variante Lysin 81 \rightarrow Glutamat (B-K81E) hergestellt. Die spezifische Aktivität der Variante lag bei

0,2 U/mg, was im Gegensatz zum Wildtyp (2,9 U/mg) deutlich verringert war. Redox titrationen zeigten einen deutlich verminderten E_M -Wert des Häms b_L , welcher als ein weiteres Indiz für die Lokalisation von Häm b_L in der Nähe des Ascorbat-Bindemotivs zu deuten ist. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das Lysin an Position 81 essentiell für die Funktionalität des B-Paralogs ist. Des Weiteren wurden zwei weitere Varianten des B-Paralogs untersucht. Es wurde das zusätzliche Histidin an Position 46 zu einem Methionin (B-H46M) ausgetauscht. Die Variante B-H46M besaß eine spezifische Aktivität von 3,2 U/mg und beide E_M -Werte waren mit 34 mV (Häm b_L) und 160 mV (Häm b_H) deutlich erhöht. Bei der untersuchten B-Paralog Variante B-H157Q wurde das Häm-kordinierende Histidin an Position 157 durch ein Glutamin ersetzt. Dieser Austausch resultierte in dem Verlust einer Häm-Gruppe, jedoch nicht im Verlust der spezifischen Aktivität. Die spezifische Aktivität lag mit 2,6 U/mg im Bereich des Wildtyps. Der E_M -Wert war 29 mV. Mit dem hier etablierten Aktivitätstest konnte für beide Histidin-Varianten keine Auswirkung auf die Funktionalität gemessen werden. Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass der Aktivitätstest mit gereinigtem Protein in einer Detergenz-Mizelle durchgeführt wurde. Eine Änderung der Aktivität könnte in einem zukünftigen Test, bei welchem das Protein in Proteoliposomen vorliegt, gemessen werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigten Optimierungen der heterologen Produktion beider CYBASC-Paralogs und die optimierte Solubilisierung und Reinigung des B-Paralogs sind die Basis für die Ermittlung einer experimentellen dreidimensionalen Kristallstruktur. Des Weiteren wurden für den B-Paralog erstmals Varianten produziert und initial charakterisiert, um Prozesse innerhalb des Proteins zu untersuchen und einzelnen Aminosäuren spezifische Funktionalitäten zuzuordnen.

2 SUMMARY: OPTIMIZATION OF THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HETEROLOGOUSLY PRODUCED CYBASC-PROTEINS FROM *ARABIDOPSIS THALIANA*

Cytochrome *b*₅₆₁-proteins are di-*b*-heme containing membrane proteins, which were found in plants, vertebrates, insects and fungi, and support transmembrane electron transfer. Cytochrome *b*₅₆₁-proteins which use ascorbate as an electron donor are also named CYBASC-proteins (CYtochrome BASCorbate reducible). The electron acceptors are monodehydroascorbate or iron chelates. Therefore, CYBASC-proteins are expected to be involved in ascorbate recycling and / or the facilitation of iron absorption. In order to understand the mechanism of this biologically important process at an atomic level, an atomic model of the three-dimensional structure is a prerequisite. To determine the three-dimensional structure via X-ray crystallography and to perform biochemical characterisation of CYBASC proteins, mg amounts of pure protein are required. This can be achieved by the aid of heterologous protein production and purification via affinity tags, large amount of pure protein can be provided.

In *Arabidopsis thaliana* two open reading frames for CYBASC-paralogs were identified: *artb561-a* (A-paralog) and *artb561-b* (B-paralog). In a previous doctoral dissertation (Heterologous Production and Characterization of Two Distinct Di-Heme Containing Membrane Integral Cytochrome *b*₅₆₁ Enzymes from *Arabidopsis thaliana*. Cenacchi, L., 2007. Dissertation (Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main)), both open reading frames were cloned in expression vectors and produced heterologously in *E. coli*. To facilitate the detection and purification of both paralog, constructs with different affinity-tags were expressed. Protein purification was performed by a single-step-Ni²⁺-immobilized-affinity-chromatography (Ni²⁺-IMAC) step. In the present work the heterologous production of the A-paralog was increased by using the *E. coli* strain Rosetta (DE3) and new production conditions (0.2 % arabinose, 5 h induction time and 37 °C). The production rate of the B-paralog was changed by using new conditions (250 µM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 3 h induction time and 33 °C). A new solubilisation strategy was established for the B-paralog. The amount of solubilized protein was increased by using 1 % Lauryldimethylamine-oxide (LDAO) as detergent. Long term stability tests showed that both paralogs were stable for more than over 144 h. The established purification procedure (single-step-Ni²⁺-immobilized-affinity-chromatography) was optimized using a new elution buffer containing 500 mM histidine and a pH of 5.5. Furthermore, a new Streptavidin affinity tag-purification (Strep) was established with an elution buffer containing 2.5 mM desthiobiotin. As a result of the new production, solubilisation and purification conditions the amount of purified CYBASC-paralog was increased

from ~ 0.042 mg/ 1L cell culture to ~ 0.3 mg/ 1L cell culture (Ni²⁺-IMAC) as well as ~ 0.27 mg/ 1 L cell culture (Strep), respectively.

For determining the functionality of the produced material, a series of characterizations were performed. Size exclusion chromatography (SEC), thermodynamic ascorbate-dependent reduction and an activity test were established and performed with the purified paralogs incubated in two different detergents (0.01 % Lauryl- β -D -maltoside (β -LM) and 0.1 % Lauryldimethylamine-oxide (LDAO)). The use of the detergent β -LM resulted in highest determined activities of both paralogs (4.1 U/mg for the A-paralog and 2.9 U/mg for the B-paralog, respectively). SEC experiments showed that both paralogs existed as monomer and dimer in 0.01 % β -LM. By using the detergent LDAO the A-paralog existed as a dimer and the B-paralog as a tetramer. Here, the specific activities were reduced to 2.6 U/mg for the A-paralog and to 1.6 U/mg for the B-paralog, respectively. In addition to the ascorbate-dependent-reduction, the oxidation of both CYBASC-paralogs by Fe³⁺-chelates was examined by calculating the oxidation rate. The specific activity of the DEPC-treated A-paralog was 1.2 U/mg (Fe³⁺-EDTA) as well as 0.05 U/mg (Fe³⁺-citrate). For the B-paralog the specific activities were 0.6 U/mg (Fe³⁺-EDTA) and 0.1 U/mg (Fe³⁺-citrate). Redox titrations were performed to determinate haem midpoint oxidation / reduction potentials (E_M -values). The redox titration curves indicated the presence of two titratable haem centres: a high-potential-haem (b_H) and a low-potential-haem (b_L). The respective b_L and b_H E_M -values were 36 mV and 180 mV (for the A-paralog) and -22 mV and 85 mV (for the B-paralog).

Analog to CYABSC-protein from bovine, the ascorbate-dependent reduction of both DEPC-treated paralogs were analysed. A significant inhibition in ascorbate-dependent reduction after incubation with DEPC was detected. The E_M -values were lowered for the haem b_L of the A-paralog and for the haem b_L and the haem b_H of the B-paralog. In contrast, the E_M -values of the samples treated with DEPC plus ascorbate were identical to those of the unmodified samples. Nevertheless the ascorbate-dependent reduction was inhibited. These results indicated the ascorbate-binding site to be next to haem b_L . During the incubation with DEPC and ascorbate, the histidine residues, which are involved in the haem b_L coordination, are protected by ascorbate. The significant inhibition of ascorbate-dependent reduction in the absence of any effect on haem E_M -values has to be a result of an additional mechanism of inhibition. As it has been shown for elsewhere other CYBASC-proteins that DEPC treatment modified also a conserved lysine which is located next to the haem b_L and should be involved in ascorbate recognition and / or electron transfer across the membrane, examinations on the corresponding lysine residue in the B-paralog were performed. The variant B-K81E was constructed using site directed mutagenesis. This variant has a glutamate residue instead of a lysine at position 81 in the B-paralog. Compared to the wild type, the specific activity of this variant was only approximately 7 % and the E_M -value of haem b_L was lowered. These results suggested that the lysine

at position 81 is essential for the functionality of the B-paralog. In this work, two more variants of the B-paralogs were examined. The additional histidine residue at position 46 was exchanged to a methionine (B-H46M). The variant B-H46M displayed a specific activity comparable to the wild type and both E_M -values were increased to 34 mV (haem b_L) and 160 mV (haem b_H). Examinations of the B-paralog variant B-H157Q (the heme-coordinating histidine at position 157 was replaced by a glutamine) revealed the loss of a haem group. The E_M -value of the remaining haem group was + 29 mV. The specific activity as measured with the current assay was determined in the range of the wild type. For both histidine variants, a loss of functionality could not be measured by the new established activity test. However, the purified protein was in the detergent-solubilized state, i. e. using a more physiological assay, for example with the protein reconstituted into proteoliposomes it is expected that a change in the functionality would be detected in the future.

The present work describes improvements in the heterologous production of both paralogs and solubilisation and purification of the B-paralog which are the basis for determining three-dimensional structure. Furthermore, this is the first characterization of B-paralog-variants for studying processes within the protein and for assuming special functions to individual amino acids.

3 EINLEITUNG

3.1 Der Elektronentransfer über die eukaryotische Membran

Eukaryotische Zellen sind in membranumschlossene Kompartimente unterteilt. Die wichtigsten Kompartimente der Zelle sind der Zellkern, das Cytosol, das endoplasmatische Retikulum, die Chloroplasten und die Mitochondrien. Jedes Kompartiment besitzt einen eigenen Satz an Proteinen und ist somit auf verschiedene Stoffwechselreaktionen spezialisiert. Dadurch können in einer eukaryotischen Zelle unterschiedliche Prozesse gleichzeitig ablaufen (Alberts et al., 2011). Bis Anfang der 1970er Jahre ging man davon aus, dass membrandurchspannende Übertragung von Elektronen nur über die Membran der Mitochondrien und Chloroplasten stattfindet. Doch auch über die Plasma- sowie über die Tonoplastmembran findet über Redoxsysteme ein Elektronentransfer statt, der vor allem in der Immunantwort, Nährstoffaufnahme, zellulären Energieweitergabe und dem Zellwachstum eine wichtige Rolle spielt (Morre et al., 1998, Asard et al., 1989, Griesen et al., 2004). Das Protein Cytochrom b_{561} (Cyt b_{561}) transferiert Elektronen über die Plasma- sowie Tonoplastmembran und benötigt dabei häufig Ascorbat als Elektronendonator.

3.2 L-Ascorbat - ein wichtiges Antioxidans in tierischen und pflanzlichen Organismen

L-Ascorbat (Asc) oder auch Vitamin C ist eines der wichtigsten wasserlöslichen Antioxidantien in eukaryotischen Zellen (Arrigoni & De Tullio, 2002). Ascorbat ist in die Verminderung von oxidativem Stress involviert. Des Weiteren ist Ascorbat ein essentieller Kofaktor für viele Oxygenasen und andere Proteine (Arrigoni & De Tullio, 2002), da es katalytische Zentren mit Metallionen im reduzierten Zustand hält. Ascorbat besitzt einen pK_a von 4,13, ist sehr licht- und temperaturempfindlich und wird in wässriger Lösung schnell zu Monodehydroascorbat (MDHA) oxidiert. In Abwesenheit von Sauerstoff bleibt gelöstes Ascorbat jedoch stabil. Aus diesem Grund kann Ascorbat im gelösten Zustand sowohl Elektronen aufnehmen (Ascorbat), als auch abgeben (MDHA) (siehe Abbildung 3.1).

Ascorbat kommt in Pflanzengewebe in Konzentrationen von 20 mM bis 50 mM vor und fungiert als Fänger für reaktive Sauerstoff-Spezies, welche zum Beispiel bei der Photosynthese produziert werden (Noctor & Foyer, 1998). In tierischen Zellen liegt die Funktion von Ascorbat als Reduktionsäquivalent vor allem in der Collagen-Synthese, der Immunabwehr durch Leukozyten sowie der Synthese von Neurotransmittern wie Adrenalin und Noradrenalin (Davey et al., 2000).

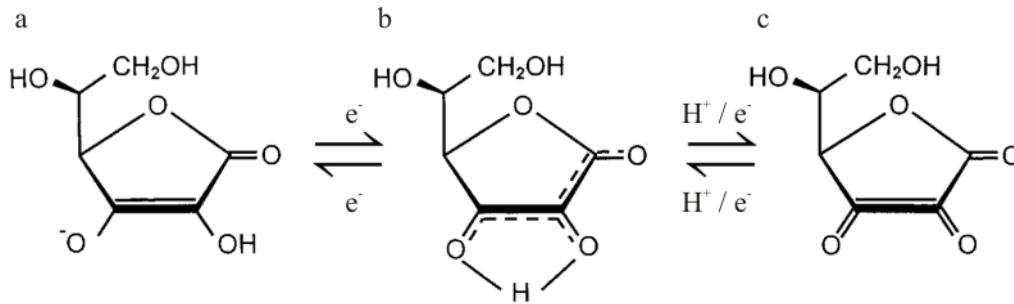


Abbildung 3.1: Oxidation von Ascorbat in wässriger Lösung.

a) Ascorbat, voll reduziert; b) Monodehydroascorbat (MDHA), teilweise reduziert; c) Dehydroascorbat (DHA), oxidiert (modifiziert nach Davey et al., 2000)

3.3 Das Element Eisen

Eisen ist ein Kofaktor für viele Proteine in Form von Häm-Gruppen oder Eisen-Schwefel-Clustern. Als Kofaktor vorliegendes Eisen ist essentiell für den Sauerstofftransport und die Sauerstoffspeicherung sowie für die Elektronenübertragung in vielen Spezies (Beard, 2001). Unter physiologischen Bedingungen und in der Gegenwart von Sauerstoff liegt Eisen oxidiert vor und kann nicht von Zellen über die Membran aufgenommen werden. Spezielle membranständige Eisenchelat-Reduktasen, welche intrazelluläre Reduktionsmittel benötigen, können Eisen reduzieren, so dass dieses über die Membran transportiert werden kann (McKie et al., 2001, Hentze et al., 2004).

3.4 CYBASC-Proteinfamilie: Funktion und Strukturvorhersage

Zu Beginn der 1970er Jahre wurde das erste Cytochrom b_{561} -Protein (BCy***t*** b_{561} -CG) aus der Vesikel-Membran chromaffiner Zellen der Nebenniere des Rindes identifiziert (Flatmark & Terland, 1971, siehe Abschnitt 3.4.1).

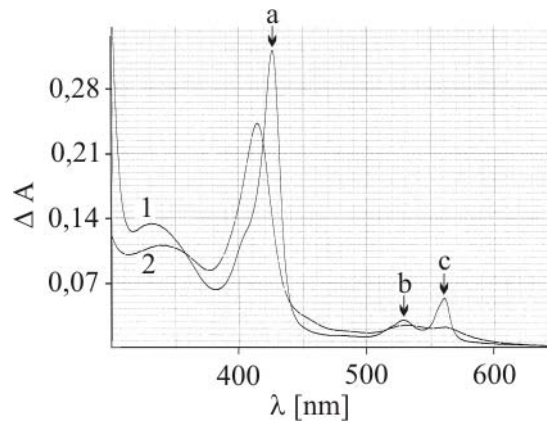


Abbildung 3.2: Absorptionsspektrum des BCy***t*** b_{561} -CG aus *Bos taurus*.

(1) Kaliumhexacyanoferrat (III)-oxidiertes BCy***t*** b_{561} -CG, (2) Ascorbat-reduziertes BCy***t*** b_{561} -CG mit der Soret-Bande bei 429 nm (a), der β -Bande bei 530 nm (b) und einer asymmetrischen α -Bande bei 561 nm (c) (modifiziert nach Okuyama et. al., 1998).

Aufgrund des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 561nm in Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren durch Kaliumhexacyanoferrat (III) und Ascorbat sowie Na-Dithionit erhielt dieses Protein seinen Namen: Cytochrom b_{561} (Flatmark & Gronberg, 1981, Flatmark & Terland, 1971, siehe Abbildung 3.2).

Auf Basis der Proteinsequenz von BCy***t*** b_{561} -CG konnten Cytochrom b_{561} -Proteine in fast allen eukaryotischen Organismen identifiziert werden (Verelst & Asard, 2003, Asard et al., 2001, Tsubaki et al., 2005). Diese wurden in einem phylogenetischen Stammbaum mit sieben Untergruppen (A bis G) zusammengefasst (siehe Abbildung 3.3).

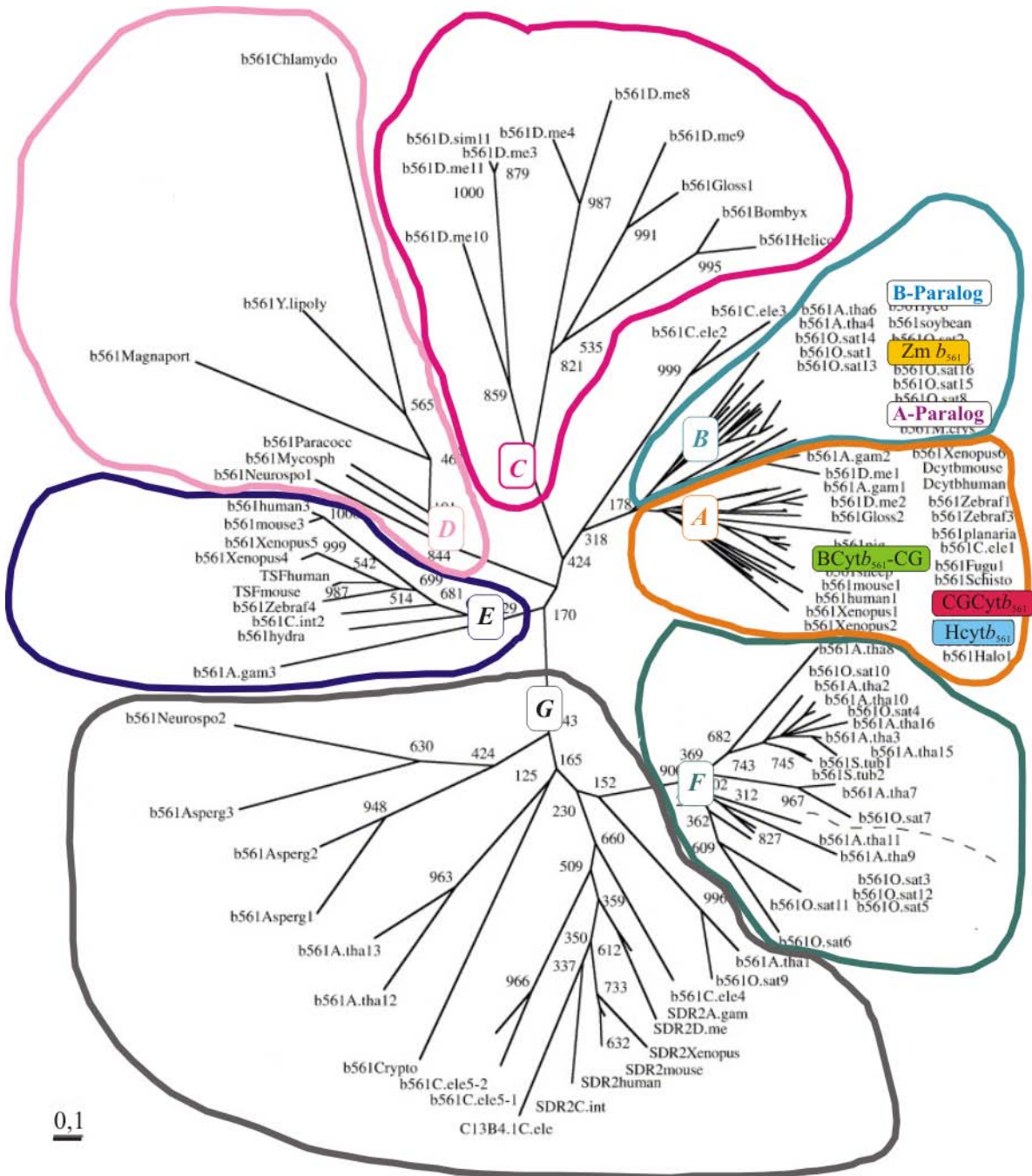


Abbildung 3.3: Phylogenetischer Stammbaum der Cytochrom b_{561} -Proteinen aus verschiedenen Spezies (modifiziert nach Tsubaki et al., 2005).

Basierend auf Sequenzhomologien wurde die Cytochrom b_{561} -Familie in 7 Gruppen (A-G) eingeteilt. A: $Cytb_{561}$ -Proteine aus Vertebraten; B: $Cytb_{561}$ -Proteine aus Pflanzen; C: $Cytb_{561}$ -Proteine aus Insekten; D: $Cytnb_{561}$ -Proteine aus Pilzen; E: hypothetische $Cytb_{561}$ -Proteine mit Homologien zum tierischen Tumor-Suppressor-Faktor (TSF); F: hypothetische $Cytb_{561}$ -Proteine mit einer hochkonservierten putativen, regulatorischen Untereinheit der Dopamin β -Hydroxylase (DoH); G: hypothetische $Cytb_{561}$ -Proteine mit einer weniger hochkonservierten DoH Untereinheit. Hervorgehoben sind die in dieser Arbeit charakterisierten CYBASC-Proteine aus *A. thaliana* (A- und B-Paralog), sowie ausgewählte CYBASC-Proteine: $Zm b_{561}$ aus *Zea mays* (gelbe Box), $BCytb_{561}$ -CG aus *Bos taurus* (grüne Box), $CGCytb_{561}$ aus *Mus musculus* (rote Box) und $Hcytb_{561}$ aus *Homo sapiens* (blaue Box).

In Gruppe A sind Cytochrom b_{561} -Proteine aus Vertebraten zusammengefasst. Zusammen mit den Cytochrom b_{561} -Proteinen aus höheren Pflanzen (Gruppe B) zeigen sie die größte Sequenzhomologie untereinander (siehe Anhang, Tabelle 11.1). Gruppe C fasst die Cytochrom b_{561} -Proteine aus Insekten zusammen. In Pilzen lokalisierte Cytochrom b_{561} -Proteine werden in Gruppe D eingeordnet. Cytochrom b_{561} -Proteine, welche homologe Bereiche zum tierischen Tumor-Suppressor-Faktor (TSF) aufweisen, sind in Gruppe E eingeordnet. Wenig konservierte Bereiche, dafür aber eine zusätzliche putative, regulatorische Einheit der Dopamin β -Hydroxylase (DoH-Domäne) (Ponting, 2001) zeigen die Cytochrom b_{561} -Proteine aus den Gruppen F und G.

Cytochrom b_{561} -Proteine aus Vertebraten und Pflanzen, welche durch Ascorbat reduzierbar sind, werden in der CYBASC-Proteinfamilie (CYtochrome B ASCorbate reducible) zusammengefasst (Vargas et al., 2003, McKie et al., 2001, Ponting, 2001, Tsubaki et al., 2005). CYBASC-Proteine beider Gruppen besitzen konservierte Struktur motive: Jedes CYBASC-Protein besteht aus 6 membrandurchspannenden Helices. Dabei bilden Helices 2 bis 5 eine konservierte Kern-Domäne. Helices 1 und 6 hingegen sind weniger hoch konserviert (Bashtovyy et al., 2003). In der Kern-Domäne befinden sich 4 konservierte Histidinreste, welche an der Koordination zweier Häm b -Gruppen beteiligt sind (Bashtovyy et al., 2003) (siehe Abbildung 3.4 und Tabelle 3.1). Im Gegensatz zu anderen Häm- b -Motiven, bei denen die Koordination von 2 Häm b -Gruppen durch 4 Histidinreste, lokalisiert auf 2 membrandurchspannenden Helices (2-Helix-Motiv), besteht (Finegold et al., 1996, Poulos, 2005), erfolgt die Koordination der b -Typ-Häme der CYBASC-Proteine über je 4 Histidinreste, die jeweils auf 4 verschiedenen membrandurchspannenden Helices (4-Helix-Motiv) liegen (Degli Esposti et al., 1989, Lancaster, 2003a, Xia et al., 1997, siehe Tabelle 3.1). Ein solches 4-Helix-Motiv wurde in der Kristallstruktur der C-Untereinheit der QFR aus *Wolinella succinogenes* gefunden (Lancaster, 2003b). Vergleiche der Proteinsequenzen der C-Untereinheit der QFR mit dem A- und B-Paralog zeigten, dass die Sequenzen zu verschieden sind, um eine Vorhersage über die CYBASC-Strukturen treffen zu können.

Tabelle 3.1: Übersicht über die vier hochkonservierten Histidinreste und deren Häm- b -Koordination in verschiedenen CYBASC-Spezies.

CYBASC-Protein	Spezies	Häm b		Häm b	
		(MDHA-Motiv)		(Ascorbat-Motiv)	
A-Paralog	<i>A. thaliana</i>	H50	H117	H83	H156
B-Paralog	<i>A. thaliana</i>	H51	H118	H84	H157
<i>Zmb₅₆₁</i>	<i>Zea mays</i>	H52	H120	H86	H159
<i>BCytb₅₆₁-CG</i>	<i>Bos taurus</i>	H54	H122	H88	H161
<i>CGCytb₅₆₁</i>	<i>Mus musculus</i>	H52	H120	H86	H159
membrandurchspannende Helices		2	4	3	5

H: Histidin; A- und B-Paralog: in dieser Arbeit charakterisierten CYBASC-Proteine aus *A. thaliana*.

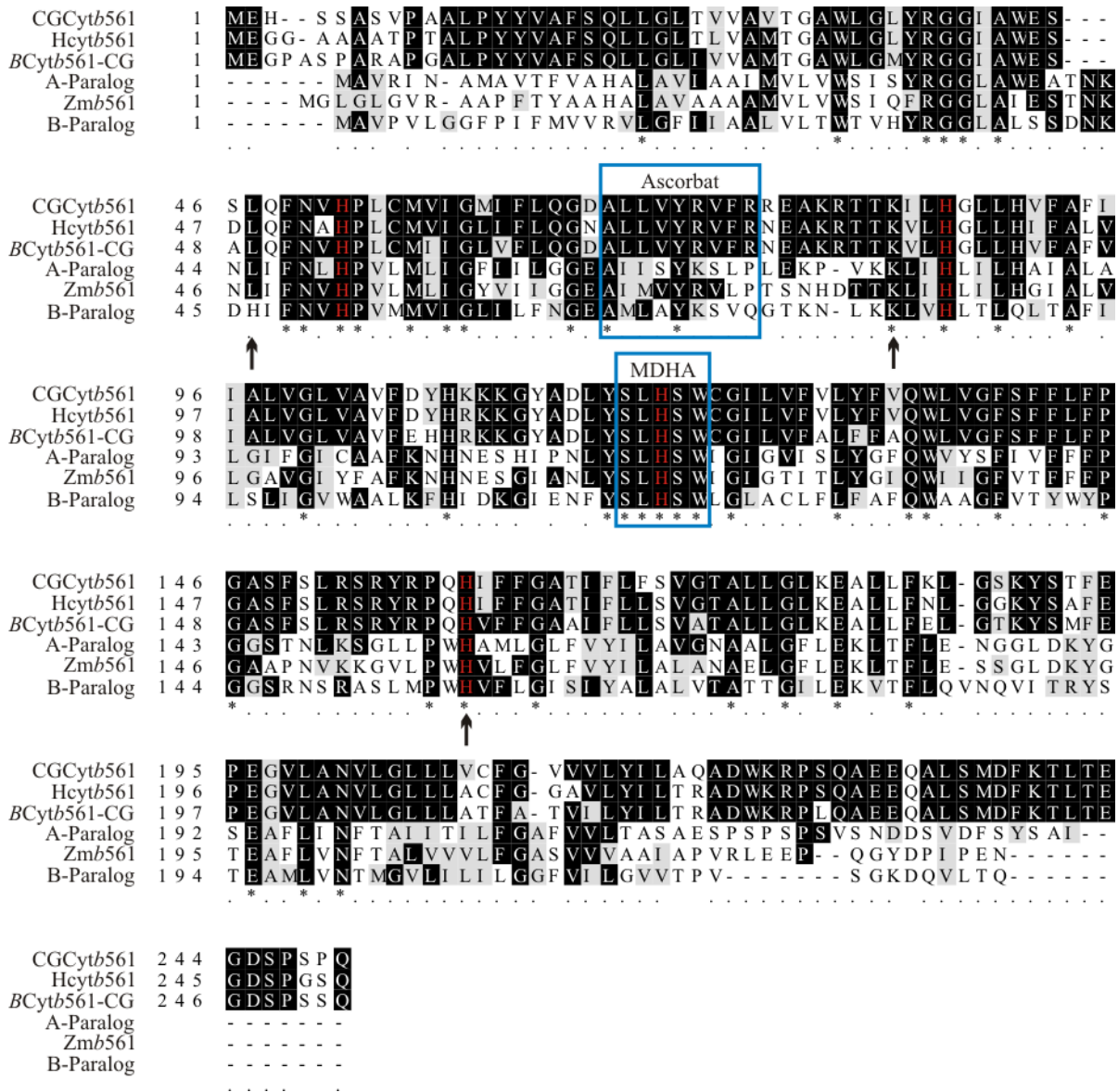


Abbildung 3.4: Protein-Sequenzvergleich 6 verschiedener CYBASC-Proteine.

CGCytb₅₆₁: CYBASC-Protein aus *Mus musculus*, welches in chromaffinen Vesikeln (CG) lokalisiert ist; Hcytb₅₆₁: CYBASC-Protein aus *Homo sapiens*, welches in chromaffinen Vesikeln lokalisiert ist; BCytb₅₆₁-CG: CYBASC-Protein aus *Bos taurus*, welches in chromaffinen Vesikeln (CG) lokalisiert ist; A-Paralog: CYBASC-Protein aus *Arabidopsis thaliana*; Zmb₅₆₁: CYBASC-Protein aus *Zea mays*; B-Paralog: CYBASC-Protein aus *A. thaliana*. *, schwarz hinterlegt: konservierte Aminosäure in allen Sequenzen; ., grau hinterlegt: biochemische Eigenschaft der Aminosäuren ist konserviert, Rot-markierte Histidinreste (H): involviert in die Häm *b*-Koordination; blauer Rahmen: Bindemotive für Ascorbat sowie MDHA. Die Analyse wurde mit dem Programm ClustalW (siehe Tabelle 4.19) durchgeführt und mit BOXSHADE 3.21 (siehe Tabelle 4.19) formatiert.

Neben den strukturellen Motiven wurden auch zwei funktionale Motive gefunden (Tsubaki et al., 2005): Als putatives MDHA-Bindemotiv wird die Aminosäuresequenz S L H S W definiert (siehe Abbildung 3.4). Diese Abfolge ist hochkonserviert und wird sogar in Cytochrom *b*₅₆₁-Proteinen aus der Gruppe E gefunden (Bashtovyy et al., 2003, Okuyama et al., 1998, Tsubaki et al., 2005). Ein weiteres funktionales

Motiv ist die Aminosäuresequenz A u u x Y z x x x, wobei u eine kleine, hydrophobe Aminosäure, z eine positiv geladene Aminosäure und x eine beliebige Aminosäure darstellt (Asard et al., 2001). In Tieren ist das Motiv A L L V Y R V F R konserviert. Die Funktion dieses Motivs liegt hier in der Bindung von Ascorbat (Tsubaki et al., 2005). Beide Bindemotive befinden sich in strukturell nächster Umgebung zu einer Häm-*b*-Gruppe und liegen auf verschiedenen Membranseiten (Bashtovyy et al., 2003, Okuyama et al., 1998). Daraus folgt, dass Elektronen vom Ascorbat-Bindemotiv über die Membran zum MDHA-Bindemotiv transferiert werden (siehe Abbildung 3.5).

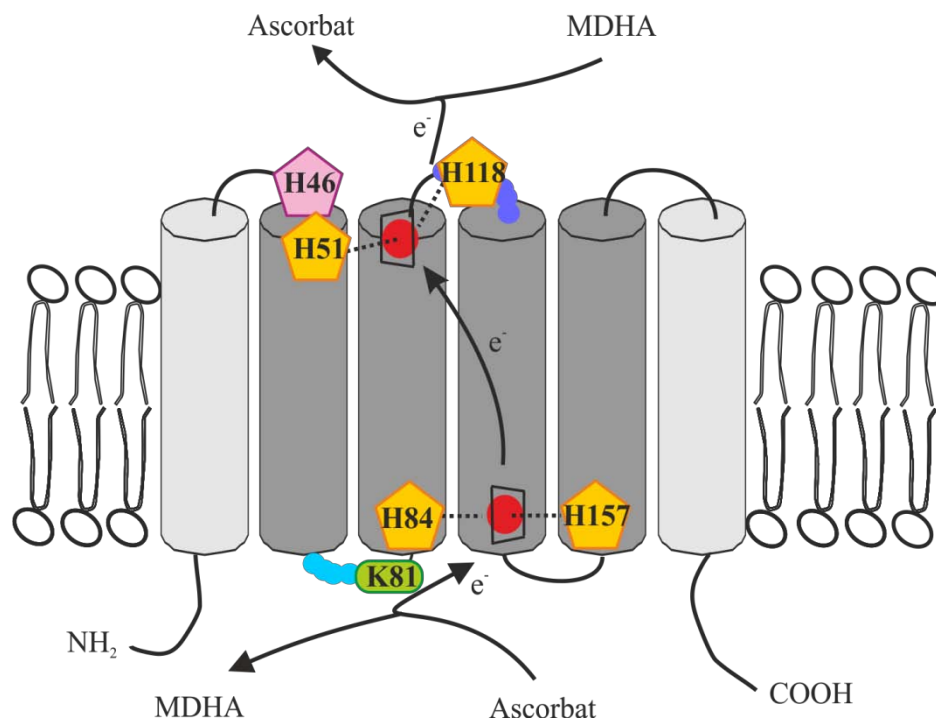


Abbildung 3.5: Topologie-Modell des B-Paralogs aus *A. thaliana* mit funktionellen Aminosäuren in Homologie zum Modell für BCytb₅₆₁-CG (Okuyama et al., 1998).

Dargestellt sind die 6 membrandurchspannenden Helices (Röhren), die Bindemotive für Ascorbat (Türkis) und MDHA (Blau): Die Histidinreste 51 und 118, sowie 84 und 157 (Orange) koordinieren zwei Häm *b*-Zentren (rote Kugeln). Des Weiteren sind das zusätzliche Histidin an Position 46 (Rosa) und das Lysin an Position 81 (Grün) dargestellt. Die hellgrauen Röhren stehen für die weniger hoch konservierten Helices und die dunkelgrauen Röhren für die hoch konservierten Helices.

3.4.1 Model-Cytochrom b_{561} : $BCytb_{561}$ -CG aus *Bos taurus*

Das bekannteste CYBASC-Mitglied ist das Cytochrom b_{561} aus der Nebenniere des Rindes ($BCytb_{561}$ -CG, Flatmark & Terland, 1971, Apps et al., 1980, Hollenbeck et al., 1975, Perin et al., 1988, Tsubaki et al., 2000, Takeuchi et al., 2005). Lokalisiert ist dieses Protein in der Vesikel-Membran chromaffiner Zellen der Nebenniere. Diese Vesikel sind spezialisiert auf die Synthese von Noradrenalin und Adrenalin. Die Reaktion des letzten Produktionsschrittes von Noradrenalin wird von dem Protein Monoxygenase-Dopamin- β -Hydroxylase katalysiert, welches Ascorbat als Elektronendonator benötigt (siehe Abbildung 3.6). Allerdings kann weder Ascorbat noch MDHA, durch die Vesikel-Membran diffundieren und für chromaffine Vesikel konnte gezeigt werden, dass kein Transport von Ascorbat über die Vesikel-Membran stattfindet (Njus et al., 1987). Mit dem vorgeschlagenen Ascorbat-Recycling-Mechanismus kann diese Diskrepanz behoben werden: Elektronen von cytosolischem Ascorbat (Elektronendonator) werden durch $BCytb_{561}$ -CG über die Membran auf intravesikuläres MDHA (Elektronenakzeptor) transferiert. Das MDHA-Radikal in den chromaffinen Vesikeln reagiert zu Ascorbat, welches für die Noradrenalin- und Adrenalin-Synthese nun wieder genutzt werden kann. Das entstandene cytosolische MDHA wird von einer NADH-abhängigen Cytochrom b_5 -Reduktase zu Ascorbat reduziert (Shirabe et al., 1995).

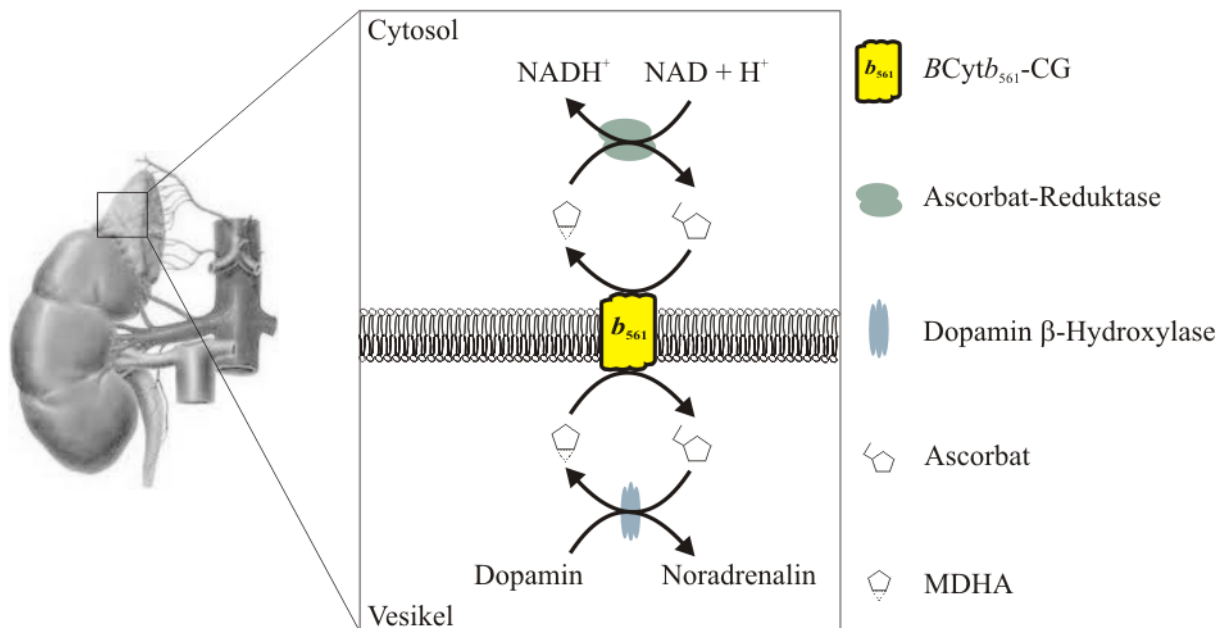


Abbildung 3.6: Funktion von $BCytb_{561}$ -CG in chromaffinen Zellen der Nebenniere.

Durch $BCytb_{561}$ -CG ist die Reduktion von intravesikulärem Monodehydroascorbat (MDHA) an die gleichzeitige Oxidation cytosolischem Ascorbats gekoppelt. Die Bereitstellung von vesikulärem Ascorbat für die Synthese von Noradrenalin durch die Ascorbat-abhängige Dopamin β -Hydroxylase ist gewährleistet.

Die Existenz von 2 Häm- b -Gruppen in $BCytb_{561}$ -CG konnte durch Redox-Häm-Titrationen (Apps et al., 1984) und EPR-Spektroskopie (Tsubaki et al., 1997) nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass es

sich dabei um ein Hoch-Potential-Häm mit einem E_M -Wert von +170 mV und um ein Niedrig-Potential-Häm (b_L) mit +60 mV als E_M -Wert handelt. Die Koordination des Häms b_L erfolgt dabei über die Histidinreste 54 und 122 und die des Häms b_H über die Histidinreste 88 und 161. Mittels ortsgerichteter Mutagenese und EPR-Spektroskopie zeigte die Gruppe um Liu, dass das Ascorbat-Bindemotiv in der Nähe des Häms b_H und das MDHA-Bindemotiv in der Nähe des Häms b_L lokalisiert ist (Hypothese 1, Liu et al., 2011, Liu et al., 2008, Kamensky et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten Versuche mit $BCytb_{561}$ -CG und Diethylpyrocarbonat (DEPC) jedoch, dass das Ascorbat-Bindemotiv in der Nähe des Häms b_L liegt (Hypothese 2). DEPC bindet kovalent an deprotonierte Stickstoff-Atome im Imidazol-Ring von Histidin-, Lysin- oder Tyrosinresten (siehe Abbildung 3.7, Miles, 1977).

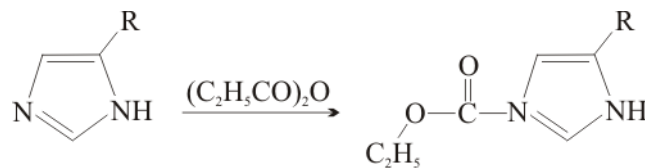


Abbildung 3.7: Kovalente DEPC-Modifikation am Beispiel eines Histidinrestes (Nakanishi et al., 2009a).

DEPC bindet am das deprotonierte Stickstoff-Atom im Imidazol-Ring des Histidins

Mit Redox-Titrationen DEPC-modifizierten $BCytb_{561}$ -CG konnte gezeigt werden, dass es nur zu einer Verringerung im E_M -Wert des Häms b_L kam (- 30mV; Kontrolle + 60 mV). (Takeuchi et al., 2001). Zudem war der Elektronentransfer zwischen dem DEPC-modifizierten $BCytb_{561}$ -CG und Ascorbat deutlich inhibiert (Kipp et al., 2001, Takigami et al., 2003, Tsubaki et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation mit DEPC und Ascorbat der E_M -Wert des Häms b_L unverändert zur unmodifizierten Probe war (Takeuchi et al., 2001). Studien mit 4,4'-Dithiodoipyridin (4-PDS), welches über Schwefelbrücken an Cysteinreste bindet (Grassett & Murray, 1967), zeigten, dass das MDHA-Bindemotiv in der Nähe der Histidinreste 54 und 122 liegt. In $BCytb_{561}$ -CG gibt es zwei Cysteinreste (57 und 125). Durch die Modifikation jeweils eines der beiden Cysteinreste konnte gezeigt werden, dass der Elektronentransfer zwischen $BCytb_{561}$ -CG und MDHA gestört war, nicht jedoch die Elektronenübertragung von Ascorbat zu $BCytb_{561}$ -CG-Protein (Takeuchi et al., 2005).

3.4.2 Cytochrom b_{561} -Proteine aus *Homo sapiens* und *Mus musculus*

Menschliches Cytochrom b_{561} ($HCytb_{561}$) konnte durch Northern-Blot-Analysen in Hirn-, Plazenta-, Lungen- und Pankreasgewebe in hohem Maße sowie in Leber- und Herzgewebe in geringem Maße nachgewiesen werden (Srivastava et al., 1994). Die Funktion von $HCytb_{561}$ liegt auch hier in der Regeneration und Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für Monoxygenasen in neuroendokrinem

Gewebe (Srivastava et al., 1994). Weitere Cytochrom b_{561} -Proteine wurden in der Schleimhaut des Duodenums von Menschen und Mäusen identifiziert. Die Lokalisation wurde durch Antikörperfärbung des Darmgewebes nachgewiesen (McKie et al., 2001). Allerdings sind diese DCy***b***₅₆₁-Proteine (Duodenal) nicht in das Ascorbat-*Recycling* involviert, sondern in die Regulation der Eisenaufnahme (McKie et al., 2001, Su & Asard, 2006): Eisen liegt in der Anwesenheit von Sauerstoff als wasserunlösliches Fe³⁺-Ion vor. Jedoch existiert in Menschen und Mäusen kein Fe³⁺ Transporter im Darm (McKie et al., 2001). So wird angenommen, dass DCy***b***₅₆₁-Proteine als Fe³⁺-Reduktasen fungieren (McKie et al., 2001, Su & Asard, 2006). Das reduzierte Fe²⁺ kann von den Kationentransportern Nramp2 (Gruenheid et al., 1995, Fleming et al., 1997) und DMT1 (Gunshin et al., 1997) über die Membran transportiert werden. Des Weiteren wurde die Fe³⁺-Reduktase-Aktivität von heterolog produzierten Cytochrom b_{561} -Proteinen in einem $\Delta fre1 \Delta fre2$ *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm nachgewiesen. Dieser Deletionsstamm zeigt nur eine minimale Ferrereduktase-Aktivität (Georgatsou & Alexandraki, 1999). In einem Ferrereduktase-Test konnte gezeigt werden, dass mit Cytochrom b_{561} transformierte $\Delta fre1 \Delta fre2$ -Zellen Eisenchelate reduzieren konnten (Bérczi et al., 2007).

3.4.3 Cytochrom b_{561} aus Pflanzen

Aufgrund des Protein-Sequenzabgleichs konnten viele CYBASC-Mitglieder in Pflanzen identifiziert werden (Asard et al., 2001). Initiale Charakterisierungen von CYBASC-Proteinen verschiedener Pflanzenspezies zeigten, dass diese durch Ascorbat reduzierbar sind (siehe Tabelle 3.2, Scagliarini et al., 1998).

Tabelle 3.2: Spezies mit CYBASC-Proteinen in verschiedenen Geweben (modifiziert nach Asard et al., 2001).

	Spezies	Gewebe	Asc-Red [%]*	α -Bande [nm]
<i>Beta vulgaris</i>	gemeine Rübe	Blätter	57	560
<i>Brassica oleracea</i>	Gemüsekohl	Blütenstand	70	558,8
<i>Cucumis sativus</i>	Gurke	Frucht	-	561
<i>Cucurbita pepo</i>	Gartenkürbis	Hypokotyl	32	560,7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne	Hypokotyl	76	560,7
<i>Spinacia oleracea</i>	Gemüsespinat	Blätter	64	561
<i>Zea mays</i>	Mais	Wurzel	67	561

Die Spezies sind jeweils mit lateinischem und deutschem Namen angegeben; * Asc-Red: Ascorbat-abhängige Reduktion [%] im Vergleich zur Reduktion durch Na-Dithionit. Die Reduktion durch Na-Dithionit wurde als 100 % gesetzt.

Als Elektronenakzeptoren fungieren auch hier MDHA und Fe³⁺-Chelate (Asard et al., 1989). Allerdings wurden pflanzliche CYBASC-Proteine in vielen verschiedenen Geweben gefunden, so dass bisher keine allgemeingültige funktionelle Vorhersage vorliegt (siehe Tabelle 3.2).

3.4.4 CYBASC-Mitglieder aus *Arabidopsis thaliana*

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia) wurde im Jahre 2000 vollständig sequenziert (Arabidopsis-Genome-Initiative, 2000). Durch Sequenzabgleiche mit bekannten Cytochrom b_{561} -Proteinen wurden vier offene Leserahmen (ORF) für putative CYBASC-Proteine gefunden. Diese Gene wurden *artb561-a*, *artb561-b*, *artb561-c* und *artb561-d* benannt (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.7). Hierbei handelt es sich um Paraloge, welche sich in ihrer Sequenz ähneln, da sie durch Genduplikation entstanden sind (Alberts et al., 2011). Der Einfachheit halber werden in dieser Arbeit die untersuchten Proteine ACytb₅₆₁-A und ACytb₅₆₁-B als A-Paralog und B-Paralog bezeichnet.

Tabelle 3.3: CYBASC-Gene/-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*.

Datenbank	Name	Gen	Protein	Länge [AS]	MW [kDa]	pI
TAIR	AT4G25570	<i>artb561-a</i>	ACytb₅₆₁-A	239	25,9	6,7 [#]
NCBI	NP_567723		A-Paralog			
NCBI	BAB21522	<i>artb561-a1</i>	ACytb₅₆₁-A1	237	25,7	6,7*
NCBI	CAA18169	<i>artb561-a</i>	ACytb₅₆₁-A_L	280	31	9,6*
TAIR	AT5G38630	<i>artb561-b</i>	ACytb₅₆₁-B	230	25,3	9,6 [#]
NCBI	BAB21521		B-Paralog			
TAIR	AT1G14730	<i>artb561-c</i>	ACytb₅₆₁-C	224	24,8	10,2*
NCBI	NP_172926					
TAIR	AT1G26100	<i>artb561-d</i>	ACytb₅₆₁-D	236	26,3	10,6*

Die grau unterlegten Proteine wurden in dieser Arbeit untersucht. AS: Aminosäuren; MW: Molekulargewicht; pI: Isoelektrischer Punkt; #: experimentell bestimmt (Cenacchi, 2007), *: theoretischer pI (TAIR); TAIR: The Arabidopsis Information Resource Database; NCBI: National Centre of Biotechnology Database.

Der offene Leserahmen des A-Paralogs (ACytb₅₆₁-A) liegt auf dem Chromosom IV und der des B-Paralogs (ACytb₅₆₁-B) wurde auf Chromosom V identifiziert. Beide offenen Leserahmen bestehen im Gegensatz zu einer 5-Exon-Struktur im offenen Leserahmen der Proteine *HCytb₅₆₁-1* und *-2* (*Homo sapiens*) und *Mumb₅₆₁* (*Mus musculus*, Verelst & Asard, 2003) nur aus 4 Exons. Die membrandurchspannenden Helices 2 und 4 beider Paraloge werden zum Teil Exon-übergreifend kodiert (siehe Abbildung 3.8). Folglich spiegelt die Intron-Exon-Organisation nicht die strukturelle Domänenanordnung wider (Asard et al., 2000).

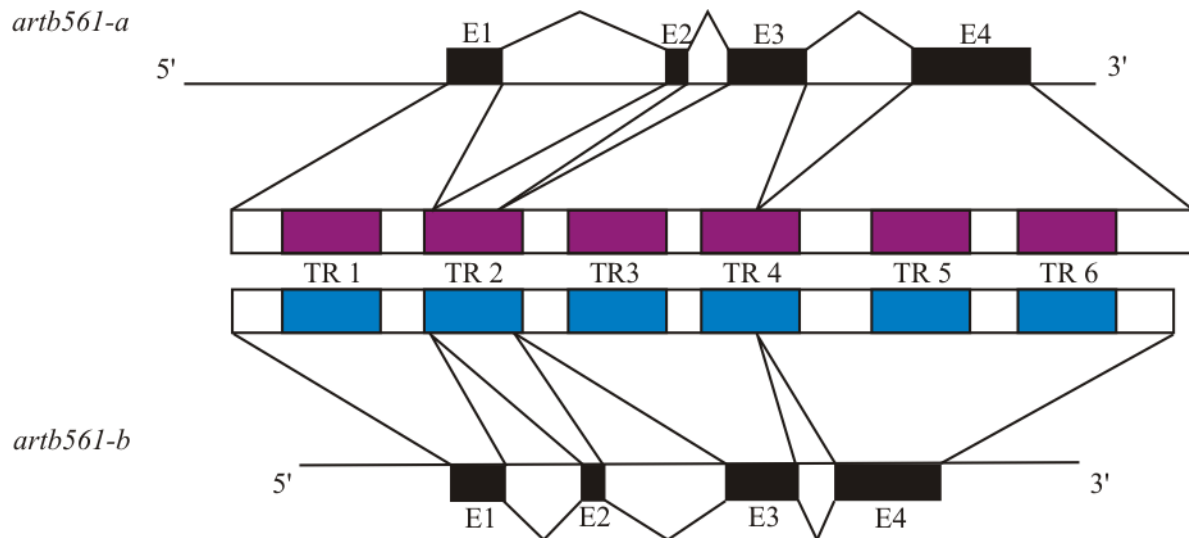


Abbildung 3.8: Intron-Exon-Struktur der CYBASC-ORFs *artb561-a* und *artb561-b* aus *Arabidopsis thaliana* (modifiziert nach Asard et al., 2000).

Die 4 Exons sind jeweils als schwarze Boxen gezeigt, Introns werden als schwarze Linien dargestellt. Im mittleren Teil wird die Proteinsequenz mit ihren membrandurchspannenden Domänen präsentiert: Für den A-Paralog in Lila und für den B-Paralog in Blau; TR: membrandurchspannende Domäne; E: Exon.

Die genaue Proteinlänge des Gens *artb561-a* ist nicht bekannt, da zwei mögliche Translations-Startpunkte gefunden wurden. Das Protein ACy₅₆₁-A_L (siehe Tabelle 3.3), dessen Translation 123 Basenpaare vor dem A-Paralog beginnt, hat eine Größe von 280 Aminosäuren. Der A-Paralog hingegen hat eine Größe von 239 Aminosäuren (Asard et al., 2000). Auch für BCy₅₆₁-CG (*Bos taurus*), Cy₅₆₁ aus *Xenopus laevis* und HCy₅₆₁ (*Homo sapiens*) wurden zwei mögliche Translationsstartpunkte gefunden. Analysen des Proteinlevels (Asard et al., 2000) und ein zusätzliches STOP-Codon in Cy₅₆₁ aus *Xenopus laevis* (Srivastava, 1996) identifizieren den *späteren* Translationsstart als den Startpunkt der Proteinsequenz. Aus diesem Grund wird auch für den A-Paralog vermutet, dass es sich bei dem kürzeren Genprodukt ACy₅₆₁-A (A-Paralog) um das native Protein handelt. Bei NCBI (siehe Tabelle 4.19) wird ein weiteres Gen mit dem Namen ACy₅₆₁-A1 geführt. Dieses Gen ist mit Ausnahme der fehlenden Aminosäuren Lys 26 und Val 27 identisch zum A-Paralog.

Durch einen Solubilisierungsschritt mit Triton X-100 und einem anschließenden Anionenaustauscher konnte die Lokalisation von CYBASC-Proteinen in der Plasmamembran von Blättern bestimmt werden (Bérczi et al., 2001). Eine Paralog-Identifikation konnte jedoch nicht durchgeführt werden. Mittels spezifischer polyklonaler Antikörper gegen den A-Paralog wurde dieser in der Tonoplastmembran (von Blättern) lokalisiert (Griesen et al., 2004). Der Nachweis einer zusätzlichen Lokalisation in der Plasmamembran konnte allerdings nicht erbracht werden. Auf Grund der Lokalisation in der Tonoplastmembran wird der A-Paralog oft auch als TCy₅₆₁ bezeichnet (Desmet et al., 2011, Bérczi et al., 2007, Bérczi & Asard, 2006).

In Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktions- und In-situ-Hybridisierungs-Ansätzen wurden beide CYBASC-Paraloge in den Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen. Für den B-Paralog konnte außerdem eine Lokalisation in unbefruchteten Eizellen gezeigt werden (Verelst et al., 2004).

Im Jahr 2006 wurde eine initiale Charakterisierung des A-Paralogs durchgeführt. Dieser wurde dafür heterolog in *S. cerevisiae* produziert und es wurden Untersuchungen zur Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit in Membranvesikeln durchgeführt. Darüber hinaus wurden verschiedene Lysin Alanin-Varianten (K70, K76, K79 und K80), welche im Ascorbat-Bindemotiv bzw. in direkter Nähe dazu liegen, hergestellt. Die Lysin → Alanin -Varianten zeigten mit Ausnahme der K80A-Variante keine Verminderung im Wachstum und wurden auf ihre Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit hin untersucht. Es zeigte sich, dass alle Varianten keine deutlich verminderte Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit in Bezug auf den Wildtyp aufwiesen. Die K80A-Variante besaß jedoch, eine um 40 % verminderte heterologe Produktion und eine verminderte Bindefähigkeit von Ascorbat (Bérczi & Asard, 2006). Die Gruppe um Bérczi und Asard schloss daraus, dass es sich entweder um zwei Ascorbat-Bindemotive oder aber um zwei Phasen der Ascorbat-Bindungen mit einer hohen und einer niedrigen Bindeaffinität handeln musste (Bérczi & Asard, 2006, Bérczi et al., 2005). Außerdem wurden Histidin → Alanin-Varianten (H50, H83, H117 und H156) hergestellt, da diese Reste an der Hämkoordination beteiligt sein sollen (siehe Tabelle 3.1). Für die Histidin → Alanin -Varianten wurde gezeigt, dass die Varianten H50A und H117A nicht sowie die Varianten H83 und H156 nur vermindert produziert wurden. Die Autoren schlossen daraus, dass diese Histidinreste in die Koordination der Häm involviert sind. Darüber hinaus wurde für den A-Paralog gezeigt, dass dieser Fe^{3+} -Chelate reduzieren kann. Auch hier wurde der A-Paralog im $\Delta fre1 \Delta fre2$ *Saccharomyces cerevisiae*-Deletionsstamm heterolog produziert und die Reduktion an ganzen Zellen detektiert (Bérczi et al., 2007). Durch Redox-Titrations wurden die E_M -Werte beider Häm bestimmt. Die Werte beliefen sich auf +57 mV (+/- 20 mV) für das Häm b_L sowie +165 mV (+/- 26 mV) für das Häm b_H (Bérczi et al., 2007).

Vor Kurzem wurde gezeigt, dass der A-Paralog *in vitro* auch durch Dihydroliponsäure (DHLA) reduzierbar ist (Bérczi et al., 2012). Die Autoren zeigten, dass die DHLA-abhängige Reduzierbarkeit der von Ascorbat entsprach. α -Liponsäure (LA) und seine reduzierte Form, Dihydroliponsäure (DHLA), sind natürlich vorkommende Thiolverbindungen und wurden in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren gefunden. DHLA ist wie auch Ascorbat ein Radikalfänger (Packer et al., 1997) und kann auf Grund seines Standardpotentials von 320 mV andere Antioxidantien zum Beispiel auch Ascorbat regenerieren (Goraca et al., 2011). Klinische Studien zeigten, dass LA/DHLA bei angeborenen Stoffwechselerkrankungen, zur Behandlung von grauem Star, Neuropathie oder auch Krebs verwendet werden kann. Die gesundheitliche Verbesserung wird dabei immer auf die antioxidantische Eigenschaften von DHLA zurückgeführt (Bérczi et al., 2012). Mit der Publizierung dieser Ergebnisse haben Bérczi und

Kollegen eine neue potentielle biologische Funktion von CYBASC-Proteinen aufgezeigt. Ob die DHLA-abhängige Reduktion *in vivo* stattfindet und wie der genaue Mechanismus dabei ist, ist noch unklar.

3.5 Arbeiten von Lucia Cenacchi (2007) zur Charakterisierung von heterolog produzierten CYBASC-Proteinen

Insbesondere für die Proteinkristallisation und die funktionelle Charakterisierung werden große Mengen an gereinigtem Protein benötigt. *In vivo* werden beide membranständigen CYBASC-Paraloge in zu geringen Mengen produziert und das Wachstum einer Pflanze kann bis zu 4 Wochen dauern. Daher wurden im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi (2007) die offenen Leserahmen des A- und B-Paralogs in verschiedene Produktionsvektoren für die Expressionssysteme *E. coli* (Grisshammer, 2006, Grisshammer & Tate, 1995) und *P. pastoris* (Cereghino & Cregg, 2000) kloniert (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Hergestellte Produktionskonstrukte für die Expressionssysteme *E. coli* und *P. pastoris* (Cenacchi, 2007).

Expressionssystem	5'kodiertes Affinitätsanhängsel	ORF	3'kodiertes Affinitätsanhängsel	Plasmid
<i>E. coli</i>		<i>artb561-A</i>	TEV + His 10	pBADA ₂ -A
	His 6 + TEV	<i>artb561-A</i>	Strep	pBADC ₃ -A
	His 6	<i>artb561-B</i>	Strep	pTTQC-B
<i>P. pastoris</i>	His 10	<i>artb561-A</i>	Bio	pPIC9K_H ₁₀ Bio-A
	His 10	<i>artb561-B</i>	Bio	pPIC9K_H ₁₀ Bio-B
	StrII	<i>artb561-B</i>	His 10	pPIC3.5K_H ₁₀ S _{II} -B

His 10: DNA-Sequenz kodierend für einen Dekahistidin-Affinitätsanhängsel; His 6: DNA-Sequenz kodierend für einen Hexahistidin-Affinitätsanhängsel; TEV: DNA-Sequenz kodierend für eine TEV-Protease-Schnittstelle; Strep: DNA-Sequenz kodierend Streptavidin-Affinitätsanhängsel; StrII: DNA-Sequenz kodierend für ein StrepII-Affinitätsanhängsel; Bio: Biotinylations-Domäne.

Die heterolog produzierten CYBASC-Paraloge wurden mittels einer Ein-Schritt Ni²⁺-immobilisierten Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt (siehe Abschnitt 6.4) und charakterisiert (Cenacchi, 2007). Untersuchungen zeigten, dass das Expressionssystem keine Auswirkungen auf die spektroskopischen Eigenschaften der Paraloge hatte. Des Weiteren wurde für den B-Paralog gezeigt, dass dieser im Gegensatz zum A-Paralog oder zu BCy₅₆₁-CG ein symmetrisches Absorptionsmaximum bei 561 nm besitzt. Der A-Paralog und BCy₅₆₁-CG hingegen besitzen ein asymmetrisches Absorptionsmaximum bei 562 nm mit einer Schulter bei 557 nm (siehe Abbildung 3.2 und 3.9). Die Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit wurde thermodynamisch mit verschiedenen Konzentrationen untersucht und lag bei 80 % in Bezug auf die vollständige Reduktion durch Na-Dithionit (100 %). Eine initiale Ascorbat-abhängige

Reduzierbarkeit wurde für beide DEPC- sowie DEPC und Ascorbat-modifizierten Paralogs durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduzierbarkeit aller modifizierten Proben deutlich vermindert war. Für beide gereinigten Paralogs konnte die Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten thermodynamisch gezeigt werden.

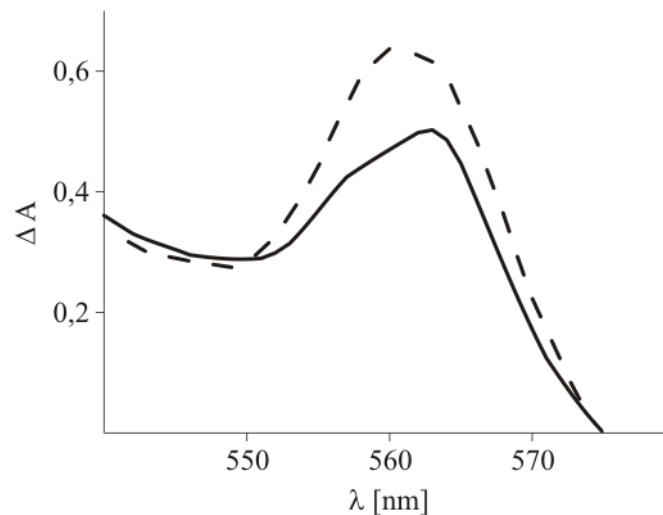


Abbildung 3.9: Vergleich der α -Bande des A- und B-Paralogs.

Die α -Bande des A-Paralogs (gestrichelte Linie) besitzt eine Schulter bei 557 nm mit einem lokalen Maximum bei 562 nm. Im Gegensatz dazu ist die α -Bande des B-Paralogs symmetrisch. Die Proben wurden mit Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert und mit Na-Dithionit reduziert (Cenacchi, 2007).

3.6 Das Expressionssystem *E. coli* und die Produktionsvektoren

Obwohl die heterologe Produktion von Membranproteinen im Expressionssystem *E. coli* für die Wirtszelle toxisch sein kann oder es zur Bildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) kommen kann, wurde dieses Expressionssystem für die CYBASC-Produktion gewählt (Cenacchi, 2007). Das für die heterologe Produktion verwendete Plasmid pBAD (Surade et al., 2006) mit dem Ampicillin-Resistenzgen ist ein Derivat des Expressionsvektors pBr322. Die eingebrachten Gene stehen unter der Kontrolle des P_{BAD} Promoters. Als negativer Regulator fungiert das Proteinprodukt aus dem Gen *araC*, welches ebenfalls auf dem pBAD-Plasmid kodiert ist. Die Produktion des eingebrachten Gens wird durch die Zugabe von L-Arabinose aktiviert (Hirsh & Schleif, 1977, Guzman et al., 1995). Da beim pBAD-System die Proteinproduktion mit L-Arabinose induziert wird, sollte der verwendete Stamm keine Arabinose verstoffwechseln können. Der Stamm TOP10 F⁻ hat die Genotypen *araBADC*⁻ und *araEFGH*⁺, was bedeutet, dass dieser Stamm L-Arabinose transportieren aber nicht metabolisieren kann (siehe

Tabelle 4.1). Ein weiteres verwendetes Plasmid-System ist das pTTQ18-System. Dieser Vektor besitzt das *Lac*-Operon mit dem *TAC*-Promoter und dem *TAC*-Repressor *LacI* (Stark, 1987). Wie bei dem pBAD-System wird das *LacI*-Gen auf dem pTTQ-Plasmid (pTTQC) kodiert. Die Produktion wird durch Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert (Surade et al., 2006).

Die verwendeten Plasmide pBADA₂ und pTTQ18C sind modifizierte Derivate von pBAD sowie pTTQ18 (Surade et al., 2006). Dabei steht das Kürzel A₂ für einen Dekahistidin-Affinitätsanhänger mit einer TEV-Protease-Schnittstelle am 3'-Ende der MCS. Das Kürzel C steht für einen Hexahistidin-Affinitätsanhänger am 5'-Ende der MCS. Am 3'-Ende der MCS wird ein Streptavidin-Affinitätsanhänger (Strep) kodiert (siehe Abbildung 3.10 und Tabelle 3.4).

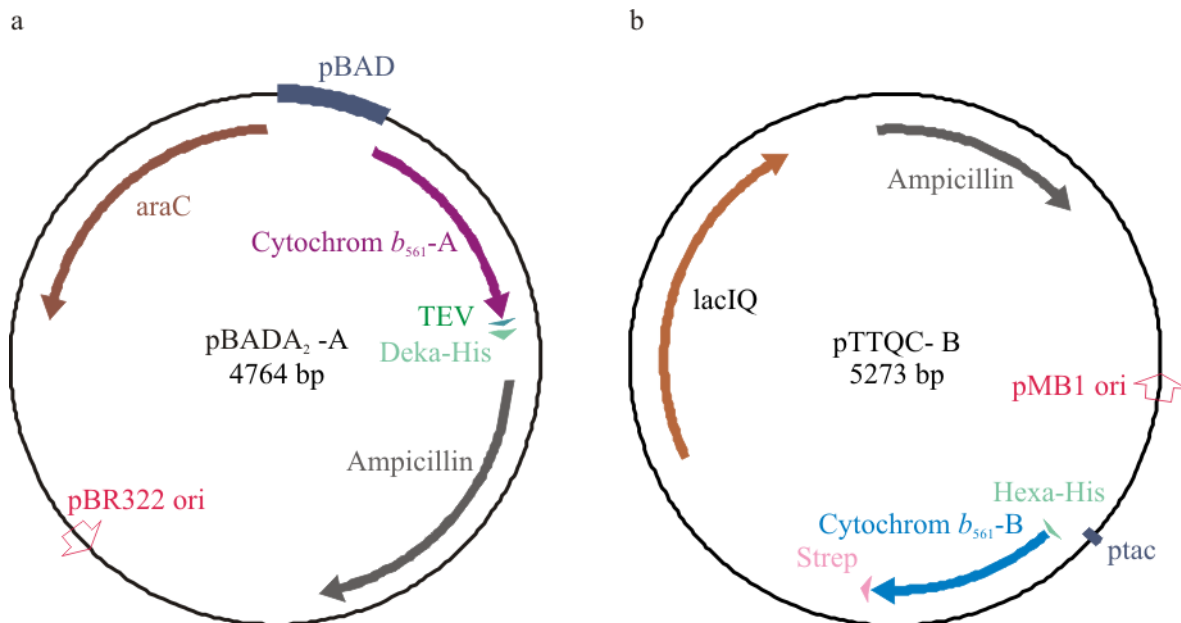


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide für die heterologe Produktion im Expressionssystem *E. coli*.

- a) Das Plasmid pBADA₂-A, welches das Gen für den A-Paralog (lila dargestellt) fusioniert mit einer TEV-Schnittstelle (dunkelgrün dargestellt) und Dekahistidin-Anhänger (hellgrün dargestellt), trägt (Cenacchi, 2007). Für die Produktionskontrolle wird zusätzlich der negative Regulator AraC auf dem Plasmid kodiert (*araC*, braun dargestellt).
- b) Das Plasmid pTTQC-B, welches das Gen für den B-Paralog (in blau gezeigt) fusioniert mit einem Strep-Anhänger (rosa dargestellt) am N-Terminus und einem Hexahistidin-Anhänger (hellgrün dargestellt) am C-Terminus, trägt (Cenacchi, 2007). Der Repressor LacIQ wird zusätzlich auf pTTQC-B kodiert (*lacIQ*, braun dargestellt). Der rote Pfeil stellt den Ori des Plasmids dar und in taube ist die Promotor-Region gekennzeichnet. Beide Plasmide tragen Ampicillin als Selektionsmarker

3.7 Ziele dieser Arbeit

Innerhalb des langfristigen Ziels der Arbeitsgruppe Lancaster der Aufklärung der Funktionsweise der CYBASC-Proteine auf Basis möglichst genau ermittelter dreidimensionaler Struktur sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Produktion im Expressionssystem *E. coli* optimiert werden. Im Rahmen der Arbeit von L. Cenacchi konnten nur ~ 0,042 mg reines Protein pro Liter Zellkultur gewonnen werden. Mit der von L. Cenacchi etablierten Ein-Schritt Ni²⁺-IMAC sollten beide Paraloge gereinigt werden. Das gereinigte Protein sollte für Kristallisationsversuche und weitere funktionelle Charakterisierungen verwendet werden. Des Weiteren sollte ein Aktivitätstest zur Quantifizierung der Funktionalität des produzierten Materials entwickelt werden. Das gereinigte Protein sollte auf dessen Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit in verschiedenen Detergenzien hin untersucht werden. Weitere Untersuchungen zur DEPC-Modifikation beider Paraloge sollten ebenfalls in dieser Arbeit analysiert werden. Durch DEPC-Modifikation konnte die Lokalisation des Häms *b_L* in *BCytb₅₆₁*-CG in der Nähe des Ascorbat-Bindemotivs identifiziert werden. Ähnliche Experimente sollten auch für beide Paraloge durchgeführt werden. Mittels ortsgerichteter Mutagenese sollten Varianten des B-Paralogs hergestellt werden, welche spektroskopisch und durch Redox titrationen charakterisiert werden sollten. Die Reste hierbei waren H46, K81 und H157. Das Histidin 46 liegt lediglich im B-Paralog vor, so dass geklärt werden sollte, ob diesem Rest eine bedeutende Funktion zugewiesen werden kann. Wie schon für den A-Paralog bei Bérczi et al. (2007) gezeigt werden konnte, besitzt der Lysinrest an Position 81 (A-Paralog: 80) eine bedeutende Funktion in der Ascorbat-Bindung. Dies sollte für den B-Paralog überprüft werden. Das Histidin an Position 157 ist in die Häm-Koordination involviert ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es weitere Funktionen dieses Restes gibt. Die Reduktion von Fe³⁺-Chelate, welche von L. Cenacchi (2007) thermodynamisch gezeigt wurde, sollten an dieser Stelle mit verschiedenen Fe³⁺-Chelat-Konzentrationen untersucht werden. Zudem sollte auch hier ein Aktivitätstest zur Bestimmung der kinetischen Aktivität entwickelt werden.

4 MATERIAL

4.1 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Verwendung	Merkmale	Referenz
C43 (DE3)	heterologe	recA araD139 Δ (lac-proAB) Δ (lac)7A hsdR rpsL	(Miroux & Walker, 1996)
Rosetta (DE3)	heterologe	F-ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (rB-,mB-) λ (DE3)	(Studier & Moffatt, 1986,
	Produktion	pRARE(CmR)	Grodberg & Dunn, 1988)
Top10F-met ⁺	heterologe	(lacIq, Tn10(TetR) mcrA Δ (mrr-hsdRMS-	(Surade et al., 2006)
	Produktion	mcrBC) [ϕ 80(lacZ) Δ lacX74] deoR araD139 Δ (ara-leu=7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG	
X11-Blue	Klonierung und Plasmidanreicherung	endA1, hsdR17 (rk-, mk+); supE44, thi-1, λ -, recA1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF) U169 [F': proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10(Tetr)],	Stratagene GmbH, Heidelberg (D)

4.2 Kulturmedien

Tabelle 4.2: Verwendete Nährmedien und Zusatzlösungen für *E. coli* (K12) Stämme.

Medium	Zusammensetzung
NZYM-Medium	10 g/l Casein-Hydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl,
	2 g/l Magnesiumsulfat Heptahydrat
NZYM-Agar	10 g/l Casein-Hydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl,
	2 g/l Magnesiumsulfat Heptahydrat + 15 g/l Bacto-Agar
Ampicillin-Konzentrat (1000 x)	100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert
Chloramphenicol-Konzentrat (1000 x)	35 mg/ml in Ethanol p.a. , sterilfiltriert
1 M IPTG	0,24g/ ml in H ₂ O, sterilfiltriert
20 % L-Arabinose	20g/ ml in H ₂ O, sterilfiltriert

4.3 Plasmide und Oligodesoxynukleotide

Tabelle 4.3: Zusammenstellung der verwendeten Plasmide die Produktion der CYBASC-Proteine für das Expressionssystem *E. coli* K12.

Paralog	Plasmid	Induktor	Selektionsmarker	Referenz
A-Paralog	pBADA ₂ -A	L-Arabinose	Ampicillin	Cenacchi, 2007
B-Paralog	pTTQC - B	IPTG	Ampicillin	Cenacchi, 2007

Tabelle 4.4: Zusammenstellung der durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten Expressionsplasmide zur Produktion von ACy₅₆₁-B-Varianten in *E. coli* C43 (DE3).

Mutante	AS -Austausch und Position	Austausch Basentriplet	Plasmid	Referenz
B-H46M	His 46 → Met	cat → atg	pTTQ18C-B-H46M*	diese Arbeit
B-K81E	Lys 81 → Glu	aaa → gaa	pTTQ18C-B-K81E*	diese Arbeit
B-H157Q	His 157 → Gln	cat → cag	pTTQ18C-B-H157Q*	diese Arbeit

* Derivate des Plasmids pTTQ18C-B mit demselben Selektionsmarker (Ampicillin) und dem gleichen Induktor (IPTG).

Tabelle 4.5: Verwendete Plasmide für die Herstellung neuer Plasmide für das Expressionssystem *Pichia pastoris*.

Paralog	Name	5' kodierendes Anhängsel	3' kodierendes Anhängsel	Referenz	Expressions-system
A	pBADC ₃ -A	Hexa-His + Tev	StrII	Cenacchi, 2007	<i>E. coli</i>
A	pBADA ₂ -A		TEV + Hexa-His	Cenacchi, 2007	<i>E. coli</i>
	pPIC3.5 K empty	-	-	Invitrogen	<i>P. pastoris</i>
A	pPIC3.5K A ₈ -A*	-	TEV + Octa-His	diese Arbeit	<i>P. pastoris</i>
	pPIC3.5K C ₃ -A*	Hexa-His + Tev	StrII	diese Arbeit	<i>P. pastoris</i>
	pPIC3.5K C ₁₂ -A*	Dodecan-His + Tev	StrII	diese Arbeit	<i>P. pastoris</i>
	pPIC3.5K C ₁₄ -A*	Quatrodacyl-His + Tev	StrII	diese Arbeit	<i>P. pastoris</i>

* Derivate des pPIC3.5K-Vektors. Bei allen Konstrukten erfolgt die Induktion mit Methanol. Tev: TEV-Protease-Schnittstelle; Hexa-His: ein Affinitätsanhängsel, bestehend aus 6 Histidinresten; Dodecan-His: ein Affinitätsanhängsel, bestehend aus 12 Histidinresten; 14-His ein Affinitätsanhängsel, bestehend aus 14 Histidinresten

Tabelle 4.6: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide zur Sequenzierung.

Expressionssystem	Name	Sequenz 5' → 3'
<i>E. coli</i>	pBAD-1SeqFor	AGATTAGCGGATCCTACCTG
	pBAD-1SeqRev	GTCTTGCCTTCGCCAGACT
	pTTQ18-2SeqFor	CATCATAACGGTTCTGGCA
	pTTQ18-2SeqRev	CTATTACGCCAGCTGGCGA
<i>P. pastoris</i>	5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
	3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Tabelle 4.7: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide zur Generierung von Varianten durch ortsgerichtete Mutagenese.

Variante	Sequenz 5' → 3' der Vorwärts (Fw)- und Rückwärtsoligodesoxynukleotide (Rev)
B H46M	Fw: GAACTTGAAAAA CTGGTT <i>ATG</i> CTTACTACTACA ACTCACAGC Rev: GCTGTGAGTTGTAGT GTAAG <i>CAT</i> AAC CAGTTTTTTT CAAGTTC
B K81E	Fw: GGTACAAAGA ACTTGAAA <i>GAA</i> CTGGTTCATCTTACTACTACAAC Rev: GTTGTAGTGTAA GATGAACCAG <i>TTT</i> TTTCAAGTTCTTTGTACC
B-H157Q	Fw: GCAGAGCCAGTTT GATGCCATGG <i>CAG</i> GTGTTCTTAGGGATTCC Rev: GGAAATCCCTA AGAACAC <i>CTG</i> CCATGGCATCAA ACTGGCTCTGC

Die ausgetauschten Codons sind hervorgehoben (kursiv und fett).

Tabelle 4.8: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide zu Generierung von Vektorkonstrukte für das Expressionssystem *Pichia pastoris*.

Variante	Sequenz 5' → 3' der Vorwärts (Fw)- und Rückwärtsoligodesoxynukleotide (Rev)
pPIC3.5_A_aus	Fw: CGAT TACGTA ACCATGGCTGTCCGGATAAACGCGATGGCGGTGACG Rev: CAT GCGGCCGC CTAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTG
pBADA2*	Fw: CGAT TACGTA ACC ATG CACCATCACCATCACCATCACCATCACCAT Rev: GTA GCGGCCGC CTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCT

Blau markiert: Schnittstellen von SnaBI; Grün markiert: Schnittstelle von NotI; die unterstrichenen Sequenz bindet im Plasmid*: Das reverse Oligodesoxynukleotid könnte auch für den B-Paralog genommen werden.

4.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4.9: Puffer und Lösungen, die für die Reinigungen der Wildtyp- und Varianten verwendet wurden.

Puffer	Zusammensetzung
10-fach Tris 20	500 mM Tris, pH 7,8 (4 °C); 200 mM NaCl; 100 % Glycerol
10-fach Tris 300	500 mM Tris, pH 7,8 (4 °C); 3 M NaCl; 100 % Glycerol
CYBASC-KP ₁	50 mM Kaliumphosphat, pH 7,2; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol
NaPhos-Puffer	50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol; 0,1 % (oder 0,01 %) β-LM
Hepes-Puffer	20 mM Hepes, pH FFF; 1 mM EDTA, 2,4 % Benzamidin; 10 % Glycerol, 0,1 % β-LM
Aufschlusspuffer	1-fach Tris 20 (oder Tris 300), pH 7,8 (4 °C); 2,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM PMSF (in Isopropanol); 1 mM Aminocaprinsäure; 1 mM Benzamidin; 1 mg/ml DNase
Solubilisierungspuffer	1-fach Tris 20 (oder 300), pH 7,8 (4 °C); 1 M Betain; 1 % LDAO
A-IMAC-Puffer	1-fach Tris 300, pH 7,8 (4 °C); 0,01 % β-LM
B-IMAC-Puffer	500 mM Histidin, pH 5,5; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol; 0,01 % β-LM
A-Strep-Puffer	1-fach Tris 300, pH 7,8 (4 °C); 0,01 % β-LM (oder 0,1 % LDAO)
B-Strep-Puffer	1-fach Tris 300, pH 7,8 (4 °C); 2,5 mM Desthiobiotin; 0,01 % β-LM (oder 0,1 % LDAO)
A-Ionen-Puffer	1-fach Tris 20, pH 7,8 (4 °C); 0,01 % β-LM
B-Ionen-Puffer	1-fach Tris 20, pH 7,8 (4 °C); 1M NaCl 0,01 % β-LM

Tabelle 4.10: Puffer und Lösungen für die Elektrophoretische Methoden und Western-Blot.

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Gele	
12 % SDS Trenngel	10,2 ml H ₂ O; 7,5 ml Trenngelpuffer; 12,0 ml Rotiphorese Gel 30 Acrylamidlösung, 0,15 ml (10 % (w/v)) Ammonium Persulfat; 0,02 ml THEMED
5 % SDS Sammelgel	3,075 ml H ₂ O; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 0,67 ml Rotiphorese Gel 30 Acrylamidlösung, 0,025 ml (10 % (w/v)) Ammonium Persulfat; 0,005 ml
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS
Trenngel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS
10-fach SDS-Elektrophorese-Puffer	250 mM Tris HCl, pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1 % SDS
4-fach Laemmli-Probenpuffer	120 mM Tris HCl; 20 % Glycerol; 8 % SDS; 0,01 % Bromphenolblau
20-fach NuPAGE MES Laufpuffer	Gebrauchsfertig von Invitrogen, San Diego (USA)
4-fach LDS Probenpuffer	Gebrauchsfertig von Invitrogen, San Diego (USA)
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250; 40 % Ethanol; 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	10 % Essigsäure in H ₂ O
SDS-Gele Silberfärbung	
Fixierpuffer	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
10-fach <i>Oxidizer</i> -Puffer	Gebrauchsfertig von BioRad, München (D)
10-fach <i>Silver</i> Reagenz	Gebrauchsfertig von BioRad, München (D)
Developer-Puffer	3, 2 g/ 100 ml dd H ₂ O
Stoppuffer	5 % (v/v) Essigsäure
Western Blot	
10-fach NuPAGE Transfer Puffer	Gebrauchsfertig von Invitrogen, San Diego (USA)
Transfer-Puffer	3 g/l Tris Base, pH 8,3; 14,4 g/l Glycin
10-fach TBS-Puffer	100 mM Tris HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl
1-fach TBST-Puffer	100 ml/l 10-fach TBS-Puffer, pH 7,5; 0,1 % Tween 20 (bezogen auf 1 L)
SMARTBLOCK Blockierlösung	Gebrauchsfertig von Candor Bioscience, Wangen (D)
Agarosegelelektrophorese	
Probenpuffer für Agarosegele	50 % (v/v) Glycerol (96 %); 1 % (w/V) SDS; 125 mM EDTA; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol
TAE-Puffer (50 fach)	2 M Tris Base, pH 7,4; 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA
Restriktionsanalyse	
Tango TM Puffer	Gebrauchsfertige Lösung von Fermentas, St. Leon-Rot (D)
sonstige Pufferlösungen	
PBS-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl
5-fach Bradfordpuffer	100 mg Coomassie Brilliant Blue G250; 50 ml EtOH; 100 ml H ₃ PO ₄ (85 %); 50 ml dd H ₂ O

4.5 Proteine und Standards

Tabelle 4.11: Verwendete Proteine und Standards.

Standard	Hersteller
Aldolase	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
alkalische Phosphatase	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
BSA	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Cytochrom C	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Deoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
DpnI	Stratagene GmbH, Heidelberg (D)
FastDigest® NotI	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Gel Filtration Calibration Kit – Low Molecular Weight	GE Healthcare, München (D)
Lysozym	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Protein Marker VI (10 – 245) prestained	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope	Biorad, München (D)
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, San Diego (USA)
T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
SnaBI	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
1 kb Standard	New England Biolabs, Frankfurt (D)

4.6 Molekularbiologische Kits und Kristallisationsassays

Tabelle 4.12: Verwendete molekularbiologische Kits und Kristallisationsassays.

Kit	Hersteller
Bio-Rad Silver Stain	Biorad, München (D)
BIOTAQ™ Red DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde (D)
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
MemGold® HT-96	Molecular Dimensions, Suffolk (UK)
PeqGold II Plasmid Mini Kit	PeqLab, Erlangen (D)
Phusion High Fidelity-Kit	New England Biolabs, Frankfurt (D)
Proteoextract Digestion Kit	CalBiochem/ Merck KGaA, Darmstadt (D)
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
Quik Change II SDM Kit	Agilent, Böblingen (D)

4.7 Chromatographiesäulen und *Batch*-Resin

Tabelle 4.13: Verwendete Säulen und *Batch*-Resin.

Säule/ Resin	Hersteller
Ni ²⁺ NTA-Agarose	Qiagen, Hilden (D)
Strep-Tactin® Sepharose® 50% Suspension	IBA, Göttingen (D)
1 ml HisTrap HP	GE Healthcare, München (D)
1ml HiTrap Chelating HP	GE Healthcare, München (D)
1 ml HiTrap SP FF	GE Healthcare, München (D)
1 ml HiTrap CM FF	GE Healthcare, München (D)
1 ml StrepTrap HP	GE Healthcare, München (D)
1 ml <i>Gravity Flow Strep-Tactin</i> ® Sepharose®	IBA, Göttingen (D)
1 ml <i>Gravity Flow Strep-Tactin</i> ® MacroPrep®	IBA, Göttingen (D)
1 ml <i>Gravity Flow Strep-Tactin</i> ® Superflow®	IBA, Göttingen (D)
5 ml prepacked Strep-Tactin® Sepharose® Cartridge H-PR	IBA, Göttingen (D)
5 ml HiTrap Chelating HP	GE Healthcare, München (D)
5 ml HisTrap HP	GE Healthcare, München (D)
5 ml HiTrap DEAE FF	GE Healthcare, München (D)
Superdex 200 5/ 150	GE Healthcare, München (D)
HiLoad 16/600 Superdex 200	GE Healthcare, München (D)
PD-10 Entsalzungssäule	GE Healthcare, München (D)

4.8 Chemikalien

Tabelle 4.14: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2,6 Dichloroindophenol-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
6-Aminocaproinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Aceton	Fisher Scientific, Schwerte (D)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe (D)
Ampicillin Natrium Salz	Roth, Karlsruhe (D)
Antifoam 204	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Bacto Agar	BD, Sparks (USA)
Bacto Yeast Extract	BD, Sparks (USA)
Benzamidin Hydrochlorid Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Betain-Monohydrat	Fisher Scientific, Schwerte (D)
Bromphenolblau-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Casein-Hydrolysat	Roth, Karlsruhe (D)
CO ₂ Gas	Praxair, Düsseldorf (D)
Coomassie Brillant Blau G250	Roth, Karlsruhe (D)
Dimethylsulfoxid	Fisher Scientific, Schwerte (D)
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt (D)

Fortführung Tabelle 4.14

Chemikalie	Hersteller
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Zentrales Chemikalienlager UKS
Essigsäure	Fisher Scientific, Schwerte (D)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol, vergällt	Zentrales Chemikalienlager UKS
Fe ³⁺ -EDTA	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Fe ³⁺ -Citrat	Zentrales Chemikalienlager UKS
Glycerol	Zentrales Chemikalienlager UKS
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
H ₂ O (2 x destilliert)	Millipore, Schwalbach (D)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Zentrales Chemikalienlager UKS
L-Histidin	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	VWR, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	VWR, Darmstadt (D)
N ₂ flüssig	Air Liquide, Neunkirchen (D)
N ₂ Gas	Praxair, Düsseldorf (D)
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt (D)
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumdithionit	Zentrales Chemikalienlager UKS
Natriumhydroxid	Zentrales Chemikalienlager UKS
NBT / Bcip Tabletten	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Nickelsulfat	VWR, Darmstadt (D)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Pyridin	Sigma-Alderich, Steinheim (D)
Rotiphorese Gel 30 Acrylamidlösung	Roth, Karlsruhe (D)
Salzsäure 37 %	Roth, Karlsruhe (D)
Tris Base	Roth, Karlsruhe (D)
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe (D)
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (D)

4.9 Redoxmediatoren

Tabelle 4.15: Auflistung der verwendeten Redoxmediatoren, deren Lösungsmittel und deren E_M -Werte (gegen die Ag/AgCl-Elektrode).

Name	Lösungsmittel	E_M (mV) vs Ag/AgCl
Ferrocenyl-triethylammoniumiodid *	EtOH	+ 607
1,1' Ferrocendicarbonsäure *	EtOH	+ 436
Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat	H ₂ O	+ 212
1,1' Dimethylferrocen	EtOH	+ 133
Quinhydron	EtOH	+ 70
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamin Dihydrochlorid	EtOH	+ 62
DCPIP	EtOH	+ 9
Hexaaminruthenium (III) chlorid	H ₂ O	- 8
1,4-Naphthochinon	EtOH	- 63
Trimethylhydrochinon	EtOH	- 108
Menadion	Aceton p. a.	- 220
2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon	EtOH	- 333
Anthrachinon-2-Sulfonsäure Natriumhydrat	EtOH	- 433
Neutralrot	EtOH	- 515

Die Chemikalien wurden bis auf die mit * gekennzeichneten von der Firma Sigma-Alderich, Steinheim (D) verwendet.

4.10 Detergenzien

Tabelle 4.16: Verwendete Detergenzien.

Detergenz	Hersteller	CMC[%]	Konzentration [%]	
			Puffer	Solubilisierung
C ₈ E ₄	Anatrace®, Maumee (USA)	0,22	0,5	1
N-Decyl-β-Maltosid (DM)	Anatrace®, Maumee (USA)	0,087	0,1	1
(Dodecylphosphocholin) Fos Cholin-12	Anatrace®, Maumee (USA)	0,047	0,1	1
Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO)	Sigma-Alderich, Steinheim	0,032	0,1	1
n-Dodecyl-β-Maltosid (β-LM)	Anatrace®, Maumee (USA)	0,0087	0,1 und 0,01	1
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (D)		-	
Triton X-100	Sigma-Alderich, Steinheim	0,015	-	1
Tween 20	Roth, Karlsruhe (D)	0,0072	-	1

Fos Cholin-12 (fett und kursiv markiert) wurde hierbei als Positivkontrolle verwendet (Cenacchi, 2007).

4.11 Geräte

Tabelle 4.17: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Anzucht-Schüttler	Multitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Anzucht-Schüttler	Minitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Autoklav	DX-200	Systec, Wettenberg (D)
Autoklav	SanoClav	Wolf, Bad Überkingen (D)
Chromatographie-Station	Äkta-Purifier	GE Healthcare, München (D)
Dewar	Isotherm	KGW, Karlsruhe (D)
Feinwaage	CPA 225D	Sartorius, Göttingen (D)
Gefrierschrank (-80 °C)	VIP-Series Ultra Low	Sanyo, San Diego (USA)
Gelgieß-Apparatur	Mini-PROTEAN 3 multi-casting chamber	Bio-Rad, München (D)
Goldnetz	30x30 µm mit einer 50% optischen Transparenz	Buckbee-Mears, St. Paul (USA)
Hochdruckhomogenisator	Emulsi-Flex C3	Avestin, Ottawa (Kanada)
Homogenisator	T25 digital Ultra-Turrax	IKA, Staufen (D)
Kristallisations-Inkubator	Minstrel HT	Rigaku, Kent (U.K.)
Kühl-/ Gefrierschrank	---	Liebherr, Ochsenhausen (D)
Kühlschrank	Vinothek	Liebherr, Ochsenhausen (D)
Kühlzentrifuge	Avanti J-26 XP	Beckman-Coulter, Krefeld (D)
Kühlzentrifuge	5810R	Eppendorf, Hamburg (D)
Küvette	Tray Cell	Hellma, Müllheim (D)
Küvette	Schichtdicke 10 mm	Hellma, Müllheim (D)
Küvette	Schichtdicke 1 mm	Hellma, Müllheim (D)
Magnetrührer	MSH-20A	IDL, Nidderau (D)
Magnetrührer	Variomag	Thermo Scientific, Bonn (D)
Mikroskop	SZX9	Olympus, Hamburg (D)
Mikrowelle	700	Severin, Sundern (D)
Milli-Q Anlage	Integral 15	Millipore, Schwalbach (D)
FTIR Spektrometer (inkl. UV/VIS Spektrometer)	Modifiziertes Bruker IFS 25	Institut für Biophysik (JWGU)
Netzgerät	Power Pack Basic	Bio-Rad, München (D)
PCR-Maschine	MyCycler	Bio-Rad, München (D)
pH-Meter	Seven Easy	Mettler-Toledo, Giessen (D)
Pipetten	Pipetman Neo P2-P1000	Gilson, Middelton (USA)
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (D)
Pipettierroboter	Phoenix / RE	Art Robbin Instruments, Sunnyvale (USA)
Potentiostat		Institut für Biophysik (JWGU)
Rotator	Intelli-Mixer	Neolab, Heidelberg (D)
Rotor	JLA 8.1000	Beckman-Coulter, Krefeld (D)
Rotor	45 Ti, 70 Ti; TLA100.3; TLA110	Beckman-Coulter, Krefeld (D)
Scanner	CanoScan 4400F	Canon, Krefeld (D)

Fortführung Tabelle 4.17

Gerät	Typ	Hersteller
SDS-Elektrophoresekammer	X-Cell Sure Lock	Invitrogen, San Diego (USA)
SDS-Elektrophoresekammer	Mini Protean	Bio-Rad, München (D)
Semi-dry Blot-Apparatur	Trans Blot SD	Bio-Rad, München (D)
Spektroelektrochemische Messzelle	(Moss et al., 1990)	Institut für Biophysik (JWGU)
Spektrometer	Agilent 8453	Agilent Technologies, Böblingen (D)
Spektrometer	Ultraspec 2100 Pro	GE Healthcare, München (D)
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Bonn (D)
Thermomixer	Comfort 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischzentrifuge	5424	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischzentrifuge	Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg (D)
Ultrazentrifuge	Optima L-90 K	Beckman-Coulter, Krefeld (D)
Ultrazentrifuge	Optima Max-E	Beckman-Coulter, Krefeld (D)
Vakuumpumpe	MP 20	Biometra, Göttingen (D)
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waage	Extend	Sartorius, Göttingen (D)
Wasserbad + Steuereinheit	K 20 + DC 10	Thermo Scientific, Bonn (D)
Zell-Densitometer	WPA CO8000	Biochrom, Cambridge (U.K.)

4.12 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4.18: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterial.

Produkt	Typ	Hersteller
µl-Spritzen	25 µl – 1000 µl	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
96 well (2 subwell) Kristallisationsplatte	MD 11-00-100	Molecular Dimensions, Suffolk (U.K.)
96 well Block	2 ml Kristallisations-Assay	Costar, Amsterdam (NL)
96 well Platte	Mikrotest 96 well F	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Bechergläser (Glas)	Diverse Größen	Schott, Mainz (D)
Bechergläser (Plastik)	Diverse Größen	VWR, Darmstadt (D)
Einmal-Küvette	1 ml Polystyrolküvette	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Einmal-Pasteurpipetten	5 ml	VWR, Darmstadt (D)
Einmal-Pipetten	1 – 25 ml Cellstar	Greiner Bio-One, Nürtingen (D)
Einmal-Spatel	Diverse Größen	Neolab, Heidelberg (D)
Einmal-Spritze	50 ml Perfusor Spritze	Braun, Melsungen (D)
Einmal-UV-Küvette	Mikro 70-550 µl	Roth, Karlsruhe (D)
Erlenmeyer-Rundkolben	Diverse Größen	Schott, Mainz (D)
Erlenmeyer-Schikanekolben	Ilmabor I-330 5 l	Techn. Glaswerke,
CaF ₂ Fenster	Ø 20(±0.1) mm x 4(±0.1) mm	Crystal GmbH, Berlin (D)

Fortführung Tabelle 4.18

Produkt	Typ	Hersteller
Glasflaschen	100 – 2000 ml	Schott, Mainz (D)
Glas-Pipetten	5-25 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (D)
Konzentrator	Ultracel YM-50 15 ml 50 kDa MWCO	Millipore, Schwalbach (D)
Konzentrator	Vivaspin 6 6 ml 50 kDa MWCO	Sartorius stedim, Aubagne cedex (F)
Kulturröhrchen	13 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Magnetische Rührstäbe	Diverse Größen	VWR, Darmstadt (D)
Messzylinder (Glas)	Diverse Größen	Schott, Mainz (D)
Messzylinder (Plastik)	Diverse Größen	VWR, Darmstadt (D)
Metall-Spatel	Diverse Größen	VWR, Darmstadt (D)
Papiertücher	Kimtech Science	Kimberly-Clark, Koblenz (D)
Parafilm	M	Pechiney, Menasha (USA)
Petrischalen	92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen	0,2 – 1000 µl Tower-Pack	Gilson, Middleton (USA)
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäße	2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Röhrchen	15 ml – Falcon	Greiner Bio-One, Nürtingen (D)
Röhrchen	50 ml -Falcon	Greiner Bio-One, Nürtingen (D)
Skalpell	Chirurgische Einmalskalpelle	Braun, Melsungen (D)
Sterilfilter	Supor-450 0,45 µm	Millipore, Schwalbach (D)
Sterilfilter	Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht (D)
UZ-Röhrchen	Microfuge Tube	Beckman-Coulter, Krefeld (D)

4.13 Computer-Programme

Tabelle 4.19: Verwendete Web-basierende Datenbanken, Programme und Server.

Programm/ Datenbank	Internetseite	Referenz
Datenbank		
ARAMEMNON	http://aramemnon.uni-koeln.de/	(Schwacke et al., 2003)
NCBIInr database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
TAIR	http://www.arabidopsis.org	(Huala et al., 2001)
Programme		
BOXSHADE 3.21	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	
ExPASy	http://expasy.org/	(Gasteiger et al., 2003)
Graphical Codon Usage Analyser	http://gcu.schoedl.de/	(Fuhrmann et al., 2004)
Konvertierungsprogramm	http://molbiol.ru/ger/scripts/01_04.html	
DiChro Web	http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk	(Whitmore & Wallace, 2008)
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	(McEntyre & Lipman, 2001)
Server		
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/	(Krogh et al., 2001)
Tools von EMBL-EB	http://www.ebi.ac.uk/Tools/	(Goujon et al., 2010)

Tabelle 4.20: Verwendete Computer-Programme.

Programm	Hersteller/ Referenz
Acrobat Adobe	Adobe (D)
Chromas	Technelysium Pty Ltd
Clone Manager 9	Sci-Ed Software, Cary (USA)
Coral DRAW Graphics Suite X6	Corel (D)
Crystal Trak	Rigaku, Kent (U.K.)
EndNote X3	Thomson Reuters (Kanada)
MSpek	(Hellwig et al., 1999)
Office 2007/ 2010	Microsoft, Unterschleißheim (D)
Origin Pro 8.1G/ 8.5G/8.6G	Originlab, Northhampton (USA)
Unicorn Workstation 5.11	GE-Healthcare, München (D)
UV-Vis ChemStation	Agilent, Böblingen (D)

5 METHODEN

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit der ortsgerechten Mutagenese (*site directed mutagenesis*, SDM) können gezielt Punktmutationen in eine Proteinsequenz eingeführt werden. Benötigt werden hierfür Oligonukleotid-Paare, welche die gewünschte Mutation tragen. Entwickelt wurden das Verfahren von Michael Smith (Smith, 1985), der dafür 1993 mit dem Nobelpreis in Chemie geehrt wurde. Die Ansätze zur ortsgerechten Mutagenese wurden mit dem Quik-Change-II-SDM-Kit (siehe Tabelle 4.12) und den Oligodesoxynukleotiden aus Tabelle 4.7 durchgeführt. Für eine höhere Ausbeute an modifizierten Plasmid wurde zunächst pro Oligodesoxynukleotid ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl (siehe Tabelle 5.1) angesetzt. Es folgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem in Tabelle 5.2 spezifizierten Programm.

Tabelle 5.1: 50 μl Reaktionsansatz für die ortsgerechte Mutagenese von pTTQC-B mit jeweils einem Oligodesoxynukleotide.

Komponenten	Volumen [μl]
ddH ₂ O	32
Plasmid (5 bis 50 ng)	10
Oligodesoxynukleotid (10 pmol/ μl)	1,5
10-fach SDM-Puffer	5
dNTPs (Kit)	1
<i>Pfu Ultra</i> Polymerase (2,5 U/ μl ; Kit)	0,5

Jeweils 25 μl Reaktionsansatz des *Vorwärts*-Oligodesoxynukleotid-Ansatzes wurden mit 25 μl des *Rückwärts*-Oligodesoxynukleotid-Ansatzes vermischt. Es folgte ein weiterer Polymerase-Kettenreaktionsschritt (Tabelle 5.3, SDM II). Um die Ursprungs-DNA zu zerstören, folgte ein 2-stündiger DpnI-Verdau bei 37 °C. Die Transformation kompetenter XL1-Blue-Zellen erfolgte mit 1 μl des verdauten Ansatzes (siehe Abschnitt 5.2.1).

Tabelle 5.2: PCR-Protokoll (SDM I) der ortsgerichteten Mutagenese von pTTC-B mit jeweils einem Oligodesoxynukleotide.

Zyklen	Temp [°C]	Zeit [sek]
1	95	60
	95	50
4	60	50
	68	300
1	10	∞
1	10	∞

Tabelle 5.3: PCR-Protokoll (SDM II) der ortsgerichteten Mutagenese von pTTC-B mit beiden Oligodesoxynukleotiden.

Zyklen	Temp [°C]	Zeit [sek]
1	95	60
	95	50
14	60	50
	68	300
1	68	420
1	10	∞

5.1.2 Herstellung neuer pPIC3.5K-Expressionskonstrukte für den A-Paralog

Für die Herstellung neuer pPIC3.5K-Derivate wurde zunächst das Cytochrom b_{561} -A-DNA-Fragment inklusive Affinitätsanhängsel aus den pBAD-Vektoren (siehe Tabelle 4.5) mittels Polymerase-Kettenreaktionsschritt amplifiziert. Hierfür wurde der Ansatz nach Vorschrift der „Phusion High Fidelity“-PCR zusammen pipettiert (siehe Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: 50 µl Reaktionsansatz zur Amplifikation des Cytochrom b_{561} -A-DNA-Fragments inklusive Affinitätsanhängsel aus den pBAD-Vektoren.

Komponenten	Volumen [µl]
ddH ₂ O	35,5
Plasmid (5 bis 50 ng)	1
Oligodesoxynukleotid FW (10 pmol/µl)	1
Oligodesoxynukleotid REV (10 pmol/µl)	1
5-fach HF Puffer	10
dNTPs (10mM)	1
Phusion Polymerase (2U/µl; Kit)	0,5

Tabelle 5.5: PCR-Protokoll zur Amplifikation des Cytochrom b_{561} -A-DNA-Fragments inklusive Affinitätsanhängsel aus den pBAD-Vektoren.

Zyklen	Temp [°C]	Zeit [sek]
1	98	30
	98	30
14	63/ 59/ 67	30
	72	30
1	72	420
1	10	∞

Als Reaktionspuffer wurde der HF-Puffer des Kits und die Oligodesoxynukleotidpaare aus Tabelle 4.8 verwendet. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler mit dem Programm aus Tabelle 5.5 durchgeführt. Nach Amplifikation wurde das Produkt mit dem „QIAquick™ PCR Purification Kit“ gereinigt. Mittels Agarosegelelektrophorese (1 %ig) wurde das PCR-Fragment auf Reinheit und Größe untersucht. Im zweiten Schritt wurden nun das PCR-Produkt und der Zielvektor (pPIC3.5K, siehe Tabelle 4.5) nach Vorschrift mit den Restriktionsenzymen *Sna*BI und FastDigest® *Not*I für 1 Stunde bei 37 °C behandelt. Als Puffer wurde der Tango™-Puffer verwendet (siehe Tabelle 4.10). Eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte durch eine Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten (*Sna*BI) und eine Inkubation bei 80 °C für 5 Minuten (FastDigest® *Not*I). Für die Reinigung beider Produkte,

geschnittener Vektor und geschnittenes PCR-Produkt, wurde eine Gel Extraktion (siehe Tabelle 4.12) nach Vorschrift durchgeführt und die Konzentration bestimmt (siehe Abschnitt 5.1.4). Für die Ligation wurden in verschiedene Ansätzen das Verhältnis von PCR-Produkt zu Zielvektor, wie auch die Temperatur und die Ligationsdauer variiert: 1:1, 1h, RT; 1:1, üN, RT; 3:1, 1h, RT; 3:1, üN, RT. Die verschiedenen Ansätze wurden nach Anleitung zusammenpipettiert. Es wurden, wie im Kit empfohlen, 5 U T4 Ligase und 5 % PEG 4000 (EK) verwendet (siehe Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: 20 µl Ligationsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Insert zu Zielplasmid.

Komponenten	<u>1:1</u>	<u>3:1</u>
	Volumen [µl]	Volumen [µl]
ddH ₂ O	add 20 µl	add 20 µl
Plasmid	x ₁	x ₃
Insert	y ₁	y ₃
10-fach Puffer	2	2
PEG 4000	2,5	2,5
T4 Ligase	1	1

x₁: Volumen des Plasmids für einen 1:1-Ansatz; y₁:
 Volumen des Inserts für einen 1:1-Ansatz; x₃:
 Volumen des Plasmids für einen 3:1-Ansatz; y₃:
 Volumen des Inserts für einen 3:1-Ansatz

Die Ligationsansätze wurden direkt für die Transformation von kompetenten XL1-Blue-Zellen verwendet (siehe 5.2.1). Isolierte Klone (siehe Abschnitt 5.2.2) wurden in einer *whole-cell*-PCR untersucht. Es wurde das BIOTAQ™ Red DNA Polymerase Kit (siehe Tabelle 4.12) verwendet. Dafür wurden 2 µl Zellkultur verwendet und die Sequenzier-Oligonukleotide 5'AOX1 und 3'AOX1. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 5.7 zusammen pipettiert.

Tabelle 5.7: Reaktionsansatz für *whole-cell*-Analyse im 50 µl-Maßstab.

Komponenten	Volumen [µl]
ddH ₂ O	31,5
Zellsuspension	2
Oligodesoxynukleotid FW (10 pmol/µl)	2,5
Oligodesoxynukleotid REV (10 pmol/µl)	2,5
10-fach Biotaq Puffer	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	4
<i>Biotaq Red</i> Polymerase (5U/µl; Kit)	1

Tabelle 5.8: *whole-cell*-PCR-Protokoll zur Herstellung neuer pPIC3.5K-Derivate.

Zyklen	Temp [°C]	Zeit [sek]
1	94	30
	94	30
14	55	30
	72	30
1	72	420
1	10	∞

In einem Thermocycler wurde die Reaktion mit dem Programm aus Tabelle 5.8 durchgeführt. Analysiert wurde die PCR auf einem 1 %igen Agarosegel in der Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 5.7.1). Positive Klone wurden nun im 50 ml bzw. 250 ml Maßstab für eine Plasmidisolierung und eine anschließende Sequenzierung angezogen (siehe Abschnitt 5.1.3 und 5.1.5).

5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Es wurden 50 ml einer *über Nacht-E. coli* Kultur pelletiert (7000g, 10 Min., 4 °C). Es folgte eine Zellyse nach Birnboim & Doly (1979) und die Plasmid-DNA wurde mittels „*peqGold II MiniPlasmid*“ Kit nach Anweisungen isoliert.

5.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit einem Ultraspec 2100 Pro Spektrometer und der Tray Cell Küvette (siehe Tabelle 4.17) wurde die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA bestimmt. Gemessen wurde die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}). Durch den Quotienten A_{260} zu A_{280} konnte die Reinheit bestimmt werden. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

5.1.5 Sequenzierung der Plasmide und Verifizierung des Kodonaustausches

Die Sequenzierungen in der vorliegenden Arbeit wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Analysiert wurden die Daten mit den Programmen Clone Manager 9 und Chromas (siehe Tabelle 4.20).

5.2 Kultivierung von *E. coli* und CYBASC-Produktion

5.2.1 Transformation von *E. coli* K12 (modifiziert nach Cohen et al., 1972)

Die Übertragung löslicher DNA auf ein Empfängerbakterium wird als Transformation bezeichnet. Kompetente *E. coli* Zellen wurden hierfür mit 5 bis 50 ng Plasmid für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Die Zellen wurden für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert und danach in 500 µl NZYM-Medium überführt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm, Minitron). 200 µl der Kultur wurden auf einer NZYM-Agarplatte (+ 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen. Wurden kompetente Zellen mit Ansätzen einer ortsgerichteten Mutagenese- oder Ligation transformiert, wurde die 500 µl-Kultur pelletiert (7000xg, 10 min, 20 °C), in 200 µl NZYM-Medium resuspendiert und auf eine NZYM-Agarplatte (+ 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

5.2.2 Zellanzucht

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden einzelne Klone von einer NZYM-Agarplatte (+ 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) in 1 ml bzw. 5 ml NZYM-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) überführt. Der Ansatz wurde über Tag (1 ml) oder über Nacht (5 ml) bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kulturen bei 4 °C gelagert.

5.2.3 Herstellung von Dauerkulturen

Um verifizierte transformierte *E. coli*-Klone langfristig aufbewahren zu können, wurden Glycerol-Dauerkulturen der Proben angelegt. *E. coli* Klone wurden dafür über Nacht in 5ml NZYM mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol inkubiert. 500 µl dieser Bakterienkultur wurden mit 500 µl sterilem Glycerol vermischt, 30 Minuten bei RT geschüttelt und dann bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte (OD) von Zellkulturen wurde mit einem Zell-Densitometer (WPA CO8000, Biowave) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Blindwert wurde steriles NZYM-Medium verwendet.

5.2.5 Zellanzucht und Proteinproduktion im analytischen Maßstab

Über Nacht wurde eine Einzelkolonie in 5 ml NZYM mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol bei 37 °C und 200 rpm (Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 200 ml bis 500 ml NZYM-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) über Tag inokuliert. Mit einem Spektrometer (WPA CO8000) wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurde die Kultur in jeweils 10 ml aufgeteilt und jeder Ansatz wurde unterschiedlich behandelt (siehe Tabelle 5.9). Nach 3 h, 5 h und 20 h (*über Nacht*) folgte eine Probenentnahme. Zu jedem Zeitpunkt wurde die optische Dichte (OD_{600}) bestimmt und 2 ml Zellkultur pelletiert (7000g, 4 °C, 10 min). Das Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert. Für spätere SDS-PAGE und Western Blot Analysen (siehe Abschnitt 5.7) wurde jedes Zellpellet in einem bestimmten Volumen resuspendiert, so dass eine OD_{600} von 10 in jeder Probe eingestellt war.

Tabelle 5.9: Auflistung der untersuchten Produktionsbedingungen im Expressionssystem *E. coli*.

Induktor	<i>E. coli</i> transformiert mit	
	pBAD-Vektor	pTTQ-Vektor
	L-Arabinose	IPTG
Induktorkonzentration	0 %; 0,002 %; 0,2 %; 2 %; 5 %	0 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 250 μ M; 500 μ M
Dauer	3 h; 5 h; 20 h (<i>über Nacht</i>)	3 h; 5 h; 20 h (<i>über Nacht</i>)
Temperatur	20 °C 30 °C 33 °C 37 °C	30 °C 33 °C 37 °C

5.2.6 Zellanzucht und Proteinproduktion im präparativen Maßstab

Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml NZYM mit 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 100 μ g/ml Ampicillin und 35 μ g/ml Chloramphenicol *über Tag* inkubiert (37 °C, 200 rpm, Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Mit dieser Kultur wurden 500 ml bzw. 200 ml NZYM-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 100 μ g/ml Ampicillin und 35 μ g/ml Chloramphenicol) inokuliert. Am darauffolgenden Tag wurden 24 L bzw. 12 L NZYM-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 100 μ g/ml Ampicillin und 35 μ g/ml Chloramphenicol mit dieser *über Nacht*-Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte nun zunächst bei 37 °C und 160 rpm (Multitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Für die Produktion des B-Paralogs und dessen Varianten wurde beim Erreichen einer OD₆₀₀ von ~ 0,45 die Temperatur auf 33 °C herabgesetzt. Die Induktion mit 250 μ M IPTG erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6. Die anschließende Produktionsdauer war 3 h. Die Produktion des A-Paralogs wurde bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Auch hier erfolgte die Induktion bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6 mit 0,2 % Arabinose und die Produktionsdauer belief sich auf 3 h bzw. 5 h. Die Zellernte erfolgte für beide Paraloge durch einen Zentrifugationsschritt bei 7500g, 8 °C für 15 Minuten. Das Zellpellet wurde bis zur Zellyse mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

5.3 Zellyse und Membranpräparation

Das Zellpellet wurde im Verhältnis 1:3 (Feuchtwicht (g):Puffer (ml)) in kaltem Aufschlusspuffer (siehe Tabelle 4.9) resuspendiert und homogenisiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe des Emulsi-Flex C3 (Avestin). Es wurden drei Durchgänge bei ~ 800 bar durchgeführt. Die Membranpräparation erfolgte durch einen Ultrazentrifugationsschritt bei 43 000 rpm (45 Ti Rotor,

Beckmann) für 1 Stunde bei 4 °C. Bis zur weiteren Verwendung, wurde das Membranpellet mit flüssigen N₂ schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

5.4 Solubilisierung der heterolog produzierten CYBASC-Proteine

5.4.1 Solubilisierung des Membranpellets im analytischen Maßstab

Das Membranpellet aus Abschnitt 5.3 wurde in 1-fachen Tris 300- oder 1-fachen Tris 20-Puffer (siehe Tabelle 4.9) resuspendiert, so dass die Membrankonzentration auf 50 mg/ml bzw. 100 mg/ml eingestellt war. Die Solubilisierung durch die Zugabe der Detergenzien (siehe Tabelle 4.16) erfolgte bei 4°C für eine Stunde in Dunkelheit in Rotation. Die Detergenzkonzentration lag dabei bei 1 %. Die Separation von Solubilisat und Pellet wurde durch einen Ultrazentrifugationsschritt (Optima Max-E mit den Rotoren TLAS100.3 und TLA110, 68000 rpm, 4 °C, 2 Stunden) durchgeführt. Analysiert wurden die Fraktionen der Solubilisierung im SDS-Gel und Westernblot (siehe Abschnitte 5.7.3, 5.7.4 und 5.7.7) sowie Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (siehe Abschnitt 5.11).

5.4.2 Solubilisierung des Membranpellets im präparativen Maßstab

Das Membranpellet aus Abschnitt 5.3 wurde im Solubilisierungspuffer (siehe Tabelle 4.9) resuspendiert und homogenisiert. Die Membrankonzentration betrug 200 mg/ml bis 400 mg/ml. Nach Zugabe von 1 % LDAO, erfolgte die Solubilisierung bei 4 °C für eine Stunde in Dunkelheit unter leichtem Rühren. Im Gegensatz zu L. Cenacchi (2007) erfolgte keine Zugabe von 2,5 mM Ascorbat. Die Separation von solubilisierter und nicht-solubilisierter Fraktion erfolgte durch einen Ultrazentrifugationsschritt bei 43 000 rpm (45 Ti Rotor, Beckmann) für 1 Stunde bei 4 °C. Der Überstand wurde zur Proteinreinigung verwendet, da durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren das heterolog produzierte Protein nachgewiesen wurde.

5.5 Reinigungsstrategien

Proteinreinigungen wurden mit Chromatographie-Säulen (siehe Tabelle 4.13) und der Chromatographiestation Äkta Purifier FPLC-System durchgeführt. Über die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen konnte die Reinigung analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wellenlängen $\lambda_1 = 280$ nm (Absorption der Gesamtproteinmenge), $\lambda_2 = 415$ nm (Absorption des Porphyrinring der Häm-Gruppe von Häm-haltigen Proteinen) und/ oder $\lambda_3 = 561$ nm (spezifische Absorption für Cytochrom *b*₅₆₁) verwendet. Zur Überprüfung des Reinigungserfolgs wurden die Wasch- und Elutionsschritte in SDS-PAGE (siehe Abschnitt 5.7) und durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren ausgewertet (siehe Abschnitt 5.11). Bei Reinigungen im *Batch*-Verfahren

oder mit den Gravitationsfluss-Säulen (siehe Tabelle 4.13 und Abschnitte 5.5.5 und 5.5.6) konnte die Reinigung nicht über die Absorption beobachtet werden. Hier erfolgte nur die nachträglich Auswertung durch SDS-Gele (siehe Abschnitt 5.7) und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (siehe Abschnitt 5.11). Für alle Reinigungen wurden die verwendeten Puffer aus Tabelle 4.9 filtriert und anaerobisiert.

5.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Die am häufigsten verwendete Trennmethode ist die Ionenaustauschchromatographie. Hierbei binden geladene Proteine über Wechselwirkungen an die Säulenmatrix. Durch die stetige Zugabe von Salzionen, werden die gebundenen Proteine verdrängt und eluiert (Lottspeich et al., 2006). Für diesen Reinigungsschritt wurde die Membranfraktion im Solubilisierungspuffer mit Tris20-Puffer solubilisiert. Die Reinigung wurde mit dem Äkta Purifier FPLC und verschiedenen Ionenaustauschersäulen (5 ml HiTrap DEAE FF, 1 ml HiTrap SP FF und 1 ml HiTrap CM FF Säule (GE Healthcare, München (D))) durchgeführt. Das Solubilisat wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Es folgte ein Waschschriff mit dem A-Ionen-Puffer bis zum Erreichen der Basislinie bei 280 nm. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen NaCl (B-Ionen-Puffer) Gradienten bis zu 1 M. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt.

5.5.2 Immobilisierte Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) mit dem Äkta Purifier FPLC-System

Bei der immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) werden Metalle an die Säulenmatrix gebunden. Die Interaktion erfolgt zwischen dem Metall und dem Poly-Histidin-Affinitätsanhängsel des Proteins (Porath et al., 1975). Die Elution resultiert durch die kontinuierliche Zugabe von Imidazol (oder Histidin). Imidazol ist die funktionelle Gruppe des Histidins, so dass dieses mit dem Poly-Histidin-Affinitätsanhängsel des Proteins um die Metallionen konkurriert. Eine weitere Möglichkeit der Elution ist die Senkung des pH-Wertess (Lottspeich et al., 2006). Für die Reinigung wurden 1 ml oder 5 ml Säulen (HisTrap HP oder HiTrap Chelating HP Säulen; GE Healthcare, München (D)) verwendet. Das Solubilisat wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 bis 1 ml/min auf die Säule über Nacht aufgetragen. Es folgte ein Waschschriff mit dem Säulenpuffer A-IMAC (siehe Tabelle 4.9). Bei diesem Schritt konnte ein Detergenzaustausch durchgeführt werden. Die Elution erfolgte zunächst mit dem Puffer 10 mM NaPhos, 250 mM Histidin, pH 7, 2; 10 % Glycerol; 0,1 % β -LM. Allerdings wurde im weiteren Verlauf der neue Elutionspuffer B-IMAC (500 mM Histidin, pH 5,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol und 0,01 % β -LM bzw. 0,1 % LDAO) verwendet (siehe Abschnitte 6.4 und 6.7.1). Die Fraktionen wurden aufgefangen und in 1 ml bis 2 ml Fraktionen gesammelt.

5.5.3 Affinitätsreinigung mittels Streptavidin-Affinitätsanhängsel mit dem Äkta Purifier FPLC-System

Das Streptavidin-Affinitätsanhängsel (Strep) ist ein aus 10 Aminosäuren bestehendes Peptid (S A W R H P Q F G G). Aufgrund der selektiven Bindung zwischen Affinitätsanhängsel und der Streptavidin-Matrix (Strep-Tactin) kann eine Ein-Schritt-Reinigung von heterolog produziertem Protein durchgeführt werden. Die Elution erfolgt mit Desthiobiotin, welches ein Derivat des natürlichen Streptavidin-Bindepartners Biotin ist (Schmidt & Skerra, 2007). Die solubilisierete Fraktion (siehe Abschnitt 5.4.2) wurde auf eine in A-Strep-Puffer äquilibrierte 1 ml-bzw., 5 ml-Säule (1 ml StrepTrap HP bzw. 5 ml fertig gepackt Strep-Tactin[®] Sepharose[®] Cartidge H-PR) aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug hierbei 0,2 bis 1 ml/min. Danach erfolgte ein Waschschrift mit A-Strep-Puffer (0,1 % LDAO oder 0,01 % β -LM). Hierbei konnte ein Detergenzaustausch durchgeführt werden. Das Volumen dieses Waschschriftes lag zwischen 10 und 30 Säulenvolumina. Die Elution erfolgte durch den B-Strep Puffer (siehe Tabelle 4.9). Für diese Reinigungsstrategie wurde kein Gradient verwendet.

5.5.4 Reinigung im *Batch*-Verfahren

Die verwendete Matrix (Ni²⁺ NTA-Agarose bzw. Strep-Tactin[®] Sepharose[®] 50% Suspension) wurde zunächst mit destilliertem Wasser verdünnt und zentrifugiert (3000g, 10 min, RT). Es folgte eine Äquilibrierung im Solubilisationspuffer oder auch in 1-fachen Tris 300 Puffer (siehe Tabelle 4.9). Die Matrix wurde erneut zentrifugiert. Die solubilisierete Fraktion (aus Abschnitt 3.4.3) sowie auch Reinigungsfractionen vorangegangener Reinigungsschritte wurden für mindesten 3 Stunden bzw. *über Nacht* mit der Matrix unter leichtem Rühren inkubiert. Die Suspension wurde in eine leere PD-10-Säule überführt. Das Resin mit dem gebundenen Protein wurde nun mit 30 ml bis 50ml A-IMAC- bzw. A-Strep-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 200- μ l bis 500 μ l-Schritten mit dem B-IMAC-, bzw. B-Strep-Puffer. Dieses Verfahren wurde unter anderem für Detergenziaustausche verwendet.

5.5.5 Gravitationsfluss-Affinitätsreinigung mittels Streptavidin-Affinitätsanhängsel

Die solubilisierete Proteinlösung wurde auf die äquilibrierte Gravitationsfluss-Säule gegeben (siehe Tabelle 4.13). Danach folgte ein Waschschrift mit 15 ml Waschpuffer A-Strep-Puffer (siehe Tabelle 4.9). Die Elution erfolgte in 6 500 μ l-Schritten des Strep-Puffers (siehe Tabelle 4.9). Die Auswertung der Reinigung erfolgte durch SDS-PAGE.

5.5.6 Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie im analytischen Maßstab

Proteine in einer Lösung können aufgrund ihrer Größe in einer Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt werden. Die Säulenmatrix besteht bei einer Größenausschlusschromatographie

aus porösem Trägermaterial (Lottspeich et al., 2006). Kleinere Proteine können in dieses eindringen, sodass das Elutionsvolumen verzögert wird. Neben der Protein-Auftrennung kann durch die Größenausschlusschromatographie und der Kalibrierung mit definierten Proteinen das Molekulargewicht unbekannter Proteine durch deren Elutionsvolumen bestimmt werden (Andrews, 1964). Für die Kalibrierung der Größenausschluss säule (Superdex 200 5/150, GE Healthcare, München (D)) wurde das Kalibrierungs-Kit „Gel Filtration Calibration Kit-Low Molecular Weight“ (GE Healthcare, München (D)) sowie Aldolase (siehe Tabelle 4.11). Die Proteine wurden nach vorgeschriebener Konzentration in PBS-Puffer (siehe Tabelle 4.10) gelöst. Für die Chromatographieläufe wurde 1-fach Tris 300 Puffer (siehe Tabelle 4.9) verwendet und die Fließgeschwindigkeit lag bei 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zur Bestimmung des Totvolumens V_0 der Säule wurden 3 Gelfiltrationsschritte mit Blue Dextran 2000 durchgeführt. Das experimentell bestimmte Totvolumen dieser Säule mit 1-fachem Tris 300-Puffer lag bei 1,17 ml. Für die Kalibrierung wurden verschiedene Protein-Mix-Ansätze (a, b und c) verwendet (siehe Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10: Verwendete Proteine für die Kalibrierung der analytischen Größenausschlusschromatographie.

Mix	Protein	MW [kDa]	V_{ret}	K_{AV}
	Blue Dextran 2000	2000	1,17 ml = V_0	
b, c	Aldolase	158	1,93	0,68306
a	Conalbumin	75	1,78	0,56831
b	Ovalbumin	44	2,13	0,52459
a	Karbon Anhydrase	29	2,21	0,4153
a, b, c	Ribonuklease A	14	2,4	0,33333

MW: *molecular weight*, Molekulargewicht; kDa: Kilo Dalton; V_{ret} : Elutionsvolumen; K_{AV} : Verhältnis von Porengröße der Säule zu Protein; V_0 : Totvolumen der Säule Superdex 200 5/150, welches mittels Blue Dextran 2000 bestimmt wurde.

Mit den Elutionsvolumina V_E der Proteine, dem Tot- und dem Säulenvolumen konnte die Kalibrierungskurve berechnet werden:

Formel 5.1: Berechnung der Kalibrierungskurve

$$K_{\text{AV}} = \frac{V_{\text{ret}} - V_0}{V_C - V_0}$$

K_{AV} : Verhältnis von Porengröße der Säule zu Protein; V_{ret} : Elutionsvolumen; V_C : Säulenvolumen; V_0 : Totvolumen der Säule Superdex 200 5/150

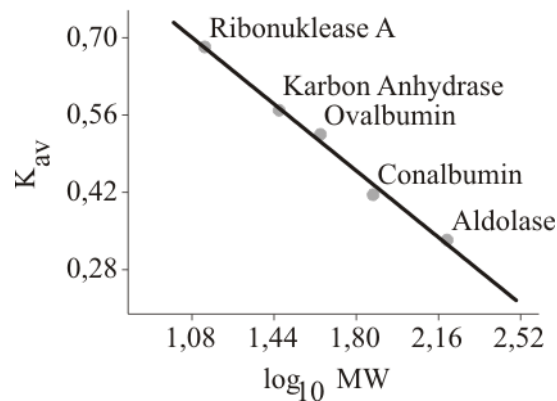


Abbildung 5.1: Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie Säule Superdex 200 5/150.

Die verwendeten löslichen Proteine waren Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Karbon Anhydrase (29 kDa) und Ribonuklease (14 kDa). Aus dem Logarithmus 10 des Molekulargewichtes und dem K_{AV} -Wert ergab sich die Geradengleichung (siehe Formel 5.2).

Für spätere Überprüfungen durch SDS-PAGE wurden die Kalibrierungsläufe in 100 μ l-Fractionen gesammelt.

5.5.7 Größenausschlusschromatographie im analytischen Maßstab

Die Größenausschlussssäule wurde mit dem Tris300-Puffer (inklusive einem Detergenz) äquilibriert. Untersucht wurde die Detergenz-Protein-Mizelle mit 0,01 % β -LM, 0,1 % DM und 0,1 % LDAO. Es wurde jeweils eine 50 μ l-Probe injiziert. Das Eluat wurde in 100 μ l-Fractionen aufgefangen. Diese wurden später durch SDS-PAGE (siehe Abschnitt 5.7.4 und 5.7.6) und mit Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (siehe Abschnitt 5.11) analysiert. Die Bestimmung der molekularen Massen durch die Elutionsvolumina erfolgte mit der Formel 5.2.

Formel 5.2: Gleichung zur Bestimmung der molekularen Massen in der analytischen Größenausschlusschromatographie.

$$K_{AV} = -0,34 \cdot (\log_{10} MW) + 1,07$$

K_{AV} : Verhältnis von Porengröße der Säule zu Protein; MW: *Molecular weight*, Molekulargewicht in kDa; $R^2 = 0,98919$.

5.5.8 Größenausschlusschromatographie im präparativen Maßstab

Ni²⁺-IMAC gereinigtes Protein wurde mit Hilfe von Konzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 50 kDa auf ein Volumen von 5 ml eingengt. Die Größenausschluss säule (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare, München (D)) wurde im NaPhos-Puffer mit 0,1 % β -LM (siehe Tabelle 4.9) äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren analysiert. Fraktionen, die das Protein beinhalteten, wurden für spätere Kristallisationsansätze vereinigt und auf ein Volumen von 20 mg/ml eingengt. Die Größenausschlussgrenze der Konzentratoren betrug 50 kDa (siehe Tabelle 4.18).

5.6 Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford, 1976

Die quantitative Proteinbestimmung beruht auf der Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 mit Proteinen.

Dafür wurden 20 μ l-Probe in eine Küvette mit 1 ml 1-fach Bradford-Lösung vermischt (siehe Tabelle 4.10). Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Leerwert diente der Probenpuffer oder destilliertes Wasser. Die Kalibrierung wurde mit einer BSA-Standardreihe durchgeführt.

5.7 Elektrophoretische Techniken und Färbemethoden

5.7.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von verschieden langen DNA-Fragmenten wurde in 1 %igen Agarosegelen durchgeführt (Sambrook & Russel, 2000). Als Größenmarker diente der 1 kB DNA-Standard (siehe Tabelle 4.11). Anschließend wurde das Gel für 15-20 min mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml) gefärbt und die DNA-Banden nach Anregung mit einem Transilluminator (Wellenlänge: 302 nm) fotografiert.

5.7.2 Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Gelen

Nach einem modifizierten Protokoll (Laemmli, 1970) wurden die SDS-Gele mit dem Tris-Glycin Puffersystem hergestellt. Verwendet wurde hier das System von BioRad. Die Zusammensetzung der Gele und des SDS-Laufpuffers lassen sich aus Tabelle 4.10 entnehmen.

5.7.3 Diskontinuierliche SDS-Gele im Tris-Glycin Laufpuffer

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht erfolgte nach Shapiro et al., 1967. Dafür wurden die Proteinproben mit 4-fach Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 4.10 (Laemmli, 1970)) versetzt und 30 min bei 40 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Je Probe wurden zwischen 7 µl und 12 µl pro Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proteinproben im elektrischen Feld erfolgte bei einer Stromstärke I von 45 mA für 30 bis 40 Minuten.

5.7.4 Diskontinuierliche SDS-Gele im MES Laufpuffer.

Das Auftrennen der Proteinproben in einem NuPAGE® Bis-Tris-Gel (Polyacrylamid-Gradient 4-12 %) erfolgte bei einer Stromspannung U von 200 mV. Hierfür wurde für das System der abgestimmte Probenpuffer NuPAGE® LDS Sample Puffer und der Laufpuffer NuPAGE® MES SDS Running Puffer (Invitrogen) verwendet (siehe Tabelle 4.10).

5.7.5 Coomassie-Färbung der aufgetrennten Proteine in SDS-Gelen

Das Anfärben der aufgetrennten Proteine im SDS Gel erfolgte durch den Farbstoff Coomassie, welcher sich an basischen Seitenketten anlagert (Kang et al., 2002). Die Nachweisgrenze liegt hierbei nur bei 0,1 bis 1 µg Protein pro Bande. Die SDS-Gele wurden in Coomassie-Lösung (siehe Tabelle 4.10) aufgeköcht. Es folgte ein Inkubationsschritt von 10 Minuten. Für das Entfärben wurden die SDS-Gele in einer 10 %igen Essiglösung ein weiteres Mal gekocht.

5.7.6 Silber-Färbung von SDS-Gelen

Im Gegensatz zur Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung eine wesentlich sensitivere Methode, um Proteine anzufärben. Hierbei können Proteinbanden im Nanogramm-Bereich detektierbar gemacht werden. Die SDS-Gele wurden nach Anleitung mit dem Bio-Rad „Silver Stain“-Kit behandelt.

5.7.7 Elektrotransfer und Detektion der Cytochrom b_{561} -Proteine

Im SDS-Gel aufgetrennte Proteine werden in einem elektrischen Feld auf eine Trägermembran übertragen. Die Bindung zwischen Makromolekül und Nitrozellulose-Membran erfolgt über Wechselwirkungen. Die Detektion der Proteinbande erfolgt durch eine darauffolgende Antikörperfärbung (Lottspeich et al., 2006). Das SDS-Gel, die Membran und die Filterpapiere wurden zunächst für 10 Minuten im Transferpuffer inkubiert behandelt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine im SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Towbin et al., 1979, Burnette, 1981) erfolgte im „Semy Dry“-Verfahren (Trans-Blot SD Cell, BioRad). Die Stromstärke I betrug hierbei $0,5 \text{ mA/cm}^2$ für 45 Minuten. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran für eine Stunde mit der SMARTBLOCK-Lösung bei 4 °C inkubiert. Für die Immundetektion erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (monoklonaler -Poly-Histidin-Antikörper aus Maus) in der

SMARTBLOCK-Lösung über Nacht. Die Verdünnung betrug hierbei 1:2000. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3-mal in TBST-Puffer (siehe Tabelle 4.9) gewaschen. Dann wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem α -Maus-IgG (IgG Hase; gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase; Verdünnung 1:4000 in SMARTBLOCK-Lösung) inkubiert und es folgte wieder 3-maliges Waschen mit dem TBST-Puffer. Anschließend wurde die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase mit 10 ml Färbelösung (1 Tablette NBT/BCIP complete in 10 ml H₂O) gestartet. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Auswaschen der Substrate mit H₂O gestoppt.

5.8 Proteinidentifizierung mittels MS/MS Experimenten

Die Methode *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) dient der Identifikation unbekannter Protein. Hierbei wird das Protein proteolytisch verdaut und die Peptide werden durch eine Chromatographiesäule getrennt. Die einzelnen Peptide werden dann durch eine Ionisierungsquelle ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Aufgrund ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses und der daraus folgenden Flugzeit können sie durch den Abgleich mit Proteindatenbanken identifiziert werden (Lottspeich et al., 2006). Die Proteinproben wurden zunächst im SDS-Gel aufgetrennt (siehe Abschnitt 5.7). Die zu untersuchende Proteinbande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und es folgte ein Chymotrypsin- sowie Trypsin und Chymotrypsin-Verdau nach Anleitung (Proteoextract Digestion Kit, CalBiochem). Die proteolytisch verdauten Fragmente wurde über eine nano-HPLC (Proxeon easy-nLC) und eine Reverse-Phase-Säule (Lade-Säule: Partikelgröße 3 μ m, C18, L=20mm; analytische Säule: Partikelgröße 3 μ m, C18, L=10cm; NanoSeparations, Nieuwkoop, NL) voneinander getrennt. Die verwendeten Puffer waren 0, 1 % Ameisensäure in H₂O (A-Puffer) und die Elution erfolgte mit 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B-Puffer). Für die Elution wurde ein linearer Gradient von 5 % zu 65 % des B-Puffers mit einer Dauer von 45 Minuten und einer Flussrate von 300 nl/min verwendet. Die eluierten Peptide wurden mit einem nano Sprayer ionisiert (Bruker Apollo ESI-Quelle) und die Analyse erfolgte in einem Quadrupol-ToF-Massenspektrometer (Bruker maXis). Über den gesamten Gradienten wurden Massenspektren in einem Massenbereich von 50 m/z bis 2200 m/z aufgenommen, wobei Sequenzinformationen zu den eluierenden Peptiden über vollautomatisierte, datenabhängige Aufnahme von Tandem-Massenspektren gewonnen wurde. Die weitere Datenprozessierung wurde mit der Software Bruker DataAnalysis 4.0 (Service Pack 1 Build 253) durchgeführt. Eine Rekalibrierung der gewonnenen Daten und eine dadurch genauere Identifikation der Proteinfragmente, konnte durch die Analyse autoproteolytische Chymotrypsinfragmente durchgeführt werden. Durch den Abgleich der generierten Massenlisten mit der NCBI Inr Datenbank (siehe Tabelle 4.19) auf einem lokalen Mascot Server (Version 2.2.2, Matrix Science (UK)) konnten die Proteine identifiziert werden. Die Datenvalidierung erfolgte manuell mit der Software BioTools 3.1 (Bruker Daltonics). Durchgeführt wurde die Elektrosprayionisations-

Masenspektrometrie am Max Planck Institut für Biophysik (Frankfurt am Main) in Zusammenarbeit mit Dr. Julian Langer.

5.9 DEPC-Inkubation der heterolog produzierten CYBASC-Paraloge

Reines Protein in NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.9) wurde zunächst mit 400 μM Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert. Die Proteinprobe wurde mit Hilfe einer PD-10 Säule vom Kaliumhexacyanoferrat (III) getrennt und in drei Proben aufgeteilt (siehe Tabelle 5.11):

Tabelle 5.11: Zusammenfassung der Arbeitsschritte bei Behandlung mit DEPC.

Arbeitsschritt	Probe		
	Kontrolle	DEPC	DEPC + Ascorbat
Inkubation (1 h, RT, unter Rühren im Dunkeln)		10 mM DEPC	10 mM DEPC und 25 mM Ascorbat
Proteinseparation durch eine PD-10 Säule		+	+
Einengen der Proben auf (15 bis 20 mg/ml)	+	+	+

Die behandelten Proben wurden mittels CD-Spektroskopie, Bestimmung der E_M -Werte, direktem Aktivitätstest und thermodynamischem Aktivitätstest analysiert.

5.10 Ascorbat-Inkubation der CYBASC-Paraloge

Die gereinigten Proteinproben wurden für die thermodynamischen Analysen mit 40 mM Ascorbat für 1 Stunde in Dunkelheit inkubiert. Ascorbat wurden mittels PD-10 Säulen vom Protein getrennt. Für die kinetischen Analysen erfolgte die Inkubation mit Ascorbat mit einer Konzentration von 100 mM über Nacht bei 4 °C. Auch hier wurde am darauffolgenden Tag das Protein durch eine PD-10 Säule vom Ascorbat abgetrennt. Der verwendete Puffer war der NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.9).

5.11 Bestimmung des Protein- und Hämgehalts

5.11.1 Bestimmung nach Liu et al., 2005

Die Konzentration der CYBASC-Paraloge wurde mit der von Liu beschriebenen Methode durchgeführt (Liu et al., 2005). Hierfür wurde ein Spektrum einer vollständig oxidierten (durch Kaliumhexacyanoferrat (III)) Probe und ein Spektrum einer vollständig reduzierten Probe (durch Na-Dithionit) aufgenommen (**Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektrum** (Differenzspektrum)). Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch die Formeln 5.3 und 5.4.

Formel 5.3: Bestimmung des Hämgehalts.

$$\text{Hämgehalt [mM]} = \frac{A_{561} - A_{575}}{\epsilon_{561-575}}$$

$\epsilon_{561-575}$: 34,2 mM⁻¹ cm⁻¹ (Liu *et al.*, 2005); A_{561} :
Absorption bei 561 nm; A_{575} : Absorption bei
575 nm

Formel 5.4: Bestimmung der Menge (in µg) an Cytochrom b_{561} :

$$\text{Cytochrom } b_{561} [\mu\text{g}] = \frac{\text{Hämgehalt (aus Formel 5.3) [mM]} \cdot 1000 \cdot V_{\text{Proteinlsg}} [\text{L}] \cdot MW \left[\frac{\text{kg}}{\text{mol}}\right]}{2 (\text{Hämgruppen})}$$

MW (Molekulargewicht): 27,5 kg/ mol für den A-Paralog und 28,0 kg/mol für den B-Paralog; $V_{\text{Proteinlsg}}$:
Volumen der Proteinlösung (Stammlösung) in Liter

5.11.2 Bestimmung mit der Alkalische Pyridin-Fe(II)-Methode

Die Anzahl der gebundenen Häme kann mit Hilfe der Alkalische Pyridin-Fe(II)-Methode bestimmt werden. Bei dieser Methode Die Häm-Gruppen des denaturierten Proteins dabei werden über Pyridinmoleküle koordiniert. Der Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 550 nm (-Bande) mit einem Absorptionsminimum bei 536 nm (Berry and Trumpower, 1987). Hierfür werden 750 µl Proteinprobe (1 – 10 µM) mit 180 µl Pyridin (100 %) und 90 µl Natronlauge (1 M) vermischt. Die Lösung wird auf zwei Küvetten aufgeteilt. Die Probe in der Referenzküvette wird mit 2,5 µl Kaliumhexacyanoferrat (III) (10 mM) oxidiert. Die Probe der Messküvette wird durch die Zugabe einer Spatelspitze Na-Dithionit reduziert. Es werden Spektren im Bereich von 400 nm bis 600 nm aufgenommen. Aus dem Differenzspektrum wird die Absorptionsdifferenz $A_{550}-A_{536}$ ermittelt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz kann nun der Extinktionskoeffizient (Lottspeich *et al.*, 2006) berechnet werden. Die Anzahl der Häm-Gruppen ergibt sich aus dem Verhältnis der berechneten Extinktionskoeffizienten (Abt, 1998).

5.12 Aktivitätsbestimmung

5.12.1 Spektroskopie der Ascorbat-abhängigen Reduzierbarkeit und der Eisen-abhängigen-Oxidation

Die Messungen zur Ascorbat-abhängigen Reduzierbarkeit wurden mit dem Spektrometer Agilent 8453 durchgeführt. Die Temperatur wurde konstant bei 24 °C gehalten und der CYBASC-KP_i-Puffer (siehe Tabelle 4.9) wurde verwendet. Zunächst wurde ein Spektrum des Puffers ohne Proteinprobe aufgenommen, welches als Leerwert verwendet wurde. In weiteren Ansätzen wurden Spektren der CYBASC-Proteinproben zu verschiedenen Zeitpunkten (T₀: direkt nach Zugabe, T₅ = 5 Minuten nach Zugabe und T₁₅ = 15 Minuten nach Zugabe) nach Zugabe von Ascorbat in verschiedene Konzentrationen (5 μM, 2 mM 80 mM) aufgenommen. Als Kontrollmessungen wurden immer Spektren des vollreduzierten Proteins durch Na-Dithionit aufgenommen. Die Auswertung der Proben erfolgte über die Berechnung der Fläche und Höhe der α -Bande. Dafür wurde im Bereich von ~ 545 nm bis ~ 575 nm eine Basislinie generiert und die Fläche bzw. Höhe des Absorptionsmaximums bestimmt. Die berechneten Werte für die reduzierten Spektren mit Na-Dithionit wurden als 100 % definiert. Die Auswertung der Spektren wurde mit dem Programm Origin (siehe Tabelle 4.20) durchgeführt. Bei den Messungen zur Eisen-abhängigen Oxidation wurden zunächst Spektren des reduzierten Proteins aufgenommen. Es folgte die Zugabe von Fe³⁺-EDTA und Fe³⁺-Citrat (1 μM, 1 mM und 10 mM). Weitere Spektren wurden aufgenommen. Die Auswertung erfolgte auch hier über die Berechnung der Fläche und Höhe der α -Bande. Allerdings wurden hier die Spektren der reduzierten Proben (siehe Abschnitt 5.10) als 100 % gewertet.

5.12.2 Direkter Aktivitätstest zur Bestimmung der Ascorbat-abhängigen-CYBASC-Umsetzungsrate

Eine Küvette (Quarzglas, Schichtdicke 1 cm) wurde mit 800 μl CYBASC-KP_i-Puffer (siehe Tabelle 4.9) befüllt. Anschließend wurde eine entsprechende Menge oxidierten Enzyms hinzugegeben. Die Messung wurde durch die Zugabe von 5 μM Ascorbat gestartet. Aufgenommen wurde die Absorption bei 561 nm und 575 nm über eine Zeitdauer von 30 Sek. Für die Auswertung wurde die Absorption bei 575 nm als Leerwert verwendet, um die absolute Steigung bei A_{561}/t zu bestimmen. Die spezifische Aktivität in U/mg konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 34,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), der Konzentration der Proteinlösung und der Anfangssteigung $\Delta A_{561-575}$ bestimmt werden. Ein U wurde hier als die Menge an Cytochrom b_{561} definiert, welche durch Ascorbat reduziert wurde. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Werte zum Teil als RCA-Werte (*relative catalytic activity*) angegeben. Als 100 % wurden die Aktivitäten der Kontrollmessungen definiert.

5.12.3 Direkter Aktivitätstest zur Bestimmung der Eisenchelat-abhängigen-CYBASC-Umsetzungsrate

Die Küvette (Quarzglas, Schichtdicke 1 cm) wurde mit 800 μl CYBASC-KP_i-Puffer (siehe Tabelle 4.9) befüllt. Anschließend wurde eine entsprechende Menge reduziertes Enzym hinzugegeben. Die Messung wurde durch die Zugabe von 2 μM Fe³⁺-EDTA bzw. Fe³⁺Citrat gestartet. Wie auch schon in Abschnitt 5.12.2 wurde die Absorptionsänderung ($\Delta A/t$) bei 561 nm und 575 nm (als Leerwert) aufgenommen. Die spezifische Aktivität in U/mg konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 34,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), der Konzentration der Proteinlösung und der negativen Steigung aus $\Delta A_{561-575}$ bestimmt.

5.13 Bestimmung der Häm-Mittelpunkts-Potentiale (E_M -Werte) durch Reduktion/Oxidation-Titration

Neben der Strukturaufklärung durch Kristallographie ist eine funktionelle Charakterisierung für das Verständnis der elektrochemischen Prozesse im Protein nötig. Dabei gibt die Bestimmung der Häm-Mittelpunkts-Potentiale (E_M -Werte) Einblicke in Redoxprozesse des Proteins. Diese erfolgte über die Absorptionsänderung im Differenzspektrum. Hierfür wurde eine elektrochemische Zelle mit einer Dreielektrodenanordnung (Moss et al., 1990) genutzt: Über die Arbeitselektrode wurde ein sich zeitlich änderndes Potential in der Messzelle vorgegeben. Um sicher zu stellen, dass in der gesamten Messzelle die eingestellte Spannung vorherrschte wurde die Ist-Spannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode abgeglichen und über die Gegenelektrode reguliert. Die Messungen wurden in einem modifizierten IFS 25 FTIR UV/ Vis Spektrometer (Bruker Optics, bereitgestellt von der JWGU) durchgeführt. 10 μl bis 15 μl gereinigtes Protein mit einer Konzentration von 15 bis 20 mg/ml wurden mit Redoxmediatoren (siehe Tabelle 4.15) inkubiert und danach auf die Arbeitselektrode geladen. Im Anschluss daran wurde die Messzelle zusammengebaut und ca. 100 μl des NaPhos-Puffers (siehe Tabelle 4.9) in das Messsystem injiziert. Dadurch war sicher gestellt, dass ein Austausch im Messsystem vorlag. Zur Bestimmung der Häm-Mittelpunkts-Potentiale der Proteinproben wurde eine Titration von voll reduziertem Protein (+ 350 mV) zu voll oxidiertem Protein (- 350 mV) durchgeführt mit 50 mV- bzw. 7 mV-Schritten. Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein Absorptionsspektrum von 400 nm bis 700 nm aufgenommen. Die Äquilibrierung zwischen den einzelnen Messschritten erfolgte für 4 min. Das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Enzym wurde über die Amplitude und Fläche der α -Bande (561 nm) beobachtet. Die beiden E_M -Werte wurden unter Anwendung der Nernst Gleichung mit einem $n = 1$ (Anzahl der transferierten Elektronen) und den gemessenen Datenpunkten berechnet (siehe Anhang 11.7). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Origin (siehe Tabelle 4.20).

5.14 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Mit der CD-Spektroskopie kann unter Verwendung des Fern-UVs die Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente aufgeklärt werden. Dabei werden die spektroskopischen Eigenschaften von chiralen Molekülen mit polarisiertem Licht genutzt und es werden die unterschiedlichen Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen ausgewertet (Lottspeich et al., 2006). CD-Spektren wurden mit einem Jasco J720 Spektropolarimeter aufgenommen. Die Temperatur (20 °C) wurde mit dem Peltier-Element (Jasco PTC348) konstant gehalten. Die Messungen erfolgten in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Das Volumen der Proteinlösung betrug 200 µl bzw. 240 µl. Mit einem Stickstofffluss von 3 l/ml wurde die Küvettenkammer gespült um das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Für jede Messung wurden 4 Spektren im Bereich von 190 nm bis 250 nm aufgenommen. Als Leerwert wurden Spektren nur mit dem NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.9) aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Proben lag zwischen 0,23 mg/ml und 0,43 mg/ml. Für die Analyse der Proteinspektren wurden zunächst die Pufferspektren subtrahiert. Die Messungen wurden im Labor von Prof. Dr. Rita Bernhardt (Biochemie) der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Server *DiChroWeb* (Whitmore & Wallace, 2008) und den folgenden Programmen:

- Contin (Provencher & Glockner, 1981) mit der Proteinreferenz 4 (Wallace & Janes, 2009)
- K2D (Andrade et al., 1993)

5.15 Kristallisationsansätze mittels Dampfdiffusionsmethode mit „sitzenden Tropfen“ (Sitting Drops)

Bei der Kristallisationsmethode mit „sitzenden Tropfen“ befindet sich der Proteintropfen auf einem Steg. Die Konzentration des Fällungsmittels im Proteintropfen ist im Gegensatz zur Reservoirlösung geringer. Durch Dampfdiffusion steigt die Konzentration des Fällungsmittels im Proteintropfen, sodass es zur Nukleation und dem daraus folgenden Kristallwachstum kommt (Rupp, 2009).

In eine 96-Well-Platte (siehe Tabelle 4.18) wurden jeweils 50 µl verschiedene Reservoirlösungen (MemGold* HT-96) pipettiert (siehe Tabelle 4.17). Die reine Proteinlösung wurde bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml eingengt. Als Probenpuffer wurde der Hepes-Puffer mit 2,4 % Benzamidin (siehe Tabelle 4.9) verwendet. Die Probe wurde aufgeteilt, mit verschiedenen Zusätzen behandelt (2 mM Ascorbat bzw. 2 mM Kaliumhexacyanoferrat (III)) und zentrifugiert (10 min, 4 °C, 14 000g). 100 nl Proteinlösung wurden mit 100 nl Reservoirlösung im Well gemischt. Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen.

6 ERGEBNISSE

6.1 Optimierung der heterologen Produktion des A-Paralogs in *E. coli*

Im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi (2007) wurden optimale Produktionsbedingungen für die in *E. coli* heterolog produzierten CYBASC-Proteine gefunden. Diese waren eine Arabinose-Konzentration von 0,02 %, eine Inkubationstemperatur von 37 °C und eine Produktionsdauer von 5 h. Zunächst sollten diese reproduziert werden. Hierfür wurden mit pBADA₂-A (siehe Tabelle 4.3) transformierte Top10 Zellen (siehe Tabelle 4.1) einer *über Tag*-Kultur bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6 mit verschiedenen L-Arabinose-Konzentrationen induziert (siehe Abschnitt 5.2.5). Nach 3 h, 5 h und *über Nacht* wurden jeweils Proben entnommen. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE und Western Blot mit α -Polyhistidin-Antikörper analysiert.

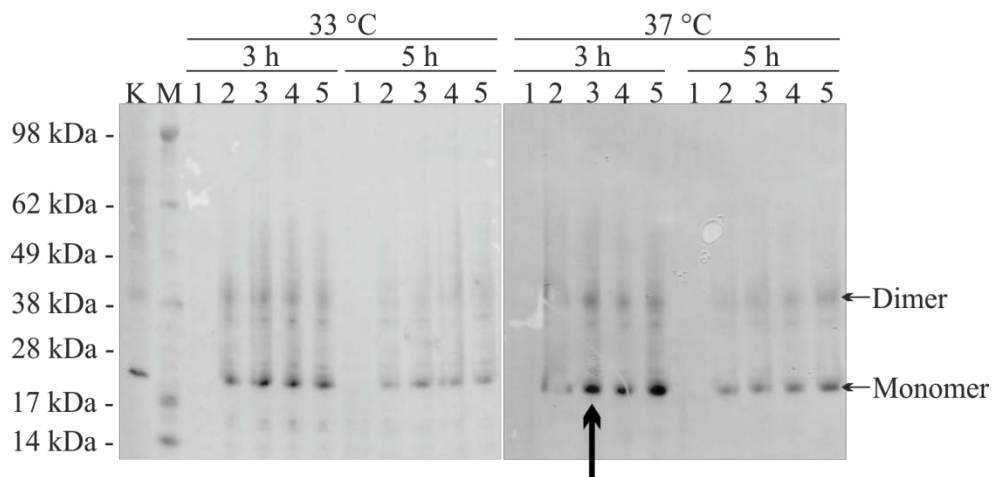


Abbildung 6.1: Western Blot Analyse der Produktionsbedingungen bei 33 °C und 37 °C für Top10/pBADA₂-A mit dem Induktor Arabinose.

Die Produktion des A-Paralogs wurde durch verschiedene Arabinose-Konzentrationen bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6 induziert. Proben wurden nach 3 h, 5 h und *über Nacht* (nicht gezeigt) genommen. Bei den gezeigten Induktionsbedingungen konnten Signale für Monomer und Dimer detektiert werden. Das beste Ergebnis wurde bei 37 °C, 0,2 % Arabinose und einer Produktionsdauer von 3 h detektiert (markiert durch den schwarzen Pfeil). Die pelletierten Proben wurden jeweils auf eine OD₆₀₀ von 10 in H₂O resuspendiert. Die Detektion im Western Blot (NuPAGE[®] 4 % -12 % Bis Tris Gel NuPAGE[®] MES-Puffer (siehe Tabelle 4.10), Nitrocellulose-Membran (Whatman)) erfolgte durch einen monoklonalen α -Polyhistidin-Antikörper. 1: 0 % Arabinose; 2: 0,02 % Arabinose; 3: 0,2 % Arabinose; 4: 2 % Arabinose; 5: 5 % Arabinose; K: Kontrolle, gereinigter A-Paralog (Probe von L. Cenacchi); M: Proteinstandard (siehe Tabelle 4.11).

Im Western Blot (siehe Abbildung 6.1) wurden Signale für das CYBASC-A Monomer und Dimer nach einer Produktionsdauer von 3 h und 5 h bei 33 °C bzw. 37 °C detektiert. Bei beiden

Temperaturen konnte keine Produktion bei den *über Nacht*-Kulturen detektiert werden (nicht gezeigt). Bei 33 °C waren die Signale und somit die Produktion bei allen Arabinose-Konzentrationen schwächer als bei den entsprechenden bei 37 °C. Das schwächste Signal bzw. die geringste Produktion zeigte sich bei 0,02 % Arabinose mit einer Produktionsdauer von 5 h bei 37 °C. Hingegen wurde das stärkste Signal und damit die höchste Produktionsrate bei einer Temperatur von 37 °C mit 5 % L-Arabinose detektiert. Jedoch wurde für spätere Großproduktionen nicht mit dieser Konzentration gearbeitet. Für die Großproduktionen wurden 0,2 % Arabinose, eine Produktionstemperatur von 37 °C und einer Dauer von 3 Stunden als Bedingungen gewählt (siehe Abschnitt 7.1).

In einem weiteren Experiment wurde die Produktionsrate der mit pBADA₂-A transformierten Stämme Top10 und Rosetta (DE3) (siehe Tabelle 4.1) verglichen. Hierbei wurden wieder verschiedene Temperaturen (20 °C, 30 °C, 33 °C und 37 °C) und Produktionszeiten (3 h, 5 h und *über Nacht*) untersucht. Basierend auf dem Ergebnis der Produktionsanalyse des Top 10-Stammes wurde als L-Arabinose-Konzentration 0,2 % genutzt.

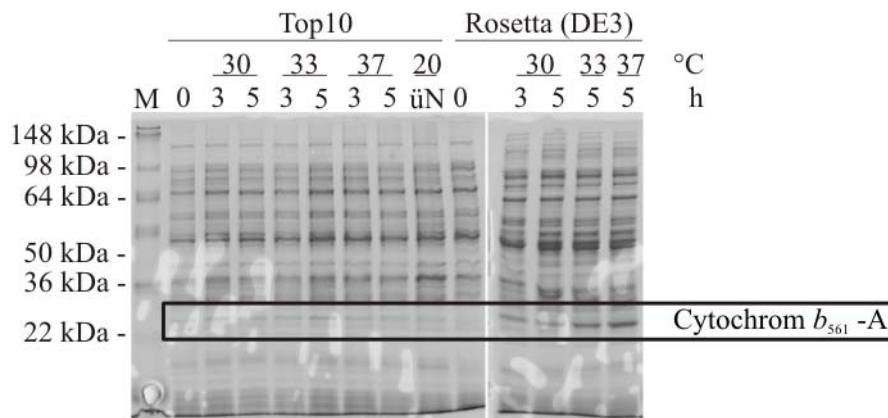


Abbildung 6.2: Analyse der Arabinose induzierten A-Paralog Produktion in den *E. coli*-Stämme Top 10 und Rosetta (DE3) via SDS-PAGE.

Bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6 wurde die Produktion des A-Paralogs, kodiert auf pBADA₂-A, bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 30 °C, 33 °C und 37 °C) und Produktionszeiten (3 h, 5 h und *über Nacht*) durch 0,2 % L-Arabinose induziert. Proben wurden nach 0 h (Zeitpunkt der Induktion), 3 h, 5 h und *über Nacht* (20 h) genommen. Die untersuchten Stämme waren Top10 und Rosetta (DE3). Die Bande auf Höhe von ~ 25 kDa ist durch eine Box markiert. Diese Bande entspricht dem Monomer des A-Paralogs. Die pelletierten Proben wurden jeweils auf eine OD₆₀₀ von 10 resuspendiert. Die Analyse erfolgte im 12 %igen SDS-PAGE mit SDS Elektrophorese-Puffer (siehe Tabelle 4.10).

In Abbildung 6.2 ist zu erkennen, dass nach Induktion durch 0,2 % Arabinose bei beiden *E. coli* Stämmen die Zunahme einer Bande in der Höhe von ca. 25 kDa zu erkennen ist. Dies ist vor allem bei dem Stamm Rosetta (DE3) zu sehen. Zusätzlich wurde auch hier die Produktion im Western Blot mit einem α -Polyhistidin-Antikörper nachgewiesen (nicht gezeigt).

In späteren Großproduktionen zeigte sich, dass im Gegensatz zu Top 10 bei der Verwendung von Rosetta (DE3) eine deutlich höhere Zellfeuchtmasse mit mehr heterolog produziertem A-Paralog von ~ 8 g pro Liter Zellkultur gewonnen werden konnte. Bei Verwendung von Top 10 lag die Zellfeuchtmasse bei ~ 1,4 g pro Liter Zellkultur.

Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse zur Produktionsoptimierung des A-Paralogs wurden in dieser Dissertation beide Stämme zur Produktion des A-Paralogs verwendet. Die Induktion erfolgte, im Gegensatz zu L. Cenacchi (2007), mit 0,2 % Arabinose und einer Produktionsdauer von 3 h für den *E. coli* Stamm Top 10 und 5 h für den *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) jeweils bei 37 °C.

6.2 Optimierung der Produktion des B-Paralogs in *E. coli*

Im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi (2007) konnte gezeigt werden, dass die Produktion des B-Paralogs im Vektor pTTQ18C-B und dem Expressionssystem *E. coli* gering war. Es sollte die heterologe B-Paralog-Produktion zunächst überprüft werden. Hierfür wurde der *E. coli* Stamm C43 (DE3) (Miroux & Walker, 1996) mit dem Plasmid pTTQ18C-B (siehe Tabelle 4.3, Surade et al., 2006) transformiert. Analysiert wurde die Proteinproduktion bei verschiedenen Temperaturen (30 °C, 33 °C und 37 °C), IPTG Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 250 µM und 500 µM) und Produktionszeiten (3 h und 5 h) im SDS-PAGE und Western Blot (siehe Abschnitt 5.2.5 und 5.7). Die Induktion einer *über Tag* Kultur erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ~0,6.

Bei 30 °C und 33 °C (siehe Abbildung 6.3) sind Signale und demzufolge eine Produktion des B-Paralogs zu erkennen. Allerdings konnten bei Konzentrationen von 50 µM und 100 µM IPTG bei einer Temperatur von 30 °C und einer Dauer von 3 h nur sehr schwache Signale detektiert werden. Mit Ausnahme der Induktion durch 500 µM IPTG waren die Produktionen bei allen Proben nach 5 h höher als bei einer Dauer von 3 h. Auffallend ist, dass bei 30 °C kein Dimer des B-Paralogs detektiert wurde. Im Gegensatz dazu konnten bei einer Produktionstemperatur von 33 °C bei allen IPTG-Konzentrationen und allen Produktionszeiten schwache Dimer-Signale detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Dimer-Signale nach 3 h stärker waren als nach 5 h. Die stärksten Signale und somit auch die höchste Produktionsrate wurde hier bei einer Induktion mit 250 µM IPTG, einer Temperatur von 33 °C und einer Produktionsdauer von 3 h ermittelt, welche auch in späteren Großproduktionen verwendet wurde. In der Großproduktion zeigte sich, dass ~ 4,2 g Zellfeuchtmasse pro Liter Zellkultur gewonnen werden konnte.

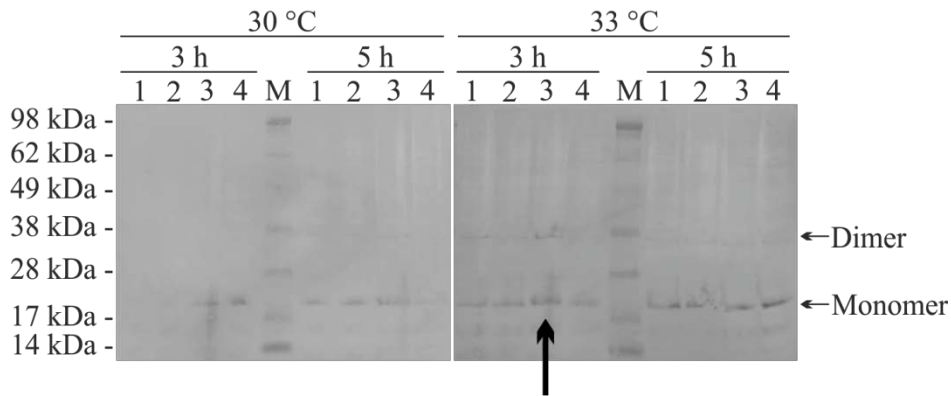


Abbildung 6.3: Western Blot Analyse der Produktionsbedingungen bei 30 °C und 33 °C für C43 (DE3)/pTTQC-B mit dem Induktor IPTG.

Die Produktion des B-Paralogs wurde durch verschiedene IPTG-Konzentrationen bei einer OD_{600} von 0,6 induziert. Proben wurden nach 3 h und 5 h genommen. Bei einer Produktionstemperatur von 30 °C konnten nur Signale des Monomers detektiert werden. Bei 33 °C konnte neben dem Monomer auch das B-Paralog Dimer detektiert werden.

Die pelletierten Proben wurden jeweils auf eine OD_{600} von 10 resuspendiert. Die Detektion im Western Blot (NuPAGE® 10 % Bis Tris Gel NuPAGE® MES-Puffer (siehe Tabelle 4.10), Nitrocellulose-Membran (Whatman)) erfolgte durch einen monoklonalen α -Polyhistidin-Antikörper. Das beste Ergebnis wurde bei 33 °C, 250 μ M IPTG und einer Produktionsdauer von 3 h detektiert (markiert durch den Pfeil). 1: 50 μ M IPTG; 2: 100 μ M IPTG; 3: 250 μ M IPTG; 4: 500 μ M IPTG; M: Proteinstandard (siehe Tabelle 4.11).

Im Gegensatz zum A-Paralog zeigte sich, dass bei 37 °C nur nach drei Stunden und einer IPTG Konzentration von 250 μ M eine sehr geringe Menge an B-Paralog durch den α -Polyhistidin-Antikörper detektiert wurde. Nach fünf Stunden konnte bei keiner IPTG-Konzentration eine B-Paralog-Produktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

6.3 Mass Fingerprint Identifikation der CYBASC-Paraloge

Neben dem Nachweis der heterologen Produktion beider CYBASC-Proteine durch SDS-PAGE und Western Blot, sollte die Proteinproduktion auch durch *Mass-Fingerprint*-Identifikation gezeigt werden. Hierfür wurden Proteinbanden auf der Höhe von ~ 25 kDa (Monomer) und ~ 50 kDa (Dimer) aus einem SDS-Gel (siehe Abschnitt 5.7.4 und 5.7.5) geschnitten und wie in Abschnitt 5.8 behandelt.

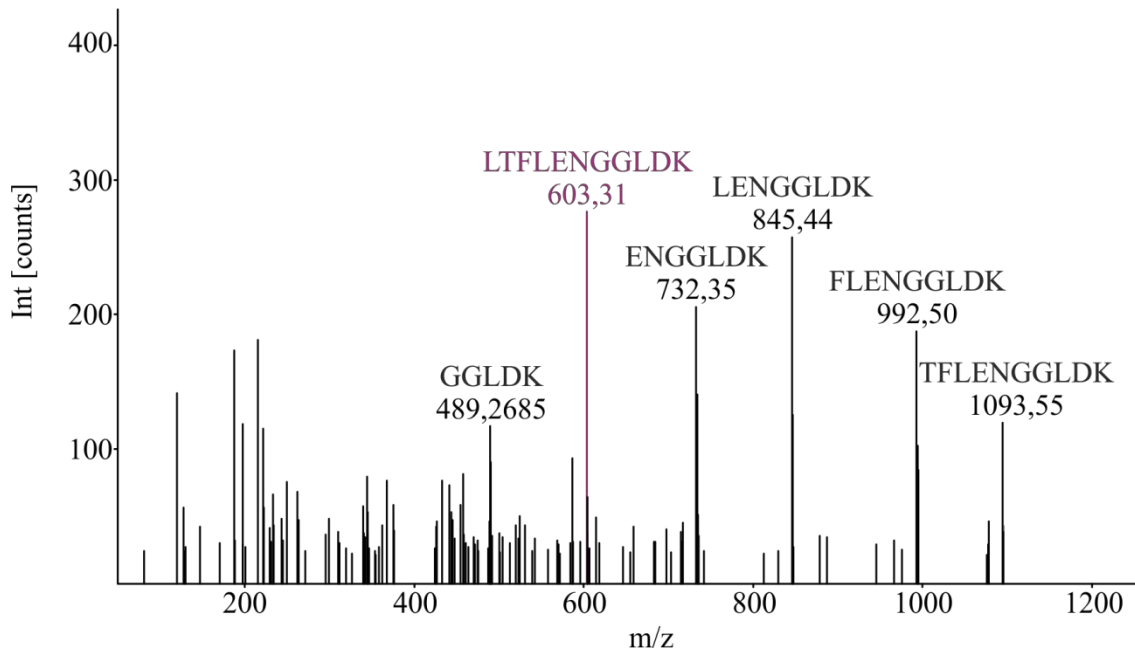


Abbildung 6.4: LC-MS/MS-Chromatogramm des A-Paralog Peptids LTFLENGGLDK und dessen Fragmente.

Eine Proteinbande eines SDS-Gels auf der Höhe von ~ 25 kDa wurde separiert und mit Chymotrypsin und Trypsin verdaut (siehe Abschnitt 5.8). Die Auftrennung der proteolytisch verdauten Fragmente erfolgte über eine nano-HPLC und eine Reverse-Phase-Säule. Das Fragment L T F L E N G G L D K (lila) wurde nach 22,1 min eluiert und durch Tandem-MS und weitere kleinere Fragmente (schwarz) analysiert. Int: Intensität; m/z: Masse pro Ladung.

Der A-Paralog konnte mit den Polypeptiden G G L A W A R N K (AS 39 – AS 48) und L T F L E N G G L D K (AS 184 – AS 194) identifiziert werden (siehe Abbildung 6.4). Die Identifikation des B-Paralogs erfolgte über die Polypeptide L S S D N K D H I F N (AS 39 – AS 49), F H I D K G I E N F Y S (AS 105 – AS 116), F L Q V N Q V I T R Y S (AS 181 – AS 193) und S T E A M L V (AS 193 – AS 199) (siehe Abbildung 6.5).

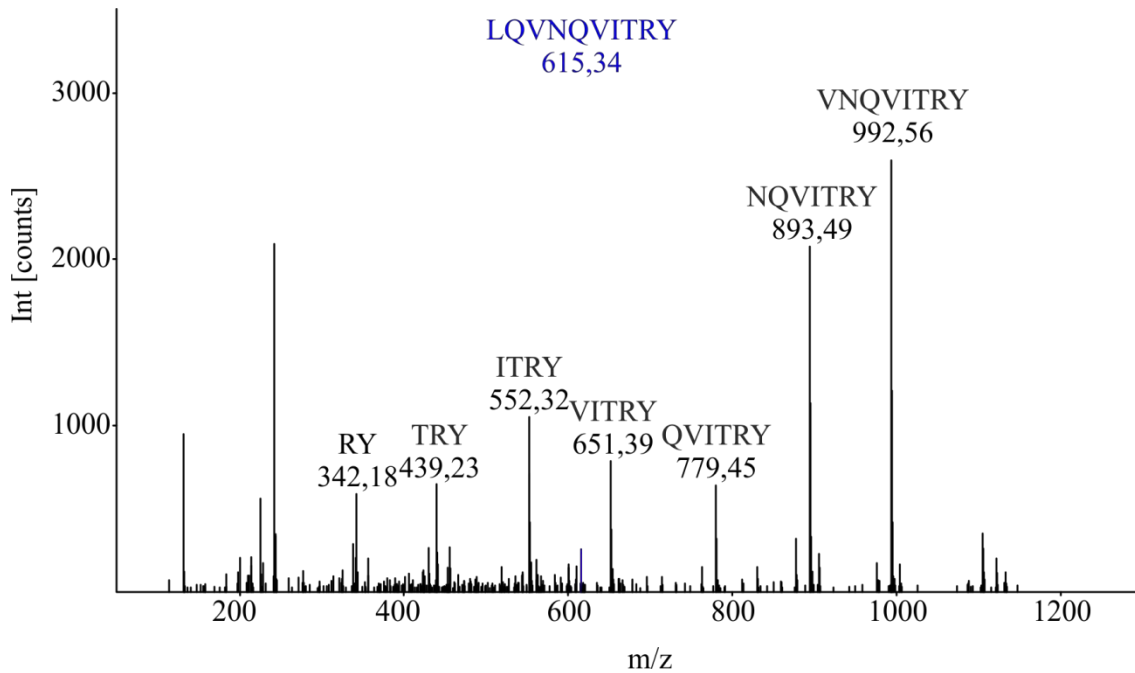


Abbildung 6.5: LC-MS/MS-Chromatogramm des Peptids L Q V N Q V I T R Y des B-Paralogs.

Auf der Höhe von ~ 25 kDa wurde eine Proteinbande eines SDS-Gels ausgeschnitten und mit Chymotrypsin verdaut (siehe Abschnitt 5.8). Die Auftrennung der proteolytisch verdauten Fragmente erfolgte über eine nano-HPLC und eine Reverse-Phase-Säule. Das Fragment L Q V N Q V I T R Y (blau) wurde nach 22,3 min eluiert und über Tandem-MS durch weitere kleinere Fragmente (schwarz) analysiert. Int: Intensität; m/z: Masse pro Ladung.

6.4 Reproduktion der Reinigungsstrategie von L. Cenacchi (2007)

Im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi (2007) wurde eine CYBASC-Proteinreinigung mit folgenden Schritten etabliert:

1. Die Solubilisierung der präparierten Membran erfolgte mit 1 % Fos Cholin-12 (siehe Tabelle 4.16) für 1 h bei 4 °C in Dunkelheit unter leichtem Rühren.
2. Durch einen Ultrazentrifugationsschritt (1 h, 4 °C, 43000 rpm, 45Ti-Rotor) wurde das Solubilisat abgetrennt.
3. Die Proteinreinigung aus dem Solubilisat erfolgte durch eine Ni²⁺-immobilisierter-Metallaffinitäts-Chromatographie mit einer 1 ml HisTrap HP Säule (Ni²⁺-IMAC). Die verwendeten Pufferlösungen waren NaPhos-Puffer (zunächst mit 0,1 % Fos Cholin-12 und dann mit 0,1 % β-LM, siehe Tabelle 4.9) als Waschpuffer und einem Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 250 mM Histidin; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol und 0,1 % β-LM.

Mit der etablierten Reinigung einer 1-Schritt Ni²⁺-IMAC sollten beide Paraloge gereinigt und dann charakterisiert werden.

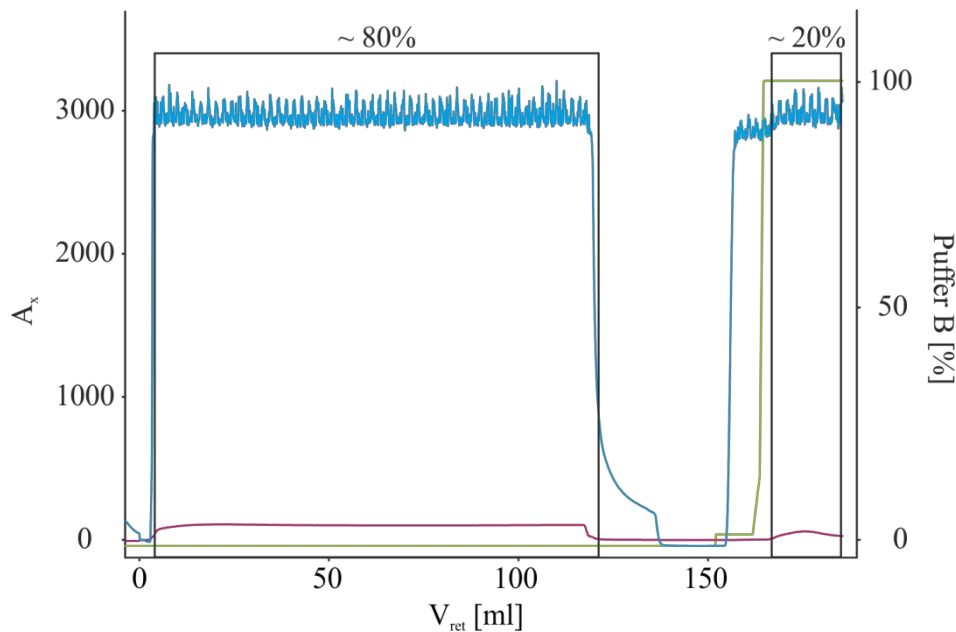


Abbildung 6.6: Äkta-Chromatogramm einer Ni²⁺-IMAC-Reinigung (1 ml HisTrap Chelating, GE Healthcare (D)) am Beispiel des B-Paralogs.

Der Reinigungsschritt wurde über die Absorption bei 280 nm (blau) und 415 nm (rosa) überwacht. Die mit 1 % Fos Cholin-12 solubilisierter Fraktion wurde mit 1 ml/min auf die Säule geladen. Es folgte ein Waschschrift bis zum Erreichen der Basislinie der Absorptionen bei 280 nm (blau) und 415 nm (pink). In einem zweiten Waschschrift folgte ein Puffertausch von 0,1 % Fos Cholin-12 zu 0,1 % β -LM. Die Elution erfolgte zunächst bei 5 % und dann mit 100 % des B-Puffers (grün). Durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren konnte gezeigt werden, dass 80 % des solubilisierter CYBASC-Proteins nicht an die Säule gebunden hatten. Nur 20 % des Proteins konnten eluiert werden. A_x : Absorption bei 280 nm, bzw. 415 nm; V_{ret} : Elutionsvolumen; Anteil des Puffers B in % ist in grün dargestellt.

Durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren, der erhöhten Absorption bei 415 nm des Säulendurchflusses (siehe Abbildung 6.6) und im SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des heterolog produzierter Proteins (~ 80 %) nicht an die Säulenmatrix gebunden hatte. Es konnten somit nur ~ 0,042 mg/L Zellkultur CYBASC-Protein gereinigt werden. Des Weiteren zeigte sich bei mehreren Reinigungsansätzen, dass schon beim Solubilisierungsschritt mit 1 % Fos Cholin-12 nur ~ 80 % der CYBASC-Proteine (siehe Abbildung 6.7) in Lösung gebracht werden konnten.

6.5 Neue Solubilisierungsstrategie

Im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi wurde 1 % Fos Cholin-12 zur Solubilisierung aus der Membran beider Paralogs verwendet (Cenacchi, 2007). In einem Solubilisierungsscreen sollte überprüft werden, ob die Ausbeute an solubiliertem Protein gesteigert werden konnte. Für den A-Paralog wurde dies im Rahmen der Diplomarbeit von Martin Klein (2011) durchgeführt. Präparierte Membran des B-Paralogs wurde in NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.9) homogenisiert. Die Membrankonzentrationen betragen 50 mg/ml und 100 mg/ml. Die Solubilisierung erfolgte mit 1 % Detergenz in 1,5 ml-Ansätzen je Detergenz für 1 h bei 4 °C unter leichtem Rühren im Dunkeln. Die Detergenzien waren DM, Fos Cholin-12, LDAO, Triton X-100 und Tween 20 (siehe Tabelle 4.16). Die Solubilisation durch Fos Cholin-12 wurde als Kontrolle genutzt. Die Separation von Solubilisat („S“) und präzipitierte Fraktion („P“) erfolgte mit einem Ultrazentrifugationsschritt (2 h, 4 °C, 68000 rpm, TLA100.3 oder TLA110). Analysiert wurden die Solubilisate und die Pellets der Ultrazentrifugationsschritte durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit Immunodetektion und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren mit Na-Dithionit und Kaliumhexacyanoferrat(III). Für eine genauere Vergleichbarkeit wurden die Pellets der nicht-solubilierten Fraktionen in 1,5 ml NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.9), entsprechend des Ansatzvolumens, gelöst.

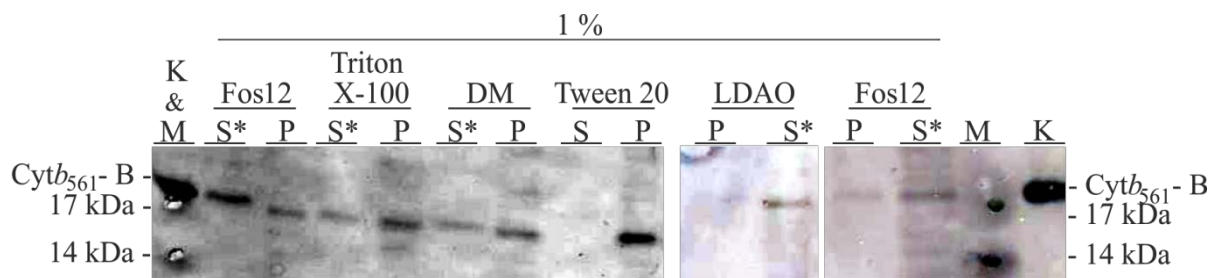


Abbildung 6.7: Western Blot Analyse der Solubilisierung des B-Paralogs durch verschiedene Detergenzien.

Die Ausbeute der Solubilisation durch Triton X-100, DM, Tween 20, LDAO und Fos Cholin-12 (Kontrolle) wurde durch SDS-PAGE und WesternBlot analysiert. Hierfür wurden das durch einen Ultrazentrifugationsschritt getrennte Solubilisat und die pelletierte Fraktion aufgetragen (jeweils 12 µL). Die Detektion im Western Blot (NuPAGE[®] 4 % -16 % Bis Tris Gel NuPAGE[®] MES-Puffer (siehe Tabelle 4.10), Nitrocellulose-Membran (Whatman)) erfolgte durch einen monoklonalen α -Polyhistidin-Antikörper. S: Solubilisat; P: Pellet des Ultrazentrifugationsschritt; M: Standard; K: Kontrolle (hier gereinigtes Protein, beschrieben in Abschnitt 6.4), Fos12: Fos Cholin-12. In den mit * gekennzeichneten Fraktionen konnte durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren der B-Paralog nachgewiesen werden.

In dem Kontrolllexperiment mit Fos Cholin-12 zeigte sich, dass ~ 80 % des B-Paralogs im Solubilisat vorlagen (siehe Abbildung 6.7, Fos 12 Probe „S“). Dieser wurde durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren belegt. Bei der Solubilisierung durch 1 % Tween 20 konnte kein Signal im Solubilisat detektiert werden. Auch konnte hier kein Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektrum gemessen werden. Im Western Blot zeigte sich ein deutliches Signal in der Pellet- Fraktion (siehe Abbildung 6.7, Tween 20 Probe „P“). Bei Zugabe von 1 % DM war ein schwaches Signal im Solubilisat (~ 30 %, β -LM, Probe

„S“, siehe Abbildung 6.7) detektierbar. Es konnten auch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren des Solubilisat aufgenommen werden. Allerdings wurde auch in der Pellet-Fraktion Protein im Western Blot detektiert. Bei Verwendung von 1 % Triton X-100 wurden in beiden Fraktionen (siehe Abbildung 6.7, Triton X-100: Solubilisat „S“ ~ 20 % und Pellet-Fraktion „P“ ~ 80 %) Signale im Western Blot gefunden. Auch hier konnten Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren des Solubilisats aufgenommen werden. Bei der Zugabe von LDAO zeigte sich, dass im Western Blot kein Signal in der Pellet-Fraktion (siehe Abbildung 6.7, LDAO Probe „P“) zu sehen war. Im Gegensatz dazu wurde aber ein deutliches Signal des B-Paralogs im Solubilisat (siehe Abbildung 6.7, LDAO Probe „S“) detektiert, welches durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren bestätigt werden konnte. Durch diesen Solubilisierungsscreen konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute des solubilisierten funktionalen B-Paralogs durch 1 % LDAO auf ~ 100 % erhöht werden konnte.

6.6 Langzeit-Stabilität des B-Paralogs in dem Detergenz LDAO

Auffällig war, dass das LDAO-Solubilisat schon nach 24 h trübe wurde. Eine Aufnahme von Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren war nicht möglich. Durch einen Filtrationsschritt (25 µm Durchmesser) konnten die Partikel vom Solubilisat abgetrennt werden. Das filtrierte Solubilisat konnte nun durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (Abbildung 6.6) analysiert werden. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Experiment die Stabilität des mit 1 % LDAO solubilisierten B-Paralogs untersucht werden. Für den A-Paralog wurde dies im Rahmen der Diplomarbeit von M. Klein (2011) durchgeführt. Präparierte Membran (siehe Abschnitt 5.4.1) von C43 (DE3)/pTTQ18C-B wurde in Solubilisierungspuffer (siehe Tabelle 4.9) homogenisiert. Die Konzentration hierbei betrug 100 mg/ml. Die Solubilisierung erfolgte mit 1 % LDAO für eine Stunde bei 4 °C im Dunklen. Die Trennung des Solubilisats von der präzipitierten Probe erfolgte in einem Ultrazentrifugationsschritt (1 h, 4 °C, 70.1 Ti, 68 000 rpm). Es wurden nun zu verschiedenen Zeitpunkten Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren mit Na-Dithionit und Kaliumhexacyanoferrat(III) aufgenommen. Der Wert zum Zeitpunkt t_0 (direkt nach der Trennung von Solubilisat und präzipitierter Fraktion durch einen Ultrazentrifugationsschritt) wurde als 100 % solubilisiertes Protein gesetzt. Die Lagerung des Solubilisats erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Zum Zeitpunkt $t_1 = 24$ h war zu sehen, dass die Reduzierbarkeit und somit die Menge des B-Paralogs nicht abgenommen hatte. Es wurden 103 % Reduzierbarkeit der Startkonzentration (t_0) bestimmt. Nach 48 h Stunden (t_2) war eine Reduzierbarkeit von 74 % in Bezug auf die Reduzierbarkeit von 100 % zum Zeitpunkt t_0 zu finden. Erst nach 144 h (t_4) wurde nur noch 50 % Reduzierbarkeit und somit nur noch die Hälfte der zu Beginn vorhandenen Menge an B-Paralog durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren nachgewiesen.

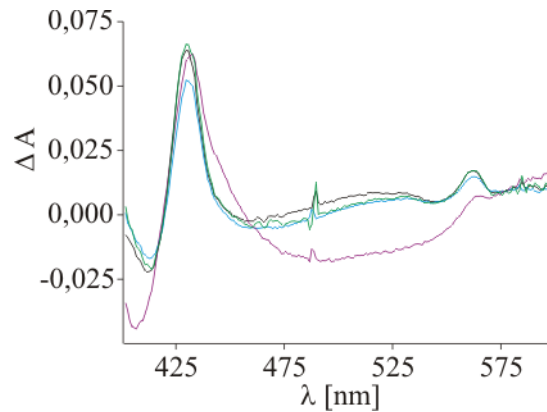


Abbildung 6.8: Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren des solubilisierten B-Paralogs in 1% LDAO zu verschiedenen Zeitpunkten (t_0 : 0 h, t_1 : 24 h, t_2 : 48 h und t_3 : 144 h).

Ein Referenzspektrum der mit Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidierten Probe wurde aufgenommen. Nach Zugabe (Spatelspitze) von Na-Dithionit wurde ein weiteres Spektrum des vollständig reduzierten B-Paralogs aufgenommen. Die Zeitpunkte waren: $t_1 = 0$ h (schwarzes Spektrum) mit einer Reduzierbarkeit die als 100 % definiert wurde, $t_2 = 24$ h (grünes Spektrum) mit einer Reduzierbarkeit von 103 % im Verhältnis zu t_0 , $t_3 = 48$ h (blaues Spektrum) mit einer Reduzierbarkeit von 74 % im Verhältnis zu t_0 und $t_4 = 144$ h (violett-schwarzes Spektrum) mit einer Reduzierbarkeit von 50 % im Verhältnis zu t_0 .

Angesichts der gewonnenen Ergebnisse wurde der B-Paralog und auch der A-Paralog (Klein, 2011) mit 1 % LDAO solubilisiert. Bei Großproduktionen lag die Membrankonzentration zwischen 200 und 400 mg/ml. Außerdem wurde auf Ascorbat im Solubilisierungspuffer verzichtet, so dass die Trübung des Solubilisats verhindert werden konnte (siehe Abschnitt 7.2). Eine weitere Änderung war das Puffersystem. Für präparative Solubilisierungsansätze wurde an Stelle des NaPhos-Puffers der Tris-basierende Puffer Tris 300- bzw. Tris 20-Puffer verwendet (siehe Tabelle 4.9, Abschnitt 6.7 und 7.2).

6.7 Neue Reinigungsstrategien für den B-Paralog

6.7.1 Neues Puffersystem für die etablierte Ni²⁺-IMAC-Chromatographie

Im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi wurde eine CYBASC-Reinigung etabliert mit einem Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 250 mM Histidin; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol und 0,1 % β -LM (siehe Abschnitt 6.4). Diese sollte durch Verwendung eines anderen Puffersystems und einer neuen Säulenbeladungszeit optimiert werden.

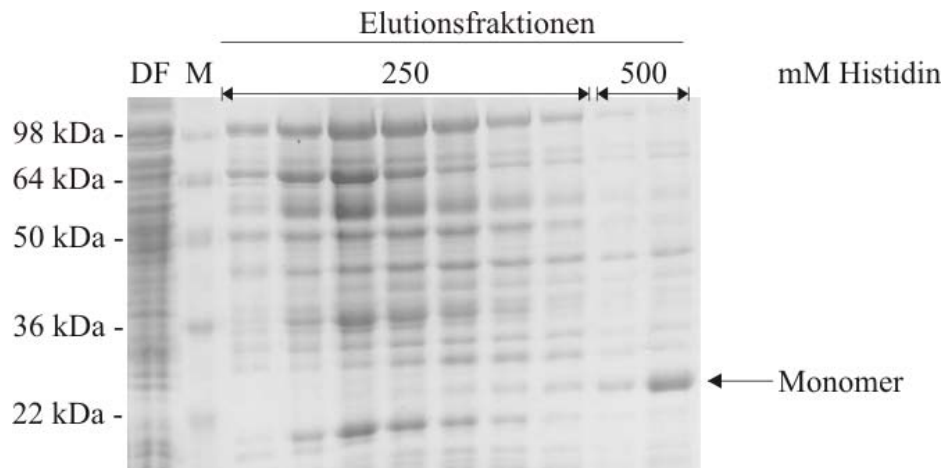


Abbildung 6.9: Analyse der optimierten Ni²⁺-IMAC-Reinigung des B-Paralogs mittels SDS-PAGE (12 %).

Aufgetragen wurden verschiedene Fraktionen einer Reinigung des B-Paralogs mit einer 5 ml HisTrap HP-Säule: Mit „250“ markiert sind verschiedene Elutionsfraktionen, welche mit dem alten Puffersystem mit 50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 250 mM Histidin; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol und 0,1 % β -LM eluiert worden sind. „500“ zeigt hier Fraktionen, welche mit dem B-IMAC-Puffer (500 mM Histidin, pH 5,5; 300 mM NaCl, 10 % Glycerol und 0,01 % β -LM) eluiert wurden. DF: Durchfluss der Säule; M: Proteinstandard.

Das LDAO-Extrakt wurde zunächst mit einer langsamen Fließgeschwindigkeit (0,5 ml/min) über 16 h auf eine 1 ml bzw. eine 5 ml Säule (HiTrap FF oder HisTrap HP Chelating, Ge Healthcare, München (D)) aufgetragen. Der Waschschritt erfolgte mit dem 1-fach Tris 300-Puffer + 0,01 % β -LM (siehe Tabelle 4.9) bis zum Erreichen der Basislinie der Absorption bei 280 nm und 415 nm. Mit dem neuen Elutionspuffer (B-IMAC-Puffer mit 500 mM Histidin, pH 5,5; 300 mM NaCl, 10 % Glycerol und 0,01 % β -LM) konnte das Protein in höherer Reinheit eluiert werden (siehe Abbildung 6.9). Durch diese Veränderung konnte der Ertrag an CYBASC-Proteinen von ~ 0,042 mg auf ~ 0,3 mg/L Zellkultur gesteigert werden.

6.7.2 Reinigung des B-Paralogs mittels Ionenaustauschchromatographie

Der isoelektrische Punkt (pI) des B-Paralogs wurde im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi (2007) experimentell bestimmt und liegt bei 9,7. Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, ob durch einen schwachen (1 ml HiTrap SP FF, GE Healthcare, München (D)) oder starken (1 ml HiTrap CM FF, GE Healthcare, München (D)) Kationenaustauscher die Reinigung optimiert werden könnte. Die Membran wurde hierfür in 1-fach Tris 20-Puffer (siehe Tabelle 4.9) solubilisiert (siehe Abschnitt 5.4) und auf die Säulen geladen. Bei beiden Kationenaustauschern wurde das gebundene Protein mit einem linearen Salzgradient (20 mM zu 1 M NaCl) eluiert.

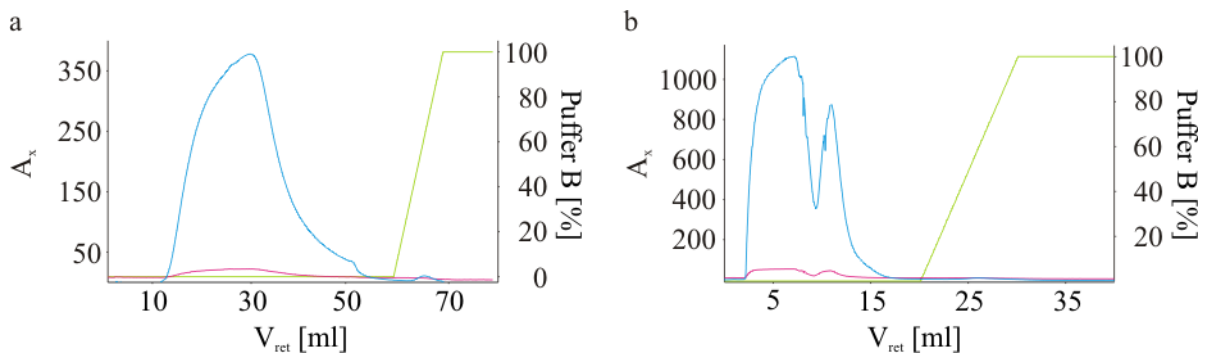


Abbildung 6.10: Reinigungsprofil der Kationenaustauschchromatographie (Äkta Chromatogramm jeweils einer 1 ml Säule).

a) starker Kationenaustauscher (HiTrap CM FF) und b) schwacher Kationenaustauscher (HiTrap SP FF) des B-Paralogs. Die mit 1% LDAO solubilisierte Fraktion in 1-fach Tris 20-Puffer wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die jeweilige Säule geladen. Es folgte ein Waschschriff bis zum Erreichen der Basislinie der Absorptionen bei 280 nm (blau) und 415 nm (pink). Die Elution mit 1-fach Tris 20, 1 M NaCl, 0,01 % β -LM(B-Puffer) erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (grün markiert). Hierbei entsprachen 0 % Puffer B 20 mM und 100 % 1M NaCl. A_x : Absorption bei 280 nm, bzw. 415 nm; V_{ret} : Elutionsvolumen; Anteil des Puffers B [%] ist in grün dargestellt.

Wie aus Abbildung 6.10 a und b ersichtlich wird, konnte weder unter Verwendung eines schwachen noch durch einen starken Kationenaustauscher eine Elution des B-Paralogs gezeigt werden. Untersucht wurde dies anhand der Absorption bei 415 nm, welche bei beiden Kationenaustauschern keine Absorptionsmaxima bei zunehmender NaCl-Konzentration zeigte (siehe Abbildung 6.10). In beiden Fällen konnte das Protein durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren zu 100 % im Durchfluss nachgewiesen werden. Trotz leichter Erhöhung der Absorption bei 280 nm im Eluat und folglich Abtrennung von unerwünschten Proteinen, wurde im Folgenden ein Anionenaustauscher getestet. Auch für diese Experimente wurde die präparierte Membran in 1-fachem Tris 20 mit 1 % LDAO solubilisiert (siehe Tabelle 4.9). Das gewonnene Solubilisat wurde auf eine 5 ml DEAE FF Säule (GE Healthcare, München (D)) mit 1 ml/min geladen. Die Elution wurde mit einem linearen und folgenden Stufen-Gradient zu 1 M NaCl durchgeführt.

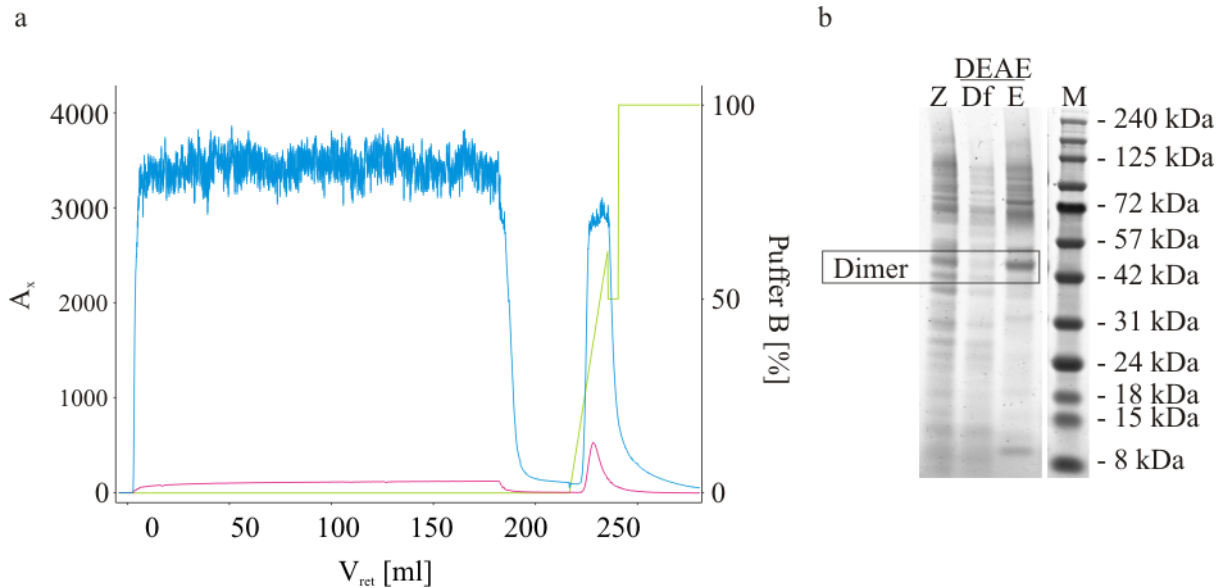


Abbildung 6.11: Reinigungsprofil der schwachen Anionenaustauscherchromatographie (5 ml Säule DEAE FF) des B-Paralogs (a) und Analyse der Reinigung via SDS-PAGE (4 % - 12 %) (b).

a) Die mit 1% LDAO solubilisierte Fraktion in 1-fach Tris20-Puffer wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule geladen. Ein Waschschrift bis zum Erreichen der Basislinie der Absorptionen bei 280 nm (blau) und 415 nm (pink) wurde durchgeführt. Die Elution mit 1-fach Tris 20, 1 M NaCl, 0,01 % β -LM (B-Puffer) erfolgte mit einem linearen und folgenden Stufen-Gradient (grün markiert). Hierbei entsprachen 0 % Puffer B 20 mM und 100 % 1M NaCl. Bei einem prozentualen Anteil von ~ 40 % (~ 410 mM NaCl) konnte der B-Paralog eluiert werden. A_x : Absorption bei 280 nm bzw. 415 nm; V_{ret} : Elutionsvolumen; Anteil des Puffers B in % ist in grün dargestellt. b) Analyse des Säulendurchflusses (DF) und des Eluats (E) der Anionenaustauscherreinigung im 4 % -16 % NuPAGE[®] Bis Tris Gel (mit NuPAGE[®] MES-Puffer (siehe Tabelle 4.10)). Aufgetragen wurden je Reinigungsfraktion (DF und E) 12 μ l. Z: Zellhomogenat (Auftragsvolumen 1,2 μ l); M: Proteinstandard (siehe Tabelle 4.11).

Abbildung 6.11 zeigt, dass bei Verwendung eines Anionenaustauschers mit Elution durch steigende NaCl-Konzentration ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und bei 415 nm erreicht wurde. Durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren und SDS PAGE (siehe Abbildung 6.11 b) konnte gezeigt werden, dass sich im Eluat der B-Paralog befindet. Allerdings wurde auch hier ein Großteil des B-Paralogs (~ 60 %) im Durchfluss durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren detektiert, so dass diese Strategie im Weiteren nicht verfolgt wurde.

6.7.3 Initiale Reinigungsversuche mit Hilfe von Gravitationsfluss-Strep-Tactin-Säulen

Neben einem Hexa-Histidin-Anhängsel wurde der B-Paralog auch mit einem Streptavidin-Affinitätsanhängsel (Strep) produziert. Mit den Gravitationsfluss-Streptactin-Säulen 1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin[®] Sepharose[®]*, 1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin[®] MacroPrep[®]* und 1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin[®] Superflow[®]* (siehe Tabelle 4.13) sollte zunächst im analytischen Maßstab die Reinigung durchgeführt werden. Hierfür wurden ~ 20 ml solubiliertes Protein in Tris 300 + 1 % LDAO auf die Säulen geladen. Es folgten 6 Waschschriffe mit jeweils 1 ml A-Strep-Puffer (siehe Tabelle 4.9 und Abbildung 6.12 „Waschfraktion“). Die Elution erfolgte in 500 μ l-Schritten mit dem B-Strep-Puffer

(siehe Tabelle 4.9, siehe Abbildung 6.12 „Eluat“). Die Auswertung erfolgte hier durch SDS-PAGE (siehe Abbildung 6.12) und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (nicht gezeigt). Bei der Verwendung der 3 Säulen (1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin*[®] Sepharose[®], 1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin*[®] MacroPrep[®] und 1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin*[®] Superflow[®] (siehe Tabelle 4.13) konnte der B-Paralog mit 2,5 mM Desthiobiotin (B-Strep-Puffer) eluiert werden (siehe Abbildung 6.12; beispielhaft gezeigt für die analytische Reinigung mit der 1 ml *Gravity Flow Strep-Tactin*[®] Sepharose[®]). Die Menge an reinem B-Paralog war in etwa gleich für alle Säulen. Neben den *Gravity Flow Strep*-Säulen wurde auch eine Reinigung im *Batch*-Verfahren mit *Strep-Tactin*[®] Sepharose[®] (siehe Tabelle 4.13) durchgeführt. Die Auswertung durch SDS-PAGE zeigte allerdings, dass hier ein geringerer Reinigungseffekt vorlag.

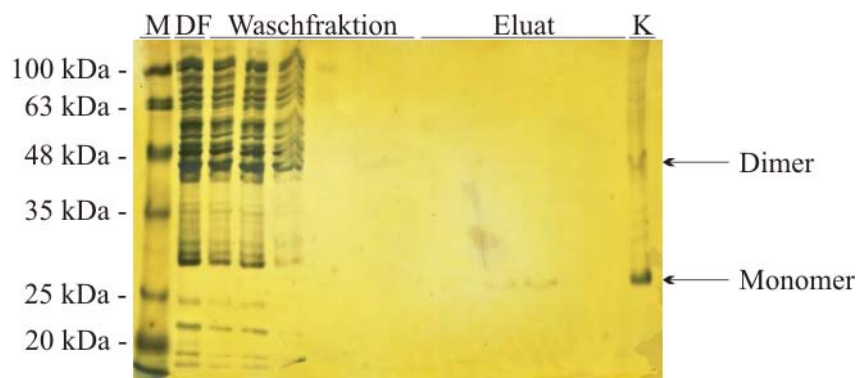


Abbildung 6.12: SDS-PAGE mit Silberfärbung zur Auswertung einer analytischen Reinigung mittels “1 ml-Gravity Flow Strep-Tactin[®] Sepharose[®]”.

Die mit 1 % LDAO solubilisierete Fraktion in 1-fach Tris 300-Puffer wurde auf die Säule geladen. 6 Waschschrte (je 1 ml) mit A-Strep-Puffer + 0,01 % β -LM wurden durchgeführt. Die Elution erfolgte durch das 6-malige auftragen von 500 μ l B-Strep-Puffer mit 0,01 % β -LM (Eluat). Für die Analyse auf einem 12 % SDS-Gel wurden 1 μ l des Durchflusses (DF) und jeweils 10 μ l der Waschfraktionen und des Eluats aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im SDS-Elektrophorese-Puffer mit einer anschließenden Silberfärbung (beides siehe Tabelle 4.10). M: Proteinstandard (siehe Tabelle 4.11).

Für folgende präparative Reinigungen wurden gepackte Säulen mit dem Säulenmaterial Sepharose[®] verwendet (siehe Abbildung 6.12), da dieses Material von IBA, Göttingen (D) und GE Healthcare, München (D) angeboten wurde.

6.7.4 Präparative Affinitätsreinigung mittels Streptavidin-Anhängsel

Für die Reinigung des B-Paralogs wurde die präparierte Membran in Tris 300-Puffer mit 1 % LDAO solubilisiert (siehe Abschnitt 5.4). Das Solubilisat wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 bis 0,5 ml/min auf eine 5 ml-*Strep-Tactin*[®] Sepharose[®]-Säule (IBA, Göttingen (D)) aufgetragen. Dabei betrug die Säulenbeladungszeit ~ 16 h. Die Säule wurde mittels A-Strep-Puffer gewaschen und es

folgte die Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin (100 % B-Strep-Puffer, siehe Tabelle 4.9). Es konnten zwei B-Paralog-beinhaltende-Fractionen eluiert werden (siehe Abbildung 6.13 a und b: Fractionen mit Absorptionsmaxima bei A_{280} und A_{415}).

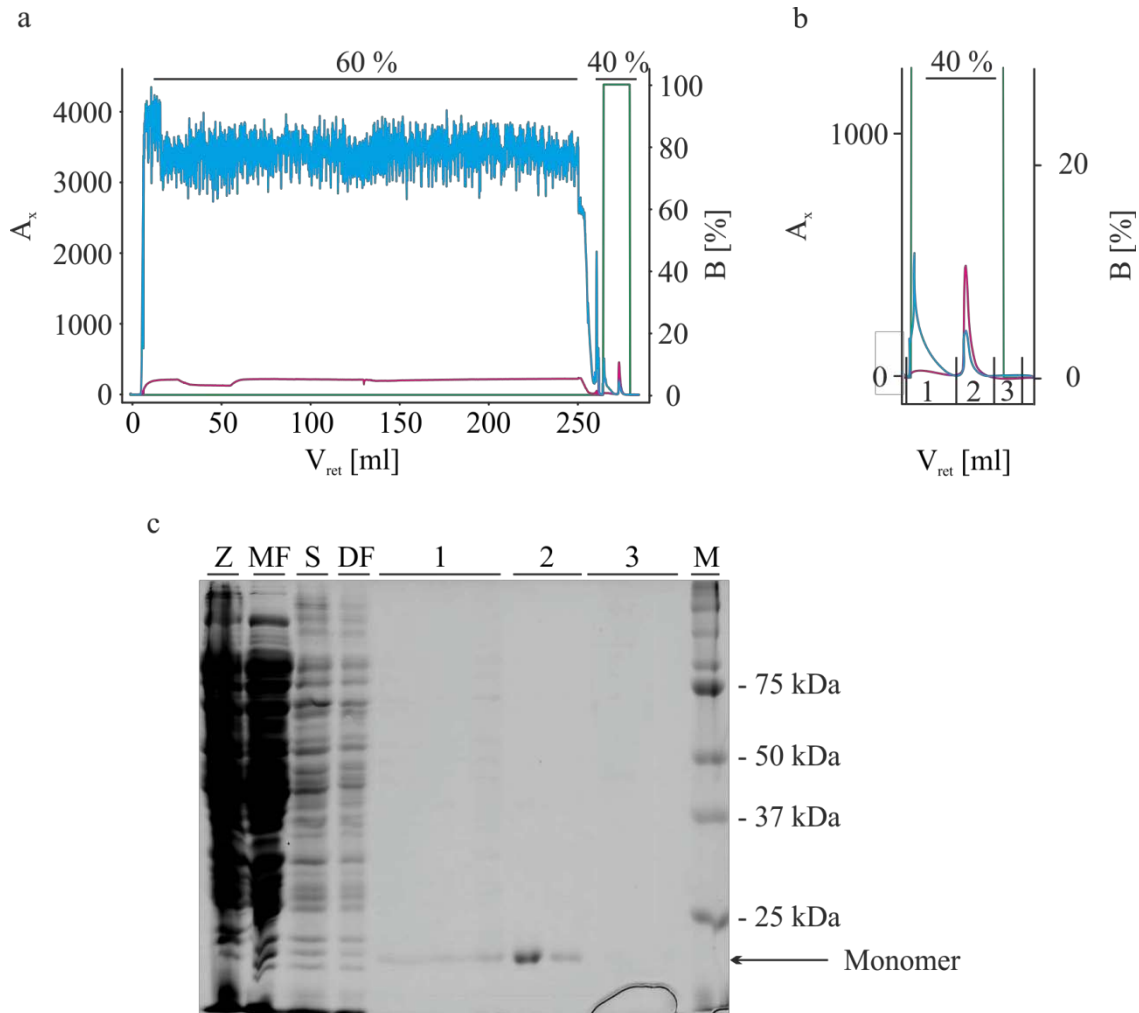


Abbildung 6.13: Reinigung des B-Paralogs (WT) über eine 5 ml-Strep-Tactin-Sepharose-Säule (IBA, Göttingen (D)).

a) Äkta-Chromatogramm der B-Paralog-Reinigung. Das Protein wurde mit einer langsamen Fließgeschwindigkeit (0,2 ml/min) auf die Säule geladen. Ungebundenes Protein wurde mit einem Waschschrift von der Säule entfernt. Dokumentiert wurde dies über die Absorption bei 280 nm (blau) und 415 nm (pink). Nach Erreichen der Basislinie erfolgte die Elution mit 100 % B-Strep-Puffer (grün; siehe Tabelle 4.9). b) Ausschnitt aus dem Äkta-Chromatogramm aus a, dargestellt ist das Elutionsprofil der Reinigung. Der B-Paralog wurde in zwei Fraktionen (1 und 2) eluiert, welche später unabhängig voneinander behandelt wurden. A_x : Absorption bei 280 nm bzw. 415 nm; V_{ret} : Elutionsvolumen; Anteil des Puffers B in % ist in grün dargestellt. c) Analyse der Reinigungsfraktionen via SDS-PAGE (12 %). Im Eluat 1 und 2 wurden Proteinbanden auf Höhe des B-Paralogs (Monomer) detektiert. Aufgetragen wurden das Zellhomogenat (Z: 2 μ l), die Membranfraktion (MF: 2 μ l), das Solubilisat (S; 2 μ l), der Durchfluss der Streptactin Säule (DF: 10 μ l), die Elutionsfraktionen (1: 10 μ l, 2: 10 μ l, 3: 10 μ l). M: Proteinstandard (siehe Tabelle 4.11).

Während Eluat 1 Fremdproteine beinhaltet, konnte in Eluat 2 nur eine Signalbande im SDS-Gel auf Höhe des B-Paralog-Monomers detektiert werden (siehe Abbildung 6.13 c). Die Funktionalität wurde mit Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren-überprüft. Die Fraktionen 1 und 2 wurden getrennt voneinander behandelt und durch mehrmaliges Verdünnen und Einengen konnte das Desthiobiotin in den Proteinproben minimiert werden. Mit dieser Reinigungsstrategie konnten $\sim 0,27$ mg/L Zellkultur reiner B-Paralog gewonnen werden.

6.8 Präparative Größenausschlusschromatographie des A-Paralogs als letzter Reinigungsschritt

Die Elutionsfraktionen einer Reinigung (siehe Abschnitt 6.7), in welchen der A-Paralog durch SDS-PAGE (siehe Abschnitt 5.7) und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (siehe Abschnitt 5.11) nachgewiesen wurde, wurden vereint und mit einem Konzentrador (Ausschlussgröße 50 kDa) eingengt. Mit einer HiLoad 16/60 Superdex 200 wurde eine Größenausschlusschromatographie im präparativen Maßstab durchgeführt (siehe Abschnitt 5.5.8 und Abbildung 6.14).

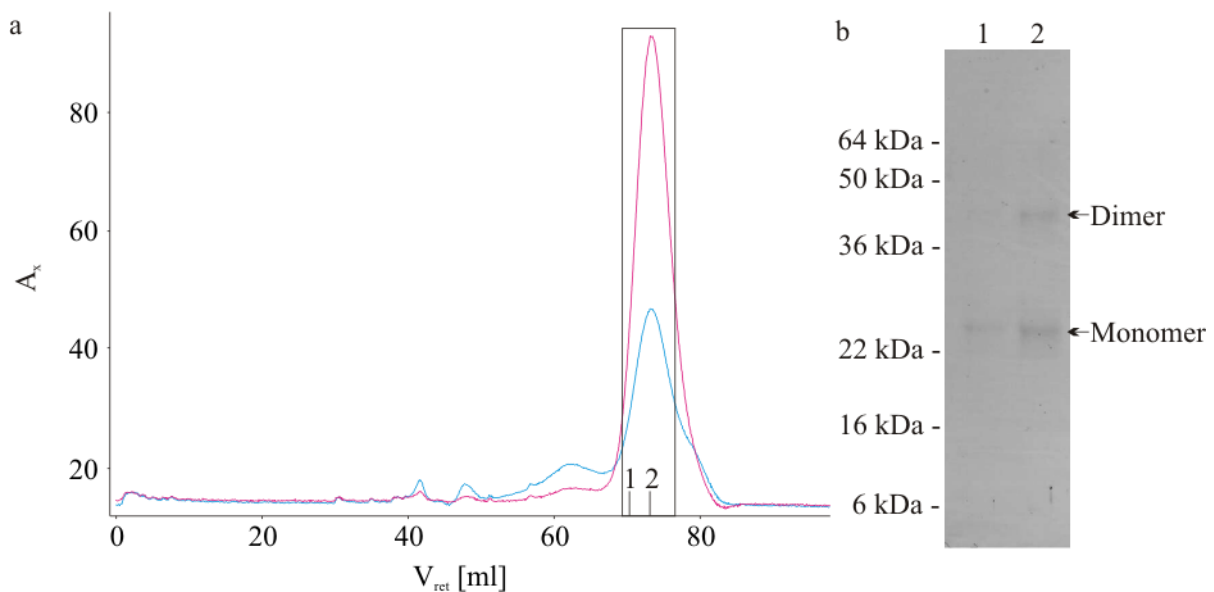


Abbildung 6.14: Äkta-Chromatogramm (a) und Ausschnitt eines SDS-Gels (b) der präparativen Größenausschlusschromatographie (16/60 Superdex 200, GE Healthcare) des A-Paralogs.

Der A-Paralog wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution wurde über die Absorption bei 280 nm (blau) und 415 nm (pink) verfolgt und in 1-ml-Schritten fraktioniert. Die Auswertung erfolgte über Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren (nicht gezeigt) und in 12 % SDS-PAGE (b) mit SDS Elektrophorese-Puffer (siehe Tabelle 4.10). Aufgetragen wurden jeweils 4 μ l der Hauptfraktion mit dem Absorptionsmaximum bei 280 nm und 415 nm (2) und eine Randfraktion (1). A_x : Absorption bei 280 nm, bzw. 415 nm; V_{ret} : Elutionsvolumen.

Die Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe Abbildung 6.14 b) und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren analysiert. Es konnte in den Fraktionen mit dem Absorptionsmaxima bei 280nm und 415 nm und dessen Randfraktionen funktionelles A-Paralog nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.14 a). Diese Elutionsproben wurden vereinigt und für spätere Kristallisationsansätze bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml eingeeengt.

6.9 Initiale Kristallisationsansätze des A-Paralogs

Mit dem gereinigten Protein (aus Abschnitt 6.8) in 20 mM Hepes/pH 7,2; 1 mM EDTA; 2,4 % Benzamidin; 0,1 % β -LM wurden im *96-well*-Screen (MemGold* HT-96) verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet. Die Proteinkonzentration lag hier bei 10 mg/ml. In weiteren Ansätzen wurde der A-Paralog mit Ascorbat (2 mM) oder Kaliumhexacyanoferrat (III) (2 mM) inkubiert. Kristalline Strukturen wurden unter verschiedenen Bedingungen nach 5 Tagen gefunden (siehe Abbildung 6.15).

Im *Grid* (Raster) Screen wurde für Bedingung *f* (0,1 M CaCl_2 ; 0,1 M Tris, pH 6,5; 13 % w/v PEG 2000 MME) die PEG 2000 MME-Konzentration von 13 % bis 30 % und der pH-Wert von 6,5 bis 7,5 variiert. Die Tropfengröße lag bei 1,4 μl (0,7 μl Reservoirlösung + 0,7 μl Proteinlösung). Auch hier konnten nach ca. 5 Tagen kristalline Strukturen gefunden werden. Jedoch zeigten die Röntgenbeugungsexperimente, dass diese Strukturen keine Proteinkristalle waren. Die Beugungsbilder zeigten, dass der untersuchte Kristall aus Salz bestand (siehe Anhang 11.12).

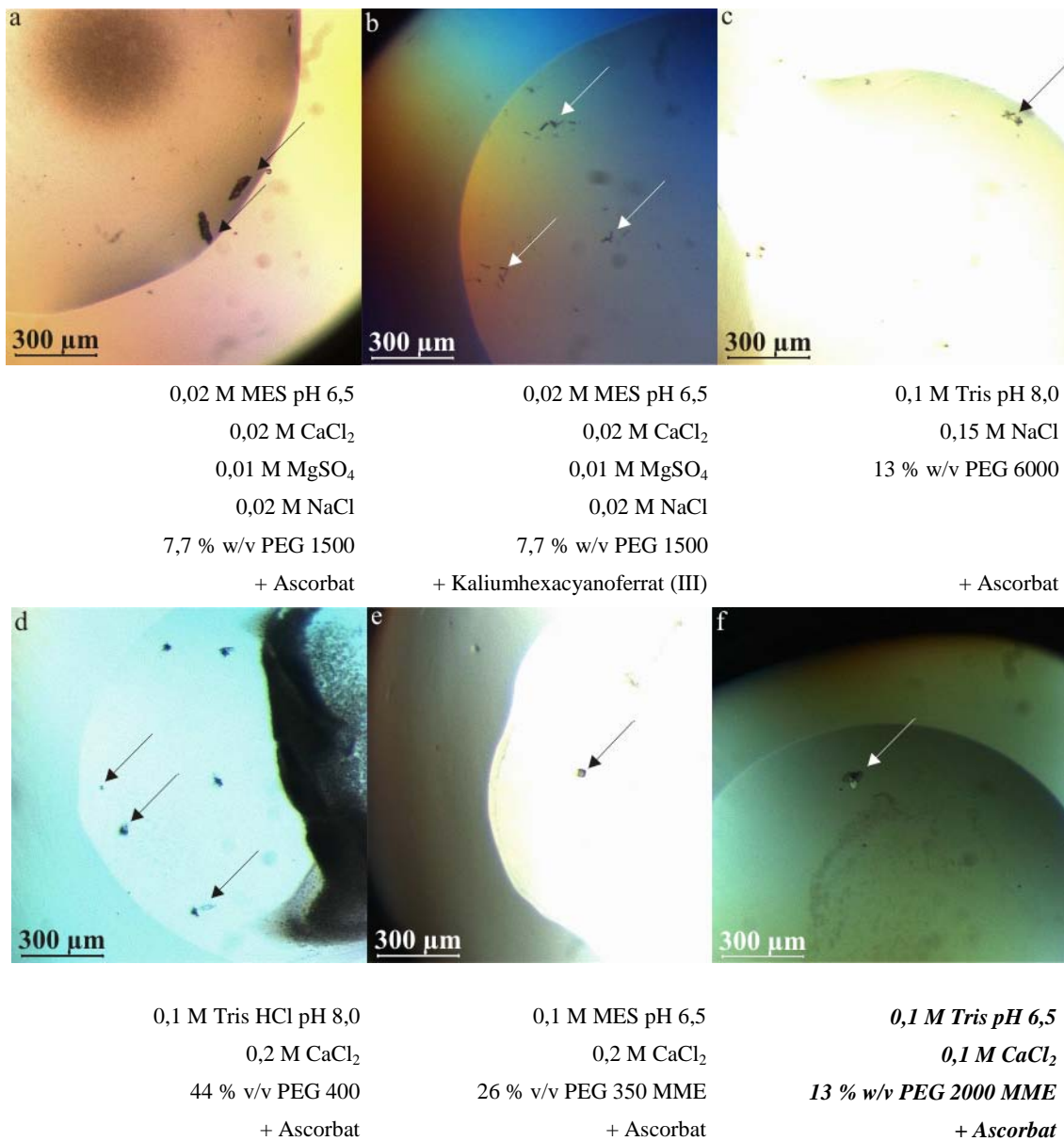


Abbildung 6.15: Kristalline Formen bei verschiedenen Bedingungen (a – f) im MemGold HT-96 Screen.

Jeweils 10 mg/ml Protein wurden in 100 nl + 100 nl Tropfen im *Sitting-Drop*-Verfahren kristallisiert. Nach 5 Tagen zeigten sich erste kristalline Strukturen. Mit der Bedingung f (fett und kursiv markiert) wurde ein *Grid* Screen durchgeführt.

6.10 Analyse der CYBASC-Wildtyp-Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen

Bei Verwendung von 0,1% β -LM wurde durch Röntgenstrukturanalyse (siehe Anhang 11.12) gezeigt, dass unter den verwendeten Konditionen keine Proteinkristalle wuchsen. Aus diesem Grund sollten weitere Detergenzien (0,5 % C_8E_4 , 0,1 % DM, 0,1 % LDAO und 0,01% β -LM, siehe Tabelle 4.16) untersucht werden. Im *Batch*-Verfahren (siehe Abschnitt 5.5.4) wurde ein Detergenzientausch zu 0,1 % LDAO sowie 0,1 % DM mit dem gereinigten B-Paralog durchgeführt. Der A-Paralog wurde dagegen in C_8E_4 , β -LM und LDAO untersucht. Allerdings zeigte sich, dass das Protein in 0,5 % C_8E_4 präzipitierte (CMC 0,22 %). Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

6.10.1 Thermodynamische Untersuchung der Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit beider Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen

Die Paraloge wurden in verschiedenen Detergenzien mit 5 μ M, 2 mM und 80 mM Ascorbat inkubiert. Es wurden Spektren aufgenommen um die Reduzierbarkeit zu berechnen. Als 100 % wurde die Reduzierbarkeit mit Na-Dithionit verwendet (siehe Abschnitt 5.12.1).

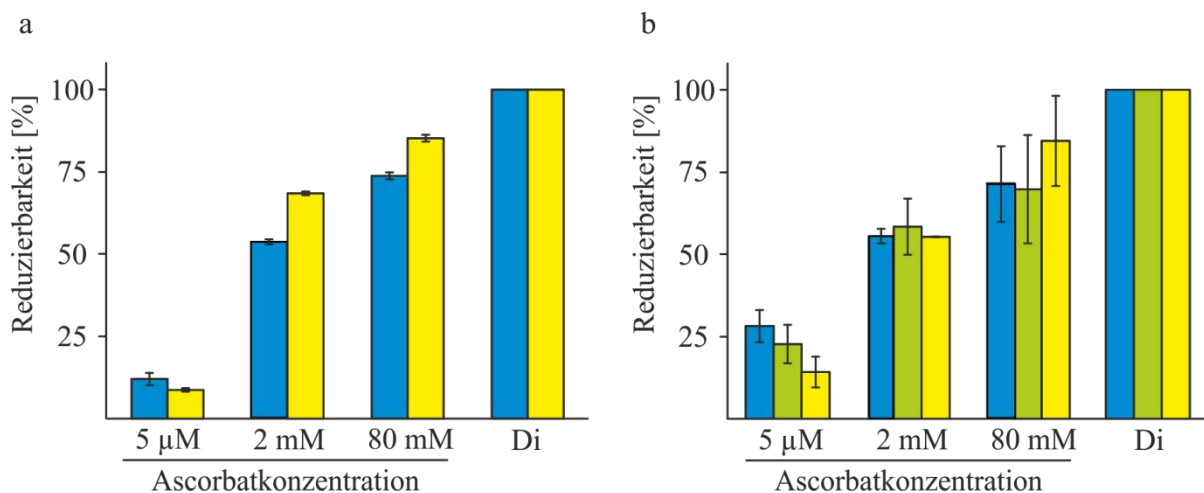


Abbildung 6.16: Reduzierbarkeit des A-Paralog (a) und B-Paralog (b) in unterschiedlichen Detergenz-Mizellen durch verschiedene Ascorbatkonzentrationen.

Mit 5 μ M, 2 mM und 80 mM Ascorbat wurde die Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit der Paraloge in verschiedenen Detergenzien spektroskopisch untersucht. Die Spektren wurden über die Peakfläche und Peakhöhe bei 561 nm ausgewertet. Als blaue Balken ist die Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit der Proteine in 0,01 % β -LM dargestellt. Als gelbe Balken sind die Reduzierbarkeiten der Paraloge in LDAO wiedergegeben. Für den B-Paralog wurde zusätzlich die Reduzierbarkeit in 0,1 % DM (grün) untersucht. Als 100 % wurde die jeweilige Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit (Di) gesetzt.

Der A-Paralog in β -LM besaß nach Inkubation mit 5 μ M Ascorbat eine Reduzierbarkeit von 12 % (+/- 2 %) bezogen auf die vollständige Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit. Bei einer Inkubation mit 2 mM lag die Reduzierbarkeit bei 53 % (+/- 1 %). Bei einer Inkubation mit 80 mM Ascorbat lag die Reduzierbarkeit bei 74 % (+/- 1 %). Ähnliche Werte wurden auch für den A-Paralog in 0,1 % LDAO

gefunden. In Relation zu der vollständigen Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit lag die Reduzierbarkeit durch 5 μ M Ascorbat bei 9 % (+/- 1 %), für 2 mM Ascorbat bei 68 % (+/- 1%) und für 80 mM Ascorbat bei 85 % (+/- 1 %) (siehe Abbildung 6.16). Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Auswertungen für den B-Paralog: Der Komplex aus B-Paralog und β -LM besaß eine Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit von 28 % (+/- 5 %) bezogen auf die Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit. Bei Verwendung von 2 mM Ascorbat lag die Reduzierbarkeit bei 55 % (+/- 2 %). Nach Inkubation mit 80 mM Ascorbat konnte mit 71 % (+/- 11 %) eine weitere Erhöhung der Reduzierbarkeit des B-Paralogs gemessen werden. Für den Komplex aus LDAO und B-Paralog wurden bei Inkubation mit 5 μ M Ascorbat 14 % (+/- 5 %) gemessen, bei 2 mM Ascorbat 55 % (+/- 1 %) und bei 80 mM Ascorbat 84 % (+/- 14 %) jeweils bezogen auf die Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit. Für den B-Paralog in 0,1 % DM konnten Reduzierbarkeiten mit 5 μ M Ascorbat von 23 % (+/- 6 %) gefunden werden, mit 2 mM Ascorbat lag die Reduzierbarkeit bei 58 % (+/- 9 %) und bei Inkubation mit 80 mM war die Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit bei 70 % (+/- 16 %) (siehe Abbildung 6.16).

6.10.2 Kinetische Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit beider CYBASC-Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen

Die kinetischen Untersuchungen mit den gereinigten Paralogen in verschiedenen Detergenzien wurden analog zu Abschnitt 5.9.3 vorgenommen. Dabei wurden alle Messungen bei 24 °C durchgeführt (siehe Abbildung 6.17).

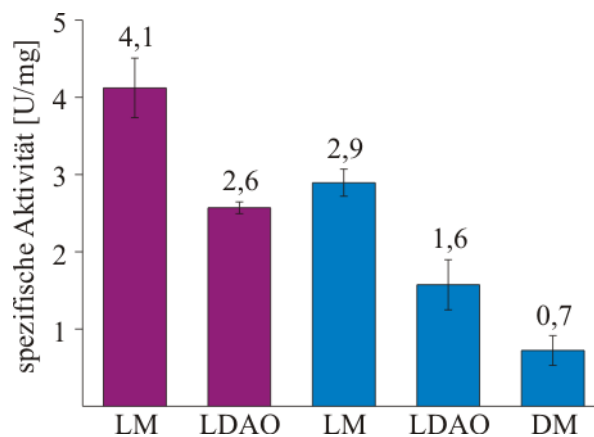


Abbildung 6.17: Direkter Aktivitätstests zur Bestimmung der Ascorbat-Umsetzungsraten (U/mg) der Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen.

Die Proteine, inkubiert in verschiedenen Detergenzien (β -LM, LDAO und DM), wurden bei 24 °C auf ihre kinetische Aktivität hin untersucht (siehe Abschnitt 5.12.2). Aktivitäten, angegeben in U/ mg, wurden mehrfach bestimmt und es wurde ein Mittelwert gebildet. In Lila sind die Aktivitäten des A-Paralogs dargestellt und in Blau die des B-Paralogs.

Die Aktivität des A-Paralogs in 0,01 % β -LM lag bei durchschnittlich 4,1 U/mg. In einem Komplex mit LDAO lag hingegen die Aktivität nur bei 2,6 U/mg. Für den B-Paralog konnten folgende Aktivitäten bestimmt werden: In β -LM betrug diese 2,9 U/mg, in LDAO 1,6 U/mg und in DM nur bei 0,7 U/mg. Für beide Paraloge wurden die höchsten Aktivitäten in 0,01 % β -LM gefunden. Aus diesem Grund wurden spätere Analysen der Varianten (siehe Abschnitt 6.14) und der modifizierten Paraloge (siehe Abschnitt 6.13) in 0,01 % β -LM durchgeführt.

6.10.3 Abbau des B-Paralogs in der DM Detergenz-Mizelle

Bei den Untersuchungen des B-Paralogs in der DM Detergenz-Mizelle wurde durch SDS-PAGE (siehe Abschnitte 5.7) gezeigt, dass das Protein in 0,1 % DM instabil war und abgebaut wurde (siehe Abbildung 6.18).

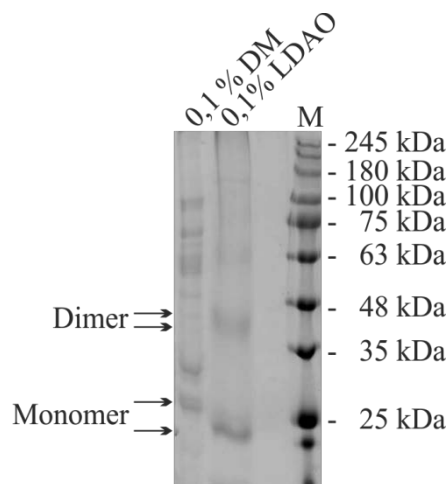


Abbildung 6.18: Analyse des Proteinabbaus in 0,1 % DM via SDS-PAGE (12 %).

Jeweils 10 μ l reines Protein in 0,1 % DM und 0,1 % LDAO wurden aufgetragen (siehe Abschnitt 5.7). Während in der Probe mit 0,1 % LDAO nur zwei Banden (Monomer und Dimer) detektiert wurden, waren in der Proteinprobe mit 0,1 % DM Abbaubanden zu erkennen.
M: Proteinstandard.

Wegen dieser Beobachtung des Proteinabbaus in 0,1 % DM wurde der Ansatz im Weiteren nicht verfolgt.

6.10.4 Größenermittlung der Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen mittels Größenausschlusschromatographie

Um die Größe und die Monodispersität der Paralogen in verschiedenen Detergenz-Mizellen zu ermitteln, wurde eine analytische Gelfiltration (Superdex 200 15/30, GE Healthcare, München (D)) durchgeführt. Untersucht wurde der A-Paralog in 0,01 % β -LM und 0,1 % LDAO sowie der B-Paralog in 0,01 % β -LM und 0,1 % LDAO. Die Fraktionen der Größenausschlusschromatographie wurden auf Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren und im SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 5.7) untersucht (siehe Anhang 11.9). Für beide Paraloge, welche in 0,01 % β -LM gereinigt wurden, wurden zwei Absorptionsmaxima mit Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren eluiert. Für den A-Paralog hatten die Peaks eine Größe von 158 kDa (1,77 ml) und 75 kDa (1,97 ml) sowie für den B-Paralog 126 kDa (1,83 ml) und 59 kDa (2,03 ml) (siehe Tabelle 6.1 und Abbildung 6.19). Auch die Größenausschlusschromatographie der Komplexe aus Paralog und 0,1 % LDAO zeigten Absorptionsmaxima mit Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren. Hierbei lagen die Größen bei 75 kDa für den A-Paralog und 126 kDa für den B-Paralog (siehe Tabelle 6.1 und Abbildung 6.19).

Tabelle 6.1: Auflistung der Molekulargewichte der CYBASC-Paraloge in verschiedenen Detergenz-Mizellen.

V_{ret}	K_{AV}	$\log_{10}(\text{MW})$	MW [kDa]	Detergenzkonz	Paralog
1,77	0,328	2,200	158	0,1 % β -LM	
1,97	0,437	1,871	74	0,1 % β -LM	A
1,97	0,437	1,871	74	0,1 % LDAO	
1,83	0,361	2,101	126	0,1 % β -LM	
2,03	0,470	1,772	59	0,1 % β -LM	B
1,86	0,377	2,052	113	0,1 % LDAO	

V_{ret} : Elutionsvolumen; K_{AV} : Verhältnis von Porengröße der Säule zu Protein; MW: Molekulargewicht; Detergenzkonz.: Konzentration des Detergenz, welches für die Chromatographieläufe verwendet wurde.

Bei allen Chromatographieläufen konnte in den mit * markierten Absorptionsmaxima Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren aufgenommen werden (siehe Abbildung 6.19). Im SDS-PAGE zeigten diese Fraktionen Banden auf der Höhe von ~ 25 kDa (Monomer) und/ oder ~ 50kDa (Dimer).

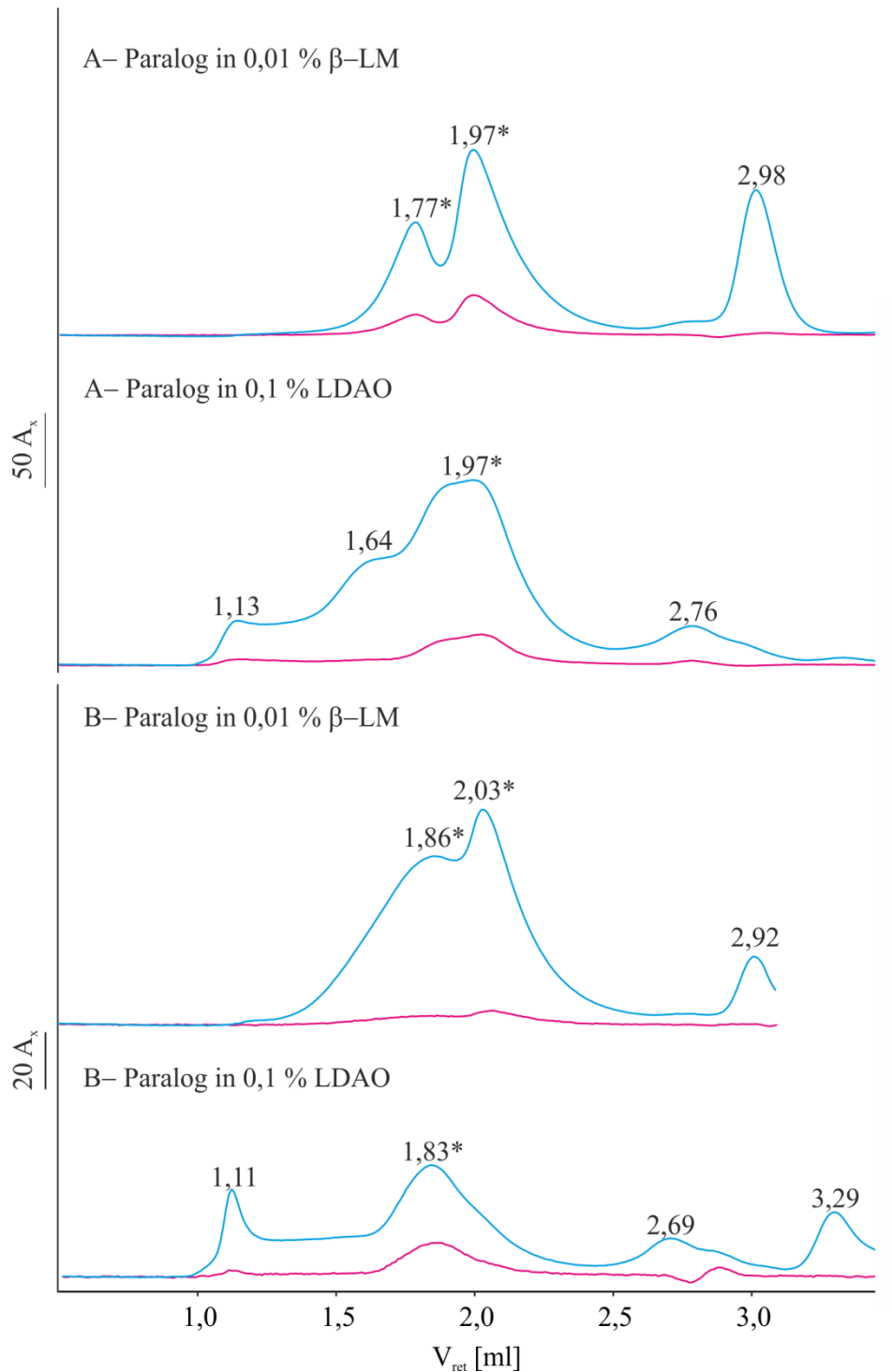


Abbildung 6.19: Elutionschromatogramme des A-Paralogs in verschiedenen Detergenz-Mizellen (Superdex 200 15/30).

50 μ l Proteinprobe wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ l/min auf die Superdex 200 15/30 Säule geladen. Die Elution wurde über die Absorption bei 280 nm (blau) und 561 nm (pink) verfolgt und in 100 μ l Schritten fraktioniert. In den Fraktionen der Absorptionsmaxima, die mit einem * gekennzeichnet sind, konnten Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren gemessen werden (nicht gezeigt). Gleichzeitig konnten in 4 -16% Bis Tris Gel NuPAGE[®] mit MES-Puffer (siehe Tabelle 4.10) und einem Probenvolumen von 12 μ l Proteinbanden bei ~ 25 kDa und ~ 50 kDa detektiert werden (siehe Anhang 11.9). A_x : Absorption bei 280 nm, bzw. 561 nm; V_{ret} : Elutionsvolumen.

6.11 Eisenchelat-Reduktion durch CYBASC-Paraloge

6.11.1 Thermodynamische Eisenchelat-abhängigen-Oxidation der CYBASC-Paraloge

In der Dissertation von L. Cenacchi (2007) wurde thermodynamisch gezeigt, dass beide Paraloge verschiedene Eisenchelate (Fe^{3+} -EDTA und Fe^{3+} -Citrat) reduzieren können.

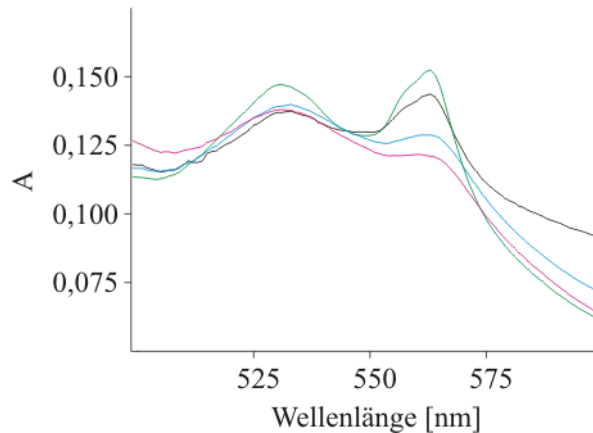


Abbildung 6.20: Oxidation des A-Paralogs am Beispiel verschiedener Fe^{3+} -EDTA-Konzentrationen.

Ascorbat reduzierte A-Paralog (grünes Spektrum) wurde mit Fe^{3+} -EDTA (1 μM Fe^{3+} -EDTA: schwarzes Spektrum; 1 mM Fe^{3+} -EDTA: blaues Spektrum, 10 mM Fe^{3+} -EDTA: pinkes Spektrum) inkubiert. Nach jeweils vollständiger Oxidation des A-Paralogs wurden die Spektren aufgenommen.

Zunächst sollten diese Ergebnisse reproduziert werden: Von den reduzierten Proteinen (siehe Abschnitt 5.12) wurden Spektren aufgenommen. Es folgte die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Fe^{3+} -EDTA, bzw. Fe^{3+} -Citrat. Nach vollständiger Oxidation der Paraloge wurde weitere Spektren aufgenommen (beispielhaft in Abbildung 6.20 für A-Paralog mit Fe^{3+} -EDTA), welche über die Peakfläche und Höhe bei 561 nm ausgewertet wurden (siehe Abschnitt 5.12). Als 100 % wurde die Reduzierbarkeit beider Paraloge vor Zugabe der Eisenchelate gewählt (siehe Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Reduktion von Fe^{3+} -EDTA und Fe^{3+} -Citrat durch die CYBASC-Paraloge.

Fe^{3+} -EDTA Konz.	Reduzierbarkeit [%]		Fe^{3+} -Citrat Konz.	Reduzierbarkeit [%]	
	A-Paralog	B-Paralog		A-Paralog	B-Paralog
0	100	100	0	100	100
1 μM	72 (+/- 18)	90 (+/- 4)	1 μM	83 (+/- 1)	88 (+/- 13)
1 mM	35 (+/- 1)	68 (+/- 5)	1 mM	70 (+/- 6)	86 (+/- 3)
10 mM	29 (+/- 1)	58 (+/- 9)	10 mM	n. g.	85 (+/- 6)

Nach Zugabe von 1 μM Fe^{3+} -EDTA lag die Gesamtreduzierbarkeit des A-Paralogs nur noch durchschnittlich bei 72 % (+/- 18%) bezogen auf die Gesamtreduzierbarkeit durch Ascorbat. Die Reduzierbarkeit des B-Paralogs hingegen war nur auf 90 % (+/- 4 %) zurückgegangen. Bei Zugabe von 1 mM konnte für den A-Paralog eine Reduzierbarkeit von 35 % (+/- 1%) gemessen werden. Die Reduzierbarkeit des B-Paralogs war lediglich auf 68 % (+/- 5%) zurückgegangen. Der A-Paralog wurde durch eine Inkubation mit 10 mM Fe^{3+} -EDTA auf 29 % (+/- 1 %) reduziert und der B-Paralog auf 58 % (+/- 9 %) (siehe Tabelle 6.2). Ähnliches konnte bei Zugabe verschiedener Fe^{3+} -Citrat Konzentrationen beobachtet werden: Bei Zugabe von 1 μM Fe^{3+} -Citrat war der A-Paralog nur noch zu 83 % (+/- 1 %) reduziert, der B-Paralog nur noch zu 88 % (+/- 13 %). Die Inkubation mit 1 mM Fe^{3+} -Citrat erbrachte eine Reduzierbarkeit von 70 % (+/- 6 %) des A-Paralogs sowie eine 86 % (+/- 3 %) Reduzierbarkeit des B-Paralogs. Die Reduzierbarkeit des A-Paralogs nach Inkubation mit 10 mM Fe^{3+} -Citrat konnte nicht ausgewertet werden, für den B-Paralog wurde eine Reduzierbarkeit von 85 % (+/- 6 %) ermittelt (siehe Tabelle 6.2).

6.11.2 Kinetische Eisenchelate-abhängigen-Oxidation der CYBASC-Paraloge

Neben den thermodynamischen Analysen sollte die Reduktion der Eisenchelate durch beide Paraloge kinetisch bestimmt werden. Hierfür wurden beide Proteine über Nacht mit 100 mM Ascorbat inkubiert (siehe Abschnitt 5.10). Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde der Abfall der Absorption $A_{\Delta 561 - 575}$ über die Zeit gemessen (siehe Abschnitt 5.12). Für den A-Paralog war es nicht möglich die Aktivität zu bestimmen, da diese zu hoch war. Aus diesem Grund wurde die mit DEPC-modifizierte Probe (siehe Abschnitt 5.9) verwendet. In Abbildung 6.21 sind die gemessenen Aktivitäten graphisch dargestellt.

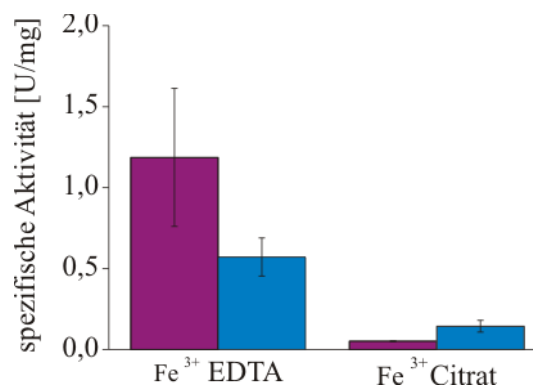


Abbildung 6.21: Umsetzungsrate der Fe^{3+} -Chelate durch beide Paraloge.

Ascorbat-reduziertes Protein wurde mit 2 μM Fe^{3+} Chelat versetzt und der Abfall bei $A_{\Delta 561 - 575}$ spektroskopisch verfolgt. Aufgrund der hohen Aktivität des A-Paralogs wurde eine DEPC-modifizierte Probe verwendet (in lila). Die Ergebnisse des B-Paralogs sind in Blau dargestellt.

Die Aktivitäten des DEPC-modifizierten A-Paralogs betragen für die Reduktion von Fe^{3+} -EDTA 1,2 U/mg (+/- 0,4 U/mg) und für Fe^{3+} -Citrat 0,05 U/mg (+/- 0,0005 U/mg). Die Aktivitäten für den B-Paralog waren 0,6 U/mg (+/- 0,1 U/mg) für Fe^{3+} -EDTA und 0,1 U/mg (+/- 0,04 U/mg) für Fe^{3+} -Citrat.

6.12 Bestimmung der E_M -Werte-der CYBASC-Proteine

Mit Hilfe der elektrochemischen Zelle (siehe Tabelle 4.17) wurden die Häm-Mittelpunkts-Potentiale beider gereinigten Paralogs bestimmt (siehe Abschnitt 5.13). Die Messungen wurden bei 5 °C und im NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.9) mit 0,01 % β -LM durchgeführt (siehe Abbildung 6.22).

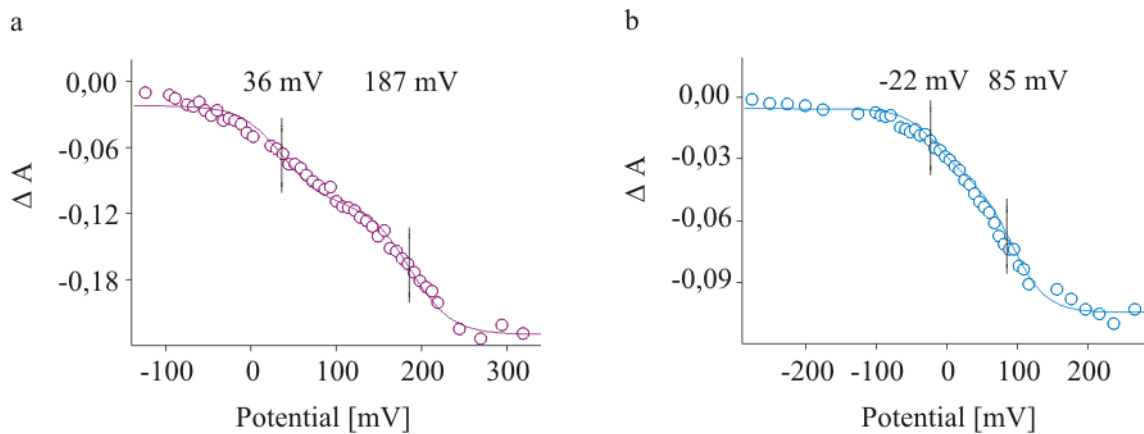


Abbildung 6.22: Redox titration des gereinigten A-Paralogs (a) und des B-Paralogs (b) in NaPhos-Puffer mit 0,01 % β -LM und einem pH 7,2.

Die E_M Werte wurden mit der Nernst-Gleichung und einem $n = 1$ bestimmt. Der Korrelationsfaktor lag für A-Paralog (a) bei $r = 0,9917$ und für den B-Paralog (b) bei $r = 0,9940$. Die Potentiale des A-Paralogs waren 36 mV (A-Häm b_L) und 187 mV (A-Häm b_H) und für den B-Paralog -22 mV (B-Häm b_L) und 85 mV (B-Häm b_H). Die Messungen wurden im NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.10) bei 4 °C durchgeführt.

Der E_M -Wert des Niedrig-Potential-Häms des A-Paralogs betrug 36 mV (A-Häm b_L). Das Hoch-Potential Häm hatte einen Wert von 187 mV (A-Häm b_H). Für den B-Paralog wurden -22 mV (Niedrig-Potential-Häm; B- b_L) und 85 mV (Hoch-Potential-Häm; B- b_H) als E_M -Werte bestimmt (siehe Abbildung 6.22).

6.13 Charakterisierung der CYBASC-Paraloge durch DEPC-Modifikation

Im Jahr 2000 konnte für das *BCytb₅₆₁*-CG gezeigt werden, dass die Ascorbat Reduktion durch DEPC inhibiert wird (Tsubaki et al., 2000). Es sollte hier überprüft werden, ob diese Hemmung der Reduktion auch für beide Paraloge nachzuweisen war. Gleichzeitig sollte auch untersucht werden, ob eine DEPC-Hemmung durch Ascorbat unterdrückt werden kann.

6.13.1 Effekte auf die Reduzierbarkeit der DEPC-modifizierten-Paraloge

Das reine oxidierte Protein wurde wie in Abschnitt 5.9 mit DEPC sowie DEPC und Ascorbat behandelt. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Probe gemessen. Die Reduzierbarkeit durch Ascorbat (Spatelspitze) wurde durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren zunächst überprüft (siehe Abbildung 6.23). Die Reduzierbarkeit der unbehandelten Kontrollprobe durch Ascorbat und Dithionit wurde jeweils als 100 % gesetzt (siehe Tabelle 7.1 und Abbildung 6.23).

Der DEPC-modifizierte A-Paralog besaß im Verhältnis zur Kontrolle eine Reduzierbarkeit durch Ascorbat von 8 %. Die Reduzierbarkeit mit Na-Dithionit hingegen betrug nur 73 % (siehe Abbildung 6.23). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den DEPC-modifizierten B-Paralog beobachtet: Die Reduzierbarkeit durch Ascorbat lag nur bei 36 % und die Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit wurde nicht inhibiert (112 %) (siehe Abbildung 6.23). Die mit DEPC und Ascorbat behandelten A-Paralog-Probe zeigte eine Reduzierbarkeit von 42 %. Die Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit blieb im Verhältnis zur Kontrollmessung unverändert (108 %). Der B-Paralog, welcher mit DEPC und Ascorbat inkubiert wurde, besaß eine Reduzierbarkeit durch Ascorbat von 54 %. Die Reduzierbarkeit des B-Paralogs durch Na-Dithionit lag hier bei 95 % (siehe Abbildung 6.23).

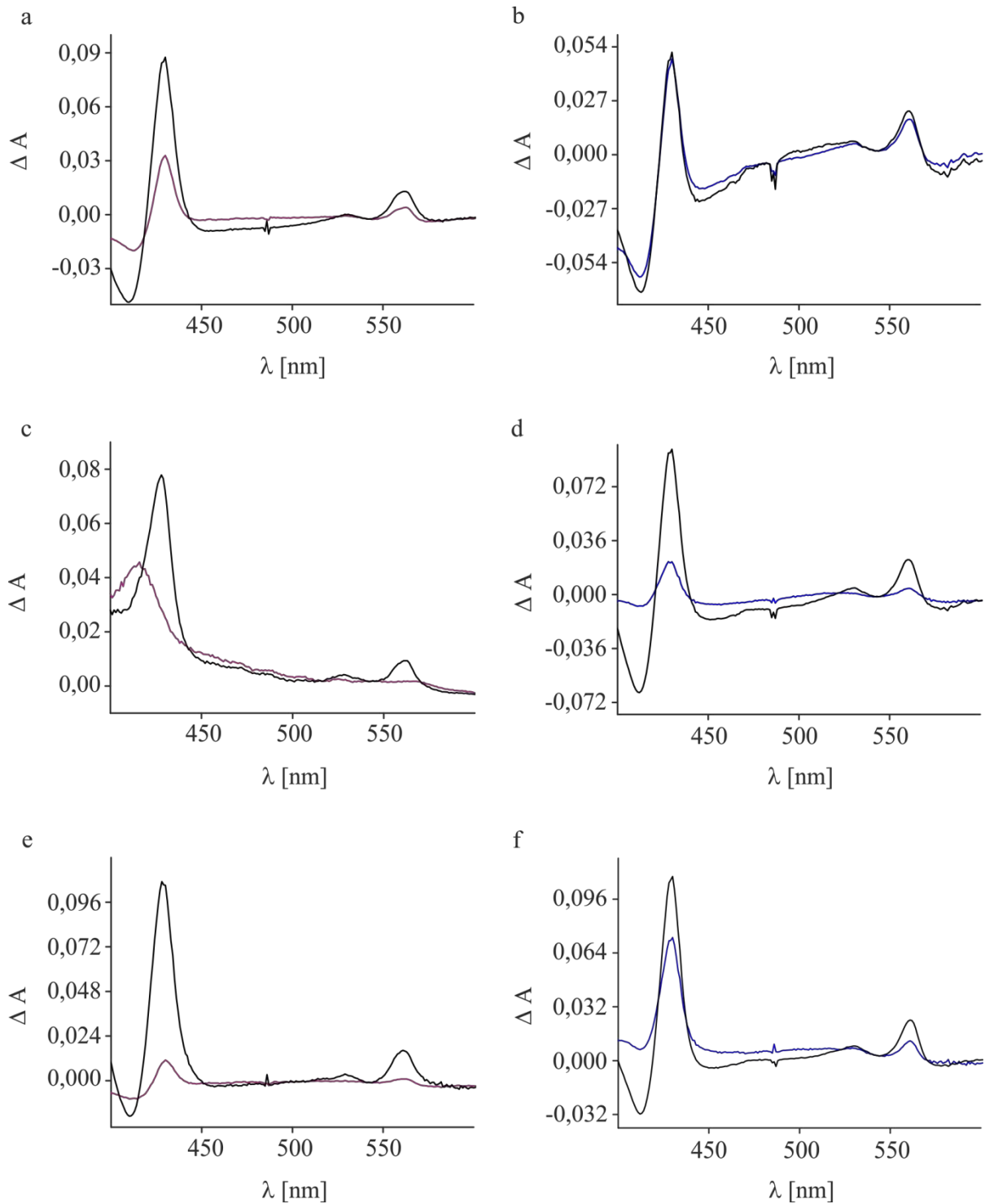


Abbildung 6.23: Spektroskopische Hemmung der Ascorbat Reduzierbarkeit nach Inkubation mit DEPC (c, d) und DEPC und Ascorbat (e, f).

Der A- (a, c, e) und der B-Paralog (b, d, f) wurden in NaPhos-Puffer (a und b), in DEPC (c und d) sowie in DEPC und Ascorbat (e und f) inkubiert. Spektren wurden nach Zugabe von Ascorbat (A-Paralog in Lila und B-Paralog in Blau) aufgenommen. Nach Zugabe von Na-Dithionit wurden weitere Spektren aufgenommen (jeweils schwarz dargestellt) und als 100 % Reduzierbarkeit definiert.

6.13.2 Kinetische Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit der DEPC-modifizierten-CYBASC-Paraloge

Neben der Reduzierbarkeit der modifizierten Paraloge wurden auch die kinetischen Aktivitäten zur Ascorbat-Umsetzungsrate geprüft (siehe Abbildung 6.24). Hierbei wurden für eine bessere Vergleichbarkeit die kinetischen Aktivitäten als RCA-Werte (*relative catalytic activity*) angegeben. Die Aktivität der Kontrolle (Probe „K“) wurde als 100 % definiert.

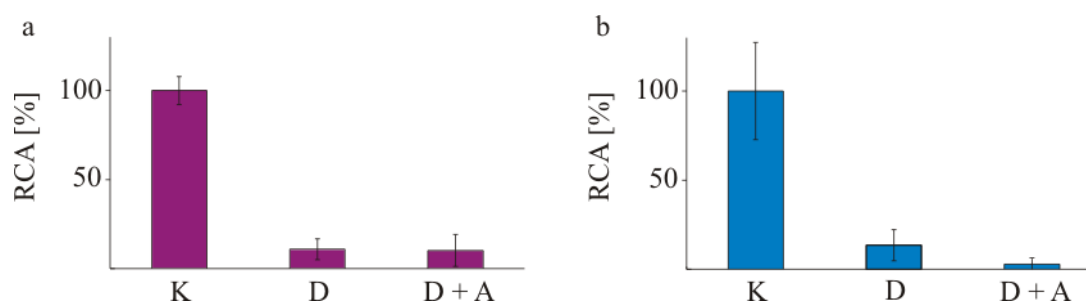


Abbildung 6.24: Relative katalytische Aktivitäten (RCA) des modifizierten A- (a) und B-Paralog (b).

Für die Messungen wurden die Paraloge zunächst mit Kaliumhexacyanoferrat(II) oxidiert und separiert. Die Messungen wurden durch Zugabe von 5 μ M Ascorbat gestartet. Die Aktivitäten der Kontrollen („K“ unmodifiziert) waren 2,2 U/mg (+/- 0,2 U/mg) für den A-Paralog und 12,8 U/mg (+/- 3,5 U/mg) für den B-Paralog. Die Messungen der DEPC-modifizierten Probe („D“) waren 11 % (a: A-Paralog) und 13 % (b: B-Paralog). Die DEPC und Ascorbat-modifizierten Proben sind in D + A gezeigt: Für den A-Paralog lag der RCA-Wert bei 10 % und für den B-Paralog bei 3%.

Der DEPC modifizierte A-Paralog (siehe Abbildung 6.24 a, Probe „D“) besaß eine RCA von 11 % (+/- 6 %) im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle. Für die A-Paralog-Probe, welche mit DEPC und Ascorbat inkubiert war, lag der RCA-Wert bei 10 % (+/- 9 %)(siehe Abbildung 6.24 a, Probe „D+A“). Der DEPC inkubierte B-Paralog (siehe Abbildung 6.24 b, Probe „D“) wies eine Aktivität von 13 % (+/- 9 %) gegenüber der Kontrollprobe auf. Der RCA Wert für die DEPC und Ascorbat behandelte B-Paralog-Probe lag sogar nur bei 3 % (+/- 3 %) (siehe Abbildung 6.24 b, Probe „D+A“).

6.13.3 Bestimmung der E_M -Werte der DEPC modifizierten CYBASC-Paraloge

Durch Redox titrationen sollte untersucht werden, ob die verminderte Reduzierbarkeit (siehe Abschnitt 6.13.1) und die geringeren Aktivitäten der DEPC (siehe Abbildung 6.24, Probe „D“) und DEPC und Ascorbat behandelten Paralog-Proben (siehe Abbildung 6.24, Probe „D+A“) durch Änderung E_M -Werte bedingt war. Dafür wurden wie auch schon bei der Bestimmung der E_M -Werte der unbehandelten Proteine die Messungen mit der elektrochemischen Zelle (siehe Abschnitt 5.13) und dem Redoxmediatoren-Cocktail aus Tabellen 4.15) durchgeführt.

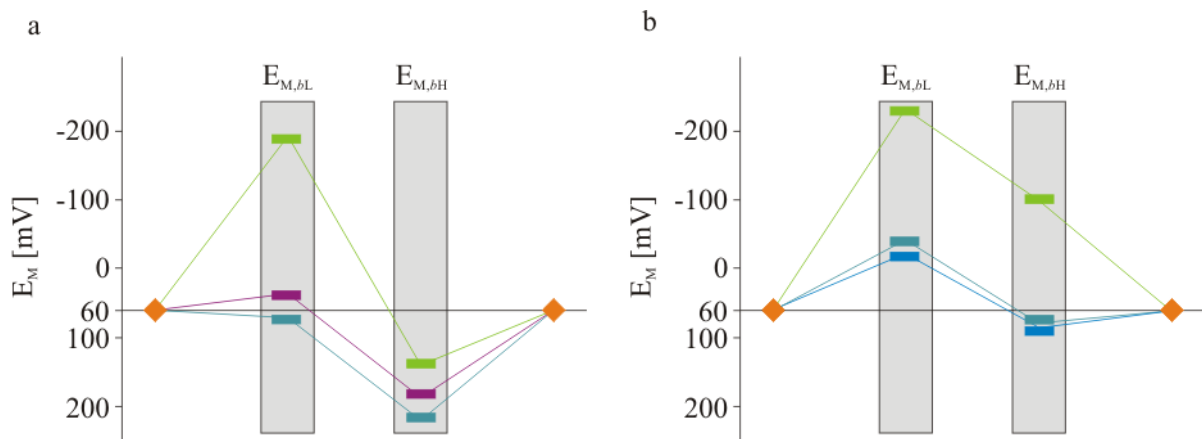


Abbildung 6.25: Vergleich der E_M -Werte der nicht-modifizierten Paraloge.

Die gemessenen E_M -Werte sind hier in Balkenform angeordnet. a) Zusammenfassung der E_M -Werte des A-Paralogs in Lila, b) Zusammenfassung der E_M -Werte des B-Paralogs in Blau. Die E_M -Werte der DEPC-modifizierten Paralogs sind in Grün wiedergegeben, die der DEPC und Ascorbat-modifizierten Paralogs in Petrol. Gereinigtes Protein wurde für 1 h mit DEPC sowie DEPC mit Ascorbat inkubiert. Die Hämmittelpunkte für den mit DEPC inkubierten A-Paralog waren -193 mV ($A-b_L$) und 140 mV ($A-b_H$) (a, Grün). Der mit DEPC modifizierte B-Paralog hatte -233 mV ($B-b_L$) und -101 mV ($B-b_H$) als E_M -Werte (b, Grün). Die DEPC und Ascorbat modifizierten Proben hatten 71 mV ($A-b_L$) und 220 mV ($A-b_H$) für den A-Paralog (a, Petrol) sowie -43 mV ($B-b_L$) und 78 mV ($B-b_H$) für den B-Paralog (b, Petrol). E_{MbL} : Mittelpunkts-Potential des Niedrig-Potential-Häms, E_{MbH} : Mittelpunkts-Potential des Hoch-Potential-Häms, orangefarbene Raute stellt das Redoxpotential (60 mV) von Ascorbat in wässriger Lösung bei pH 7 dar. Die Messungen wurden bei einem pH von 7,2 im NaPhos-Puffer (siehe Tabelle 4.10) bei 5 °C durchgeführt.

In allen vier Titrationen (A- und B-Paralog jeweils inkubiert mit DEPC (siehe Abbildung 6.25, „Grün“) und DEPC mit Ascorbat (siehe Abbildung 6.25 „Petrol“) konnten jeweils 2 Häme bestimmt werden (siehe Abbildung 6.25 und Anhang 11.8). Die E_M -Werte des DEPC modifizierten A-Paralogs waren -193 mV und 140 mV (in der Kontrolle waren die E_M -Werte 36 mV und 187 mV). Der B-Paralog, welcher mit DEPC behandelt wurde, besaß -233 mV und -101 mV als E_M -Werte (die E_M -Werte der Kontrolle waren -22 mV und 85 mV). Die Redox titrationen der DEPC und Ascorbat behandelten Paralogs ergaben folgende E_M -Werte: Der A-Paralog hatte 71 mV und 220 mV. Für den B-Paralog waren es -43 mV und 78 mV.

6.13.4 Untersuchung der Sekundärstrukturelemente des A-Paralogs durch CD-Spektroskopie

Mit der CD-Spektroskopie sollte untersucht werden, ob die Inkubation mit DEPC und DEPC mit Ascorbat einen Einfluss auf die Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente hatte. Für die Messung wurde Ni²⁺-IMAC-gereinigter A-Paralog (bereitgestellt von Florian Müller) verwendet. Die Messungen wurden 4-fach durchgeführt und es wurden gemittelte Spektren für die Auswertung verwendet (siehe Abbildung 6.26). Die Auswertung erfolgte über den Server DiChroWeb (Whitmore & Wallace, 2008) und zwei verschiedener Programme (K2D (Andrade et al., 1993) und Contin (Provencher & Glockner, 1981).

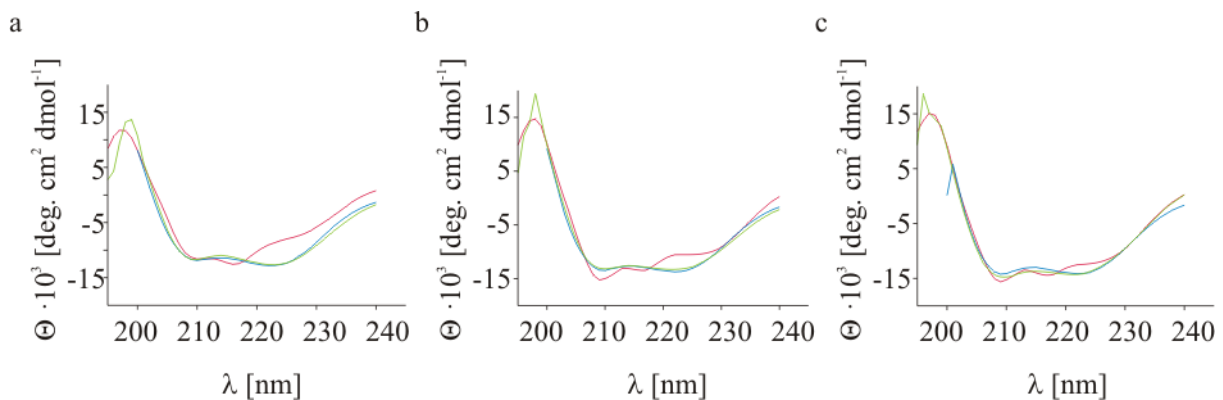


Abbildung 6.26: CD-Spektren (grün) und deren rekonstruierte Spektren (rot: Contin; blau: K2D) des A-Paralogs (a), des DEPC-modifizierten A-Paralogs (b) sowie des DEPC und Ascorbat-modifizierten Paralogs (c).

CD-Spektren der Proben wurden aufgenommen und mit zwei verschiedenen Methoden (in Rot Provencher & Glockner Methode und in Blau K2D) ausgewertet.

Spektren aller drei Proben (Kontrolle, inkubiert in DEPC und DEPC und Ascorbat) konnten mit beiden Programmen ausgewertet werden (siehe Abbildung 6.26). In Tabelle 6.3 sind die gemittelten Werte beider Programme zusammengestellt (im Anhang 11.10 befindet sich die Auswertung der einzelnen Methoden). Für die Kontrollmessungen konnten 44,5 % (+/- 0,7 %) helikaler Anteil bestimmt werden. Für die Probe, welche mit DEPC inkubiert wurde, lag dieser bei 50 % (+/- 7,1 %) und für die DEPC und Ascorbat-modifizierte Probe bei 54 % (+/- 7,1 %). Der Anteil an Faltblätter lag zwischen 8 % (+/- 1,4 %) für die DEPC und Ascorbat behandelte Probe, 12,5 % (+/- 0,7 %) für die DEPC inkubierte Probe und bei 13 % (+/- 5,7 %) für die unbehandelte Probe. Der prozentuale Anteil an Random Coils war für die unbehandelte Probe 42 % (+/- 7,1) (siehe Abbildung 6.26 a). Für die DEPC behandelte Probe wurden 38 % (+/- 7,1 %) gefunden und für die DEPC und Ascorbat inkubierte Probe lag dieser Wert bei 38,5 % (+/- 6,4 %).

Tabelle 6.3: Zusammenstellung der ermittelten Sekundärstrukturelemente durch die Programme Contin und K2D als gemittelte Werte (Wallace et al., 2003).

A-Paralog inkubiert	Konz [mg/ml]	Helix	Faltblatt	RC	NRMSD (Provencher & Glockner ¹)	NRMSD (K2D ²)
	0,43	44,5 % (+/-0,7 %)	13 % (+/-5,7 %)	42 % (+/-7,1 %)	0,33	0,072
DEPC	0,3	50 (+/-7,1 %)	12,5 % (+/-0,7 %)	38 % (+/-7,1 %)	0,213	0,042
DEPC + Asc	0,23	54 % (+/-7,1 %)	8 % (+/-1,4 %)	38,5 % (+/-6,4 %)	0,159	0,14

RC: Random Coil; NRMSD: Fitparameter des rekonstruierten Spektrums zum gemessenen Spektrum -ein geringer Wert besagt, dass beide Spektren sehr gut übereinstimmen. Der NRMSD-Wert wird nach $\sum[\frac{(\theta_{exp}-\theta_{cal})^2}{\theta_{exp}^2}]^{1/2}$ über alle Wellenlängen berechnet (Sreerama et al., 1999, Wallace et al., 2003); Konz: verwendete Konzentration für die CD-Messungen.

6.14 Charakterisierung von B-Paralog-Varianten

Die Funktion einzelner Aminosäuren sollte durch den Aminosäureaustausch durch ortsgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 5.1.1) untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Varianten des B-Paralogs hergestellt und auf ihre Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit, ihre Ascorbat-Umsetzungsrate (siehe Abschnitt 5.12) und ihre E_M -Werte (siehe Abschnitt 5.13) hin charakterisiert. Dies waren die Varianten B-H46M, B-K81E und B-H157Q (siehe Tabelle 4.4). Die Varianten wurden wie auch der Wildtyp B-Paralog heterolog produziert (siehe Abschnitt 5.2.6) und gereinigt (siehe Abschnitt 5.5).

6.14.1 Thermodynamische Bestimmung der Ascorbat abhängigen Reduzierbarkeit der B-Paralog-Varianten

Um zu überprüfen, ob der Austausch der Aminosäuren in den Varianten eine Auswirkung auf die Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit hat, wurden zunächst die Proben mit verschiedenen Ascorbatkonzentrationen inkubiert und Spektren wurden aufgenommen. Die Analyse erfolgte über Peakfläche und Höhe des 561 nm Peaks sowie einer 100 %igen Reduzierbarkeit durch Na-Dithionit (siehe Abbildung 6.27).

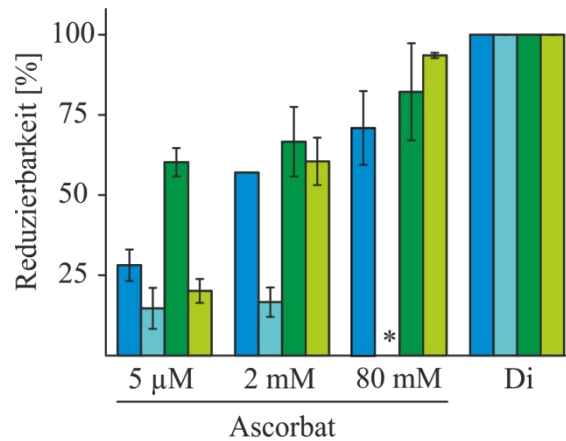


Abbildung 6.27: Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit der B-Paralog-Varianten B-H46M (hellgrün), B-K81E (Türkis) und B-H157Q (Dunkelgrün) im Vergleich zum Wildtyp (Blau).

Oxidiertes Protein wurde mit 5 µM, 2 µM und 80 mM Ascorbat inkubiert. Spektren wurden aufgenommen und über den 561 Peak ausgewertet. Als Kontrolle wurde die Na-Dithionit-Reduzierbarkeit (Di) verwendet. *: konnte nicht gemessen werden, da das Protein B-K81E nach Zugabe von 80 mM Ascorbat präzipitierte. Die Messungen wurden bei 24 °C durchgeführt.

Die Variante B-H157Q besaß nach Zugabe von 5 µM Ascorbat eine Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit von 60 % (+/- 4 %) im Verhältnis zur Reduktion durch Na-Dithionit. Die Reduzierbarkeit der Variante B-H46M entsprach mit 20 % (+/- 4) in etwa der Reduzierbarkeit des Wildtyp-Enzyms (28 % (+/- 5); blau). Die Variante B-K81E besaß mit 15 % (+/- 6 %) eine geringfügig verminderte Reduzierbarkeit (siehe Abbildung 6.27). Nach Inkubation mit 2 mM Ascorbat besaßen die Varianten B-H157Q (67 % (+/- 11 %)) und B-H46M (61 % (+/- 7)) eine gering erhöhte Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit im Vergleich zum Wildtypenzym mit 55 % (+/- 2 %). Die Reduzierbarkeit von B-K81E lag nur bei 17 % (+/- 5 %) bezogen auf die Reduzierbarkeit mit Na-Dithionit. Die Reduzierbarkeit der Proben mit 80 mM Ascorbat zeigte für die Variante B-H157Q einen Wert von 82 % (+/- 15 %) im Vergleich zu der Reduzierbarkeit mit Na-Dithionit. Die Variante B-H46M hatte einen Wert von 94 % (+/- 1 %). Hingegen hatte der Wildtyp hier nur eine Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit von 71 % (+/- 11 %). Für die Variante B-K81E konnte dieser Wert nicht bestimmt werden, da das Protein nach Zugabe von 80 mM Ascorbat präzipitierte (siehe Abbildung 6.27).

6.14.2 Bestimmung der kinetischen Aktivität der Ascorbatumsetzung durch die B-Paralog-Varianten

Auch für die Varianten B-H46M, B-K81E und B-H157Q wurde die Ascorbat-Umsetzungsrate in U/mg bestimmt. Dabei wurden die Messungen wie in Abschnitt 5.12 beschrieben, durchgeführt.

Die gemessenen Umsetzungsraten für die Variante B-H157Q lag bei 2,6 U/mg (+/- 0,2). Die Variante B-H46M hatte eine Aktivität von 3,2 U/mg (+/- 0,1 U/mg). Die Variante B-K81E wies einen Wert von 0,2 U/mg (+/- 0,04 U/mg). In Vergleichsmessungen besaß der B-Paralog-Wildtyp eine Aktivität von 2,9 U/mg (+/- 0,2 U/mg) (siehe Abbildung 6.28).

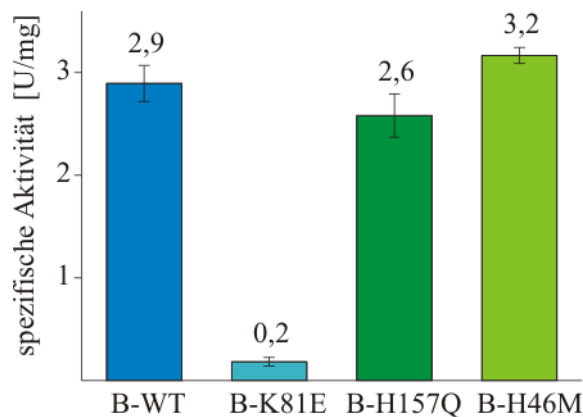


Abbildung 6.28: Ascorbat-Umsetzungsrate (U/mg) der Varianten B-K81E (Türkis), B-H157Q (Dunkelgrün) und B-H46M (Hellgrün) im Vergleich zum Wildtypenzym (Dunkelblau).

Für die Messungen wurden die Varianten zunächst durch Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert und separiert. Die Messungen wurden bei 24 °C durch Zugabe von 5 µM Ascorbat gestartet. Die Steigung der Absorption $A_{\lambda 561-575}$ wurde über die Zeit aufgenommen. Die Aktivität des Wildtyps betrug 2,9 U/mg (+/-0,2 U/mg). Ähnliche Werte wurden für B-H157Q (2,6 U/mg (+/-0,2 U/mg)) und B-H46M (3,2 U/mg (+/-0,1 U/mg)) gemessen. Die Aktivität der Variante B-K81E betrug 0,2 U/mg (+/-0,04 U/mg).

6.14.3 Bestimmung der E_M -Werte der Varianten

Wie in Abschnitt 5.13 beschrieben wurden Reduziert-zu-oxidiert-Titrationen zur Bestimmung der E_M -Werte durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die Aminosäure-Austausche eine Änderung der E_M -Werte hervorrufen (siehe Abschnitt 5.13). Für die Varianten B-K81E und B-H46M konnten zwei titrierbare Häme bestimmt werden. Die E_M -Werte der Variante B-K81E waren - 119 mV (b_L) und + 124 mV (b_H). Für die Variante B-H46M betragen die E_M -Werte 34 mV (b_L) und 160 mV (b_H).

Die Titrationskurve für die Variante B-H157Q wies nur ein titrierbare Häm mit einem Wert von + 29 mV auf (siehe Abbildung 6.29 und Anhang 11.8).

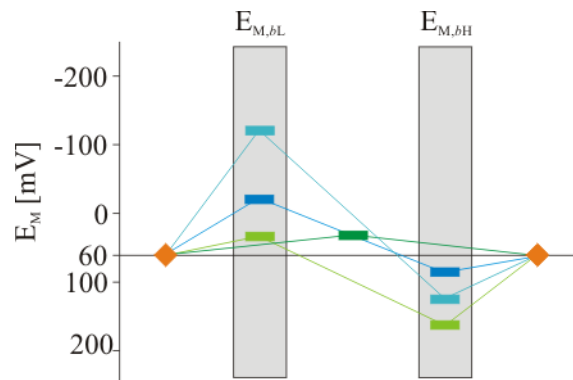


Abbildung 6.29: Vergleich der E_M -Werte der Varianten B-H46M (in Hellgrün), B-K81E (in Türkis) und der Variante B-H157Q (in Dunkelgrün) mit dem Wildtyp (in Blau).

Die gemessenen E_M -Werte sind hier in Balkenform angeordnet.

Die Variante B-H46M besaß ein b_L von 34 mV (+/- 3 mV) und b_H von 160 mV (+/- 6 mV).

Für die Variante B-K81E waren die E_M -Werte -119 mV (+/- 4 mV) (b_L) und + 124 mV (+/- 8 mV) (b_H). Die Variante B-H157Q besaß nur eine Häm-Gruppe mit einem E_M -Wert von 29 mV (+/- 7 mV). Die Werte des Wildtyps waren - 22 mV (b_L) und 85 mV (b_H) (siehe Abschnitt 6.12).

$E_{M,bL}$: Mittelpunkt-Potential des Niedrig-Potential-Häms, $E_{M,bH}$: Mittelpunkt-Potential des Hoch-Potential-Häms, orangefarbene Raute deutet das Redoxpotential (60 mV) von Ascorbat an.

6.14.4 Bestimmung des Hämgehalts

Aufgrund der Redox Titration der Variante B-H157Q wurde deren Hämgehalt bestimmt, wie in Abschnitt 5.11.2 beschrieben. Als Kontrolle wurde gereinigter B-Paralog verwendet. Der Extinktionskoeffizient des Wildtyps (2 Häme) lag $2373,7 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizient der Variante ergab $962,9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Dies entsprach 0,8 Häme pro CYBASC-Monomer.

6.15 Herstellung neuer Konstrukte für das Expressionssystem *Pichia pastoris*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Konstrukte für die Produktion des A-Paralogs im Expressionssystem *Pichia pastoris* hergestellt. Beschrieben wird dies in Abschnitt 5.1.2. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung und *whole cell*-PCR (siehe Abbildung 6.30 und Abschnitt 5.1.2) überprüft.

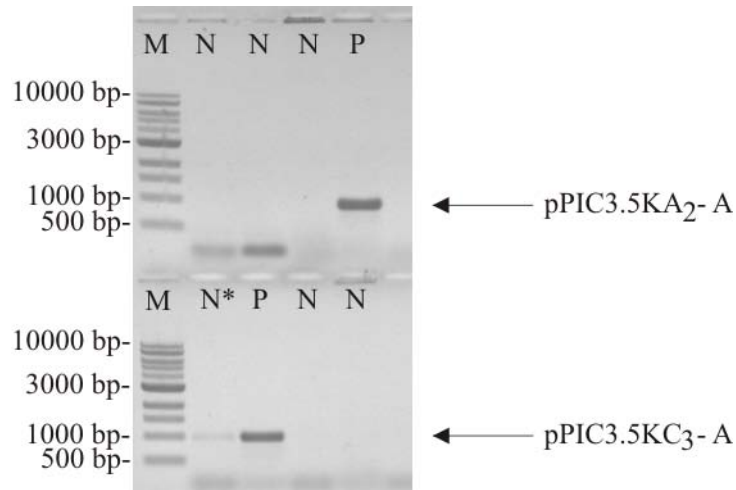


Abbildung 6.30: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung der neuen Konstrukte via *whole cell*-PCR mit den Oligodesoxynukleotiden 5' AOX1 und 3' AOX1.

Vereinzelte Klone wurden in 500 μ l NZYM mit Ampicillin für 16 h inkubiert. Analysiert wurden die Klone mit der *whole cell*-PCR (siehe Abschnitt 5.1.2) und den Oligodesoxynukleotiden 5' AOX1 und 3' AOX1. Die erwartete PCR-Fragmentgröße liegt bei \sim 1000 bp. N: PCR-Fragment von negativen Klonen. Das aufgenommene Konstrukt ist fehlerhaft ligiert. P: PCR-Fragment mit der korrekten Größe von positiven Klonen. N*: Mischkultur aus negativen und positiven Klonen.

Durch Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass neben den Plasmiden pPIC3.5A₂-A und pPIC3.5C₃-A weitere Plasmide mit längerem Affinitätsanhängsel entstanden waren. Diese waren pPIC3.5K C₁₂-A mit einem Dodecan-His-Affinitätsanhängsel und pPIC3.5K C₁₄-A mit einem Quatrodacyl-His-Affinitätsanhängsel.

7 DISKUSSION

7.1 Heterologe Produktion dihämhaltiger CYBASC-Paraloge im Expressionssystem *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Cytochrom b_{561} -Paraloge heterolog in *E. coli* (K12) Stämmen produziert. Je Paralog wurden verschiedene Induktionssysteme verwendet: Die Produktion des A-Paralogs unter Verwendung der Stämme Top 10 und Rosetta (DE3) (Studier & Moffatt, 1986, Grodberg & Dunn, 1988) wurde mit Arabinose induziert (Guzman et al., 1995, Hirsh & Schleif, 1977, Smith & Schleif, 1978). Für den B-Paralog wurde hingegen die Produktion mit IPTG induziert (Stark, 1987) unter Verwendung des Produktionsstammes C43 (DE3) (Miroux & Walker, 1996). In einer neuen Produktionskinetik konnten für beide Paraloge neue und geringfügig bessere Produktionsbedingungen gefunden werden (siehe Abbildung 6.1, 6.2 und 6.3). Für den A-Paralog konnte das deutlichste Signal und somit die höchste Produktion bei Verwendung von 5 % Arabinose detektiert werden (siehe Abbildung 6.1). Allerdings wurde in dieser Produktionsanalyse nicht auf Protein-Funktionalität, sondern mittels Intensität der Western Blot-Bande auf Masse untersucht. Somit könnte der A-Paralog aufgrund der hohen Induktorkonzentration in Einschlusskörperchen fehlgefaltet vorliegen (Baneyx & Mujacic, 2004). Aus diesem Grund wurden die Bedingungen mit dem zweitbesten Signal gewählt. Diese waren für den A-Paralog 37 °C, 0,2 % Arabinose und 3 h (Top10), bzw. 5 h (Rosetta (DE3)) Produktionszeit. Im Gegensatz zu L. Cenacchi (2007) waren die neuen Produktionsbedingungen für den B-Paralog 33 °C, 3 h und 250 µM IPTG. Trotz Verwendung des Stammes C43 (DE3) (Miroux & Walker, 1996) konnte keine deutliche Überproduktion des B-Paralogs im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

Obwohl die Produktion eukaryotischer Proteine in prokaryotischen Organismen hinsichtlich verschiedener Kodon-Verwendung limitiert werden kann (Lipman & Wilbur, 1983), war eine weitere Veränderung gegenüber der Dissertation von L. Cenacchi (2007) der Verzicht des Vektors pRARE bei der CYBASC-Paralog-Produktion. Der Plasmid pRARE (Rogulin et al., 2004) kodiert zusätzliche tRNAs (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) für die heterologe Produktion eukaryotischer Proteine. Der Vergleich des Kodon-Gebrauchs von *Arabidopsis thaliana* und *E. coli* (K12) (siehe Anhang 11.3) durch den Server „Graphical Codon Usage Analyser“ (Fuhrmann et al., 2004) ergab, dass die tRNAs AGA (Arginin), CGG (Arginin) und ATA (Isoleucin) die Paralog-Produktion beschränken. Jedoch ist auf dem Vektor pRARE nur die für die CYBASC-Produktion relevante tRNA AGA kodiert. Die tRNA wird allerdings nur einmal im A- und viermal im B-Paralog genutzt. Somit ist die erhöhte Produktion des A-Paralogs in Rosetta (DE3) (siehe Abbildung 6.2) offenbar nicht durch den pRARE-Vektor erklärbar, sondern eher durch das Fehlen der Proteasen OmpT und Lon (Grodberg & Dunn, 1988).

Neben dem Nachweis der heterologen Produktion der Paraloge durch Western Blot (siehe Abbildung 6.1 und 6.3) und Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren wurde hier erstmals die Produktion beider Paraloge durch *Peptide mass fingerprinting* (PMF) gezeigt (siehe Abschnitt 5.8 und 6.3). Der gereinigte A-Paralog war nur durch 2 Peptide G G L A W A R N K (AS 39 – AS 48) und L T F L E N G G L D K (AS 184 – AS 194) nachweisbar. Analysen mit dem Server TMHMM v. 2.0 (Krogh et al., 2001) zeigten, dass sich das Peptid G G L A W A R N K größtenteils und das Gesamtpeptid L T F L E N G G L D K vollständig in Schleifen befinden, welche zwei membrandurchspannende Helices miteinander verbinden. Auch die B-Paralog-Fragmente L S S D N K D H I F N (AS 39 – AS 49), F H I D K G I E N F Y S (AS 105 – AS 116) und F L Q V N Q V I T R Y S (AS 181 – AS 193) liegen laut TMHMM v 2.0 Server (Krogh et al., 2001) in Schleifen. Nur das Peptid S T E A M L V (AS 193 – AS 199) des B-Paralogs liegt in der membrandurchspannenden Helix 6. Trotz der Auftrennung im SDS-Gel, inhibierten offenbar stabilisierende Lipide oder auch die Detergenz-Mizelle einen vollständigen Proteaseverdau.

7.2 Optimierte Solubilisierung mit LDAO

Ein erster Solubilisierungsscreen mit 19 verschiedenen Detergenzien wurde im Rahmen der Dissertation von L. Cenacchi (2007) durchgeführt. N-Dodecylphosphocholin (Fos Cholin-12) wurde als bestes Detergenz für die Solubilisierung funktionsfähiger CYBASC-Proteine gefunden. Allerdings konnten unter Verwendung von Fos Cholin-12 nur 80 % des heterolog produzierten Proteins in Lösung gebracht werden (siehe Abbildung 6.7, Dissertation L. Cenacchi, 2007). Des Weiteren wird Fos-Cholin-12 vor allem für Proteinstrukturaufklärung durch NMR-Experimente verwendet (White et al., 2007, Tate, 2010) und nicht für Kristallisationsexperimente genutzt (Anatrice, Duquesne & Sturgis, 2009). Aus diesen Gründen wurde ein weiterer Solubilisierungsscreen durchgeführt mit einem Tris-basierendes Puffersystem, da dies für spätere Reinigungsversuche von Vorteil war (siehe Tabelle 4.9 und Abschnitt 7.3).

Die Solubilisierung eines Membranproteins durch Tween 20 ist bisher nicht bekannt. Vielmehr wird Tween 20 vor allem zur Steigerung der Löslichkeit von Proteinen genutzt (Bondos & Bicknell, 2003). Somit war eine Solubilisierung des B-Paralogs durch Tween 20 war weder im Western Blot noch durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren zu detektieren. Triton X-100 wurde aufgrund der Arbeiten zu der QFR aus *Wolinella succinogenes* gewählt (Unden et al., 1980, Lancaster et al., 1999). Trotz der Solubilisierung durch Triton X-100, welches ein Detergenzgemisch aus unterschiedlich langen hydrophoben Ketten ist (Collins & Salton, 1979), konnte hier die Röntgenstruktur der membranständigen QFR gelöst werden (Lancaster et al., 1999). Anzumerken ist, dass bei der Reinigung der homolog produzierten QFR während eines Reinigungsschrittes (Anionenaustauscher) ein Detergenzaustausch von 0,1 % Triton X-100 zu einem Detergenzgemisch aus 0,1 % DM und

0,01 % β -LM durchgeführt wird. Das Detergenz n-Decyl- β -maltosid (DM) wurde gewählt, da dieses neben β -LM und LDAO eines der favorisierten Detergenzien zur Solubilisation und Proteinkristallisation ist (Duquesne & Sturgis, 2010, Willis & Koth, 2008). Da durch Detergenzienaustausche (Duquesne & Sturgis, 2010), während der Reinigung die Proteinstruktur durch das Wegwaschen stützender Lipide destabilisiert werden kann (Duquesne & Sturgis, 2010), sollte für die Solubilisierung und Reinigung nur ein Detergenz verwendet werden. Jedoch war die Solubilisierungsausbeute durch DM mit 30 % an solubiliertem B-Paralog zu gering, um mit diesem Detergenz weiterzuarbeiten. Das Detergenz Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) wurde auf Grund der Kristallisation des Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis* gewählt (Michel, 1982). Durch Verwendung von 6 % LDAO konnte das Reaktionszentrum erfolgreich solubiliert und später kristallisiert werden. Für den B-Paralog konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Verwendung von nur 1 % LDAO nahezu 100 % des heterolog produzierten B-Paralogs solubiliert werden konnte (siehe Abbildung 6.7). In Langzeit-Stabilitäts-Tests wurde gezeigt, dass beide Paraloge trotz Trübung des Solubilisats mindestens 6 Tage bei 4 °C stabil blieben (siehe Abbildung 6.8 und M. Klein, 2011). Die Trübung konnte durch einen Zentrifugations-/ Filtrationsschritt von der Lösung abgetrennt werden. Die Analyse des Pellets durch SDS-PAGE zeigte, dass der B-Paralog nicht ausgefallen war (nicht gezeigt). Die Hypothese von L. Cenacchi (2007), dass es sich bei der Trübung um Aggregationen aus LDAO, *E. coli*-eigenen-Proteinen und Ascorbat handelt, wird durch dieses Ergebnis bestärkt. Erst ab dem 6. Tag (B-Paralog) bzw. ab dem 23. Tag (A-Paralog, Klein, 2011) konnte mittels Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren und SDS-PAGE eine deutliche Minderung der Paralog-Menge im Solubilisat detektiert werden. Bei präparativen Solubilisierungsansätzen wurde daher auf Ascorbat verzichtet, so dass das Solubilisat des B-Paralogs für ~ 6 Tage klar blieb. Erst nach 6 Tagen konnte hier Proteinpräzipitation detektiert werden.

7.3 Reinigungsstrategien für den B-Paralog im Vergleich

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Reinigungsstrategien für den B-Paralog untersucht. Diese waren Ionenaustauscher- und Affinitäts-Chromatographien. Bei Verwendung von Ionenaustauscher-Chromatographien sollten keine ionischen Puffersysteme verwendet werden. Es war zu erwarten, dass die Ionen des etablierten NaPhos-Puffers (Cenacchi, 2007) an die Ionenaustauscher-Matrix binden und somit eine Bindung des B-Paralogs vermindern. Die Puffersubstanz Tris hingegen ist nicht ionisch und wurde im Folgenden verwendet.

7.3.1 Die Verwendung von Ionenaustauscher-Chromatographien erhöht nicht den Reinheitsgrad des B-Paralogs

Der isoelektrische Punkt von 9,2 des B-Paralogs wurde theoretisch und praktisch bestimmt (Cenacchi, 2007). Bei der Verwendung des Tris-Puffers (siehe Tabelle 4.9) mit einem pH von 7,4 war die Erwartung, dass der B-Paralog an einen Kationenaustauscher bindet. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Kationenaustauscher mit verschiedener Matrix getestet (siehe Abschnitt 6.7.2). Die deutlich erhöhte Absorption bei 415 nm des Durchflusses und das nicht-Vorhandensein des B-Paralogs nach Zugabe von Natriumchlorid in den Elutionsfraktionen, zeigten, dass der B-Paralog weder an den Kationenaustauscher mit der Q-Sepharose-Matrix noch an den Kationenaustauscher mit der CM-Sepharose-Matrix band (siehe Abbildung 6.10). CYBASC-Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 5.11) durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren sowohl der Durchfluss- als auch der Elutionsfraktionen zeigten, dass die CYBASC-Gesamtproteinmenge im Durchfluss vorlag. Jedoch band bei gleichen Pufferbedingungen (pH 7,4) der B-Paralog an eine Diethylaminoethyl (DEAE)-Matrix (siehe Abbildung 6.11). Diese Ergebnisse zeugen von einer negativen Oberflächenladung des Proteins. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des Reinigungseffekts wurde die Verwendung einer Anionenaustauscher-Chromatographie in späteren Reinigungen nicht verwendet.

Im Gegensatz dazu konnte für den A-Paralog im Rahmen der Diplomarbeit von M. Klein (2011) eine 2-Schritt-Reinigung etabliert werden: Der Durchfluss einer Anionenaustauscher-Chromatographie mit DEAE-Matrix wurde für eine Ni²⁺-IMAC verwendet. Durch die Verwendung des Anionenaustauschers konnten *E. coli*-eigene Proteine abgetrennt werden, so dass in der darauffolgenden Ni²⁺-IMAC der A-Paralog mit einem höheren Reinheitsgrad und Konzentration eluiert werden konnte (siehe Abbildung 7.1).

7.3.2 Optimierung der etablierten 1-Schritt-Ni²⁺-IMAC-Reinigung

Eine deutlich erhöhte Beladungszeit in Verbindung mit der Verwendung eines neuen Elutionspuffers (siehe Tabelle 4.9) erbrachte einen deutlichen Effekt auf den Reinheitsgrad des B-Paralogs bei der 1-Schritt-Ni²⁺-IMAC-Reinigung (siehe Abschnitt 6.7). Durch die längere Beladungszeit und eine

deutlich geringere Flussrate konnte das Protein an die Ni²⁺-Matrix binden. Die Verwendung von 500 mM Histidin in Kombination mit einem geringeren pH (5,5) erhöhte dazu die Ausbeute und den Reinheitsgrad der B-Paralog-Probe. Zum einen wurde die Elution durch die Erniedrigung des pHs im Elutionspuffer (Gaberc-Porekar & Menart, 2001) und zum anderen durch die Erhöhung der Histidinkonzentration optimiert. Die Menge an gereinigtem Protein konnte 7-fach erhöht werden in Bezug auf die ursprüngliche Ni²⁺-IMAC-Strategie von Cenacchi (2007) (siehe Abbildung 7.1). Zusätzlich wurde auf die Zugabe von Ascorbat verzichtet, da durch Ascorbat Radikale entstehen können, welche die Ausbeute an funktionalem Protein vermindern (Gaberc-Porekar & Menart, 2001, Krishnamurthy et al., 1995).

Auf die Verwendung von Imidazol im Elutionspuffer wurde verzichtet, da dieses Bindungen zu Häm-Gruppen eingehen kann und dadurch modifiziert bzw. aus dem Protein löst (Schejter & Aviram, 1969, Guergova-Kuras et al., 1999, Kashino, 2003, Li et al., 2011). Neben der Verwendung von IMAC beladen mit Ni²⁺-Ionen wurde auch ein Cu²⁺-IMAC durchgeführt (nicht gezeigt). Jedoch wurden offenbar während der Elution Häm *b*-Zentren aus dem B-Paralog gelöst, so dass kein funktionsfähiges Protein durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren nachweisbar war.

7.3.3 Etablierung einer 1-Schritt-Streptavidin-Affinitätsreinigung

Die deutlichste Steigerung im Reinheitsgrad wurde mit einer 1-Schritt-Strep-Reinigung erzielt (Skerra & Schmidt, 2000, Gross et al., 2004, Schmidt & Skerra, 2007, Kleymann et al., 1995). Hierbei erfolgt die Bindung über eine definierte Aminosäuresequenz (Streptavidin-Anhängsel) S A W R H P Q F G G an eine Strep-Tactin-Matrix. Die Elution erfolgt mit Desthiobiotin. Die Regenerierung der Strep-Tactin-Matrix erfolgt durch 2-[4'-Hydroxyphenylazo]-Benzoessäure oder Natronlauge. Im Gegensatz zu der Ni²⁺-IMAC-Reinigung binden hier keine *E. coli*-eigenen-Proteine an die Strep-Tactin-Matrix, welche später Co-eluiert werden können (Tiwari et al., 2010). Die Ausbeute an gereinigtem Protein konnte um ein 6-faches erhöht werden (siehe Abbildung 7.1).

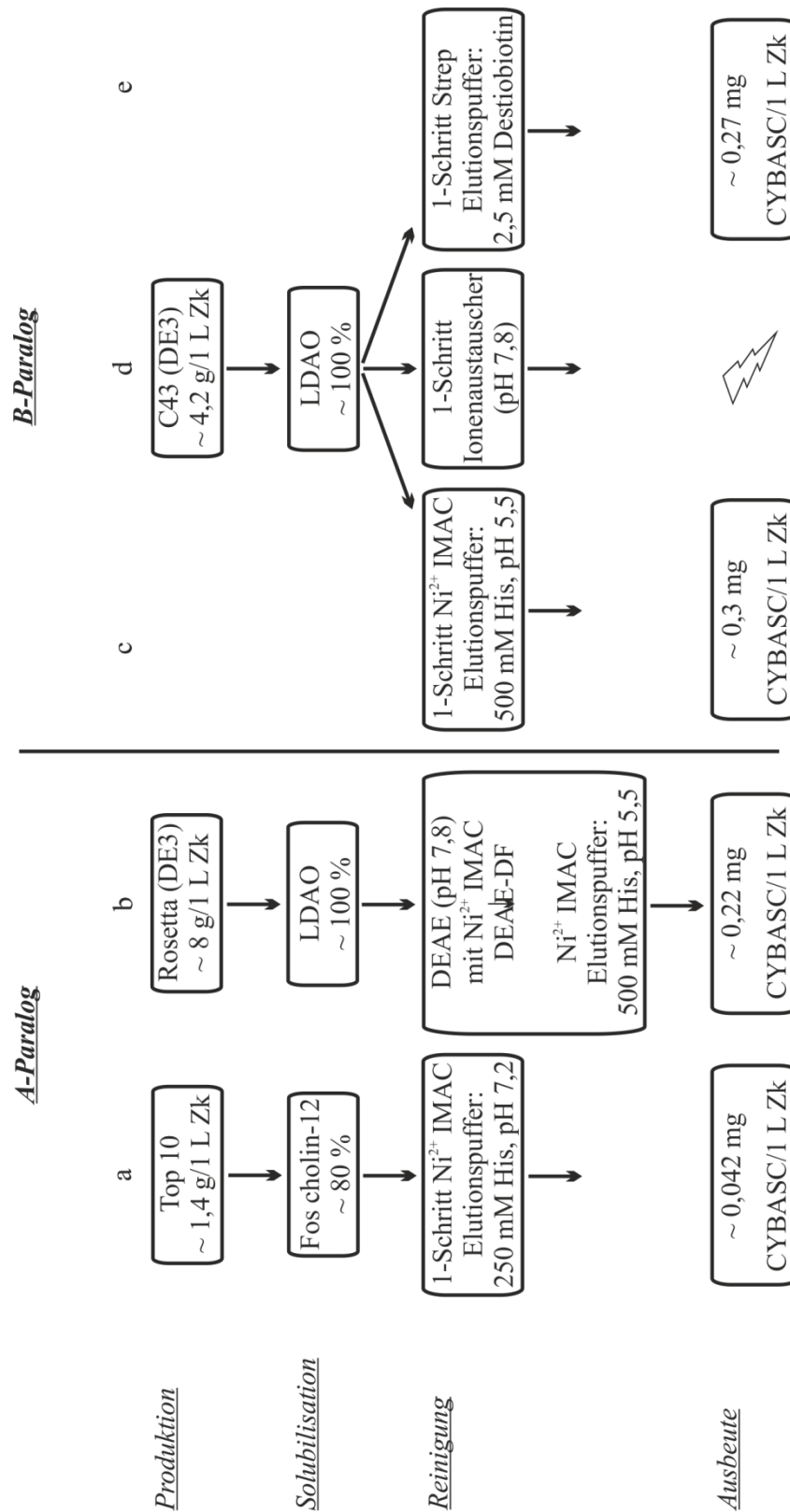


Abbildung 7.1: Optimierte Produktions- und Reinigungsstrategien (b - e) im Vergleich zur ursprünglichen Reinigungsstrategie (a).

a) Ursprüngliche Produktions- und Reinigungsstrategie für beide CYBASC-Paraloge (Cenacchi, 2007). Damit konnten 0,042 mg/L Zellkultur reines Protein gewonnen werden. b) Optimierte Produktions- und Reinigungsstrategie für den

Fortsetzung der Abbildung 7.1

A-Paralog (M. Klein, 2011). Durch die Verwendung des *E. coli*-Stammes Rosetta (DE3) konnte die Zellmasse erhöht werden. Zudem konnte der Ertrag an solubilisiertem A-Paralog durch die Verwendung von LDAO auf ~ 100 % erhöht werden. Der Durchfluss einer DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie wurde auf eine Ni²⁺-IMAC-Säule geladen. Dadurch konnten ~ 0,22 mg/L Zellkultur reines Protein eluiert werden. c) Neu etablierte Produktion, LDAO-Solubilisation und Ni²⁺-IMAC mit neuer Beladungszeit und Elutionspuffer. Die Menge an gereinigtem Protein wurde auf ~ 0,3 mg/L Zellkultur erhöht. d) Reinigungsversuche mit Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Menge an gereinigtem Protein wurde nicht bestimmt, da dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde (siehe Abschnitt 7.3.1 und 6.7.2). e) Neu etablierte Strep-Reinigung des B-Paralogs. Eine verringerte Beladungsgeschwindigkeit der Chromatographie-Säule und der Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin erbrachten ~ 0,27 mg/L Zellkultur reines Protein.

7.4 Größenausschlusschromatographie und initiale Kristallisationsansätze des A-Paralogs

Der letzte Reinigungsschritt für die Protein-Kristallisationsansätze sollte eine Größenausschlusschromatographie sein. Durch diesen Reinigungsschritt kann die Monodispersität der Proteinprobe verbessert und geprüft werden (Mileni et al., 2006). Zudem können Proteine mit deutlich kleinerem sowie deutlich größerem Molekulargewicht abgetrennt werden (Hallberg, 2008). Bei der durchgeführten Größenausschlusschromatographie wurde die Matrix Superdex 200 (Auftrennung von 5 kDa bis 800 kDa) verwendet, da das Molekulargewicht des A-Paralogs zu dem Molekulargewicht der Detergenz-Mizelle (0,1 % β -LM) addiert werden muss (siehe Abschnitt 6.8 und 6.10). Die Größenausschlusschromatographie zeigte, dass der A-Paralog in 0,1 % β -LM monodispers vorlag (siehe Abschnitt 6.8). Um einen Kristallkeim- und Kristallwachstum zu ermöglichen, wurde die Proteinprobe mit Benzamidin inkubiert. Dadurch wurde die Mizellengröße verringert (Lancaster et al., 1999). Nach 5 Tagen konnten bei verschiedenen Bedingungen kristalline Strukturen beobachtet werden (siehe Abbildung 6.15). Da kristalline Strukturen aus 400 nl Tropfen sehr klein sind, wurde Bedingung f in 1,4 μ l-Tropfen reproduziert (nicht gezeigt). Die entstandenen kristallinen Strukturen wurden in Röntgenbeugungsexperimenten untersucht und als Salzkristalle identifiziert (siehe Anhang 11.12). Durch das Einengen (50 kDa-Ausschlussgröße) der Probe wurde nicht nur die Protein-, sondern auch die β -LM-Konzentration erhöht. β -LM-Mizellen besitzen eine Größe von ~ 60 kDa (Prive, 2007). Zudem lag die Detergenzkonzentration mit 0,1 % β -LM deutlich über der kritischen Mizellenkonzentration (0,0087 % β -LM, Heerklotz & Seelig, 2000). Dadurch könnte trotz der Zugabe von 2,4 % Benzamidin das Kristallwachstum inhibiert sein (Schertler et al., 1993). Ein weiterer Grund für die Inhibition des Kristallwachstums könnte auch die Größe der hydrophoben Kette von β -LM sein, welches Protein-Protein-Interaktionen verhindern könnte. Des Weiteren könnte der Dek-

Histidin-Affinitätsanhängsel ein Grund für die Inhibition des Kristallwachstums sein. Aufgrund seiner Flexibilität wird vorhergesagt, dass dieser die Kristallisation inhibiert (Carson et al., 2007). Allerdings kann ein Poly-Histidin-Affinitätsanhängsel auch die Proteinkristallisation optimieren (Smits et al., 2008). Für das Protein Octopin-Dehydrogenase konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe des Kofaktors NADH im Zusammenspiel mit einem Penta-Histidin-Affinitätsanhängsel das Protein in einer speziellen Konformation vorlag, welche das Kristallwachstum fördert.

7.5 Etablierung eines direkten Aktivitätstests für die Charakterisierung der CYBASC-Paraloge

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein direkter Aktivitätstest etabliert, welcher es ermöglicht, Cytochrom b_{561} -Proteine in verschiedenen Puffern oder Detergenzien auf deren Aktivität hin zu charakterisieren. Weiterhin ist es durch diesen Aktivitätstest erstmals möglich, Wildtyp-Paraloge mit Varianten zu vergleichen. Die Aktivität in dem hier etablierten Aktivitätstest wird über die Absorptionssteigung bei 561 nm und 575 nm bestimmt. Vorbild des direkten Aktivitätstests waren der „BV \rightarrow Fu-Test“ und der „DMNH₂ \rightarrow Fu-Test“, welche für die Charakterisierung der QFR und deren Varianten aus *Wolinella succinogenes* verwendet wurden (Lancaster et al., 2005, Lancaster et al., 2000). Beim „BV \rightarrow Fu-Test“ wird die Oxidation von reduzierten Benzylviologen durch Fumarat bei 546 nm gemessen. Die Enzymaktivität berechnet sich aus der Steigung der Absorptionsänderung und dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon/2e^- = 19,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für zwei Elektronen (Uden & Kröger, 1986). Beim „DMNH₂ \rightarrow Fu-Test“ wird der Verbrauch des Substratanalogens 2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinon (DMNH₂) über die Absorptionsveränderung A_{270} und A_{290} verfolgt. Die Berechnung der Aktivität erfolgt hierbei mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon/2e^- = 15,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Uden & Kröger, 1986) und der Differenz aus A_{270} und A_{290} . Bei beiden Aktivitätsassays bezieht sich die Aktivität U/mg auf die Umsetzung des Substrats pro QFR in mg. Beim Aktivitätstest für die Charakterisierung der CYBASC-Paraloge wurde die zeitliche Absorptionsänderung bei 561 nm und 575 nm beobachtet. Um die absolute Steigung bei 561 nm nach Zugabe des Substrats pro Zeiteinheit zu erhalten, wurde als Basislinie die Absorption bei 575 nm pro Zeiteinheit subtrahiert. Die Aktivität wurde mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 34,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Liu et al., 2005) berechnet. Bei dem hier etablierten CYBASC-Aktivitätsassay wurde an Stelle der Substrat-Umsetzungsrate die spezifische Reduktion des Proteins nach Zugabe von Ascorbat ausgewertet und als U definiert. Nach Erreichen des Absorptionsmaximums bei 561 nm wurde durch die Zugabe von Na-Dithionit die CYBASC-Konzentration nach Liu et al. (2005) berechnet, so dass daraus die spezifische Aktivität bestimmt werden konnte (siehe Anhang 11.4). Für die Bestimmung der Aktivitäten wurden 5 μM Ascorbat eingesetzt. Bei Verwendung höherer Ascorbatkonzentrationen war eine Auswertung der Aktivität nicht möglich, da die Katalyse zu schnell ablief. Trotz der geringen Ascorbatkonzentration war die CYBASC-Konzentration in der Messküvette geringer, als die des Substrats. Somit war gewährleistet,

dass die gemessenen Aktivitäten in einem Substrat-übersättigten Milieu gemessen wurden. In gleicher Weise wurde bei der Aktivitätsbestimmung der Reduktion der Fe^{3+} -Chelate durch die Ascorbat-reduzierten CYBASC-Paraloge der Abfall der Absorption bei 561 nm analysiert. Auch hier diente die Absorption bei 575 nm als Basislinie. U wurde hier als oxidiertes Protein durch die Fe^{3+} -Chelate definiert (siehe Anhang 11.5). Die Bestimmung der CYBASC-Aktivität wurde in einem modifizierten KP_i -Puffer durchgeführt. Die Modifikation bestand in der Zugabe von 300 mM NaCl und 10 % Glycerol (CABSC- KP_i -Puffer; siehe Tabelle 4.9). Die Zugabe von 300 mM NaCl und 10 % Glycerol war nötig geworden, da das gereinigte Protein zur Präzipitation neigte.

In weiteren Ansätzen wurde versucht über die Absorptionsänderung bei 280 nm (Absorption von Ascorbat) die Aktivität U/mg durch den Ascorbatverbrauch zu bestimmen. Da aber auch aromatische Aminosäuren bei 280 nm absorbieren (Walker, 2009), waren diese Messungen nicht reproduzierbar. Des Weiteren wurde ein indirekter Assay mit Cytochrom *c* getestet (Seike et al., 2003). Hierbei sollte der Ascorbat-reduzierte CYBASC-Paralog Cytochrom *c* reduzieren, was über die Absorptionsänderung bei 550 nm detektierbar ist (Qualliotine-Mann et al., 1993). In Kontrollmessungen ohne CYBASC-Paraloge konnte jedoch gezeigt werden, dass Cytochrom *c* selbst durch Ascorbat reduziert wird. In weiteren Ansätzen erfolgte eine wie in Abschnitt 5.8 beschriebene Reduktion der Paraloge. Jedoch gewährleisteten auch diese Messungen von reduziertem CYBASC-Paralog und Cytochrom *c* keine zufriedenstellende Reproduktion der Ergebnisse. In Vesikeln eingebautes Cytochrom b_{561} , welches durch Na-Dithionit reduziert wurde, reduzierte Cytochrom C. Seike et al. (2003) zeigten dies allerdings nicht kinetisch, sondern nur thermodynamisch. Die hier beschriebenen Versuche und auch die Messungen von Seike et al. (2003) zeigen, dass die Etablierung eines Aktivitätstests zur Bestimmung der kinetischen Aktivität für CYBASC-Proteine schwierig ist. Dagegen ist die thermodynamische Untersuchung durch Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren leichter zu etablieren.

7.6 Charakterisierung der Wildtyp-Paraloge

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit auch die Fe^{3+} -Chelat-Reduktase-Aktivität kinetisch und thermodynamisch bestimmt. Beide Ergebnisse sind mit den gemessenen E_M -Werten konsistent (siehe Abschnitt 6.10 bis 6.12).

7.6.1 Unterschiede in der thermodynamischen und kinetischen Ascorbat-Reduzierbarkeit bei Verwendung verschiedener Detergenzien

Mit verschiedenen Ascorbatkonzentrationen konnte die thermodynamische Reduzierbarkeit beider Paraloge gezeigt werden (Cenacchi, 2007). In dieser Arbeit wurden die Ascorbatkonzentrationen nach folgenden Kriterien gewählt: 5 μM Ascorbat wurde verwendet, da die Aktivitätstest mit dieser

Konzentration durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 7.5). 2 mM Ascorbat wurden verwendet, da bei dieser Konzentration eine partielle Reduzierbarkeit der CYBASC-Proteine vorlag. 80 mM Ascorbat wurden verwendet, da bei dieser Konzentration das Protein maximal Ascorbat-abhängig reduziert war (Cenacchi, 2007). Eine vollständige Reduktion beider Paraloge konnte nur mit Na-Dithionit erbracht werden (Griesen et al., 2004, Cenacchi, 2007). Zu vereinfachten Diskussion der Effekte auf die Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit durch verschiedene Detergenzien wird der ΔR -Wert, welcher als die Differenz aller Detergenz-abhängigen-Reduzierbarkeiten durch eine Ascorbatkonzentration definiert ist, an dieser Stelle eingeführt. Die Differenz der Reduzierbarkeit (ΔR) des A-Paralogs in dem Detergenz β -LM und LDAO durch 5 μ M Ascorbat lag bei einem ΔR -Wert von 3 % (siehe Abbildung 6.16). Bei der Inkubation mit 2 mM Ascorbat lag der ΔR -Wert bei 15 % und für eine Inkubation mit 80 mM Ascorbat bei 11 %. Ähnliche Ergebnisse konnten für den B-Paralog gewonnen werden. Die Differenz der Reduzierbarkeit ΔR betrug nach Inkubation mit 5 μ M Ascorbat für die Detergenzien LDAO, β -LM und DM 14 %, der ΔR -Wert für 2 mM Ascorbat lag bei 3 % und bei Inkubation mit 80 mM Ascorbat lag der ΔR -Wert bei 14 %. Die thermodynamische Ascorbat-abhängige Reduktion war für beide Paraloge Detergenz-unabhängig (siehe Abbildung 6.16).

Jedoch konnte bei den gemessenen kinetischen Aktivitäten ein deutlicher Unterschied beobachtet werden. Die höchsten Aktivitäten bei 24 °C wurden für beide Paraloge mit dem Detergenz β -LM gemessen (A-Paralog: 4,1 U/mg und B-Paralog 2,9 U/mg). Die Aktivitäten der Paraloge in 0,1 % LDAO waren um 1/3 vermindert und betragen nur 2,6 U/mg für den A-Paralog und 1,6 U/mg für den B-Paralog. Der Komplex aus B-Paralog und DM besaß mit 0,7 U/mg nur 1/4 der Aktivität im Vergleich zur β -LM-Probe. Anzumerken ist, dass die Konzentration nach Liu et al., 2004 bestimmt wurde, so dass für die Berechnung der spezifischen Aktivität aller Proteinproben die Proteinkonzentration von funktionsfähigem Cytochrom b_{561} verwendet wurde (siehe Abschnitt 6.10.2). Weitere funktionelle Charakterisierungen und Redoxitrationen wurden auf Grund der kinetischen Aktivitäten im Folgenden in 0,01 % β -LM durchgeführt.

7.6.2 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes beider Paraloge in 0,1 % LDAO und 0,01 % β -LM

Die analytische Größenausschlusschromatographie zeigte, dass beide Paraloge in 0,01% β -LM in zwei Spezies mit typischen Reduziert-Minus-Oxidiert-Spektren vorlagen. Diese Spezies hatten ein Molekulargewicht von 158 kDa und 74 kDa für den A-Paralog sowie 126 kDa und 59 kDa für den B-Paralog. Da β -LM-Mizellen eine Größe von \sim 60 kDa hat (Prive, 2007) haben, handelt es sich bei den 74 kDa (A-Paralog) bzw. 59 kDa (B-Paralog) Spezies um Monomer-Detergenz-Mizellen und bei den 158 kDa- (A-Paralog) bzw. 126 kDa-Spezies (B-Paralog) um Dimer-Detergenz-Mizellen. Bei der Verwendung von 0,1 % β -LM konnte gezeigt werden, dass in der Größenausschlusschromatographie nur eine Spezies vorlag und zwar die des Dimers in einer Detergenz-Mizelle (Cenacchi, 2007). Die

Schlussfolgerung aus diesen beiden Ergebnissen war, dass mit steigender β -LM-Konzentration die Dimer-Bildung präferiert wird. Bei der Verwendung von 0,1 % LDAO konnten beide Paraloge in einer Spezies nachgewiesen werden. Diese hatte eine Größe von 74 kDa (A-Paralog), bzw. 116 kDa (B-Paralog). Da LDAO eine Mizellengröße von ~ 16 kDa (Prive, 2007) besitzt, kann daraus geschlossen werden, dass der A-Paralog als Dimer und der B-Paralog als Tetramer in der LDAO-Mizelle vorlag. Allerdings können durch die gewonnenen Kenntnisse keine Rückschlüsse auf den Polymerisierungszustand *in vivo* gezogen werden. Vielmehr zeigten beide Ergebnisse, dass eine Kristallisation in beiden Detergenzien möglich ist.

7.6.3 Identifikation zweier titrierbarer Häm *b*-Gruppen

Redox titrationen beider Paraloge in 0,01 % β -LM zeigten zwei titrierbare *b* Häme mit verschiedenen E_M -Werten. Der E_M -Wert des Niedrig-Potential Häms b_L betrug 36 mV (± 4 mV) und der des Hoch-Potential-Häms b_H 187 mV (± 2 mV) für den A-Paralog. Diese Werte wurden durch die Arbeit von Desmet et al. (2011) bestätigt. Die E_M -Werte des B-Paralogs waren -22 mV (± 6 mV) für das Häm b_L und 85 mV (± 3 mV) für Häm b_H . Die E_M -Werte des Häms b_L beider Paraloge waren geringer als das Standardredoxpotential von Ascorbat (60 mV, Takeuchi et al., 2004).

7.6.4 Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten

Die Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten durch Cytochrom b_{561} -Proteine wurde schon für Dcytb₅₆₁, LCytb₅₆₁, CGCytb₅₆₁ aus *Mus musculus* (Su & Asard, 2006, McKie et al., 2001) sowie Dcytb₅₆₁ aus *Homo sapiens* (Ludwiczek et al., 2008) und auch für den A-Paralog aus *Arabidopsis thaliana* (Bérczi et al., 2007) gezeigt. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der thermodynamischen Reduktion von Fe^{3+} -EDTA und Fe^{3+} -Citrat mit verschiedenen Konzentrationen (1 μ M, 1 mM und 10 mM) durchgeführt. Die Reduktion von Fe^{3+} -EDTA war im Gegensatz zu Fe^{3+} -Citrat bei beiden Paralogen höher. Das Standardredoxpotential von + 200 mV für Fe^{3+} -Citrat (Bérczi et al., 2007) könnte dies erklären. Im Gegensatz dazu liegt das Standardpotential von Fe^{3+} -EDTA bei + 130 mV (Holden et al., 1991). Die Aktivitäten der Paraloge spiegeln Ähnliches wieder: Auch hier waren die Reduktionsaktivitäten für Fe^{3+} -EDTA mit 1,2 U/mg (DEPC-modifizierter A-Paralog) und 0,6 U/mg (B-Paralog) deutlich höher als die für Fe^{3+} -Citrat (DEPC-modifizierter-A-Paralog: 0,05 U/mg, B-Paralog: 0,1 U/mg). Generell zeigte der A-Paralog für beide Fe^{3+} -Chelate eine deutlich höher Aktivität. Aufgrund der hohen Katalyseaktivität des unbehandelten A-Paralogs, wurde hier die DEPC-modifizierte-Probe verwendet (siehe Abschnitt 6.11 und Anhang 11.5).

Im Jahr 2003 wurde mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktions-Ansätzen gezeigt, dass die mRNA beider Paraloge vor allem in der Wurzel exprimiert wird (Verelst et al., 2004). Die Eisenaufnahme findet in den Wurzeln statt, so dass beide Paraloge darin involviert sein könnten. Eisen

liegt bei hohem pH und/ oder aerob oxidiert vor (Morrissey & Guerinot, 2009). CYBASC-Paraloge könnten wie auch AtFRO2 (eine Fe^{3+} -Chelat-Reduktase, Wu et al., 2005) Fe^{3+} -Chelate reduzieren. Das Fe^{2+} -Chelat könnte dann durch den Transporter AtIRT1 (Henriques et al., 2002, Vert et al., 2002, Varotto et al., 2002) in die Wurzeln hinein transportiert werden. Des Weiteren wurde für den A-Paralog eine Lokalisation im Tonoplastmembran vorhergesagt (Griesen et al., 2004, Shimaoka et al., 2004, Preger et al., 2005, Bérczi et al., 2003). In der Tonoplastmembran von *Arabidopsis thaliana* wurde der Transporter VIT (Morrissey & Guerinot, 2009, Kim et al., 2006) identifiziert. Bei Überschuss von Eisen in der Zelle transportiert dieser Transporter reduziertes Eisen in die Vakuole, welches dort gelagert wird. Kommt es zu Eisenmangel in der Zelle, können die Fe^{2+} -spezialisierten Transporter NRAMP3 und 4 reduziertes Eisen (Fe^{2+}) aus der Vakuole zurück in die Zelle transportieren (Kim et al., 2006). In Zellen wird hochreaktives Eisen meist in einem Komplex mit Chelatoren im oxidierten Zustand gelagert (Burkitt, 2003). Aus diesem Grund muss das oxidierte Eisen (Fe^{3+}) vor dem Transport in oder aus der Vakuole zunächst reduziert werden (Morrissey & Guerinot, 2009). Trotz des niedrigen pHs in der Vakuole von 5,5 kann unter Verbrauch von Ascorbat die Reduktion (Cenacchi, 2007) von Eisen durch beide Paraloge katalysiert werden. Es kann nun spekuliert werden, ob die Ascorbat-Oxidation durch CYBASC-Paraloge in der Vakuole stattfindet und somit eine Reduktion der Fe^{3+} -Chelate im Cytoplasma stattfindet oder aber, ob die Fe^{3+} -Chelat-Reduktion in der Vakuole erfolgt und damit die Ascorbat-Oxidation durch den A-Paralog im Cytoplasma abläuft. Da die Konzentration von Ascorbat in der Vakuole sehr gering ist und somit die Fe^{3+} -Chelat-Reduktion durch CYBASC-Proteine limitiert werden könnte und im Gegensatz dazu die Ascorbatkonzentration im Cytosol im millimolaren Bereich liegt, könnte der A-Paralog dementsprechend eher am Eisen-Transport (durch NRAMP3 und 4) aus der Vakuole hinaus, als in die Vakuole hinein, involviert sein (Morrissey & Guerinot, 2009).

7.7 Verwendung von DEPC zur Lokalisation des Hoch- und Niedrig-Potential-Häms

Eine Inkubation mit DEPC modifiziert mit einer hohen Affinität Histidin-, Tyrosin- und Lysinreste (Miles, 1977, Nakanishi et al., 2009b, Tsubaki et al., 2000). Hierbei reagiert DEPC zum Beispiel mit dem deprotonierten Stickstoffatom des Imidazolrings. Die Inhibition des *BCytb*₅₆₁ CGs konnte bereits gezeigt werden (Takigami et al., 2003, Tsubaki et al., 2000, Takeuchi et al., 2001, Njus et al., 2001, Kipp et al., 2001). Durch MALDI-TOF-Analysen wurden diejenigen Aminosäuren identifiziert, welche modifiziert wurden. Diese waren Lysin 81 (*BCytb*₅₆₁-CG: 85; *Zmb*₅₆₁: 83), Histidin 84 (*BCytb*₅₆₁-CG: 88; *Zmb*₅₆₁: 86) und Histidin 157 (*BCytb*₅₆₁-CG: 161; *Zmb*₅₆₁: 159) (Takeuchi et al., 2001, Tsubaki et al., 2000, Nakanishi et al., 2009a).

7.7.1 Inkubation mit DEPC inhibiert die Ascorbat-abhängige Reduktion: thermodynamisch und kinetisch

DEPC-modifiziertes *BCytochrom* b_{561} -CG zeigte eine um 70 % verminderte Ascorbat-abhängige Reduktion (Tsubaki et al. 2000). Auch die Inkubation der gereinigten Paraloge A und B aus *Arabidopsis thaliana* mit DEPC resultierten in einer Inhibition der Ascorbat-abhängigen-Reduktion. Die Reduktion betrug für den A-Paralog nur 8 % (siehe Abbildung 6.23 c und Tabelle 7.1) und für den B-Paralog 36 % (siehe Abbildung 6.23 d und Tabelle 7.1) jeweils bezogen auf die Ascorbat-abhängige Reduktion der nicht modifizierten Kontrollmessung (siehe Abbildung 6.23a, b und Tabelle 7.1). Des Weiteren wurde auch die Na-Dithionit-abhängige Reduzierbarkeit untersucht. Die Na-Dithionit-Reduktion der unmodifizierten Paraloge wurden auch hier als Kontrolle gemessen und als 100 % Reduzierbarkeit gewertet. Der DEPC-modifizierte A-Paralog besaß eine Na-Dithionit-Reduzierbarkeit von 73 % bezogen auf die Reduzierbarkeit der Kontrolle, wobei der B-Paralog eine Reduzierbarkeit von 112 % aufwies (siehe Abbildung 6.23c, d und Tabelle 7.1). Die spezifischen kinetischen Aktivitäten angegeben als RCA-Werte (siehe Abschnitt 5.12.2) betragen nur 11 % (A-Paralog) bzw. 13 % (B-Paralog) in Bezug auf die Aktivität der unmodifizierten Kontrollmessungen (100%, siehe Abschnitt 6.13.2). Die Proben, welche mit DEPC und Ascorbat inkubiert worden waren, zeigten ebenfalls eine Inhibition der thermokinetischen Ascorbat-abhängigen-Reduktion (A-Paralog: 42 %; B-Paralog: 54 %). Die Na-Dithionit-abhängige Reduktion lag bei 108 % für den A- und 95 % für B-Paralog. Auch die RCA-Werte waren vermindert: Der A-Paralog besaß 10 % und der B-Paralog 3 % in Bezug auf die unmodifizierten Kontrollproben. Die Na-Dithionit-abhängige Reduktion war durch die Inkubation mit DEPC bzw. DEPC und Ascorbat nicht vermindert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Abgabe der Elektronen von Na-Dithionit an die Paraloge nicht an der Ascorbat-Bindestelle stattfindet. Ähnliches wurde schon für die QFR im „BV → Fu-Test“ beobachtet. Auch hier ist die Elektronenabgabe an die QFR weder an der Bindestelle für Menachinol noch an der Bindestelle für Fumarat zu finden (Unden & Kröger, 1986).

7.7.2 Effekt der DEPC-Modifikation auf die E_M -Werte

Mit Redox titrationen (siehe Abschnitt 5.13 und 6.13) wurde untersucht, ob die Inhibition der thermodynamischen und kinetischen Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit auf eine Veränderung der E_M -Werte zurückzuführen ist. Redox titrationen des DEPC-modifizierten A-Paralogs zeigten zwei titrierbare Häme. Die Differenz $\Delta E_{M,bL}$ zwischen DEPC-modifizierter und Kontrollprobe lag bei 229 mV. Der E_M -Wert des Hoch-Potential-Häms zeigte keine Veränderung gegenüber der unmodifizierten Probe ($\Delta E_{M,bH}$: 47 mV) (siehe Abbildung 6.25, Tabelle 7.1 und Anhang 11.8). Im Gegensatz zum A-Paralog waren beide E_M -Werte des DEPC-modifizierten B-Paralogs deutlich verändert (siehe Anhang 11.8, Tabelle 7.1 und Abbildung 6.25). Die Differenz $\Delta E_{M,bL}$ betrug 211 mV und die Differenz $\Delta E_{M,bH}$ 186 mV. Die Modifikation des Häms b_H könnte durch ein zusätzliches Histidin hervorgerufen werden: Untersuchungen der Aminosäure-Sequenz (siehe Abbildung 3.4) des A-Paralogs mit dem B-Paralog

zeigten zwei weitere Histidinreste im B-Paralog an den Positionen 32 und 46. Beide Histidinreste wären für eine DEPC-Modifikation zugänglich, da das Histidin 32 in einer Schleife und das Histidin 46 am Ende einer membrandurchspannenden Helix in der Nähe des Häms *b* beim MDHA-Bindemotiv lokalisiert ist. Zusätzliche Lysinreste, welche auch durch DEPC modifiziert werden könnten (Kipp et al., 2001, Njus et al., 2001, Takeuchi et al., 2001, Tsubaki et al., 2000, Nakanishi et al., 2009a, Nakanishi et al., 2009b), wurden nicht gefunden. Vielmehr wurden zwei weitere Tyrosinreste an den Positionen 140 und 142 lokalisiert. Das Tyrosin an Position 140 liegt wie das Histidin am Ende einer membrandurchspannenden Helix und das Tyrosin an Position 142 in einer Schleife, so dass eine Modifikation durch DEPC nicht ausgeschlossen werden kann (siehe Abbildung 3.4 und Anhang 11.2).

Die Veränderung des E_M -Wertes des Häms b_L konnte nicht für das Protein Zmb_{561} gezeigt werden. Hier betrug die Differenz $\Delta E_{M,bL}$ nur 23 mV ($\Delta E_{M,bH}$ -Wert: 19 mV, Nakanishi et al., 2009a). Jedoch wurde auch hier eine Inhibition in der Ascorbat-abhängigen-Reduktion beobachtet (siehe Abschnitt 7.8). Im Gegensatz dazu konnte eine drastische Änderung des E_M -Wertes für das Häm b_L des $BCytb_{561}$ -CG beobachtet werden. Die Differenz $\Delta E_{M,bL}$ betrug 90 mV. Der E_M -Wert des Häms b_H war hingegen nicht betroffen (Takeuchi et al., 2001).

Redox titrationen der DEPC- und Ascorbat-inkubierten Proben zeigten, dass beide E_M -Werte beider Paraloge nahezu dieselben Werte, wie die der unmodifizierten Wildtyp-CYBASC-Proteine besaßen (siehe Anhang 11.8, Tabelle 7.1 und Abbildung 6.25). Die Differenzen des A-Paralogs waren $\Delta E_{M,bL} = 35$ mV und $\Delta E_{M,bH} = 33$ mV, die des B-Paralogs $\Delta E_{M,bL} = 21$ mV und $\Delta E_{M,bH} = 7$ mV. Vergleichbares wurde für das Protein $BCytb_{561}$ -CG beobachtet: Auch hier resultierte die Inkubation mit DEPC und Ascorbat in identischen E_M -Werten beider Häme *b* im Vergleich zu den unmodifizierten Proben (Takeuchi et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in beiden Paralogen sowie $BCytb_{561}$ -CG das Ascorbat-Bindemotiv in der Nähe des Niedrig-Potential-Häms liegt. Durch die Bindung von Ascorbat während der DEPC-Modifikation wird das Niedrig-Potential-Häm des CYBASC-Proteins *beschützt*, da eine Modifikation der Häm-koordinierenden Histidinreste nicht möglich ist. Das Topologie-Modell, nach welchem sich das Niedrig-Potential-Häm in der Nähe der Ascorbat-Bindestelle befindet, wird von Tsubaki (Nakanishi et al., 2007, Takeuchi et al., 2004, Takeuchi et al., 2001, Takigami et al., 2003, Tsubaki et al., 2000) und Asard (Bérczi et al., 2005) vertreten: In Tsubakis Labor wurden DEPC-modifizierte-CYBASC-Protein ($BCytb_{561}$ -CG) durch *Stopped-Flow*-Analysen, Ascorbat- und MDAH-Bindungsassays als auch Redox titrationen charakterisiert. Untermauert wird die Hypothese durch Analysen von Varianten des $BCytb_{561}$ -CGs im Labor von Asard (siehe Tabelle 7.2). Jedoch stehen diese Ergebnisse in Konflikt mit den Ergebnissen von Desmet (Desmet et al., 2011) und Liu (Liu et al., 2011). EPR-Messungen sowie Redox- und Ascorbat-Titrationen suggerieren, dass das Hoch-Potential-Häm in der Nähe der Ascorbat-Bindestelle liegt (siehe Tabelle 7.2).

7.7.3 Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die DEPC-Modifikation des A-Paralogs mittels CD-Spektroskopie untersucht. Durch die experimentelle Bestimmung der Anteile der sekundären Struktur motive sollte untersucht werden, ob diese durch DEPC-Modifikation verändert werden und die Inhibition der thermodynamischen und kinetischen Aktivitäten darauf zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 6.13.4). Die Auswertung der CD-Spektren wurde mit zwei verschiedenen Programmen durchgeführt. Bei der Provencher & Glockner-Methode wurden die gemessenen CD-Spektren mit Spektren anderer Proteine abgeglichen und daraus die Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente ermittelt. Bei dieser Methode wurde der helikale und der Faltblatt-Anteil in reguläre/geordnete (Helix 1/ Faltblatt 1) und in ungeordnete (Helix 2/ Faltblatt 2) unterteilt (Wallace & Janes, 2009). Bei der K2D-Methode hingegen wird diese Unterscheidung nicht durchgeführt. Hier wurde nur zwischen Helices, Faltblättern und Random Coils unterschieden. Die Auswertung hierbei beruht auf einem neuronalen Netzwerk-Programm. Es wurden über neuronale Verbindungen die eingespeisten CD-Spektren ausgewertet und die sekundären Strukturelemente bestimmt (Andrade et al., 1993). Durch den NRMSD-Faktor werden die berechneten Spektren und die daraus resultierende Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente bewertet. Für lösliche Proteine sollte der NRMSD-Faktor gering sein ($< 0,046$). Für Membranproteine jedoch bedeutet ein geringer NRMSD-Faktor nicht, dass die berechneten Spektren und damit die berechnete Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente mit der tatsächlichen Strukturzusammensetzung übereinstimmen (Wallace et al., 2003). Bei der Untersuchung des A-Paralogs wurde aus diesem Grund eine doppelte Auswertung mit einem geringen (K2D) und einem hohen NRMSD-Faktor (Provencher & Glockner-Methode) durchgeführt.

Für beide Methoden wurde eine ähnliche Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente für jeweils alle drei Proben vorhergesagt (siehe Abbildung 6.26, Tabelle 6.3 und Anhang 11.10). Die maximale Abweichung der vorhergesagten sekundären Strukturelemente war mit 7,1 % gering (siehe Tabelle 6.3 und Anhang 11.10). Die Inkubation mit DEPC zeigte keine gravierende Veränderung in der Zusammensetzung der Strukturelemente (siehe Abbildung 6.26, Tabelle 6.3 und Anhang 11.10). Den verminderten Ascorbat-abhängigen-Aktivitäten und den verminderten E_M -Werten waren demnach keine massiven strukturellen Änderungen vorangegangen. Auch die Zugabe von Ascorbat während der DEPC-Modifikation hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente (gleiche Strukturzusammensetzung). Aus diesen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die Inhibition der thermodynamischen und kinetischen Aktivitäten nur auf die Modifikationen einzelner Aminosäuren zurückzuführen ist und nicht auf eine Umstrukturierung des Proteins.

Ob die Proteinstabilität des DEPC- sowie des DEPC- und Ascorbat-modifizierten A-Paralogs verändert ist, konnte hier nicht geklärt werden, da die Bestimmung des Schmelzpunktes (T_m) nicht auswertbar war. Bei allen drei Messungen zeigte sich, dass der Proteinkomplex sehr stabil war und eine komplette Entfaltung der Proteine bei Erreichen der Temperatur von 95 °C nicht stattgefunden hatte (siehe Anhang 11.11).

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse zur Modifikation durch DEPC und DEPC und Ascorbat beider Paraloge.

Paralog	Substrat/ Inhibitor	$E_{M,bL}$ [mV] ^c	$E_{M,bH}$ [mV] ^c	r^d	Reduzierbarkeit		RCA ^m
					Asc ^e	Di ^h	
^{S.c.} Tcyth ₅₆₁ ^a	-	57 (+/- 20)	165 (+/-26)				
^{S.c.} Tcyth ₅₆₁ ^b	-	20 (+/-14)	178 (+/-15)				
	-	36 (+/-4)	187 (+/-2)	0,9917	100 % ^f	100 % ⁱ	100 % ⁿ
A-Paralog	DEPC	-193 (+/-5)	140 (+/-4)	0,9614	8 % ^f	73 % ⁱ	11 % ⁿ
	DEPC und ASC	71 (+/-6)	220 (+/-8)	0,9654	42 % ^f	108 % ⁱ	10 % ⁿ
	-	-22 (+/-6)	85 (+/-3)	0,9940	100 % ^g	100 % ^k	100 % ^o
B-Paralog	DEPC	-233 (+/-6)	-101 (+/-3)	0,9958	36 % ^g	112 % ^k	13 % ^o
	DEPC und ASC	-43 (+/-3)	78 (+/-2)	0,9828	54 % ^g	95 % ^k	3 % ^o

^a: E_M -Werte der Häm-Gruppen aus Desmet et al., 2011; ^b: $E_{M7,2}$ Werte der Häm-Gruppen aus Berzi et al., 2007^c: Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben; r^d : Korrelationskoeffizient; Asc^e: Reduktion durch Ascorbat; Di^h: Reduktion durch Na-Dithionit; ^{f,i}: Die Reduzierbarkeit der unbehandelten Probe (Kontrolle) durch Ascorbat wurde als 100 % gesetzt. Die Reduzierbarkeiten der behandelten Proben (DEPC sowie DEPC und Ascorbat) sind in Relation zur Kontrollmessung angegeben; ^{g,k}: Die Reduzierbarkeit der unbehandelten Probe (Kontrolle) durch Na-Dithionit wurde als 100 % gesetzt. Die Reduzierbarkeiten der behandelten Proben (DEPC sowie DEPC und Ascorbat) sind in Relation zur Kontrollmessung angegeben; ^{n,o}: relative Aktivitäten in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle; ^m: relative katalytische Aktivität; $E_{M,bL}$: Mittelpunkts-Potential des Niedrig-Potential-Häms; $E_{M,bH}$: Mittelpunkts-Potential des Hoch-Potential-Häms.

7.8 Schlüsselfunktion der Aminosäure B-K81

Weder der A-Paralog noch der B-Paralog konnte nach DEPC-Modifikation durch Ascorbat voll reduziert werden (siehe Abbildung 6.23, Abschnitt 7.7 und Tabelle 7.1). Die Aktivität beider DEPC-modifizierten Paraloge war im Vergleich zu den Kontrollmessungen deutlich geringer (siehe Abbildung 6.24 und Tabelle 7.1). Diese Ergebnisse lassen sich durch die verminderten E_M -Werten erklären (siehe Abschnitt 7.7). Nach Inkubation mit DEPC und Ascorbat jedoch wäre die Erwartung gewesen, dass die Werte der Ascorbat-abhängigen Reduzierbarkeit und die spezifische Aktivität in Höhe der Kontrollmessung liegen. Dies war nicht der Fall (siehe Abschnitt 7.7 und Tabelle 7.1). Vielmehr lag auch hier eine deutliche Inhibition für die Reduzierbarkeit und die Aktivität vor (siehe Abschnitt 7.7.1). Erklären lässt sich dies mit einer zusätzlichen Inhibition. In Betracht kommen an

dieser Stelle das Lysin an der Position 81 (im A-Paralog 80) oder das Tyrosin an Position 218 in *Bcytb*₅₆₁-CG sein (Nakanishi et al., 2009a, Nakanishi et al., 2009b, Takeuchi et al., 2001). Beide Aminosäuren sollen in die Erkennung oder initiale Bindung von Ascorbat bzw. am initialen Elektronentransfer beteiligt sein. Allerdings ist Tyrosin 218 (*Bcytb*₅₆₁-CG) nur in Säugetieren konserviert; in Pflanzen findet man dieses nicht. Im Gegensatz dazu ist das Lysin an Position 81 (B-Paralog) in allen Untergruppen der CYBASC-Proteinfamilie zu finden (Nakanishi et al., 2009b). Schon im Jahr 2000 wurde für *BCytb*₅₆₁-CG gezeigt, dass sowohl das Tyrosin 218 als auch das Lysin 85 (Takeuchi et al., 2004, Tsubaki et al., 2000, entsprechend K80 im A-Paralog und K81 im B-Paralog) durch DEPC modifiziert werden. Eine Inkubation mit DEPC und Ascorbat schützt nur die Häm *b*_L-koordinierten Histidinreste sowie das Tyrosin 218 vor einer DEPC-Modifikation, die Schlüsselaminosäure K85 jedoch nicht (Takeuchi et al., 2001). Dieser Rest wird trotz gleichzeitiger Inkubation mit DEPC und Ascorbat DEPC-modifiziert und die Erkennung/ initiale Bindung von Ascorbat bzw. der Elektronentransfer könnte blockiert, bzw. inhibiert sein. Für das Protein *Zmb*₅₆₁ aus *Zea mays* zeigte Nakanishi, dass DEPC neben den Histidinresten auch das konservierte Lysin 83 (entsprechend K80 im A-Paralog und K81 im B-Paralog) modifiziert (Nakanishi et al., 2009a, Nakanishi et al., 2009b, Takeuchi et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Lysin an Position 81 untersucht. Hierfür wurde die Variante B-K81E hergestellt (siehe Abschnitt 5.1.1), produziert (siehe Abschnitt 5.2.6) und gereinigt (siehe Abschnitt 5.5). Der Vergleich der Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit der Variante B-K81E mit dem Wildtyp-Paralog zeigte bei der Inkubation mit 5 μ M Ascorbat einen ΔR -Wert von 13 %. Bei Verwendung von 2 mM Ascorbat lag der ΔR -Wert bei 38%. Des Weiteren war auffällig, dass eine Reduktion durch 80 mM Ascorbat nicht möglich war. Die Variante präzipitierte nach Zugabe des Ascorbats. Da die Variante in mehreren Ansätzen gereinigt wurde, ist davon auszugehen, dass ein Defekt des Proteins vorlag und nicht die Art der Reinigung ursächlich für die Präzipitation war. Mit einer Aktivität von 0,2 U/mg zeigte diese Variante auch eine deutlich geringere Aktivität gegenüber dem Wildtyp, welcher eine Aktivität von 2,9 U/mg besaß. Diese verminderte Ascorbat-abhängige Reduzierbarkeit ist konsistent zu der A-Paralog-Variante K80A (Bérczi & Asard, 2006). Dies deutet auf eine Funktion in der Ascorbatbindung oder Erkennung durch den Lysinrest hin. Redox titrationen der Variante B-K81E zeigten, dass der Austausch von Lysin zu Glutaminsäure eine deutliche Veränderung im E_M -Wert des Häms *b*_L bewirkt: Der Wert lag hier bei -119 mV (+/- 4 mV) (Häm *b*_L des Wildtyp-Enzyms: -22 mV; $\Delta E_{M,bL}$: 97 mV). Die Differenz $\Delta E_{M,bH}$ betrug lediglich 39 mV (Häm *b*_H: 124 mV (+/- 8mV)). Die Veränderung des Niedrig-Potential-Häms durch den Austausch des Lysins an Position 81 untermauert die Hypothese 2, welche das Häm *b*_L in der Nähe der Ascorbat-Bindestelle und nicht in der Nähe des MDHA-Bindemotivs vorhersagt. Außerdem lässt die Änderung des E_M -Wertes des Häms *b*_L aber auch den Schluß zu, dass der Lysinrest in die Positionierung der Hämgruppe involviert ist (Schneider et al., 2007). Es wurde zum Beispiel für Cytochrom P450-

Proteine oder auch für die QFR aus *Wolinella succinogenes* gezeigt, dass auch hier Lysinreste mit den Propionat-Gruppen der Häm interagieren und diese positionieren (Lancaster et al., 1999, Li et al., 2011). Der Verlust des Lysinrestes an Position 81 könnte zu einer falschen Häm-Positionierung führen, so dass der Elektronentransfer und daraus resultierend auch die Aktivität des Proteins gestört ist. Für das Protein Zmb_{561} wurde ebenfalls die Variante K83E hergestellt. Redox titrationen ergaben, dass in dieser Variante eine geringe Verschiebung beider E_M -Werte gegenüber dem Wildtyp vorlag. $\Delta E_{M,bH}$ lag bei 29 mV und $\Delta E_{M,bL}$ bei 32 mV. Zudem konnte das Protein Zmb_{561} K83E im Gegensatz zur *A. thaliana*-Variante B-K81E mit Ascorbat in Bezug auf die Reduktion des Wildtypenzym vollständig reduziert werden (Nakanishi et al., 2009b). Aufgrund der Ergebnisse zur Variante B-K81E und dessen analoger K83E-Variante des Proteins Zmb_{561} kann nicht abschließend geklärt werden, ob die verminderte Aktivität aus einer Inhibition der Ascorbat-Bindung/Erkennung resultiert oder ein Effekt des veränderten E_M -Wertes des Häms b_L darstellt.

7.9 Funktion der Histidinreste an den Positionen 46 und 157

Die Funktion des zusätzlichen Histidinrestes an Position 46 im B-Paralog sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Dafür wurde die Variante B-H46M hergestellt und charakterisiert. Es wurde Methionin gewählt, da diese Aminosäure auch Häm-*c*-Gruppen koordinieren kann (Kaysser et al., 1995). Der Austausch an Position 46 zeigte bezüglich der thermodynamischen Ascorbat-abhängigen Reduktion als auch der spezifischen Aktivität keine Auswirkungen (siehe Abbildung 6.27 und 6.28). Durch Redox titration konnte jedoch gezeigt werden, dass der E_M -Wert mit +160 mV (+/- 6 mV) ($\Delta E_{M,bH}$: 75 mV) des Häms b_H , als auch der des Häms b_L ($\Delta E_{M,bL}$ -Wert: 56 mV) stark erhöht waren (siehe Abbildung 6.29). Der Austausch H46M resultierte somit in erhöhten E_M -Werten (Gunner & Honig, 1991). Die Variante B-H157Q wurde hergestellt, da der Häm-koordinierende Histidinrest untersucht werden sollte. Glutamin (Q) ist eine neutrale Aminosäure mit langer Seitenkette. Histidin hingegen ist basisch, besitzt aber ebenfalls eine große Seitenkette. Wie auch der H → M-Austausch an Position 46, hatte dieser Austausch keine Verminderung der Ascorbat-abhängigen-Reduzierbarkeit sowie Aktivitätsreduktion zur Folge. Vielmehr war bei Verwendung von 5 μ M Ascorbat die Reduktion der Variante im Gegensatz zum Wildtyp erhöht. Dies konnte für die Variante $BCytb_{561}$ -CG-H161Q nicht beobachtet werden. Diese Variante war durch Ascorbat nicht reduzierbar (Liu et al., 2008). Die Hämbestimmung erbrachte einen Wert von 1,3 Häm/Monomer. Die Autoren schlossen daraus, dass diese Variante ein Häm verloren hatte (Liu et al., 2008). Für die A-Paralog-Varianten ($Tcytb_{561}$) H83A/H156A und H83L/H157L wurde gezeigt, dass diese in selber Höhe wie das Wildtypenzym durch Ascorbat reduzierbar waren. Redox titrationen beider Varianten zeigten, dass die Varianten jeweils nur eine Häm *b*-Gruppe besaßen (Desmet et al., 2011). Die E_M -Werte der Varianten des A-Paralogs beliefen sich auf 46 mV (+/- 11 mV) (H83A/H156A) bzw. 21 mV (+/- 5 mV) (H83L/H157L), was in etwa dem Wildtyp- E_M -Wert des Häms b_L entsprach. Desmet und Koautoren

schlossen daraus, dass das Häm b_H durch die Histidinreste 83 und 156 koordiniert wird. Diese Histidinreste befinden sich in der Nähe des Ascorbat-Bindemotivs, so dass diese Ergebnisse Hypothese 1 entsprechen (siehe Abschnitt 3.4.1, Tabelle 7.2). In Redox-titrations der B-Paralog-Variante B-H157Q konnte auch nur eine Häm b -Gruppe mit einem E_M -Wert von 29 mV (\pm 7 mV) titriert werden. Der Verlust des Häms konnte durch die Bestimmung des Hämgehalts bestätigt werden (siehe Abschnitt 5.11.2 und 6.14.4). Eine Aussage zur Lokalisation von Häm b_L und Häm b_H kann auf Grund des E_M -Wertes der Variante B-H157Q (29 mV) nicht getroffen werden, da die ΔE -Werte mit 51 mV ($\Delta E_{M,bH}$) und 56 mV ($\Delta E_{M,bL}$) in etwa gleichgroß sind. Jedoch zeigen diese Ergebnisse, dass der Histidinrest an Position 157 an der Koordination einer Häm-Gruppe beteiligt ist.

Für beide Histidin-Varianten konnte im Rahmen dieser Arbeit nur eine Änderung der E_M -Werte bestimmt werden. Die Bestimmungen der Ascorbat-abhängigen Reduzierbarkeit und der spezifischen Aktivität weisen zunächst auf keine Veränderung der Funktionalität beider Varianten hin. Allerdings könnte dies auf den Aufbau des Aktivitätstest zurückzuführen werden, da hierbei das gereinigte Protein in Lösung vorliegt. Dies entspricht keiner physiologischen Situation. Änderung der Funktionalität des B-Paralogs auf Grund von Aminosäure-Austauschen, die nur unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden können, können mit dem hier etablierten Aktivitätstest nicht detektiert werden.

7.10 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die heterologe Produktion des A-Paralogs durch die Verwendung des Stammes Rosetta (DE3) gesteigert werden. Die Produktion des B-Paralogs war bei Verwendung des Stammes C43 (DE3) geringer. In folgenden Arbeiten sollte auch für die Produktion des B-Paralogs der Rosetta (DE3)-Stamm genutzt werden. Obwohl die gesteigerte Produktion des A-Paralogs auf das Fehlen der Proteasen OmpT und Lon zurückzuführen ist, sollte für beide Paraloge die heterologe Produktion unter Verwendung von des Stammes Rosetta (DE3) 2 untersucht werden. Dieser Stamm ist mit einem Plasmid transformiert, welcher neben den 6 tRNAs (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA) von pRARE für eine siebte tRNA (CGG) kodiert. Diese tRNA ist für beide Paraloge limitierend (siehe Anhang 11.3). Trotz Steigerung an heterolog produzierten CYBASC-Proteinen wurden Konstrukte für das Expressionssystem *Pichia pastoris* hergestellt (Daly & Hearn, 2005). Der Vorteil der neuen Konstrukte ist, dass sie neben dem Poly-Histidin-Affinitätsanhängsel eine TEV-Protease-Schnittstelle haben, so dass im Verlauf der Reinigung das Poly-Histidin-Affinitätsanhängsel entfernt werden könnte (siehe Abbildung 6.30). Die Erhöhung der Anzahl an Histidinresten im Affinitätsanhängsel soll außerdem die Bindung zwischen A-Paralog und Ni^{2+} -IMAC-Matrix steigern und somit die Ausbeute an gereinigtem A-Paralog erhöhen (siehe Tabelle 4.5 und Abschnitt 6.15). Zudem könnte der A-Paralog auch über das StrepII-Affinitätsanhängsel gereinigt werden. Der A-Paralog sowie dessen Affinitätsanhängsel wurden in den Vektor pPIC3.5K kloniert. Bei diesem

Vektor wird die Produktion durch Zugabe von Methanol induziert, da das Gen unter der Kontrolle des *AOXI* Promotors steht (Cereghino & Cregg, 2000). Zusätzlich kann die Produktion durch multiple Plasmidintegration in das Genom erhöht werden, welche durch eine gesteigerte Geneticin-Resistenz detektiert wird (Scorer et al., 1994, Weiss et al., 1998). Da es sich um ein eukaryotisches Expressionssystem handelt, könnten so höhere Ausbeuten mit 0,5 mg/L Zellkultur erwartet werden (Cenacchi, 2007). Anzumerken bleibt, dass für beide Paraloge keine Glykolisierung vorhergesagt wird. Für eine initiale Charakterisierungen neuer Varianten, kann die Produktion weiterhin in *E. coli* durchgeführt werden (Cenacchi, 2007, Nakanishi et al., 2009b).

Die im Rahmen dieser Arbeit und in der Diplomarbeit von M. Klein (Klein, 2011) optimierte Solubilisierung und Proteinreinigung steigerte zum einen den Reinheitsgrad der Proteinprobe und zum anderen die Menge an reinem Protein. In Größenausschlusschromatographie-Ansätzen wurde gezeigt, dass die Probe im Detergenz β -LM monodispers vorlag. Trotzdem sollten in weiteren initialen Kristallisationsansätzen weitere Detergenzien, wie zum Beispiel LDAO oder DM, untersucht werden. Zudem sollte die Zugabe von kleinen Amphiphilen, wie zum Beispiel Benzamidin oder Heptan-1,2,3-triol, in verschiedenen Konzentrationen getestet werden. Durch Zugabe dieser kleinen Amphiphile wird die Detergenz-Mizelle verkleinert und eine Kristallisation ermöglicht (Michel, 1983, Gast et al., 1994, Chae et al., 2010). Eine Möglichkeit überschüssiges Detergenz aus der Proteinlösung zu entfernen, wäre zusätzlich die Verwendung von Biobeads (Rigaud et al., 1998, Galian et al., 2011).

Für die weiterführende funktionelle Charakterisierung der CYBASC-Proteine sollten neue Varianten hergestellt werden. Zugleich sollten die schon bestehenden Varianten weiterhin untersucht werden: Die Auswirkung der DEPC-Modifikation auf die Variante B-K81E sollte mittels Bestimmung der spezifischen Aktivität und Bestimmung der E_M -Werte untersucht werden. Die Frage hierbei wäre, ob durch DEPC-Modifikation eine Änderung der E_M -Werte und eine Aktivitätsverminderung/Steigerung hervorgerufen werden. Gleiches gilt auch für die Variante B-H46M. Durch die Variante B-H46M konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagen über eine Funktion getroffen werden. DEPC-Inkubationen und die Bestimmung der Aktivitäten sowie der E_M -Werte könnten hier neue Erkenntnisse aufzeigen. Außerdem sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, einen Aktivitätstest zu etablieren, bei welchem in Proteoliposomen eingebaute Paraloge sowie deren Varianten untersucht werden (Madej et al., 2006). Dies entspräche eher einer physiologischen Umgebung. Die Funktionalität von Varianten, insbesondere der hier vorgestellten Histidin-Varianten, könnten so genauer untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Lokalisierung des Häms b_H und des Häms b_L sind vergleichend in Tabelle 7.2 zusammengefasst. Die gesammelten Ergebnisse sind konsistent mit der Lokalisation des Häms b_L in der Nähe des Ascorbat-Bindemotivs ist. Analog zu Versuchen mit der

QFR aus *Wolinella succinogenes* und Substratanalogen sollten auch hier Versuche mit Ascorbatderivaten, welche deutlich unterschiedliche Redoxpotentiale besitzen, durchgeführt werden (Madej et al., 2006). Dies könnten die entscheidenden Ergebnisse zur Lokalisation der Häme b_L und b_H erbringen.

Tabelle 7.2: Zusammenfassung zur Lokalisierung des Häms b_H und des Häms b_L .

untersuchtes CYBASC-Protein	Hypothese	Referenz
A-Paralog	2	diese Arbeit
B-Paralog	2	diese Arbeit
B-K81E	2	diese Arbeit
B-H46M	*	diese Arbeit
B-H157Q	*	diese Arbeit
TCyt b_{561} -Varianten: H83A/H156A und H83L/H157L	1	(Desmet et al., 2011)
Zmb $_{561}$ K83E	*	(Nakanishi et al., 2009b)
BCyt b_{561} -CG-H161Q	*	(Liu et al., 2008)
BCyt b_{561} -CG	2	Takeuchi et al., 2001, Kipp et al., 2001, Takigami et al., 2003, Takeuchi et al., 2005)
BCyt b_{561} -CG-Varianten	2	(Bérczi et al., 2005)
BCyt b_{561} -CG	1	(Liu et al., 2011)

*. Ergebnisse lassen keine Zuordnung zu; Hypothese 1: b_H liegt in der Nähe des Ascorbat-Bindemotivs und b_L in der Nähe des MDHA-Bindemotivs; Hypothese 2: b_L liegt in der Nähe des Ascorbat-Bindemotivs und b_H in der Nähe des MDHA-Bindemotivs.

Sequenzvergleiche zeigten, dass beide CYBASC-Paraloge gegenüber anderen CYBASC-Proteinen ein Doppel-Lysin-Motiv an den Positionen 80 und 81 (B-Paralog) bzw. 79 und 80 (A-Paralog) besitzen. Für eine genauere Charakterisierung dieser Reste sollten Varianten auch mit Doppelaustauschen synthetisiert werden. Bei Varianten, bei denen nur ein Lysinrest ausgetauscht ist, könnte die Funktion vom jeweilig anderen Lysinrest übernommen werden (Bérczi & Asard, 2006). In Arbeiten aus 2006 zeigte die Gruppe um Assard, dass die heterolog produzierte LCyt b -Mutante Q131A (lysosomales Cytochrom b_{561} aus *Mus musculus*) eine um 45 % verminderte Fe^{3+} -Reduktase-Aktivität besaß (Su & Asard, 2006). Die Autoren schlossen daraus, dass der Rest Q131 elementar für den Elektrontransfer über die Membran ist. Eine Untersuchung des Restes, der im A-Paralog an Position 131 und im B-Paralog an Position 132 liegt, sollte daher durchgeführt werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. ABT, D. 1998. Nitritreduktasen aus sulfatreduzierenden Bakterien: Reinigung, biochemische und spektroskopische Charakterisierung. *Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz*
2. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., HAECKER, B., HORSTMANN, C. & SCHAEFER, U. 2011. Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 5. Auflage.
3. ANATRACE. Detergents and their uses in membrane proteinescience. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/detergents/ANATRACE_DetergentsUse.pdf
4. ANDRADE, M. A., CHACON, P., MERELO, J. J. & MORAN, F. 1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*, 6, 383-90.
5. ANDREWS, P. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem J*, 91, 222-&.
6. APPS, D. K., BOISCLAIR, M. D., GAVINE, F. S. & PETTIGREW, G. W. 1984. Unusual redox behaviour of cytochrome b-561 from bovine chromaffin granule membranes. *Biochim Biophys Acta*, 764, 8-16.
7. ARRIGONI, O. & DE TULLIO, M. C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta*, 1569, 1-9.
8. ASARD, H., KAPILA, J., VERELST, W. & BÉRCZI, A. 2001. Higher-plant plasma membrane cytochrome b(561): a protein in search of a function. *Protoplasma*, 217, 77-93.
9. ASARD, H., TEROL-ALCAYDE, J., PREGER, V., DEL FAVERO, J., VERELST, W., SPARLA, F., PEREZ-ALONSO, M. & TROST, P. 2000. Arabidopsis thaliana sequence analysis confirms the presence of cyt b-561 in plants: Evidence for a novel protein family. *Plant Physiol Biochem*, 38, 905-912.
10. ASARD, H., VENKEN, M., CAUBERGS, R., REIJNDERS, W., OLTMANN, F. L. & DEGREEF, J. A. 1989. b-Type Cytochromes in Higher Plant Plasma Membranes. *Plant Physiol*, 90, 1077-1083.
11. BANEYX, F. & MUJACIC, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat Biotechnol*, 22, 1399-408.
12. BASHTOVYY, D., BÉRCZI, A., ASARD, H. & PALI, T. 2003. Structure prediction for the di-heme cytochrome b561 protein family. *Protoplasma*, 221, 31-40.
13. BEARD, J. L. 2001. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr*, 131, 568S-579S.
14. BÉRCZI, A. & ASARD, H. 2006. Characterization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 by site-directed mutagenesis. *Acta Biol Szeged*, 50, 55-59.

15. BÉRCZI, A., CAUBERGS, R. J. & ASARD, H. 2003. Partial purification and characterization of an ascorbate-reducible b-type cytochrome from the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Protoplasma*, 221, 47-56.
16. BÉRCZI, A., LUTHJE, S. & ASARD, H. 2001. b-type cytochromes in plasma membranes of *Phaseolus vulgaris* hypocotyls, *Arabidopsis thaliana* leaves, and *Zea mays* roots. *Protoplasma*, 217, 50-5.
17. BÉRCZI, A., SU, D. & ASARD, H. 2007. An *Arabidopsis* cytochrome b561 with trans-membrane ferrireductase capability. *FEBS Lett*, 581, 1505-8.
18. BÉRCZI, A., SU, D., LAKSHMINARASIMHAN, M., VARGAS, A. & ASARD, H. 2005. Heterologous expression and site-directed mutagenesis of an ascorbate-reducible cytochrome b561. *Arch Biochem Biophys*, 443, 82-92.
19. BÉRCZI, A., ZIMÁNYI, L. & ASARD, H. 2012. Dihydrolipoic acid reduces cytochrome b561 proteins. *Eur Biophys J*.
20. BERRY, E. A. & TRUMPOWER, B. L. 1987. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem*, 161, 1-15.
21. BONDOS, S. E. & BICKNELL, A. 2003. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem*, 316, 223-231.
22. BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
23. BURKITT, M. J. 2003. Chemical, biological and medical controversies surrounding the Fenton reaction. *Prog React Kinet Mech*, 28, 75-103.
24. BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
25. CARSON, M., JOHNSON, D. H., MCDONALD, H., BROUILLETTE, C. & DELUCAS, L. J. 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63, 295-301.
26. CENACCHI, L. 2007. Heterologous Production and Characterization of Two Distinct Di-Heme Containing Membrane Integral Cytochrome b561 Enzymes from *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt am Main)*.
27. CEREGHINO, J. L. & CREGG, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24, 45-66.
28. CHAE, P. S., RASMUSSEN, S. G. F., RANA, R. R., GOTFRYD, K., CHANDRA, R., GOREN, M. A., KRUSE, A. C., NURVA, S., LOLAND, C. J., PIERRE, Y., DREW, D., POPOT, J.-L., PICOT, D., FOX, B. G., GUAN, L., GETHER, U., BYRNE, B., KOBILKA, B. & GELLMAN, S. H. 2010. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods*, 7, 1003-U90.

29. COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y. & HSU, L. 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 2110-&.
30. COLLINS, M. L. & SALTON, M. R. 1979. Solubility characteristics of *Micrococcus lysodeikticus* membrane components in detergents and chaotropic salts analyzed by immunoelectrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, 553, 40-53.
31. CORNISH-BOWDEN, A. 1984. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Recommendations 1983). *Eur J Biochem*, 138, 9-37.
32. DALY, R. & HEARN, M. T. W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 18, 119-138.
33. DAVEY, M. W., VAN MONTAGU, M., INZE, D., SANMARTIN, M., KANELIS, A., SMIRNOFF, N., BENZIE, I. J. J., STRAIN, J. J., FAVELL, D. & FLETCHER, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
34. DEGLI ESPOSTI, M., KAMENSKY YU, A., ARUTJUNJAN, A. M. & KONSTANTINOV, A. A. 1989. A model for the molecular organization of cytochrome beta-561 in chromaffin granule membranes. *FEBS Lett*, 254, 74-8.
35. DESMET, F., BERCI, A., ZIMANYI, L., ASARD, H. & VAN DOORSLAER, S. 2011. Axial ligation of the high-potential heme center in an *Arabidopsis* cytochrome b561. *FEBS Lett*, 585, 545-8.
36. DUQUESNE, K. & STURGIS, J. N. 2010. Membrane protein solubilization. *Methods Mol Biol*, 601, 205-17.
37. FINEGOLD, A. A., SHATWELL, K. P., SEGAL, A. W., KLAUSNER, R. D. & DANCIS, A. 1996. Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 271, 31021-31024.
38. FLATMARK, T. & GRONBERG, M. 1981. Cytochrome b-561 of the bovine adrenal chromaffin granules. Molecular weight and hydrodynamic properties in micellar solutions of triton X-100. *Biochem Biophys Res Commun*, 99, 292-301.
39. FLATMARK, T. & TERLAND, O. 1971. Cytochrome b 561 of the bovine adrenal chromaffin granules. A high potential b-type cytochrome. *Biochim Biophys Acta*, 253, 487-91.
40. FLEMING, M. D., ROMANO, M. A., GARRICK, L. M., GARRICK, M. D. & ANDREWS, N. C. 1997. The iron transporter Nramp2 is mutated in the anemic belgrade (b) rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2675-2675.
41. FUHRMANN, M., HAUSHERR, A., FERBITZ, L., SCHODL, T., HEITZER, M. & HEGEMANN, P. 2004. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol*, 55, 869-81.

42. GABERC-POREKAR, V. & MENART, V. 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods*, 49, 335-360.
43. GALIAN, C., MANON, F., DEZI, M., TORRES, C., EBEL, C., LEVY, D. & JAULT, J.-M. 2011. Optimized Purification of a Heterodimeric ABC Transporter in a Highly Stable Form Amenable to 2-D Crystallization. *PLoS One*, 6.
44. GAST, P., HEMELRIJK, P. & HOFF, A. J. 1994. Determination of the number of detergent molecules associated with the reaction center protein isolated from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. Effects of the amphiphilic molecule 1,2,3-heptanetriol. *FEBS Lett*, 337, 39-42.
45. GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R. D. & BAIROCH, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31, 3784-8.
46. GEORGATSOU, E. & ALEXANDRAKI, D. 1999. Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe Cu reductase related genes. *Yeast*, 15, 573-584.
47. GORACA, A., HUK-KOLEGA, H., PIECHOTA, A., KLENIEWSKA, P., CIEJKA, E. & SKIBSKA, B. 2011. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep*, 63, 849-858.
48. GOUJON, M., MCWILLIAM, H., LI, W., VALENTIN, F., SQUIZZATO, S., PAERN, J. & LOPEZ, R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*, 38, W695-9.
49. GRASSETT, D. R. & MURRAY, J. F. 1967. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys*, 119, 41-&.
50. GRIESEN, D., SU, D., BÉRCZI, A. & ASARD, H. 2004. Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast. *Plant Physiol*, 134, 726-34.
51. GRISSHAMMER, R. 2006. Understanding recombinant expression of membrane proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 17, 337-340.
52. GRISSHAMMER, R. & TATE, C. G. 1995. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys*, 28, 315-422.
53. GRODBERG, J. & DUNN, J. J. 1988. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 170, 1245-1253.
54. GRUENHEID, S., CELLIER, M., VIDAL, S. & GROS, P. 1995. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics*, 25, 514-525.
55. GUERGOVA-KURAS, M., SALCEDO-HERNANDEZ, R., BECHMANN, G., KURAS, R., GENNIS, R. B. & CROFTS, A. R. 1999. Expression and one-step purification of a fully active polyhistidine-tagged cytochrome bc(1) complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *Protein Expr Purif*, 15, 370-380.

56. GUERRERO, S. A., HECHT, H. J., HOFMANN, B., BIEBL, H. & SINGH, M. 2001. Production of selenomethionine-labelled proteins using simplified culture conditions and generally applicable host/vector systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 718-723.
57. GUNNER, M. R. & HONIG, B. 1991. Electrostatic control of midpoint potentials in the cytochrome subunit of the Rhodospseudomonas viridis reaction center. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9151-9155.
58. GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U. V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M. F., BORON, W. F., NUSSBERGER, S., GOLLAN, J. L. & HEDIGER, M. A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388, 482-488.
59. GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. 1995a. TIGHT REGULATION, MODULATION, AND HIGH-LEVEL EXPRESSION BY VECTORS CONTAINING THE ARABINOSE P-BAD PROMOTER. *Journal of Bacteriology*, 177, 4121-4130.
60. GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. 1995b. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177, 4121-30.
61. HALLBERG, B. M. 2008. Protein production and purification. *Nat Methods*, 5, 369-369.
62. HEERKLOTZ, H. & SEELIG, J. 2000. Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. *Biophys J*, 78, 2435-2440.
63. HELLWIG, P., GRZYBEK, S., BEHR, J., LUDWIG, B., MICHEL, H. & MAENTELE, W. 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.
64. HENRIQUES, R., JASIK, J., KLEIN, M., MARTINOIA, E., FELLER, U., SCHELL, J., PAIS, M. S. & KONCZ, C. 2002. Knock-out of Arabidopsis metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol Biol*, 50, 587-97.
65. HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U. & ANDREWS, N. C. 2004. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117, 285-297.
66. HIRSH, J. & SCHLEIF, R. 1977a. ARAC PROMOTER - TRANSCRIPTION, MAPPING AND INTERACTION WITH ARABAD PROMOTER. *Cell*, 11, 545-550.
67. HIRSH, J. & SCHLEIF, R. 1977b. The araC promoter: transcription, mapping and interaction with the araBAD promoter. *Cell*, 11, 545-50.

68. HOLDEN, M. J., LUSTER, D. G., CHANEY, R. L., BUCKHOUT, T. J. & ROBINSON, C. 1991. Fe-Chelate Reductase Activity of Plasma Membranes Isolated from Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Roots : Comparison of Enzymes from Fe-Deficient and Fe-Sufficient Roots. *Plant Physiol*, 97, 537-44.
69. HUALA, E., DICKERMAN, A. W., GARCIA-HERNANDEZ, M., WEEMS, D., REISER, L., LAFOND, F., HANLEY, D., KIPHART, D., ZHUANG, M., HUANG, W., MUELLER, L. A., BHATTACHARYYA, D., BHAYA, D., SOBRAL, B. W., BEAVIS, W., MEINKE, D. W., TOWN, C. D., SOMERVILLE, C. & RHEE, S. Y. 2001. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res*, 29, 102-5.
70. KAMENSKY, Y., LIU, W., TSAI, A. L., KULMACZ, R. J. & PALMER, G. 2007. Axial ligation and stoichiometry of heme centers in adrenal cytochrome b(561). *Biochemistry*, 46, 8647-8658.
71. KANG, D. H., GHO, Y. S., SUH, M. K. & KANG, C. H. 2002. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*, 23, 1511-1512.
72. KASHINO, Y. 2003. Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 797, 191-216.
73. KAYSSER, T. M., GHAIM, J. B., GEORGIU, C. & GENNIS, R. B. 1995. Methionine-393 is an axial ligand of the heme b558 component of the cytochrome bd ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 34, 13491-13501.
74. KIM, S. A., PUNSHON, T., LANZIROTTI, A., LI, L., ALONSO, J. M., ECKER, J. R., KAPLAN, J. & GUERINOT, M. L. 2006. Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314, 1295-8.
75. KIPP, B. H., KELLEY, P. M. & NJUS, D. 2001. Evidence for an essential histidine residue in the ascorbate-binding site of cytochrome b561. *Biochemistry*, 40, 3931-7.
76. KLEIN, M. 2011. Charakterisierung, heterolog in *E. coli* produzierter Varianten-Enzyme von Cytochrom b561-A aus Arabidopsis thaliana. *Diplomarbeit am Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB)*.
77. KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G. & SONNHAMMER, E. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305, 567-80.
78. LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

79. LANCASTER, C. R., GROSS, R., HAAS, A., RITTER, M., MAENTELE, W., SIMON, J. & KROEGER, A. 2000. Essential role of Glu-C66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13051-6.
80. LANCASTER, C. R., KROEGER, A., AUER, M. & MICHEL, H. 1999. Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature*, 402, 377-85.
81. LANCASTER, C. R. D. 2003a. The structure of *Wolinella succinogenes* quinol: Fumarate reductase and its relevance to the superfamily of succinate: Quinone oxidoreductases. *Adv Protein Chem*, 63, 131-149.
82. LANCASTER, C. R. D. 2003b. *Wolinella succinogenes* quinol : fumarate reductase and its comparison to E-coli succinate : quinone reductase. *FEBS Lett*, 555, 21-28.
83. LANCASTER, C. R. D., SAUER, U. S., GROSS, R., HAAS, A. H., GRAF, J., SCHWALBE, H., MAENTELE, W., SIMON, J. & MADEJ, M. G. 2005. Experimental support for the "E pathway hypothesis" of coupled transmembrane e(-) and H+ transfer in dihemic quinol : fumarate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18860-18865.
84. LI, T., BONKOVSKY, H. L. & GUO, J.-T. 2011. Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction. *Bmc Structural Biology*, 11.
85. LIPMAN, D. J. & WILBUR, W. J. 1983. Contextual constraints on synonymous codon choice. *J Mol Biol*, 163, 363-76.
86. LIU, W., DA SILVA, G. F. Z., WU, G., PALMER, G., TSAI, A.-L. & KULMACZ, R. J. 2011. Functional and Structural Roles of Residues in the Third Extramembrane Segment of Adrenal Cytochrome b(561). *Biochemistry*, 50, 3149-3160.
87. LIU, W., KAMENSKY, Y., KAKKAR, R., FOLEY, E., KULMACZ, R. J. & PALMER, G. 2005. Purification and characterization of bovine adrenal cytochrome b561 expressed in insect and yeast cell systems. *Protein Expr Purif*, 40, 429-39.
88. LIU, W., ROGGE, C. E., DA SILVA, G. F. Z., SHINKAREV, V. P., TSAI, A.-L., KAMENSKY, Y., PALMER, G. & KULMACZ, R. J. 2008. His92 and His110 selectively affect different heme centers of adrenal cytochrome b(561). *Biochim Biophys Acta*, 1777, 1218-1228.
89. LIU, W., ROGGE, C. E., KAMENSKY, Y., TSAI, A. L. & KULMACZ, R. J. 2007. Development of a bacterial system for high yield expression of fully functional adrenal cytochrome b561. *Protein Expr Purif*, 56, 145-52.
90. LOTTSPEICH, F., ENGELS, J. W. & ZETTLMEIER LAY, S. 2006. Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, 2. Auflage.
91. LUDWICZEK, S., ROSELL, F. I., LUDWICZEK, M. L. & MAUK, A. G. 2008. Recombinant expression and initial characterization of the putative human enteric ferric reductase Dcytb. *Biochemistry*, 47, 753-61.

92. MADEJ, M. G., NASIRI, H. R., HILGENDORFF, N. S., SCHWALBE, H. & LANCASTER, C. R. D. 2006. Evidence for transmembrane proton transfer in a dihaem-containing membrane protein complex. *Embo Journal*, 25, 4963-4970.
93. MCKIE, A. T., BARROW, D., LATUNDE-DADA, G. O., ROLFS, A., SAGER, G., MUDALY, E., MUDALY, M., RICHARDSON, C., BARLOW, D., BOMFORD, A., PETERS, T. J., RAJA, K. B., SHIRALI, S., HEDIGER, M. A., FARZANEH, F. & SIMPSON, R. J. 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 291, 1755-9.
94. MICHEL, H. 1982. Three-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction centre from *Rhodospirillum rubrum*. *J Mol Biol*, 158, 567-72.
95. MICHEL, H. 1983. Crystallization of membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 8, 56-59.
96. MILENI, M., MACMILLAN, F., TZIATZIOS, C., ZWICKER, K., HAAS, A. H., MAENTELE, W., SIMON, J. & LANCASTER, C. R. D. 2006. Heterologous production in *Wolinetella succinogenes* and characterization of the quinol : fumarate reductase enzymes from *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Biochem J*, 395, 191-201.
97. MILES, E. W. 1977. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol*, 47, 431-42.
98. MIROUX, B. & WALKER, J. E. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260, 289-98.
99. MORRE, D. J., WU, L. Y. & MORRE, D. M. 1998. Response of a cell-surface NADH oxidase to the antitumor sulfonylurea N-(4-methylphenylsulfonyl)-N'-(4-chlorophenylurea)(LY181984) modulated by redox. *Biochim Biophys Acta*, 1369, 185-192.
100. MORRISSEY, J. & GUERINOT, M. L. 2009. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem Rev*, 109, 4553-67.
101. MOSS, D., NABEDRYK, E., BRETON, J. & MAENTELE, W. 1990. Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c. *Eur J Biochem*, 187, 565-72.
102. NAKANISHI, N., RAHMAN, M. M., SAKAMOTO, Y., MIURA, M., TAKEUCHI, F., PARK, S. Y. & TSUBAKI, M. 2009a. Inhibition of electron acceptance from ascorbate by the specific N-carbonylations of maize cytochrome b561: a common mechanism for the transmembrane electron transfer in cytochrome b561 protein family. *J Biochem*, 146, 857-66.

103. NAKANISHI, N., RAHMAN, M. M., SAKAMOTO, Y., TAKIGAMI, T., KOBAYASHI, K., HORI, H., HASE, T., PARK, S. Y. & TSUBAKI, M. 2009b. Importance of the conserved lysine 83 residue of *Zea mays* cytochrome b(561) for ascorbate-specific transmembrane electron transfer as revealed by site-directed mutagenesis studies. *Biochemistry*, 48, 10665-78.
104. NAKANISHI, N., TAKEUCHI, F. & TSUBAKI, M. 2007. Histidine cycle mechanism for the concerted proton/electron transfer from ascorbate to the cytosolic haem b centre of cytochrome b561: a unique machinery for the biological transmembrane electron transfer. *J Biochem*, 142, 553-60.
105. NJUS, D., KELLEY, P. M., HARNADEK, G. J. & PACQUING, Y. V. 1987. Mechanism of ascorbic acid regeneration mediated by cytochrome b561. *Ann N Y Acad Sci*, 493, 108-119.
106. NJUS, D., WIGLE, M., KELLEY, P. M., KIPP, B. H. & SCHLEGEL, H. B. 2001. Mechanism of ascorbic acid oxidation by cytochrome b(561). *Biochemistry*, 40, 11905-11.
107. NOCTOR, G. & FOYER, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 249-279.
108. OKUYAMA, E., YAMAMOTO, R., ICHIKAWA, Y. & TSUBAKI, M. 1998. Structural basis for the electron transfer across the chromaffin vesicle membranes catalyzed by cytochrome b561: analyses of cDNA nucleotide sequences and visible absorption spectra. *Biochim Biophys Acta*, 1383, 269-78.
109. PACKER, L., ROY, S. & SEN, C. K. 1997. Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol*, 38, 79-101.
110. PONTING, C. P. 2001. Domain homologues of dopamine beta-hydroxylase and ferric reductase: roles for iron metabolism in neurodegenerative disorders? *Hum Mol Genet*, 10, 1853-8.
111. PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I. & BELFRAGE, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598-599.
112. POULOS, T. L. 2005. Structural and functional diversity in heme monooxygenases. *Drug Metab Dispos*, 33, 10-18.
113. PREGER, V., SCAGLIARINI, S., PUPILLO, P. & TROST, P. 2005. Identification of an ascorbate-dependent cytochrome b of the tonoplast membrane sharing biochemical features with members of the cytochrome b561 family. *Planta*, 220, 365-75.
114. PRIVE, G. G. 2007. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, 41, 388-97.
115. PROVENCHER, S. W. & GLOCKNER, J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20, 33-37.
116. QUALLIOTINE-MANN, D., AGWU, D. E., ELLENBURG, M. D., MCCALL, C. E. & MCPHAIL, L. C. 1993. Phosphatidic acid and diacylglycerol synergize in a cell-free system for activation of NADPH oxidase from human neutrophils. *J Biol Chem*, 268, 23843-9.

117. RIGAUD, J. L., LEVY, D., MOSSER, G. & LAMBERT, O. 1998. Detergent removal by non-polar polystyrene beads - Applications to membrane protein reconstitution and two-dimensional crystallization. *Eur Biophys J*, 27, 305-319.
118. ROGULIN, E. A., PEREVYAZOVA, T. A., ZHELEZNAYA, L. A. & MATVIENKO, N. I. 2004. Plasmid pRARE as a vector for cloning to construct a superproducer of the site-specific nickase N.BspD6I. *Biochemistry*, 69, 1123-7.
119. RUPP, B. 2009. Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. *Taylor & Francis Ltd*.
120. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 3. Auflage.
121. SCAGLIARINI, S., ROTINO, L., BAURLE, I., ASARD, H., PUPILLO, P. & TROST, P. 1998. Initial purification study of the cytochrome b(561) of bean hypocotyl plasma membrane. *Protoplasma*, 205, 66-73.
122. SCHEJTER, A. & AVIRAM, I. 1969. Reaction of cytochrome c with imidazole. *Biochemistry*, 8, 149-&.
123. SCHERTLER, G. F. X., BARTUNIK, H. D., MICHEL, H. & OESTERHELT, D. 1993. Orthorhombic Crystal Form of Bacteriorhodopsin Nucleated on Benzamidine Diffracting to 3.6 Å Resolution. *J Mol Biol*, 234, 156-164.
124. SCHNEIDER, S., MARLES-WRIGHT, J., SHARP, K. H. & PAOLI, M. 2007. Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins. *Natural Product Reports*, 24, 621-630.
125. SCHMIDT, T. G. M. & SKERRA, A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, 2, 1528-1535.
126. SCHWACKE, R., SCHNEIDER, A., VAN DER GRAAFF, E., FISCHER, K., CATONI, E., DESIMONE, M., FROMMER, W. B., FLUGGE, U. I. & KUNZE, R. 2003. ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol*, 131, 16-26.
127. SCORER, C. A., CLARE, J. J., MCCOMBIE, W. R., ROMANOS, M. A. & SREEKRISHNA, K. 1994. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology (N Y)*, 12, 181-184.
128. SEIKE, Y., TAKEUCHI, F. & TSUBAKI, M. 2003. Reversely-oriented cytochrome b561 in reconstituted vesicles catalyzes transmembrane electron transfer and supports extravesicular dopamine beta-hydroxylase activity. *J Biochem*, 134, 859-67.
129. SHAPIRO, A. L., VINUELA, E. & MAIZEL, J. V., JR. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28, 815-20.

130. SHIMAOKA, T., OHNISHI, M., SAZUKA, T., MITSUHASHI, N., HARA-NISHIMURA, I., SHIMAZAKI, K., MAESHIMA, M., YOKOTA, A., TOMIZAWA, K. & MIMURA, T. 2004. Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 45, 672-83.
131. SHIRABE, K., LANDI, M. T., TAKESHITA, M., UZIEL, G., FEDRIZZI, E. & BORGESSE, N. 1995. A novel point mutation in a 3' splice site of the NADH-cytochrome b5 reductase gene results in immunologically undetectable enzyme and impaired NADH-dependent ascorbate regeneration in cultured fibroblasts of a patient with type II hereditary methemoglobinemia. *Am J Hum Genet*, 57, 302-310.
132. SKERRA, A. & SCHMIDT, T. G. 2000. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol*, 326, 271-304.
133. SMITH, B. R. & SCHLEIF, R. 1978. Nucleotide sequence of the L-arabinose regulatory region of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem*, 253, 6931-3.
134. SMITH, M. 1985. In Vitro Mutagenesis. *Annual Review of Genetics*, 19, 423-462.
135. SMITS, S. H. J., MUELLER, A., GRIESHABER, M. K. & SCHMITT, L. 2008. Coenzyme- and His-tag-induced crystallization of octopine dehydrogenase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 64, 836-839.
136. SREERAMA, N., VENYAMINOV, S. Y. & WOODY, R. W. 1999. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci*, 8, 370-80.
137. SRIVASTAVA, M. 1996. *Xenopus* cytochrome b561: Molecular confirmation of a general five transmembrane structure and developmental regulation at the gastrula stage. *DNA Cell Biol*, 15, 1075-1080.
138. SRIVASTAVA, M., GIBSON, K. R., POLLARD, H. B. & FLEMING, P. J. 1994. Human cytochrome b561: a revised hypothesis for conformation in membranes which reconciles sequence and functional information. *Biochem J*, 303 (Pt 3), 915-21.
139. STARK, M. J. 1987. Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 51, 255-67.
140. STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189, 113-130.
141. SU, D. & ASARD, H. 2006. Three mammalian cytochromes b561 are ascorbate-dependent ferrireductases. *FEBS J*, 273, 3722-34.
142. SURADE, S., KLEIN, M., STOLT-BERGNER, P. C., MUENKE, C., ROY, A. & MICHEL, H. 2006. Comparative analysis and "expression space" coverage of the production of prokaryotic membrane proteins for structural genomics. *Protein Sci*, 15, 2178-89.

143. TAKEUCHI, F., HORI, H., OBAYASHI, E., SHIRO, Y. & TSUBAKI, M. 2004. Properties of two distinct heme centers of cytochrome b561 from bovine chromaffin vesicles studied by EPR, resonance Raman, and ascorbate reduction assay. *J Biochem*, 135, 53-64.
144. TAKEUCHI, F., HORI, H. & TSUBAKI, M. 2005. Selective perturbation of the intravesicular heme center of cytochrome b561 by cysteinyl modification with 4,4'-dithiodipyridine. *J Biochem*, 138, 751-62.
145. TAKIGAMI, T., TAKEUCHI, F., NAKAGAWA, M., HASE, T. & TSUBAKI, M. 2003. Stopped-flow analyses on the reaction of ascorbate with cytochrome b561 purified from bovine chromaffin vesicle membranes. *Biochemistry*, 42, 8110-8.
146. TATE, C. G. 2010. Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation. *Methods Mol Biol*, 601, 187-203.
147. TIWARI, N., WOODS, L., HALEY, R., KIGHT, A., GOFORTH, R., CLARK, K., ATAAL, M., HENRY, R. & BEITL, R. 2010. Identification and characterization of native proteins of Escherichia coli BL-21 that display affinity towards Immobilized Metal Affinity Chromatography and Hydrophobic Interaction Chromatography Matrices. *Protein Expr Purif*, 70, 191-195.
148. TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
149. TSUBAKI, M., KOBAYASHI, K., ICHISE, T., TAKEUCHI, F. & TAGAWA, S. 2000. Diethyl pyrocarbonate modification abolishes fast electron accepting ability of cytochrome b561 from ascorbate but does not influence electron donation to monodehydroascorbate radical: identification of the modification sites by mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, 39, 3276-84.
150. TSUBAKI, M., NAKAYAMA, M., OKUYAMA, E., ICHIKAWA, Y. & HORI, H. 1997. Existence of two heme B centers in cytochrome b561 from bovine adrenal chromaffin vesicles as revealed by a new purification procedure and EPR spectroscopy. *J Biol Chem*, 272, 23206-10.
151. TSUBAKI, M., TAKEUCHI, F. & NAKANISHI, N. 2005. Cytochrome b561 protein family: expanding roles and versatile transmembrane electron transfer abilities as predicted by a new classification system and protein sequence motif analyses. *Biochim Biophys Acta*, 1753, 174-90.
152. UNDEN, G., HACKENBERG, H. & KROEGER, A. 1980. Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes*. *Biochim Biophys Acta*, 591, 275-88.
153. UNDEN, G. & KROEGER, A. 1981. The function of the subunits of the fumarate reductase complex of *Vibrio succinogenes*. *Eur J Biochem*, 120, 577-584.

154. VARGAS, J. D., HERPERS, B., MCKIE, A. T., GLEDHILL, S., MCDONNELL, J., VAN DEN HEUVEL, M., DAVIES, K. E. & PONTING, C. P. 2003. Stromal cell-derived receptor 2 and cytochrome b561 are functional ferric reductases. *Biochim Biophys Acta*, 1651, 116-23.
155. VAROTTO, C., MAIWALD, D., PESARESI, P., JAHNS, P., SALAMINI, F. & LEISTER, D. 2002. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 31, 589-99.
156. VERELST, W. & ASARD, H. 2003. A phylogenetic study of cytochrome b561 proteins. *Genome Biol*, 4, R38.
157. VERELST, W., KAPILA, J., DE ALMEIDA ENGLER, J., STONE, J. M., CAUBERGS, R. & ASARD, H. 2004. Tissue-specific expression and developmental regulation of cytochrome b561 genes in *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus*. *Physiol Plant*, 120, 312-318.
158. VERT, G., GROTZ, N., DEDALDECHAMP, F., GAYMARD, F., GUERINOT, M. L., BRIAT, J. F. & CURIE, C. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, 14, 1223-33.
159. WALKER, J. 2002. The Protein Protocols Handbook. *Humana Press*, 2nd edition.
160. WALLACE, B. A., LEES, J. G., ORRY, A. J., LOBLEY, A. & JANES, R. W. 2003. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. *Protein Sci*, 12, 875-84.
161. WEISS, H. M., HAASE, W., MICHEL, H. & REILANDER, H. 1998. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem J*, 330 (Pt 3), 1137-47.
162. WHITE, M. A., CLARK, K. M., GRAYHACK, E. J. & DUMONT, M. E. 2007. Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins. *J Mol Biol*, 365, 621-36.
163. WHITMORE, L. & WALLACE, B. A. 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 89, 392-400.
164. WILLIS, M. S. & KOTH, C. M. 2008. Structural proteomics of membrane proteins: a survey of published techniques and design of a rational high throughput strategy. *Methods Mol Biol*, 426, 277-95.
165. WU, H., LI, L., DU, J., YUAN, Y., CHENG, X. & LING, H. Q. 2005. Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 46, 1505-14.
166. XIA, D., YU, C. A., KIM, H., XIAN, J. Z., KACHURIN, A. M., ZHANG, L., YU, L. & DEISENHOFER, J. 1997. Crystal structure of the cytochrome bc(1) complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 277, 60-66.

8.1 Eigene Publikationen

CENACCHI, L. & BUSCH, M., SCHLEIDT, P. G., MUELLER, F. G., STUMPP, T. V., MAENTELE, W., TROST, P. & LANCASTER, C. R. 2012. Heterologous production and characterisation of two distinct dihaem-containing membrane integral cytochrome b(561) enzymes from *Arabidopsis thaliana* in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* cells. *Biochim Biophys Acta*, 1818, 679-88.

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Prof. Dr. C. Roy D. Lancaster für die Möglichkeit am CYBASC-Projekt arbeiten zu können. Ich bedanke mich für die Förderung, Anregung, Unterstützung und den gewährten Freiraum. Ich danke Dir sehr für die Möglichkeit verschiedene Methoden kennenzulernen. Darüber hinaus danke ich für private Gespräche und dafür, dass Du mich mit ins Saarland genommen hast.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, UdS), der im Rahmen des GRKs 845 und DokProBio die Rolle des wissenschaftlichen Begleiters übernommen hat. Ich danke Dir für dein Interesse an dieser Arbeit und die tollen Gespräche. Außerdem danke ich Dir und Deinen Mitarbeitern für die unkomplizierte Hilfe und die Verwendung der TischUZ.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Strukturbiologie, für das tolle Arbeitsklima, Hilfestellungen, Freude und das Ihr mich auch in angespannter und gestresster Laune ertragen habt. Mein besonderer Dank gilt Birgit Herrmann, Ulrike Denne, Dr. Yvonne Carius und Martin Klein.

Bei Dr. Julian Langer und Imke Wüllenweber (beide MPI für Biophysik, Ffm) möchte mich für die ESI-MS/MS-Experimente und deren Auswertungen bedanken. Zudem konnte ich eines meiner GRK 845-Praktikas bei Julian und Imke durchführen, so dass ich Einblicke in die ESI-MS/MS-Methode bekam. Imke und Julian, darüber hinaus danke ich Euch einfach für all das Lachen mit Euch zusammen und das Zuhören.

Mein Dank gilt auch Michael Jähme und Schara Safarian (beide MPI für Biophysik, Ffm) für Ihre Unterstützung bei den Experimenten mit der analytischen Gelfiltration. Bei Michael bedanke ich mich auch für die Hilfe bei der Auswertung der CD-Spektren.

Ich danke Prof. Dr. Dr. h.c. Hartmut Michel (MPI für Biophysik, Ffm) für die Möglichkeit die oben genannten Experimente in seiner Abteilung durchführen zu können.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Werner Mäntele (Institut für Biophysik, JWGU) für die Benutzung der Messzelle und des Spektrometers. Besonders bei Dr. Georg Wille (Institut für Biophysik, JWGU) möchte ich mich für die Unterstützung bei den Redox titrationen und die Hilfestellung bei der Benutzung des Spektrometers bedanken. Mein Dank gilt auch Werner Müller (Institut für Biophysik, JWGU) für Zuspruch, Unterstützung, Ideen und gemeinsames Lachen. Für die Einarbeitung in die Redox titrationen bedanke ich mich bei Philipp Schleidt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Rita Bernhardt (Lehrstuhl für Biochemie, UdS) für die Benutzung des CD-Spektrometers. Ich danke Dr. Frank Hannemann (Lehrstuhl für Biochemie, UdS) und Florian Müller für die Einarbeitung und Hilfestellungen bei der CD-Spektroskopie.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern des GRKs 845, besonders der wissenschaftlichen Koordinatorin Dr. Gabriele Amoroso, für spannende und lehrreiche Seminare und Ausflüge, sowie tolle Kolloquien.

Markus Höhen von der Additive GmbH danke ich sehr für die Hilfe mit Origin.

Für die Finanzierung dieser Arbeit bedanke ich mich beim Graduiertenkolleg (GRK 845) „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“ und der Universität des Saarlandes.

Mein ganz besonderer Dank gilt

meinen Eltern

Carmen & Jochen Busch,

meinen Großeltern

Lore & Jürgen Heinemann, sowie Liesel Busch,

meinen Freunden

Anika Mellinghoff, Annina Müller, Corinna Humann, Elena Christl, Inga Scholl, Nadine Leitenberger,

Patrick Schönig, Tim Racinowski, Thomas Weiss, Uwe Struck und Verena Kohl

meinem Freund

Christian Seib ♥ .

10 LEBENS LAUF

Manuela Busch

geboren am 02. August 1983 in Leipzig

Promotion

- 11/2008 – heute Promotion zum Thema: Optimierung der Reinigung und Charakterisierung von heterolog produzierten CYBASC-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* Abteilung Strukturbiologie bei Prof. Dr. Roy Lancaster
- 11/2011 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Strukturbiologie bei Prof. Dr. Roy Lancaster
- 11/2008 – 10/2011 Stipendiatin des Graduiertenkollegs 845 „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“

Studium

- 2008 Master of Science, Gesamtnote 1,6
Masterthesis am Max Planck Institut für Biophysik (Frankfurt am Main), Abteilung Molekulare Membranbiologie (Prof. Dr. Dr. h.c. Hartmut Michel), Arbeitsgruppe Lancaster
Thema: Charakterisierung von durch gerichtete Mutagenese generierten Varianten der Chinol:Fumarat-Reduktase aus *Wolinella succinogenes*
Note: 1,0
- 10/2006 – 10/2008 Masterstudiengang „Biologie“ an der Justus Liebig Universität, Gießen
Studienschwerpunkte: Genetik, Naturschutz und Zellbiologie
- 2006 Bachelor of Science, Gesamtnote 2,4
Bachelorthesis in der Abteilung Genetik (Prof. Dr. Jürgen Heinisch)
Thema: Molekularbiologische Analyse verschiedener EIICB^{Glc}-Fusionsproteine in *Escherichia coli* K-12
Note: 1,8
- 09/2003 – 09/2006 Bachelorstudiengang „Biologie der Zellen“ an der Universität Osnabrück
Studienschwerpunkte: Biophysik und Genetik

Schulausbildung

- 2003 allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote 2,4
- 1994 - 2003 „Graf-Stauffenberg-Schule“ Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe in Flörsheim am Main

11 ANHANG

11.1 Proteinsequenz-Homologie

Tabelle 11.1: Proteinsequenz-Homologie verschiedener CYBASC-Proteine.

	identischer Anteil pro Proteinsequenz-Vergleich [%]					
	CGCytb ₅₆₁	HCytb ₅₆₁	BCytb ₅₆₁ -CG	A-Paralog	Zmb ₅₆₁	B-Paralog
CGCytb ₅₆₁	x	88 (93)	85 (91)	32 (49)	35 (51)	31 (51)
HCytb ₅₆₁	88 (93)	x	87 (91)	33 (47)	34 (50)	30 (48)
BCytb ₅₆₁ -CG	85 (91)	87 (91)	x	30 (47)	34 (50)	33 (60)
A-Paralog	32 (49)	33 (47)	30 (47)	x	60 (71)	41 (60)
Zmb ₅₆₁	35 (51)	34 (50)	34 (50)	60 (71)	x	39 (58)
B-Paralog	31 (51)	30 (48)	33 (60)	41 (60)	39 (58)	x

Der in Klammer angegebene Wert entspricht dem ähnlichen Anteil [%] pro Proteinsequenz-Vergleich. Verwendet wurde das Programm *EMBOSS Needle* (siehe Tabelle 4.19 Tools von EMBL-EB).

CGCytb₅₆₁: CYBASC-Protein aus *Mus musculus*, welches in chromaffinen Vesikeln (CG) lokalisiert ist;

HCytb₅₆₁: CYBASC-Protein aus *Homo sapiens*, welches in chromaffinen Vesikeln lokalisiert ist, BCytb₅₆₁-CG:

CYBASC-Protein aus *Bos taurus*, welches in chromaffinen Vesikeln (CG) lokalisiert ist, A-Paralog: CYBASC-

Protein aus *Arabidopsis thaliana*, Zmb₅₆₁: CYBASC-Protein aus *Zea mays*, B-Paralog: CYBASC-Protein aus

Arabidopsis thaliana.

11.2 Strukturvorhersage der CYBASC-Paraloge

Tabelle 11.2: Strukturvorhersage und Orientierung beider Paraloge durch den Server TMHMM (Krogh et al., 2001).

A-Paralog		
Abschnitt		Vorhergesagtes Strukturmotiv
AS	AS	
1	9	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
10	32	Helix 1
33	44	Schleife (MDHA-Bindemotiv)
45	67	Helix 2
68	81	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
82	102	Helix 3
103	114	Schleife (MDHA-Bindemotiv)
115	137	Helix 4
138	151	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
152	174	Helix 5
175	194	Schleife (MDHA-Bindemotiv)
195	217	Helix 6
218	239	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
B-Paralog		
Abschnitt		Vorhergesagtes Strukturmotiv
AS	AS	
1	4	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
5	27	Helix 1
28	46	Schleife (MDHA-Bindemotiv)
47	69	Helix 2
70	81	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
82	104	Helix 3
105	118	Schleife (MDHA-Bindemotiv)
119	141	Helix 4
142	153	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)
154	176	Helix 5
177	195	Schleife (MDHA-Bindemotiv)
196	218	Helix 6
219	230	Schleife (Ascorbat-Bindemotiv)

AS: Aminosäure

11.3 Vergleichsanalysen des Kodongebrauchs zwischen *E. coli* und *Arabidopsis thaliana*

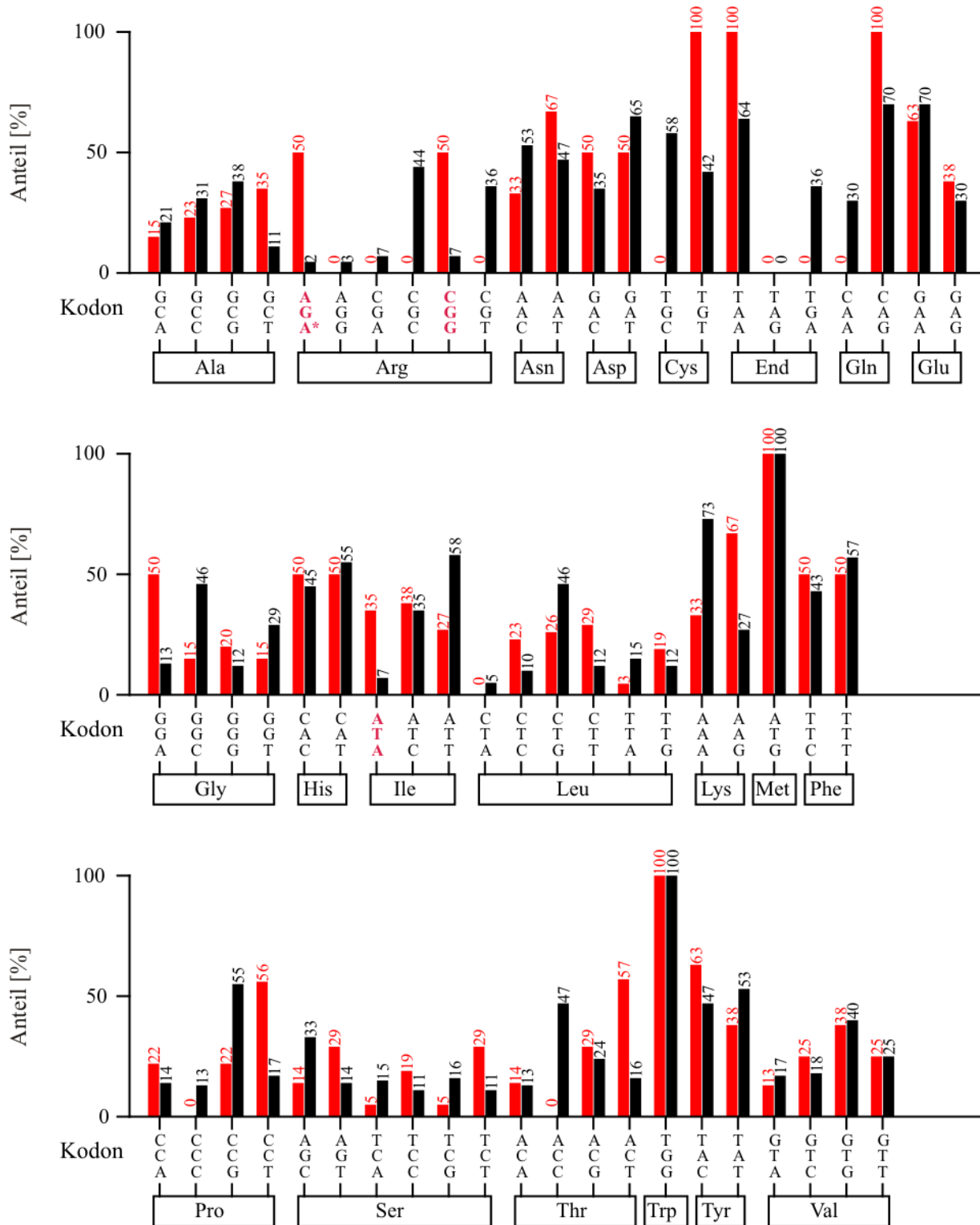


Abbildung 11.1: Vergleichsanalysen des Kodongebrauchs zwischen dem Expressionssystem und *Arabidopsis thaliana* für den A-Paralog.

Der Kodonverbrauch von *Arabidopsis thaliana* ist in Rot dargestellt, der des Expressionssystem *E. coli* in Schwarz. Rot-markierte Basentriplets könnten die heterologe Produktion in *E. coli* vermindern. Das mit * Rot-markierte Basentriplet wird auf dem Plasmid pRARE kodiert (Rogulin et al., 2004).

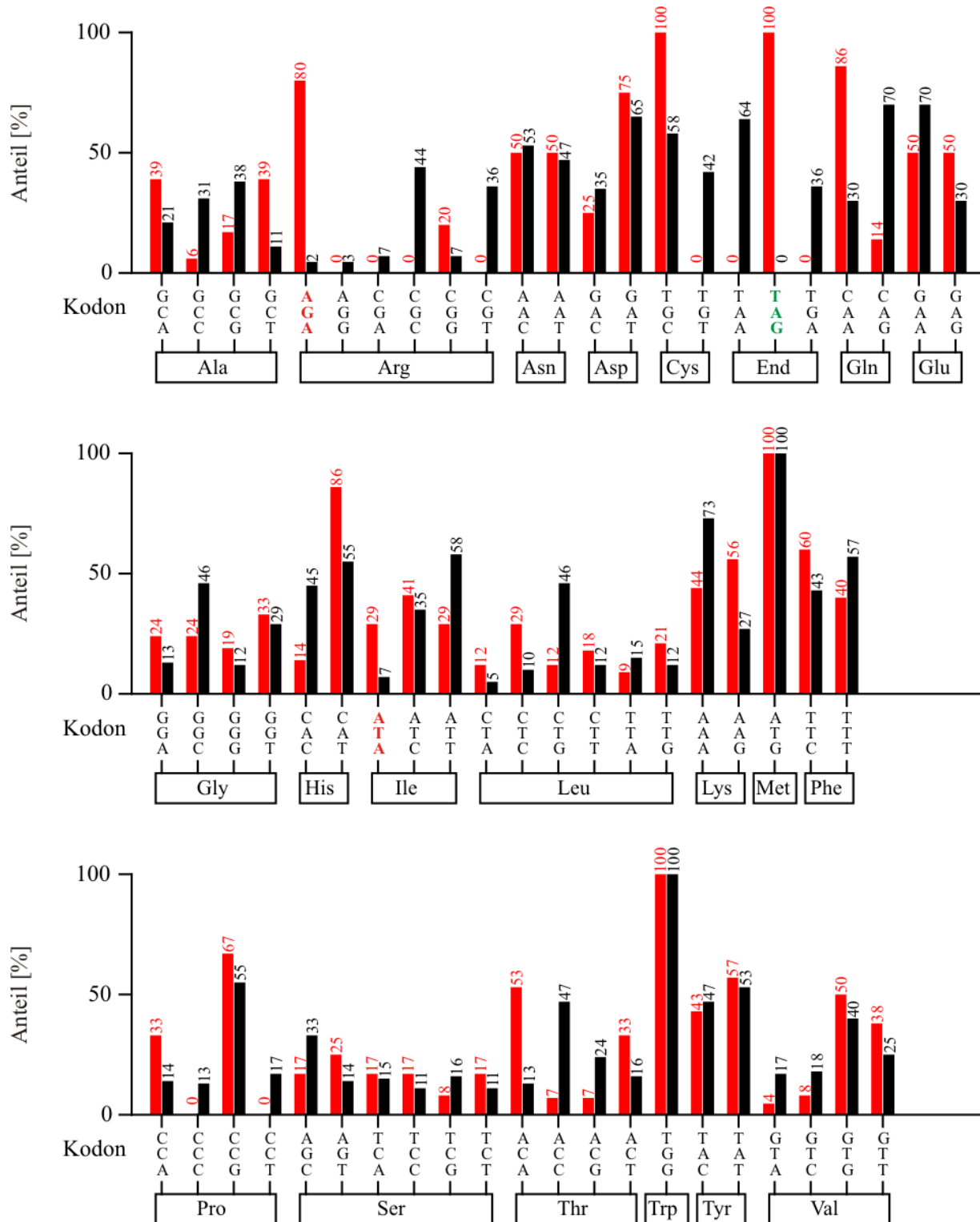


Abbildung 11.2: Vergleichsanalysen des Kodongebrauchs zwischen dem Expressionssystem und *Arabidopsis thaliana* für den B-Paralog.

Der Kodonverbrauch von *Arabidopsis thaliana* ist in Rot dargestellt, der des Expressionssystem *E. coli* in Schwarz. Rot-markierte Basentriplets könnten die heterologe Produktion in *E. coli* vermindern. Das Grün-markierte Basentriplet ist im Protein mit Affinitätsanhängseln nicht vorhanden. Als STOP-Kodon nach dem Affinitätsanhängsel wird das Basentriplet TAA verwendet.

11.4 Zeitabhängige Absorptionsänderung zur Bestimmung der Umsatzrate von Ascorbat

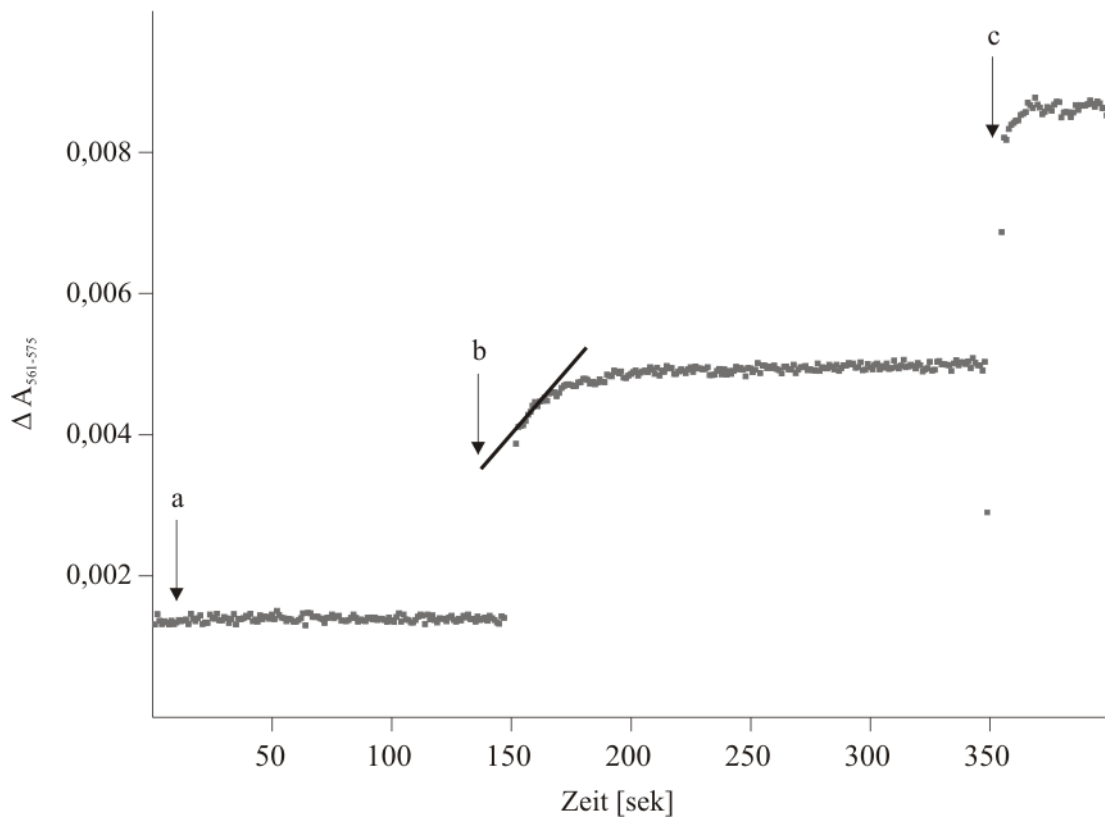


Abbildung 11.3: Zeitabhängige Absorptionsänderung ($\Delta A_{561-575}$) zur Bestimmung der Ascorbat-abhängigen-Aktivität U/mg am Beispiel des B-Paralogs.

Aufgenommen wurde die zeitabhängige Absorptionsänderung bei 561 nm und 575 nm. Zunächst wurde bis zum Erhalten einer stabilen Basislinie das Protein inkubiert (a). Nach Zugabe von 5 μM Ascorbat konnte ein Absorptionsanstieg ($\Delta A_{561-575}$) gemessen werden. Die initiale Steigung (markiert durch schwarze Linie) und die direkte Konzentrationsbestimmung (Liu et al., 2005) durch die Zugabe von Na-Dithionit (c) wurde für die Berechnung der spezifischen Aktivität verwendet.

11.5 Zeitabhängige Absorptionsänderung zur Bestimmung der Umsetzungsrate von Eisenchelaten

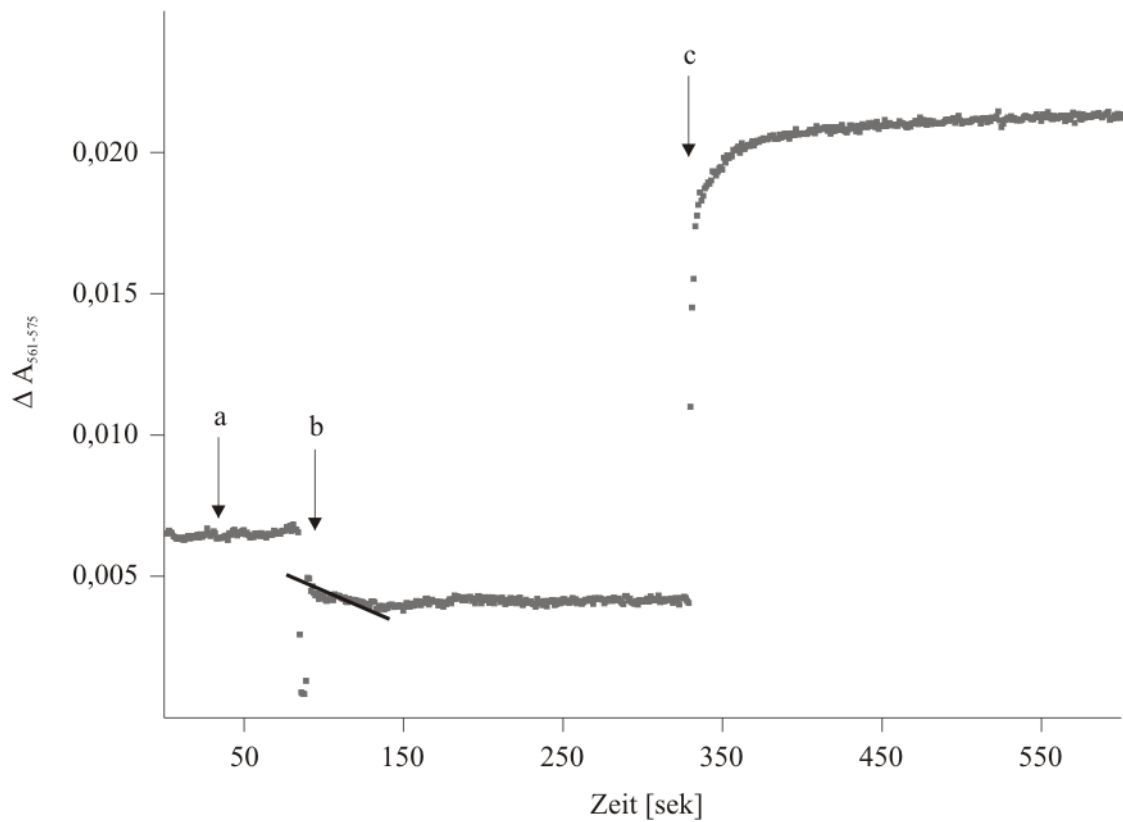


Abbildung 11.4: Zeitabhängige Absorptionsänderung $\Delta(A_{561-575})$ zur Bestimmung der Eisenchelatabhängigen-Aktivität U/mg am Beispiel des DEPC-modifizierten A-Paralogs.

Aufgenommen wurde die zeitabhängige Absorptionsänderung bei 561 nm und 575 nm. Zunächst wurde bis zum Erhalten einer stabilen Basislinie das Protein inkubiert (a). Nach Zugabe von $2 \mu\text{M Fe}^{3+}$ -EDTA konnte ein Absorptionsabnahme ($\Delta A_{561-575}$) gemessen werden. Die initiale negative Steigung (markiert durch schwarze Linie) und die direkte Konzentrationsbestimmung (Liu et al., 2005) durch die Zugabe von Na-Dithionit (c) wurde für die Berechnung der spezifischen Aktivität verwendet.

11.7 Berechnung der E_M -Werte

Formel 11.1: Nernst-Gleichung zur Berechnung der E_M -Werte.

$$Y = \frac{A}{1 + e^{\frac{z \cdot f}{R \cdot T}(E - E_{Häm1})}} + \frac{B}{1 + e^{\frac{z \cdot f}{R \cdot T}(E - E_{Häm2})}} + C$$

A: ΔA des Mittelpunkts-Potentials der Häm-Gruppe Häm 1

B: ΔA des Mittelpunkts-Potentials der Häm-Gruppe Häm 2

C: niedrigstes ΔA der Redox titrationen

z: Anzahl, der transportierten Elektronen (1)

$E_{Häm1}$: Mittelpunkts-Potential der Häm-Gruppe: Häm 1

$E_{Häm2}$: Mittelpunkts-Potential der Häm-Gruppe: Häm 2

f: Faradaykonstante 96 485,3415 C Mol⁻¹

R: Gaskonstante 8 3145 J K⁻¹ Mol⁻¹

T: Temperatur in Kelvin 278 (5 °C)

Y: ΔA - Werte zu allen Messschritten

E: Messschritte

11.8 Reduziert zu oxidiert Titrations zur Bestimmung der E_M -Werte

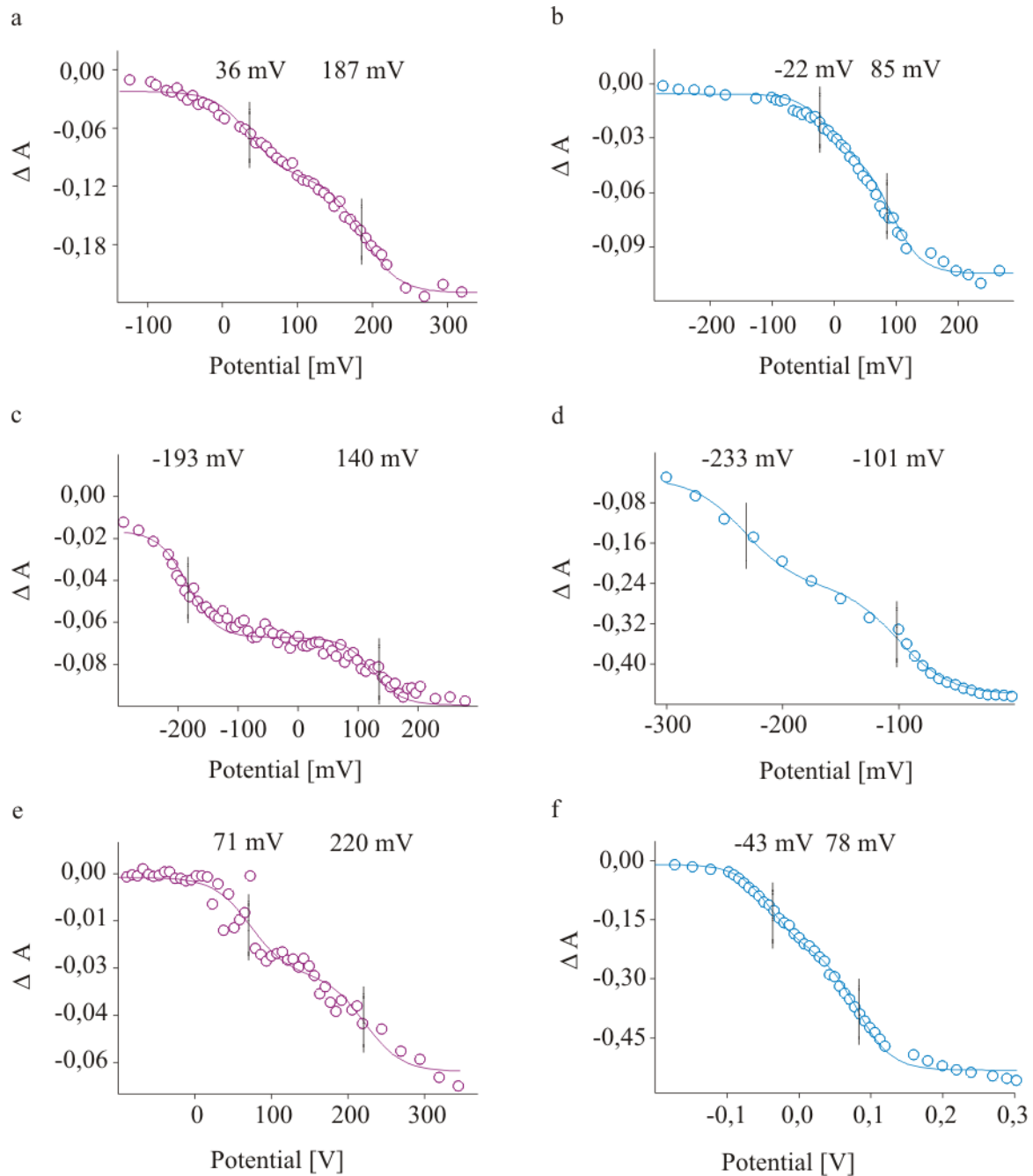


Abbildung 11.5: Redoxitrationen des A- und B-Paralogs.

Die experimentellen Datenpunkte sind als offene Kreise und die angepasste Nernst-Gleichung (siehe Anhang 11.7) ist als Linie dargestellt. a) Die bestimmten E_M -Werte des A-Paralog betragen 36 mV (\pm 4 mV) für das Häm b_L und 187 mV (\pm 2 mV) für das Häm b_H . Der Korrelationskoeffizient r ergab 0,9917. b) Der B-Paralog besaß -22 mV (\pm 6 mV) (Häm b_L) und 85 mV (\pm 3 mV) (Häm b_H). Der Korrelationskoeffizient r ergab 0,9940. c) Der DEPC-modifizierte A-Paralog waren -193 mV (\pm 5 mV) (Häm b_L) und 140 mV (\pm 4 mV) (Häm b_H). Der Korrelationskoeffizient r ergab 0,9614. d) Die bestimmten E_M -Werte des DEPC-modifizierten B-Paralogs betragen -233 mV (\pm 6 mV) für das Häm b_L und -101 mV (\pm 3mV) für das Häm b_H . Der Korrelationskoeffizient r ergab 0,9958. e) Der DEPC und Ascorbat inkubierte A-Paralog besaß -71 mV (\pm 6 mV) (Häm b_L) und 220 mV (\pm 8 mV) (Häm b_H). Der Korrelationskoeffizient r ergab 0,9654. f) Der Wert des Häms b_L ergab -43 mV (\pm 3 mV) und der des Häms b_H 124 mV (\pm 8 mV) für den DEPC und Ascorbat inkubierten B-Paralog. Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,9828.

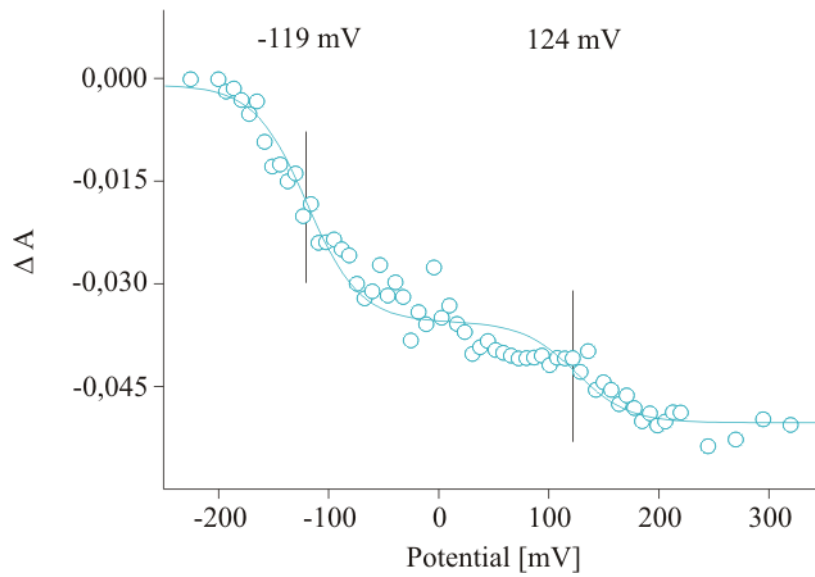


Abbildung 11.6: Redox titration der B-Paralog-Variante B-K81E.

Die experimentellen Datenpunkte sind als offene Kreise und die angepasste Nernst-Gleichung (siehe Anhang 11.7) ist als Linie dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,97228. Der Wert des Häms b_L ergab -119 mV (+/- 4 mV) und der des Häms b_H 124 mV (+/- 8 mV).

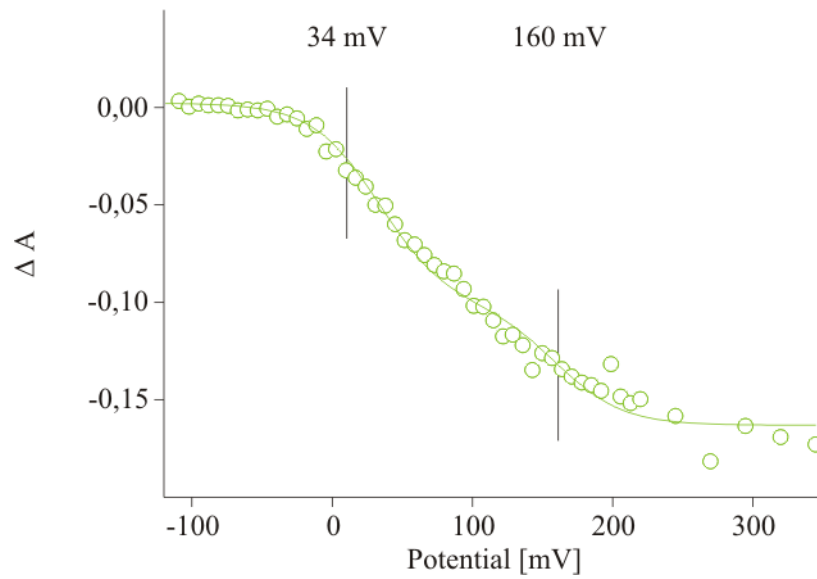


Abbildung 11.7: Redox titration der B-Paralog-Variante B-H46M.

Die experimentellen Datenpunkte sind als offene Kreise und die angepasste Nernst-Gleichung (siehe Anhang 11.7) ist als Linie dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,99087. Der Wert des Häms b_L ergab 34 mV ($\pm 3 \text{ mV}$) und der des Häms b_H 160 mV ($\pm 6 \text{ mV}$).

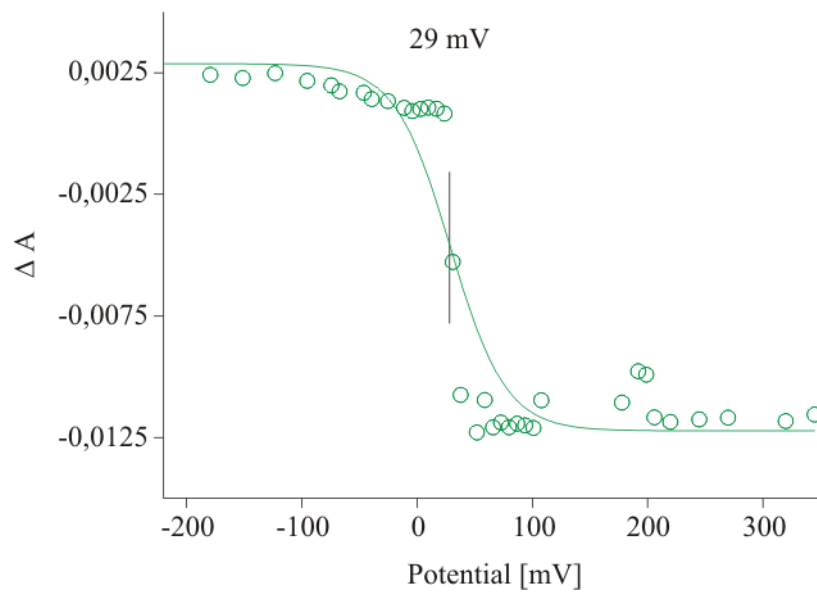


Abbildung 11.8: Redox titration der B-Paralog-Variante B-H157Q.

Die experimentellen Datenpunkte sind als offene Kreise und die angepasste Nernst-Gleichung (siehe Anhang 11.7) ist als Linie dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,88463. Der Wert des Häms b ergab 29 mV ($\pm 7 \text{ mV}$).

11.9 Auswertung der analytischen Größenausschlusschromatographie durch SDS-PAGE

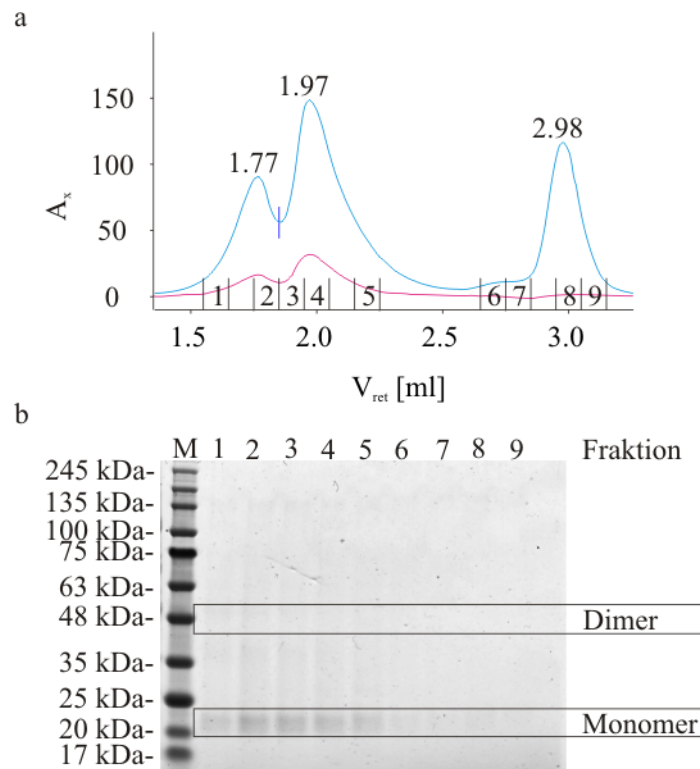


Abbildung 11.9: Auswertung der analytischen Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) des A-Paralog in 0,01 % β -LM.

a. Chromatogramm: Fraktionen sind mit Nummern von 1 bis 9 markiert. Die Absorption (A_x) bei 280 nm ist in blau und bei 561 nm in Pink dargestellt. V_{ret} : Elutionsvolumen.

b. Analyse der Fraktionen (1 bis 9) durch SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 9 μ l je Fraktion.

Wegen des hohen Kompensationsvolumens der Chromatographie-station fand eine klare Trennung der verschiedenen Absorptionsmaxima nicht statt.

11.10 CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Schmelzpunktes T_M

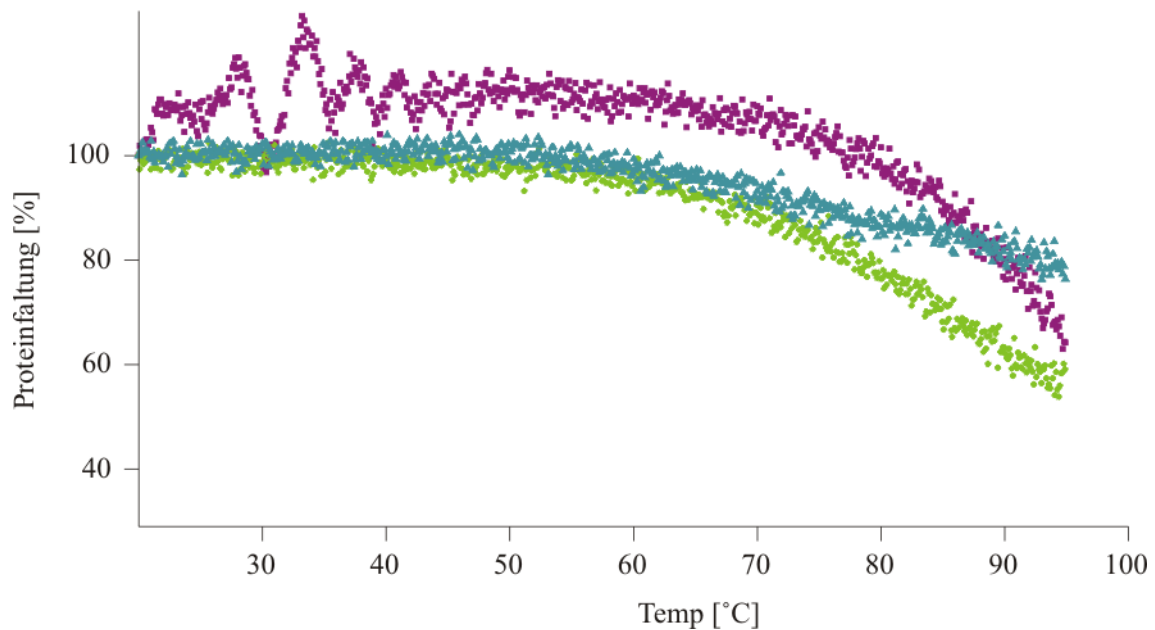


Abbildung 11.10: Bestimmung der Schmelzpunkte des A-Paralogs (Lila), des DEPC-modifizierten A-Paralogs (Hellgrün) und des DEPC und Ascorbat-modifizierten A-Paralogs.

Die Messung wurden bei einer Wellenlänge von 220 nm durchgeführt mit 0,2 °C Temperaturschritten.

Die Messungen konnten nicht ausgewertet werden, da keine vollständige Protein-Entfaltung vorlag.

11.11 Auswertung der CD-Spektren mit der Provencher & Glockner-Methode und K2D-Methode

Tabelle 11.3: Zusammenstellung der ermittelten Sekundärstrukturelemente durch die Provencher & Glockner und K2D-Methode.

A-Paralog		Provencher & Glockner-Methode							K2D-Methode			
inkubiert	Konz [mg/ml]	Helix1	Helix2	Fb1	Fb2	Turns	RC	NRMSD	Helix	Faltblatt	RC	NRMSD
	0,43	24	20	7	2	12	35	0,33	45	17	37	0,072
		44		9								
DEPC	0,3	23	22	10	2	15	28	0,213	55	13	33	0,042
		45		12								
DEPC + Asc	0,23	25	24	8	1	15	28	0,159	59	7	34	0,14
		49		9								

Helix1: reguläre Helix; Helix2: ungeordnete Helix; Fb1 (Faltblatt 1): reguläres Faltblatt, Fb2 (Faltblatt 2): ungeordnetes Faltblatt; Turns: Drehung; RC: Random Coil; NRMSD: der Fitparameter des rekonstruierten Spektrum zum gemessenen Spektrum -ein geringer Wert besagt, dass beide Spektren sehr gut übereinstimmen. Der NRMSD-Wert wird nach $\sum \left[\frac{(\theta_{exp} - \theta_{cal})^2}{\theta_{exp}^2} \right]^{1/2}$ über aller Wellenlängen berechnet (Sreerama et al., 1999, Wallace et al., 2003); Konz: verwendete Konzentration für die CD-Messungen.

11.12 Röntgenbeugungsaufnahme

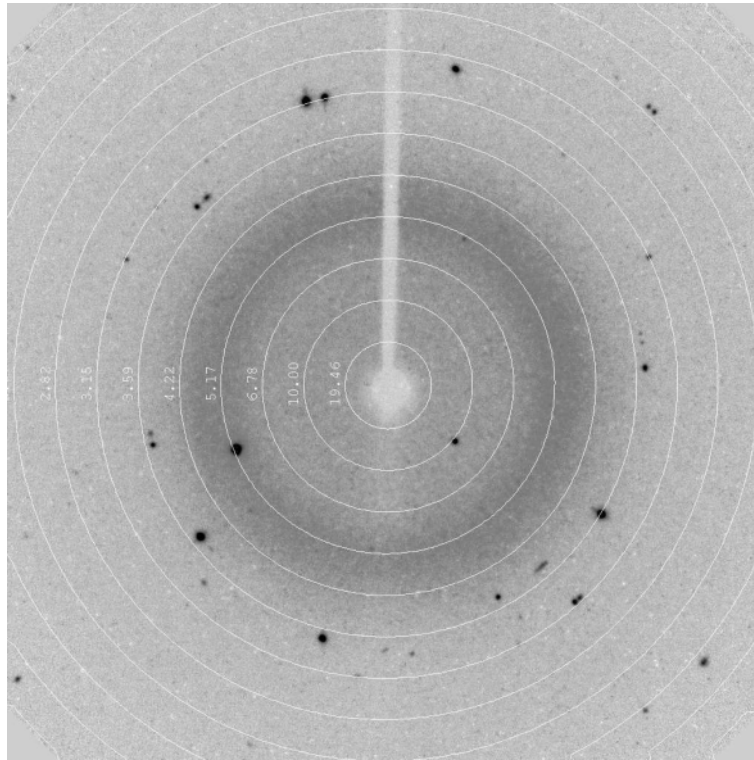
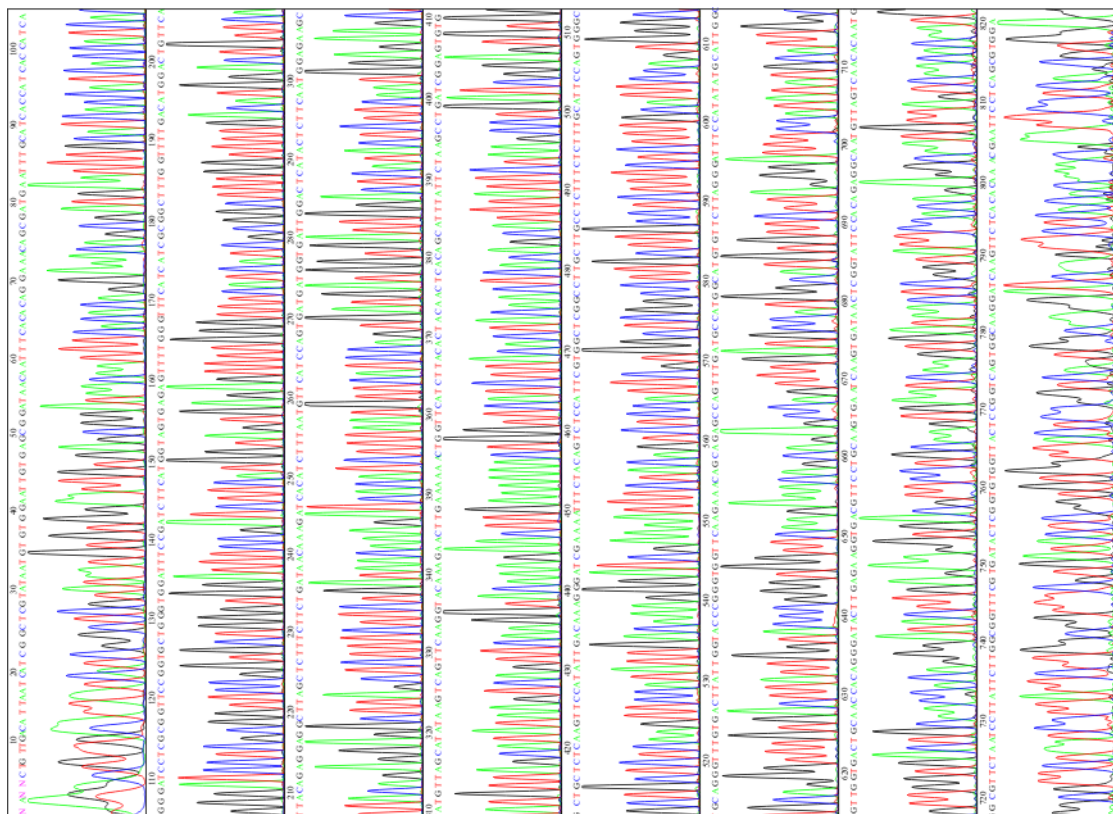
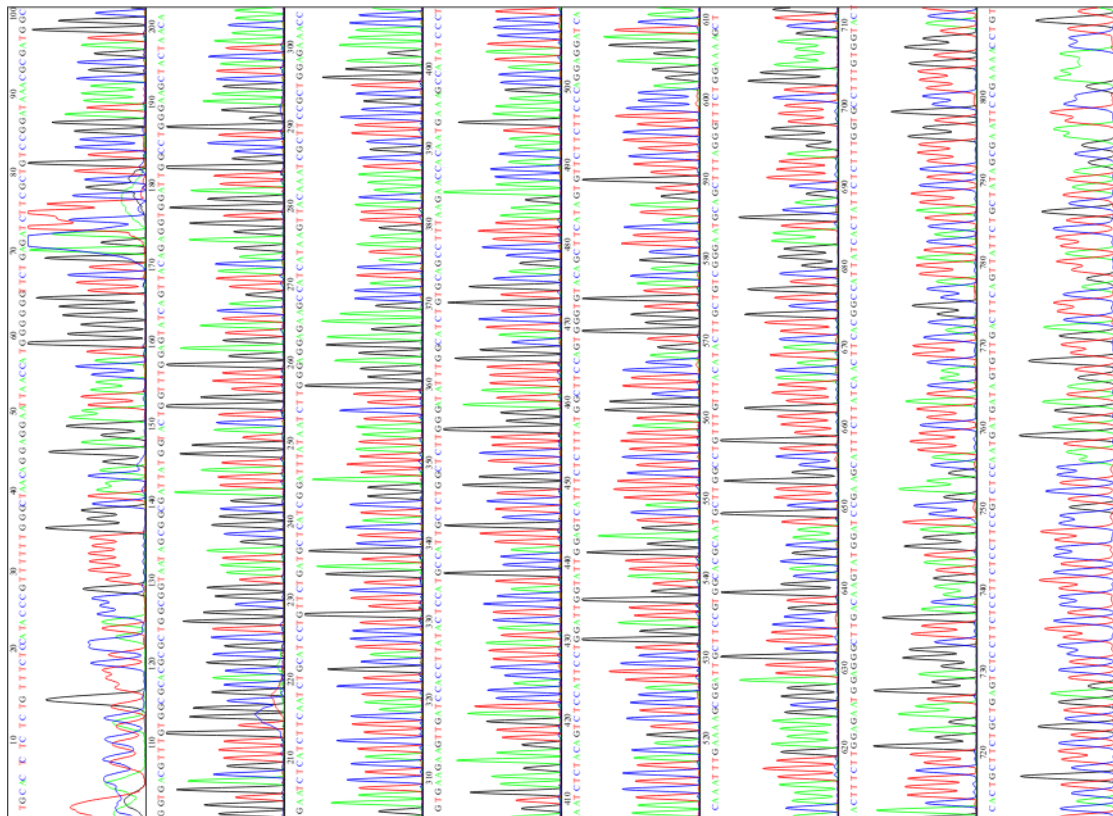


Abbildung 11.11: Röntgenbeugungsaufnahme eines Salzkristall.

Der Kristall wurde während der Aufnahme um 5° gedreht. Die Reflexionsanordnung weist auf einen Salzkristall hin.

11.13 DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide



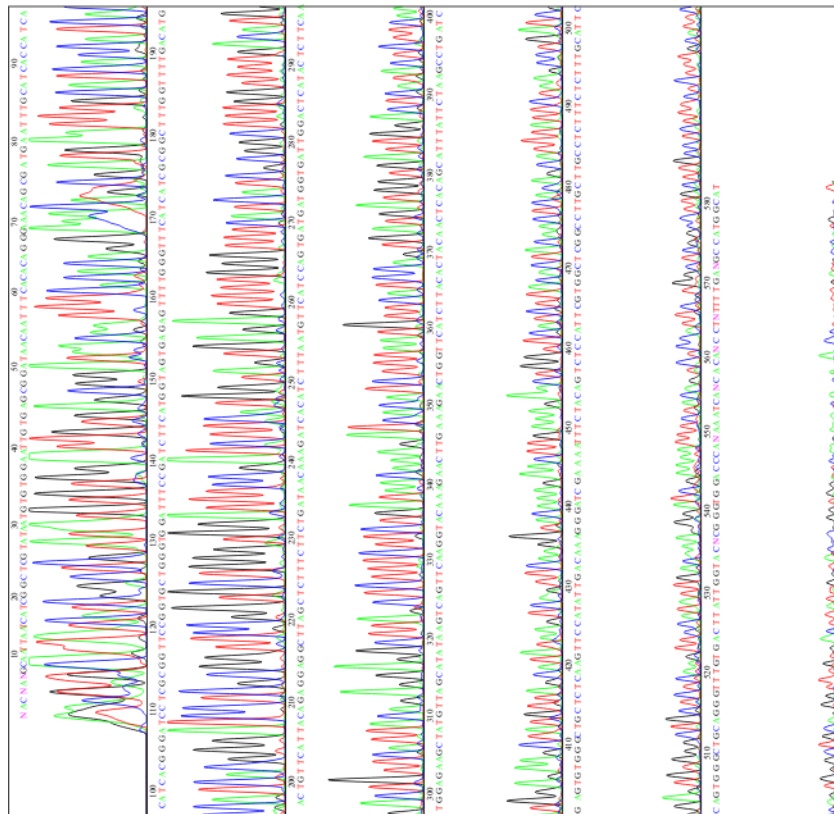


Abbildung 11.14: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B-K81E mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.

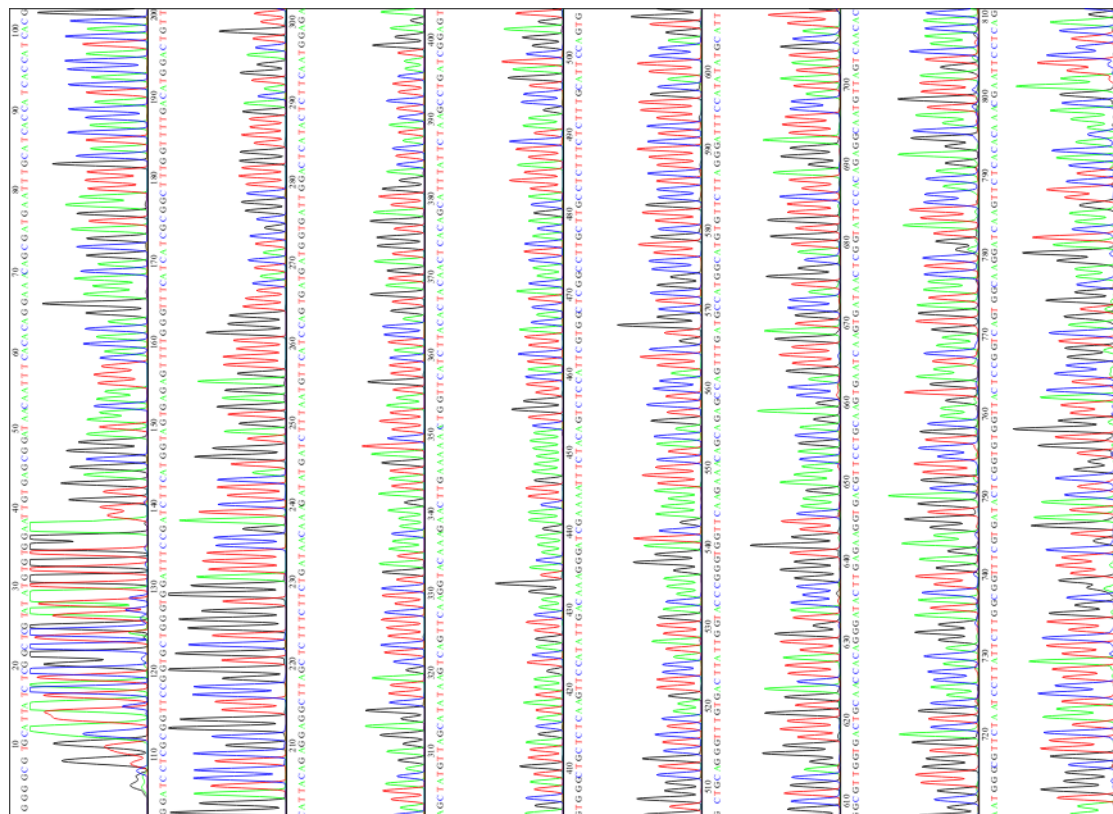


Abbildung 11.15: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B-H46M mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.

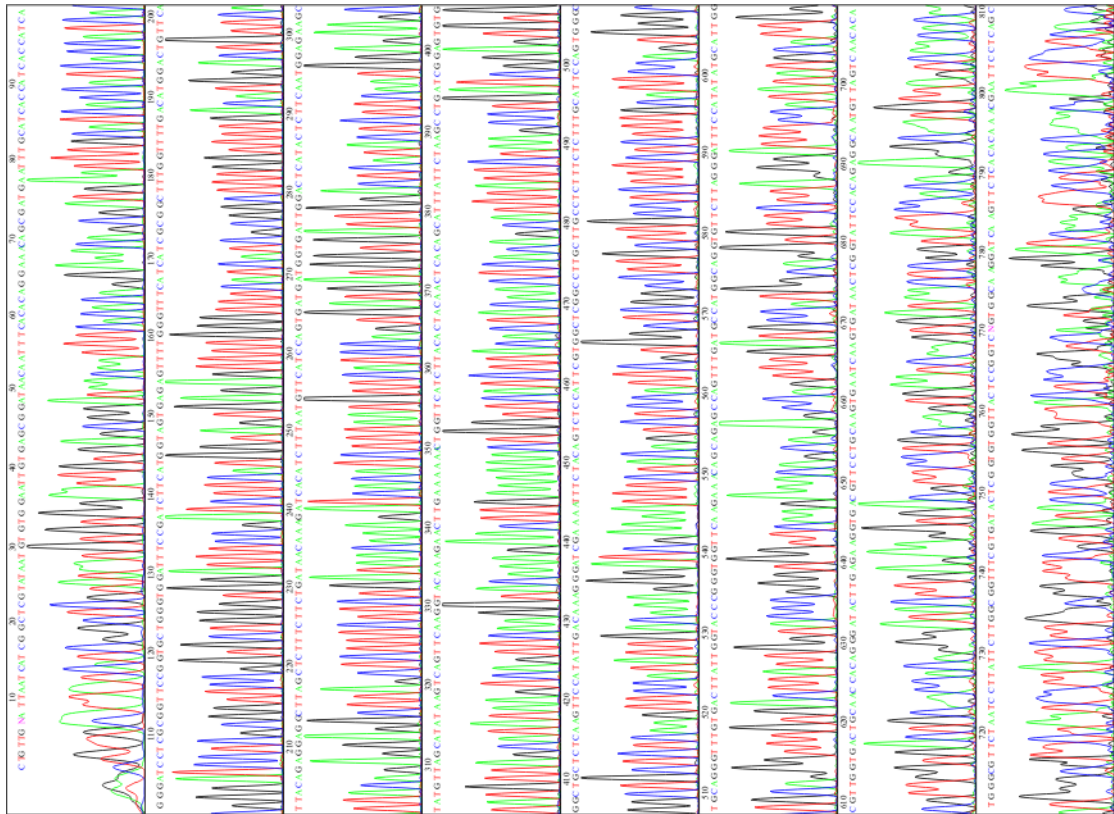


Abbildung 11.16: Sequenzierung des Plasmids pTTQ18C-B-H157Q mit dem Oligonukleotid pTTQ18-2SeqFor.