

Diplomarbeit  
zur Erlangung des akademischen Titels  
Diplom-Ingenieurin

**CYTOCHROM C OXIDASEN  
IN DIAZOTROPHEN FILAMENTÖSEN  
CYANOBAKTERIEN**

Durchgeführt am Department für Chemie, Abteilung für Biochemie  
Metalloprotein Forschungsgruppe  
Universität für Bodenkultur, Wien

Vorgelegt von

**Doris Gusenbauer**

Wien, Dezember 2008

---

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cyanobakterien</b>	1
<b>1.2 Atmung</b>	4
1.2.1 Terminale Häm-Kupfer Oxidasen in Cyanobakterien:	5
1.2.2 <i>aa</i> <sub>3</sub> -Typ Cytochrom <i>c</i> Oxidase	6
<b>1.3 Stickstofffixierung</b>	15
<b>1.4 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 und Heterocysten</b>	17
1.4.1 Heterocystenentwicklung	19
<b>2. ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Klonierung Cox1 Untereinheit II Lösliche Domäne (Sulld2 Cox1)</b>	22
3.1.1 Amplifizierung des Sulld2 Cox1 Gens mittels PCR	22
3.1.2 Reinigung der DNA mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	25
3.1.3 Präparation des Vektors pET-3a	26
3.1.4 Restriktionsverdau des Vektors und der PCR-Produkte	29
3.1.5 Ligation	31
3.1.6 Herstellung elektrokompetenter BL21(DE3)pLysS Zellen	33
3.1.7 Elektroporation des Vektors in BL21(DE3)pLysS Zellen	35
3.1.8 Überprüfung der Transformation	37
3.1.9 Herstellen einer Kryokultur	42
3.1.10 Sequenzierung	43
<b>3.2 Klonierung Cox2</b>	44
3.2.1 Amplifizierung des Sulld7 Cox2	44
3.2.2 Präparation des Vektors pET3a	46
3.2.3 Restriktionsverdau des Vektors und des PCR-Produkts	46
3.2.4 Ligation	47
3.2.5 Herstellung elektrokompetenter BL21(DE3)pLysS Zellen	47
3.2.6 Elektroporation in BL21(DE3)pLysS Zellen	48

---

---

3.2.7 Überprüfung der Transformation	49
3.2.8 Herstellen einer Kryokultur	50
3.2.9 Sequenzierung	50
<b>3.3 Heterologe Expression von Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1</b>	<b>50</b>
3.3.1 Methodik	50
3.3.2 Durchführung	51
3.3.3 Geräte und Reagenzien	51
<b>3.4 Proteinreinigung Sullj3 Cox2</b>	<b>53</b>
3.4.1 Zellaufschluss Sullj3 Cox2	53
3.4.2 Chromatographische Reinigung von Sullj3 Cox2	54
3.4.3 Aufkonzentration der Proteinlösungen mit Amicon Centripreps	65
3.4.4 SDS-PAGE	66
<b>3.5 Proteinreinigung Sulld2 Cox1</b>	<b>71</b>
3.5.1 Zellaufschluss	71
3.5.2 Chromatographische Reinigung von Sull Cox1d2	71
<b>3.6 Spektroskopische Messungen</b>	<b>75</b>
3.6.1 Steady-state Messungen	75
3.6.2 Pre-steady State Messungen	81
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Klonierung Cox1 Subunit II lösliche Domäne (Sulld2 Cox1)</b>	<b>87</b>
4.1.1 Amplifizierung des Sulld2 Cox1 Gens mittels PCR	87
4.1.2 Präparation des Vektors pET3a	88
4.1.3 Restriktionsverdau des Vektors sowie des PCR-Produkts und Ligation	89
4.1.5 Elektroporation in BL21(D3)pLysS Zellen	90
4.1.6 Überprüfung der Transformation	90
<b>4.2 Klonierung Cox2 Subunit II lösliche Domäne (Sulld7 Cox2)</b>	<b>94</b>
4.2.1 Amplifizierung des Sulld7 Cox2 Gens mittels PCR	95
4.2.2 Präparation des Vektors pET3a	96
4.2.3 Restriktionsverdau des Vektors sowie des PCR-Produkts und Ligation	96

---

---

4.2.4 Elektroporation in BL21(DE3)pLysS Zellen	97
4.2.5 Überprüfung der Transformation	98
<b>4.3 Proteinreinigung Sullj3 Cox2 und photometrische</b>	<b>101</b>
<b>Charakterisierung</b>	<b>101</b>
4.3.1 Proteinreinigung	101
4.3.2 Photometrische Charakterisierung Sullj3 Cox2	105
<b>4.4 Proteinreinigung Sulld2 Cox1</b>	<b>110</b>
4.4.1 Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF	110
4.4.2 Kupfer Rekonstitution von Sulld2 Cox1 und Bestimmung der Proteinkonzentration	111
<b>4.5 Messungen des Elektronentransfers (ET)</b>	<b>115</b>
4.5.1 Steady-state Messungen	115
4.5.2 Pre-steady-state Messungen	118
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>123</b>
<b>5.1 Klonierung von Sulld2 Cox1 und Sulld7 Cox2</b>	<b>123</b>
<b>5.2 Zellaufschluss und Reinigung von Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1</b>	<b>124</b>
<b>5.3 Rekonstitution von Cu<sub>A</sub> aus Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1</b>	<b>125</b>
<b>5.4 Messungen zur Überprüfung der Redoxaktivität von Sullj3 Cox2</b>	<b>126</b>
<b>5.5 Stopped-Flow Messungen (Vorläufige Ergebnisse)</b>	<b>127</b>
<b>6. REFERENZEN</b>	<b>129</b>

---

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Christian Obinger für die hervorragende Betreuung bedanken, ebenso wie für seine wissenschaftlichen Ratschläge und das angenehme Arbeitsklima während der Durchführung meiner Diplomarbeit. Besonderer Dank gebührt auch Margit Bernroither, die mir eine große Stütze war, sowohl in fachlicher als auch in freundschaftlicher Hinsicht.

Herzlichen Dank an alle weiteren Mitglieder der Metalloprotein Forschungsgruppe, Srijib Banerjee, Paul Furtmüller, Bernadette Ganster, Christa Jakopitsch, Chantal Lucini, Martin Pairer, Judith Schachinger, Manfred Schwanninger, Johanna Stampler, Jutta Vlasits und Marcel Zamocky für die wertvolle Ratschläge und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meinen Eltern Josef und Marianne Gusenbauer, für die moralische und finanzielle Unterstützung und Förderung, sowie für das grenzenlose Vertrauen, das sie mir entgegengebracht haben. Danke, dass Ihr mir alles ermöglicht habt, vorbehaltlos hinter mir gestanden seid und immer an mich geglaubt habt.

Weiters möchte ich mich bei meiner Schwester Vera Gusenbauer und all meinen FreundInnen bedanken, allen voran Ulrike Kaindl, Ivana Pilic, Petra Sussner, Eveline und Michaela Wahlmüller, sowie Romana Zehetner, mit denen ich gemeinsame Wege im Rahmen meiner Studienzeit beschritten habe, deren FreundInnenschaft mir immer wieder Energie und Motivation gegeben hat.

## Abstract

Cyanobacteria are capable of photosynthesis and respiration. *Nostoc* sp. PCC 7120 is a filamentous cyanobacterium which can also fix molecular nitrogen. This process of nitrogen fixation takes place in specially differentiated cells, called heterocysts. They develop by cell differentiation when there is a shortage of bound nitrogen in the growth medium. The aim of this work was to characterise the structure and function of cyanobacterial cytochrome *c* oxidase (Cox) which is the terminal enzyme in respiratory electron transport. *Nostoc* sp. PCC 7120 possesses two genes, *coxBAC1* and *coxBAC2* which carry the genetic information of Cox1 and Cox2. Cox1 is expressed in vegetative cells and Cox2 in heterocysts. Cyanobacterial Coxs consist of three subunits and catalyse the reduction of oxygen to water. Additionally, they serve as proton pumps generating an electrochemical gradient which is used for ATP synthesis.

The copper containing Cu<sub>A</sub>-domain is located in subunit II. It functions as entry site of electrons which are necessary for the reduction of oxygen to water. The gene segments encoding for subunits II of *coxB1* and *coxB2* containing a Cu<sub>A</sub> domain, respectively, were cloned into *E. coli* cells. The heterologous expression of the truncated subunits II of Cox1 (Sulld2 Cox1) and Cox2 (Sullj3 Cox2) in *E. coli* has been performed successfully, as well as their chromatographic purification. Furthermore, methods were established to perform (partial) copper reconstitution of the domains. Electron transfer studies of Sullj3 Cox2 were performed with one of its potential electron donors, cytochrome *c*<sub>6</sub> (cyt *c*<sub>6</sub>) and with horse heart cytochrome *c* (hh cyt *c*). Electron transfer between Sullj3 Cox2 and cyt *c*<sub>6</sub> could be observed. The transfer of electrons from hh cyt *c* to Sullj3 Cox2 could also be shown.

## Zusammenfassung

Cyanobakterien besitzen die Fähigkeit sowohl Photosynthese, als auch Atmung zu betreiben. *Nostoc* sp. PCC 7120 ist ein filamentöses Cyanobakterium, welches zusätzlich molekularen Stickstoff fixieren kann. Die Stickstofffixierung findet in speziell differenzierten Zellen, den Heterocysten statt, welche sich unter Mangel gebundenen Stickstoffs im Medium entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Cytochrom *c* Oxidasen (Cox) aus *Nostoc* sp. PCC 7120, Schlüsselenzyme der Atmung, näher charakterisiert werden. Durch die Erforschung der Struktur und der Funktionsweise der Enzyme sollte auch näherer Aufschluss über die noch nicht vollständig geklärte physiologische Rolle der cyanobakteriellen Atmung gewonnen werden. *Nostoc* sp. PCC 7120 besitzt zwei Gene *coxBAC1* und *coxBAC2*, welche für Cox1 und Cox2 codieren. Cox1 wird in vegetativen Zellen, Cox2 in Heterocysten exprimiert. Coxs aus *Nostoc* sp. PCC 7120 bestehen aus drei Untereinheiten und katalysieren die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Sie fungieren als Protonenpumpen, wodurch ein elektrochemischer Gradient entsteht, welcher zur ATP-Synthese genutzt wird.

Die Cu<sub>A</sub>-Domäne befindet sich in der Untereinheit II. Sie fungiert als Eintrittsstelle der für die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser notwendigen Elektronen. Gensegmente der beide Gene *coxB1* und *coxB 2*, welche jeweils ein Cu<sub>A</sub>-Zentrum enthalten, wurden in *E. coli* Zellen kloniert. Es konnten Proteinsegmente der Untereinheit II von Cox1 (Sulld2 Cox1) und von Cox2 (Sullj3 Cox2) erfolgreich in *E. coli* exprimiert und chromatographisch gereinigt werden. Weiters wurden Verfahren, die zur teilweisen Besetzung des Cu<sub>A</sub>-Zentrums mit Kupfer führten, entwickelt. Durchgeführte Elektronentransferstudien zwischen Sullj3 Cox2 und einem seiner potentiellen Elektronendonoren Cytochrom *c*<sub>6</sub> zeigten, dass ein Elektronentransfer zwischen den beiden Molekülen stattfindet. Ebenso wurde der Elektronenaustausch zwischen Sullj3 Cox2 und Pferdeherz Cytochrom *c* beobachtet.

# 1. Einleitung

## 1.1 Cyanobakterien

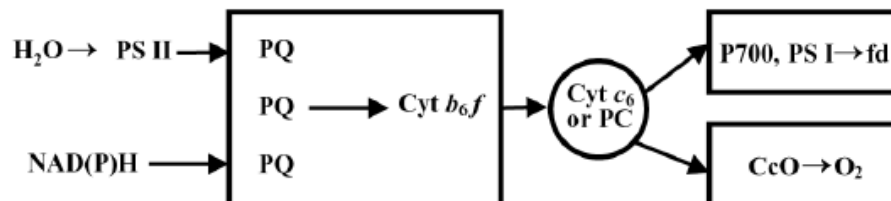
Cyanobakterien gelten sowohl in evolutionärer, bioenergetischer als auch in ökologischer Hinsicht als Vorzeigemikroorganismen. Sie haben es im Laufe der Evolution geschafft, sowohl eine photosynthetische Elektronentransportkette (PET) als auch eine respiratorische Elektronentransportkette (RET) innerhalb einer Zelle zu entwickeln [1]. Sie waren die ersten und sind bis heute die einzigen oxygenen, phototrophen Prokaryonten [2, 3]. Sie verwenden Licht als ubiquitäre Energiequelle, Wasser als ubiquitäre Elektronenquelle und CO<sub>2</sub>, gemeinsam mit einigen Mineralstoffen, als ubiquitäre Kohlenstoffquelle [4]. Da viele Cyanobakterien zusätzlich noch mit der Fähigkeit zur Stickstofffixierung ausgestattet sind, werden sie des Öfteren als das bioenergetische „Nonplus-ultra“ der Lebewesen bezeichnet [6-7].

Da Cyanobakterien als erste Organismen O<sub>2</sub> produzierten, setzten sie vor 2,4 - 3,2 Milliarden Jahren den Grundstein für eine sauerstoffreiche Biosphäre und Atmosphäre. Sie waren wahrscheinlich auch unter den Ersten, die Sauerstoff genutzt haben, womit auch die Entwicklung von zum Beispiel, detoxifizierenden Enzymsystemen für teilweise reduzierende und reaktive Sauerstoffverbindungen notwendig wurde, um die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen. So könnte durch schrittweise Weiterentwicklung, die bereits existierende PET in eine respiratorische Elektronentransportkette umgewandelt worden sein (Konversionshypothese) [8].

In Cyanobakterien laufen die oxidative Phosphorylierung und die Photophosphorylierung innerhalb einer prokaryotischen Zelle ab. Sie produzieren Energie vorwiegend über Photosynthese, da die meisten Cyanobakterien obligat phototrophe Organismen sind. Bei Abwesenheit von Licht und unter bestimmten Stresssituationen sind sie jedoch vollkommen auf respiratorische Atmung angewiesen, um genügend Energie zum Überleben zu gewinnen [31].



In Cyanobakterien können zwei verschiedene bioenergetisch aktive Membransysteme unterschieden werden, die Thylakoid oder intracytoplasmatische Membran (ICM) und die cytoplasmatische Membran (CM). Die ICM enthält Komponenten sowohl der photosynthetischen als auch der respiratorischen Elektronentransportkette, während sich in der CM nur Komponenten der respiratorischen Atmungskette befinden. Das bedeutet, dass Komponenten von RET und PET nicht physisch voneinander getrennt sind. In der ICM teilen sich PET und RET einige Proteine wie Cytochrom  $c_6$  (Cyt  $c_6$ ), Plastocyanin (PC) und den Cytochrom  $b_6f$  Komplex. Je nach äußeren Einflüssen werden jedoch die beiden Systeme inhibiert bzw. aktiviert. So wird bei Anwesenheit von Licht die respiratorische Atmung unterbunden [4, 9 - 11].



**Abb. 1.1:** Zeigt das bifunktionelle RET-PET System in der ICM von Cyanobakterien.

Entweder Cytochrom  $c_6$  (Cyt  $c_6$ ) oder Plastocyanin (PC) sind unumgängliche Bestandteile sowohl für die Photosynthese als auch für die respiratorische Atmung.

CcO: Cytochrom *c* Oxidase; PSI Photosystem I; PSII: Photosystem II; fd: Ferredoxin; PQ: Plastoquinol.

Für Cyanobakterien ist die respiratorische Atmung immer dann essentiell, wenn die äußeren Bedingungen keine Photosynthese zulassen. Dies ist nicht nur bei Dunkelheit der Fall, sondern auch unter Stresssituationen. Während bei erhöhten Salzkonzentrationen und bei Stickstofffixierung das Photosystem II (PSII) inhibiert wird, kommt es zu einem wesentlichen Anstieg der Konzentration und der Aktivität von respiratorischen Komponenten in der CM und/oder der PSII-inhibierten ICM. Dabei kann die respiratorische Aktivität bis auf das Zehnfache erhöht werden, um fehlendes ATP zur Verfügung zu stellen und so der Zelle zum Überleben zu verhelfen [12].

Der energetische Beitrag, den die CM zum Zellmetabolismus in Cyanobakterien liefert, beträgt etwa nur 10 – 20 %. Daher wurde der wissenschaftliche Fokus lange auf die cyanobakterielle Photosynthese gelegt. Trotzdem wurden große Unterschiede, je nach dem physiologischen Entwicklungszustand der Zellen (Wachstumsphase, Stress etc.) sowie auch zwischen verschiedenen Spezies beobachtet [13, 14].

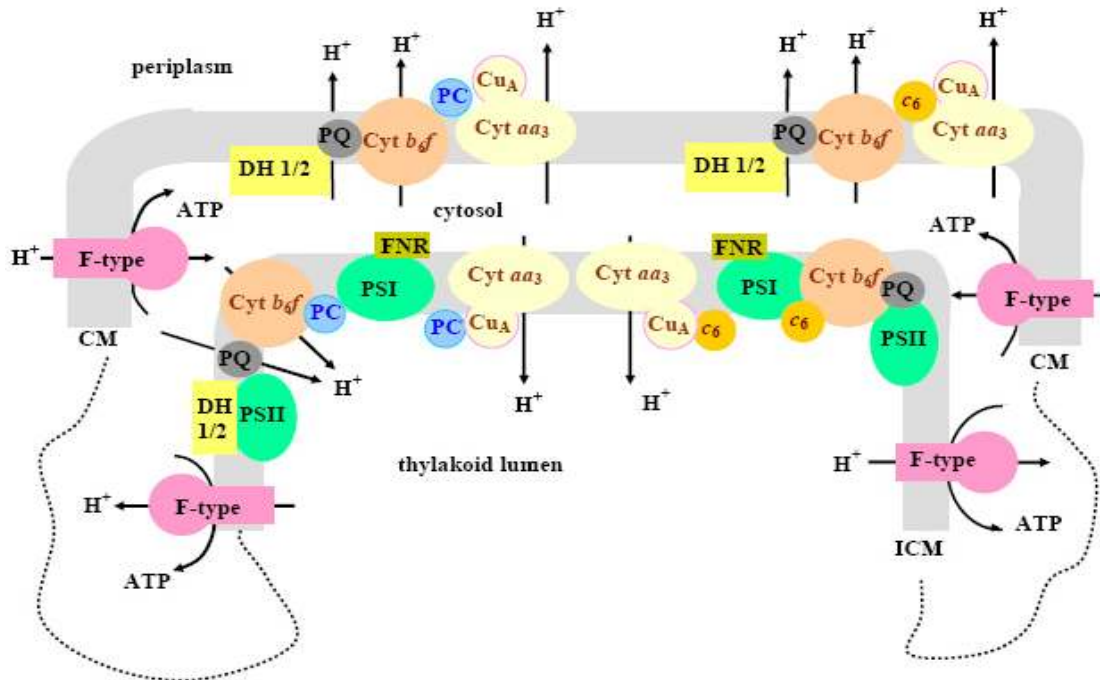
In Pflanzen findet die Photosynthese im Thylakoidmembransystem der Chloroplasten statt. Licht wird genutzt, um Reduktionsäquivalente zu erzeugen: Durch die Absorption von Licht durch Chlorophyll kommt es zur Anregung von Elektronen. Diese Energie wird in ein Reaktionszentrum weitergeleitet, wo es schlussendlich zur lichtinduzierten Ladungstrennung kommt.

Die photosynthetische Elektronentransportkette besteht aus drei integralen Thylakoidmembrankomponenten: Photosystem I (PS I), Photosystem II (PSII) und dem Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex. Die drei Komponenten sind über die mobilen Redoxcarrier Plastocyanin und Plastochinol (QH<sub>2</sub>) verbunden. PS I nützt Licht für die Erzeugung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. PS II dient bei gleichzeitiger Entwicklung von molekularem Sauerstoff als Elektronenüberträger von Wasser auf Chinon.

Über den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex fließen Elektronen von PS II zum PS I, indem es die Elektronenübertragung von Plastochinol zu Plastocyanin katalysiert. Dabei werden Protonen aktiv durch die Thylakoidmembran gepumpt, wodurch ein transmembranaler Protonengradient entsteht. Auch die Photolyse von Wasser durch PS II trägt durch die Freisetzung von Protonen im Lumen zum Aufbau des Protonengradienten bei. Dieser wird, ebenso wie in der oxidativen Phosphorylierung zum Energiegewinn, dem Antrieb der ATP-Synthase, genutzt [15].

Das Prinzip der photosynthetischen Elektronentransportkette von Pflanzen kann prinzipiell auf Cyanobakterien übertragen werden. Es kommen dieselben membranintegrierten Komponenten vor. Diese befinden sich in der ICM [16].

Der einzige Unterschied besteht darin, dass Cyanobakterien entweder Cytochrom  $c_6$  oder Plastocyanin als wasserlöslichen Elektronenüberträger von Cytochrom  $b_6f$  auf Photosystem I verwenden können [17 - 21].



**Abbildung 1.2:** Systematische Abbildung des cyanobakteriellen Membransystems bestehend aus ICM und CM und den Komponenten von PET und RET:

Cu<sub>A</sub>: binukleares Kupfer Zentrum der Untereinheit II der Cytochrom  $c$  Oxidase, Typ- $aa_3$ : Cytochrom  $c$  Oxidase, Cyt  $b_6f$ : Cytochrom  $b_6f$  Komplex,  $c_6$ : Cytochrom  $c_6$ , DH<sub>1/2</sub>: cyanobakterielle NADH Dehydrogenase Typ 1 bzw 2, FNR: Ferredoxin-NADH Reduktase, F-type: F-Typ protonenpumpende ATPase, PC: Plastocyanin, PQ: Plastochinon, PSI und PSII: Photosystem I und II.

## 1.2 Atmung

Das Wissen über die Atmung in Cyanobakterien ist wesentlich geringer als das über die Photosynthese [67].

Der wesentliche Unterschied zwischen Photosynthese und der oxidativen Phosphorylierung besteht in der Quelle der Reduktionsäquivalente. Während diese in der Photosynthese durch Anregung durch Lichtenergie entstehen,

werden sie in der respiratorischen Elektronentransferkette durch Oxidation von organischen Verbindungen gewonnen.

In der Atmungskette der Mitochondrien werden Reduktionsäquivalente der Nahrungsstoffe sukzessive auf molekularen Sauerstoff übertragen. Gleichzeitig werden Protonen aus der mitochondrialen Matrix herausgepumpt. Beim Zurückfließen der Protonen wird über das transmembranale Enzym ATP-Synthase ATP gebildet. Drei transmembranale Enzymkomplexe sind daran beteiligt: Die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase (Komplex I), die Cytochrom c Reduktase (Komplex III) und die  $aa_3$ -Typ Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) [15].

### 1.2.1 Terminale Häm-Kupfer Oxidasen in Cyanobakterien

Terminale Häm-Kupfer Oxidasen spielen eine zentrale Rolle im aeroben RET. Im letzten Schritt der respiratorischen Atmung katalysieren sie die Vier-Elektronen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Diese Reaktion ist gekoppelt mit dem redox-getriebenen transmembranalen Protonentransfer. Der so entstandene Ladungsgradient wird durch die ATP-Synthase zur Energiegewinnung genutzt [22].

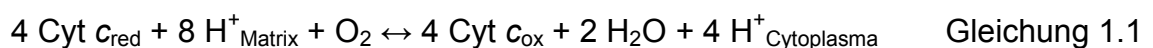
Die meisten terminalen Oxidasen gehören zur Superfamilie der Häm-Kupfer Oxidasen. Diese zeichnen sich durch die Anwesenheit eines Häm-Kupfer binuklearen Reaktionszentrums, bestehend aus  $Cu_B$  Zentrum und high-spin Häm  $a_3$ , aus. Weiters besitzen sie ein low spin Häm  $a$  [23, 31].

Häm-Kupfer Oxidasen können entweder Cytochrome  $c$  [24, 25], Typ-1 (oder blaue) Kupfer Proteine (Plastocyanin) [24, 26, 27] oder Quinole [28] als Elektronendonoren aufweisen, was auch das Kriterium für die Unterscheidung der Häm-Kupfer Oxidasen in zwei Zweige darstellt: Cytochrom  $c$  Oxidasen (Cox,  $aa_3$ -Typ Cytochrom Oxidase) enthalten ein zusätzliches Metallzentrum, das  $Cu_A$ -Zentrum, über welches die Elektronen von PC und Cyt  $c_6$  aufgenommen werden können, und Quinol Oxidasen (Qox,  $bo$ -Typ-Quinol Oxidasen), denen dieses zusätzliche Redoxzentrum fehlt [29 - 31].

Es existiert eine weitere Klasse terminaler Oxidasen, die jedoch nicht zur Superfamilie der Häm-Kupfer Oxidasen gehört: Die *bd*-Quinol Oxidasen. Sie besitzen zwei Häm Gruppen (Häm *b* und *d*), aber kein binukleares Kupfer-Reaktionszentrum, fungieren nicht als Protonenpumpen und weisen auch keine sequentiellen Ähnlichkeiten mit den beiden oben genannten Gruppen auf. Obwohl die *bd*-Quinol-Oxidasen Protonen nicht aktiv pumpen, bauen sie doch einen Protonengradienten auf, da sie für die terminale Reduktion von Sauerstoff zu Wasser ausschließlich Protonen der negativen Seite der Membran verwenden [31, 67].

### 1.2.2 *aa*<sub>3</sub>-Typ Cytochrom *c* Oxidase

Um den Mechanismus der Elektronenübertragung vom Elektronendonator Cytochrom *c*<sub>6</sub> bzw. Plastocyanin auf den Endakzeptor O<sub>2</sub> zu verstehen, müssen die molekularen Strukturen des Enzyms, ihre Elektronentransferwege und ihre Koppelung mit dem Aufbau der Protonengradienten bekannt sein. Die Nettoreaktion, der von der Cytochrom *c* Oxidase katalysierten Reaktion, zeigt Gleichung 1.1.



Die sogenannten skalaren Protonen oder Substratprotonen werden von der Innenseite der Membran aufgenommen und konsumiert, während Cytochrom *c* Elektronen von der Membranaußenseite doniert. Zusätzlich werden die vektoriellen Protonen, eines pro Elektron, aktiv auf die Membranaußenseite gepumpt [32, 33].

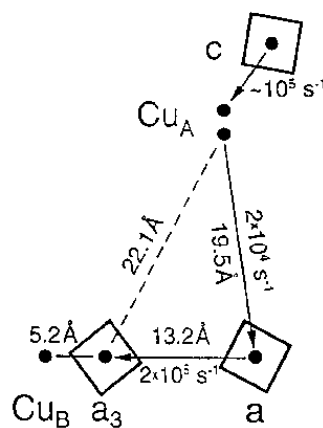
#### 1.2.2.1 Struktur

Die *aa*<sub>3</sub>-Typ Cytochrom *c* Oxidase stellt den wichtigsten Typ der Oxidasen in Cyanobakterien dar. Sie kommt sowohl in der Plasma- als auch in der Thylakoidmembran vor [9]. Cyanobakterielle Cytochrom *c* Oxidasen bestehen aus drei Untereinheiten (SU I, II, und III). Ihre Gene befinden sich immer

geclustert, in einem Operon *coxBAC*, welches für Su II, Su I und Su III kodiert [30, 31].

Kürzlich durchgeführte Genomstudien beweisen, dass alle vorhandenen, vollständig oder teilweise sequenzierten Cyanobakteriengenome zumindest ein vollständiges *coxBAC* Operon, welches für *aa*<sub>3</sub>-Typ Cytochrom *c* Oxidase codiert, enthalten. *Nostocales*, heterocystenbildende und N<sub>2</sub>-fixierende Cyanobakterien besitzen zwei *coxBAC* Operone, *coxBAC1* und *coxBAC2* [22]. Mehr zu der physiologischen Bedeutung von Cox1 und Cox2 siehe Kapitel 1.4.

In der Untereinheit I befindet sich das binukleare Häm-Kupfer Reaktionszentrum, Untereinheit II besitzt das Cu<sub>A</sub>-Zentrum, welches als Elektronenakzeptor für die löslichen Donoren fungiert, während Untereinheit III als Membranprotein keine Redoxzentren besitzt [31, 34-37]. Der katalytische Prozess beginnt damit, dass das Cu<sub>A</sub>-Zentrum Elektronen von den kleinen, löslichen Elektronendonoren aufnimmt. Anschließend werden die Elektronen zum Häm *a* in der Untereinheit I transferiert, wo sie schließlich zum katalytischen Zentrum, dem binuklearen häm *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> gelangen, wo die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser stattfindet [35, 77, 78].



Distances and electron transfer rates between the redox centers in *Paracoccus* cytochrome oxidase

**Abbildung 1.3** zeigt den schematischen Aufbau der Redoxzentren von Cox aus *Paracoccus denitrificans* und ihre Distanzen zueinander und die Elektronentransferraten zwischen den einzelnen Redoxzentren.

Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum ist die erste und einzige Elektronenakzeptorstelle im Cox-Komplex. Dies haben orts-spezifische Mutationsstudien bestätigt [44]. Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum liegt näher am Häm *a* als am Häm *a*<sub>3</sub>, was dazu führt, dass die Elektronen vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum auf das Häm *a* der Untereinheit I übertragen werden.

### Untereinheit I

Die Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase ist die größte und am stärksten konservierte Untereinheit. Sie bindet ein Häm-Kupfer binukleares Reaktionszentrum, bestehend aus Cu<sub>B</sub> und high-spin Häm *a*<sub>3</sub>. Weiters besitzt sie ein low spin Häm *a*. Das low-spin Häm *a* ist der direkte Elektronendonator für das binukleare Zentrum. Alle cyanobakteriellen Cox-Untereinheiten I bilden 12 Transmembranhelices aus, und fungieren als Baugerüst der Redoxzentren, die im Inneren der Untereinheit I eingebettet sind, sodass keine reaktiven Sauerstoffspezies, die während des katalytischen Prozesses als Zwischenprodukte gebildet werden, austreten können [23, 38].

Jeweils vier der zwölf Transmembranhelices bilden zusammen einen Bogen innerhalb der Membran und formen somit, gemeinsam mit dem letzten Element des vorhergegangenen Bogens eine porenartige Struktur aus. In der ersten Pore, Pore A, befinden sich aromatische Reste, in der zweiten Pore B liegt das binukleare Häm *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> Reaktionszentrum vor und in der dritten das low-spin Häm *a*. Das Häm *a*<sub>3</sub> wird von dem Aminosäurerest HisI-411 koordiniert, Cu<sub>B</sub> von HisI-276, HisI-325 und HisI-326 und HisI-94 HisI-413 (Nummerierung von *P. denitrificans*). Diese sechs Aminosäurereste sind in allen cyanobakteriellen Cox Untereinheiten I höchst konserviert. Des Weiteren bilden die beiden ersten Poren Protonenkanäle, die sogenannten D- und K-Kanäle, aus [38 - 41, 102]. Die Anwesenheit bzw. unterschiedliche Ausprägung dieser D- und K-Kanäle führte auch zu einer Klassifizierung von Cox. Demnach zählen cyanobakterielle Cox zu den Typ A<sub>2</sub> Oxidasen [38].

Abseits dieser sechs Histidyl-Reste, gibt es noch weitere Aminosäuren in cyanobakteriellen Untereinheiten I, die stark konserviert sind, nämlich Vall-279,

---

TrpI-272 und ArgI-474 (Nummerierung von *P. denitrificans*). Ihnen werden wichtige Rollen in der Sauerstoffdiffusion, dem Protonen- und Elektronentransfer zugeschrieben [38, 68 - 73].

### Untereinheit II

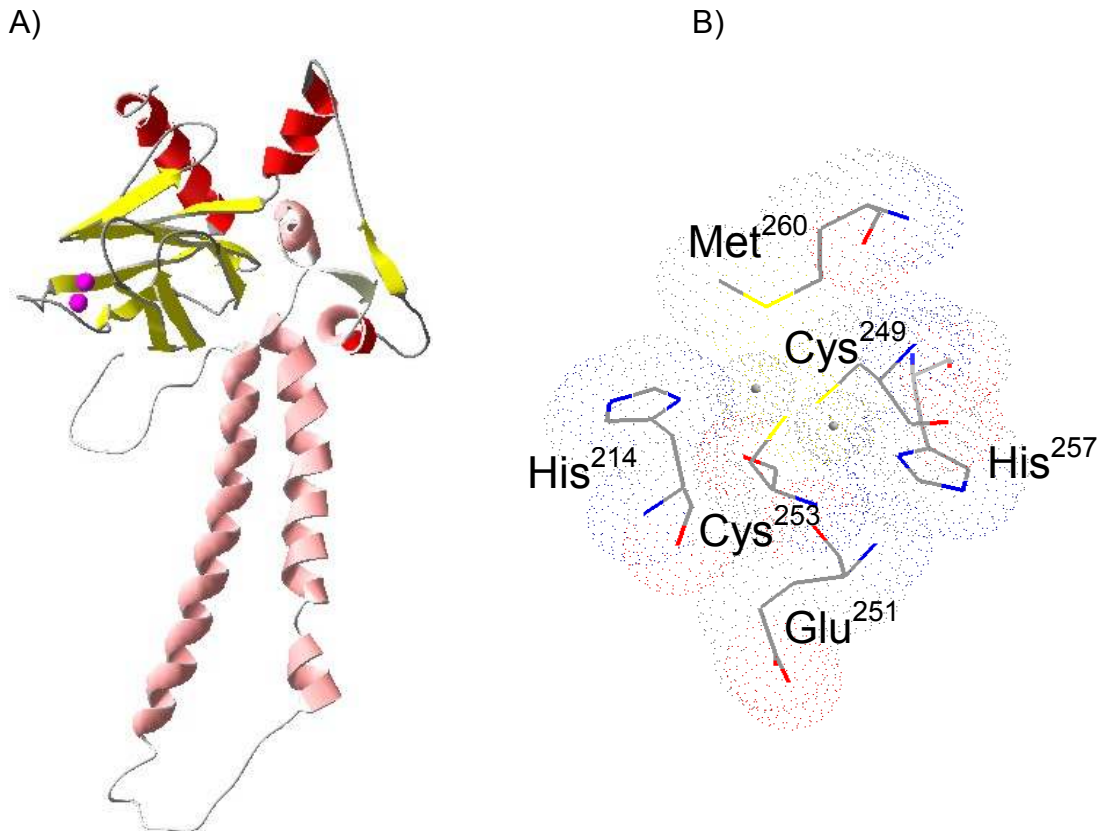
Die Untereinheit II besteht aus zwei Transmembranhelices, und einer löslichen, globulären Domäne, welche sich an der äußeren Membranoberfläche befindet. In der periphären, löslichen Domäne befinden sich die Liganden des Cu<sub>A</sub>-Zentrums [38]. Beim Vergleich der cyanobakteriellen Cox Untereinheit II mit der von *P. denitrificans* zeigt sich eine klare strukturelle Ähnlichkeit der löslichen Domäne: Zehn  $\beta$ -Faltblätter bilden einen  $\beta$ -Barrel [40, 74 - 76].

Cyanobakterielle Untereinheiten II weisen einen erweiterten C-Terminus und eine Insertion zwischen der zweiten Transmembranhelix und der Cu<sub>A</sub>-Bindungsstelle auf, welche vor allem bei Cox1 in *Nostocales* ausgeprägt erscheint. Dieses dürfte ein weiteres Merkmal der Typ A<sub>2</sub> Häm-Kupfer Oxidasen sein [22, 23, 38].

Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum ist ein binukleares Redoxzentrum und besteht aus zwei elektronisch gekoppelten Kupfer-Ionen mit einer gemischten Valenz mit einer Formalladung [Cu(1,5)-Cu(1,5)] [25]. Das einsame, ungepaarte Elektron wird von beiden Kupferionen in gleichem Ausmaß geteilt. Die Liganden der Kupferatome befinden sich in der Nähe des C-terminalen Endes der Peptidkette. Sie bilden ein hochkonserviertes Motiv, welches sich in allen cyanobakteriellen Cox wiederfindet. Dieses besteht aus HisII-246/-214, CysII-281/-249, GluII-283/-251, CysII-285/-253, HisII-289/-257 und MetII-292/-260 (Nummerierung nach *Nostoc* sp. PCC 7120, Cox1/Cox2), siehe Abb.1.5. Die beiden N<sub>δ1</sub> Atome der Histidinreste sind an je ein Kupferion gebunden, während die beiden Cysteinreste mit ihren S<sub>γ</sub> Atomen bis-( $\mu$ -dithiolato) Brücken zwischen den beiden Metallionen ausbilden. Das S<sub>δ</sub> Atom des Methioninrests und das Carbonylatom des Gerüsts der Glutaminsäure sind die axialen Liganden [34, 40, 43, 76].

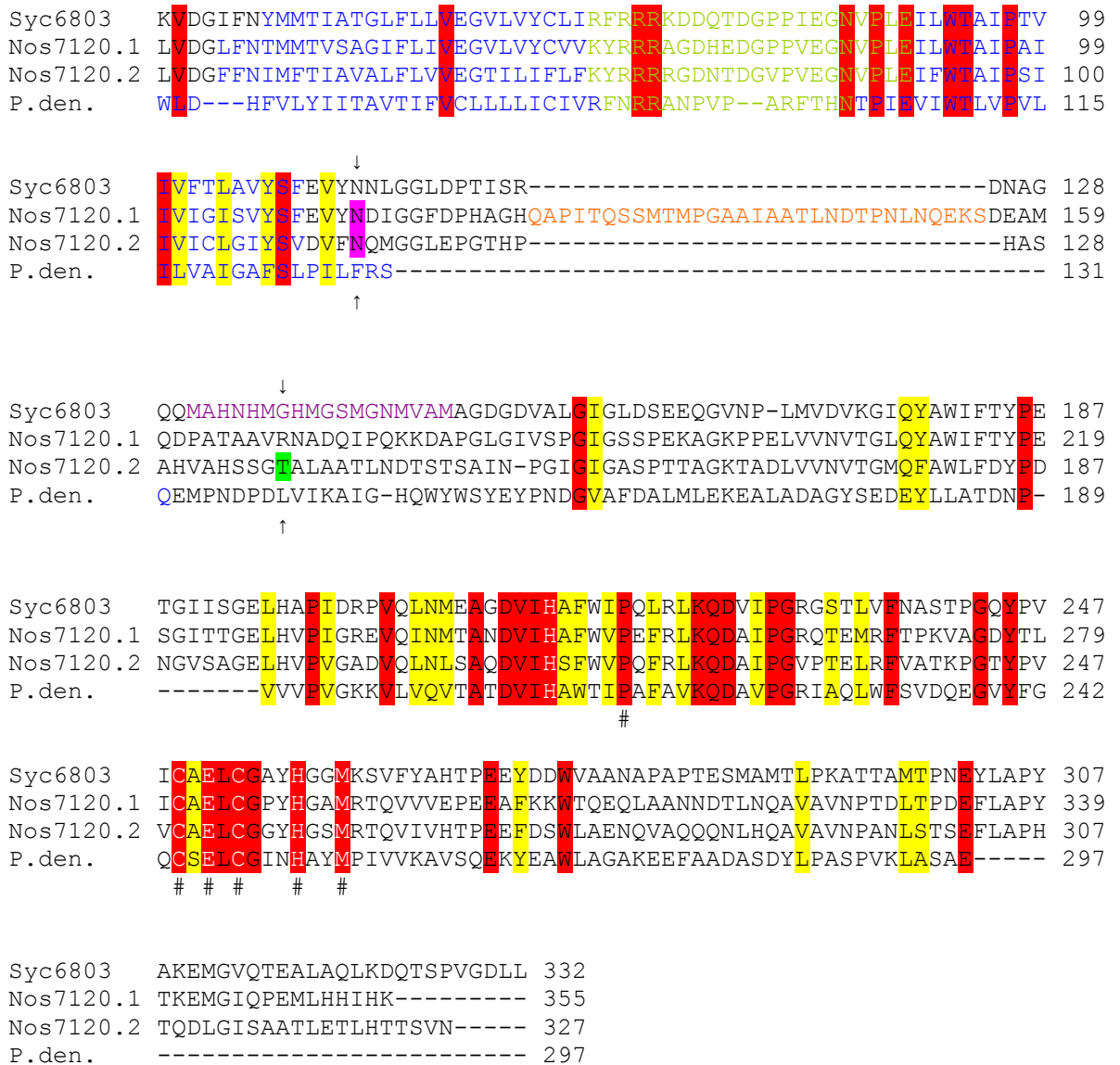


Die Bindungsstelle von Cytochrom *c* wird in den beiden Schleifen zwischen den Faltblattstrukturen  $\beta 3/\beta 4$  und  $\beta 5/\beta 6$  vermutet, da sich dort carboxylische Aminosäurereste befinden, die unter den Cytochrom *c* Oxidasen, nicht jedoch unter den Quinol Oxidasen konserviert sind [42, 43].



**Abbildung 1.4:** (A) Dreidimensionales Modell von Cox aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, erstellt mit SWISS-Model und SWISS-Pdb Viewer. Das Modell wurde auf Basis der Kristallstruktur von Cox aus *Paracoccus denitrificans* erstellt.  $\beta$ -Faltblätter sind gelb dargestellt,  $\alpha$ -Helices rot und die beiden Kupferionen violett. (B) Detaillierte Darstellung des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums und ihrer Liganden (*Nostoc* sp. PCC 7120 Cox2 Nummerierung). Die beiden Cu-Ionen sind als graue Punkte dargestellt. An jedes Cu-Ion ist ein Histidin gebunden. Zwei Cysteine bilden ( $\mu$ -dithilato) Brücken zwischen den beiden Metallatomen aus.

Syc6803	-----MKIPGSVITLLIGVVITVVVSLWYGQNHGLMPVAASADAE	39
Nos7120.1	-----MKIPSSIWTLLIGIGLTLASLWYGQNHGLMPVAAADEAD	39
Nos7120.2	-----MQQIPVSLWTLLIAGIVVGVISLWIGQNHLLPIQASEQAP	40
P.den.	<u>MAIATKRRGVAAVMSLGVATMTAVPALAQDVLGDLFPVIGKPVNGGMNFQPASSPLAHDQQ</u>	60



**Abbildung 1.5:** Alignment der Aminosäuresequenzen der Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nostoc* sp. PCC 7120 und *Paracoccus denitrificans*. Vollständig konservierte Aminosäurereste sind rot unterlegt, hoch konservierte sind gelb gekennzeichnet und # beschreibt die Kupferliganden. Die unterstrichenen Aminosäurereste beschreiben bekannte bzw. potentielle N-terminale Signalsequenzen, Transmembranregionen sind blau dargestellt, während die grünen Aminosäuren die cytoplasmatische Schleife zwischen den Transmembranhelices darstellen. Die beiden Pfeile ↓↑ beschreiben die pink hinterlegten Schnittstellen der Klone Sulld2 Cox1 und Sulld7 Cox2, sowie die grün markierte Schnittstelle des Klons Sullj3 Cox2.

### 1.2.2.2 Protonentransfer

Die katalytische Reduktion von O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O involviert vier Protonen. Nachdem das Reaktionszentrum im Inneren der Untereinheit I eingebettet ist, müssen

---

Protonenpfade vorhanden sein. Diese Kanäle wurden als D- und K-Kanäle bezeichnet (entsprechend den konservierten Aminosäureresten AspI-124 (D) und LysI-354 (K)) (Nummerierung von *P. denitrificans*) [38]. Das gängige Modell des Protonentransfers beschreibt der sogenannte Grotthus Mechanismus: Die Protonen werden mittels eines Netzwerks aus H<sub>2</sub>O Molekülen weitertransportiert. Im Inneren der Pore erfolgt die Stabilisierung der H<sub>2</sub>O Moleküle durch Interaktion mit Amidgruppen des Proteingerüsts oder durch hydrophile Seitenketten polarer Aminosäurereste [79-84].

Enzyme, die sowohl D- als auch K-Kanäle aufweisen, werden als Typ A Oxidasen klassifiziert. Der D-Kanal enthält die Aminosäurereste AspI-124, AsnI-199, AsnI-113, AsnI-131, TyrI-35, Ser-134, Ser-193 und GluI-278 und befindet sich im unteren Teil der Pore A und im oberen Teil der Pore B von Su I. Der K-Kanal enthält LysI-354, ThrI-351, SerI-291 und TyrI-280 und führt direkt zu einem der Histidinliganden von Cu<sub>B</sub> [38].

Es wird angenommen, dass der D-Kanal aus zwei Teilen besteht: Einem hydrophilen, der an der Moleküloberfläche der negativen Membranseite beginnt und bei GluI-278 endet. Der zweite Teil ist hydrophob und führt zum binuklearen Zentrum [40, 74-76]. Cyanobakteriellen Cox fehlt jedoch genau GluI-278 am hydrophoben Ende des D-Kanals. Hydroxylgruppen eines Thyrosin- und eines Serinrests (YS) könnten die Funktion von GluI-278 ersetzen. Diese Eigenschaft führt zur Klassifizierung cyanobakterieller Oxidasen zur Untergruppe A<sub>2</sub> [23, 38, 41].

Alle cyanobakteriellen Cox besitzen einen konservierten Glutaminsäurerest (GluI-106) am Beginn der zweiten Transmembranhelix der Untereinheit II. Nachdem sich dieser sehr nahe am konservierten LysI-353 des K-Kanals befindet, wird er als mögliche Regulationsstelle des Protoneneintritts in den K-Kanal gehandelt. [23, 38].

### 1.2.2.3 Elektronentransfer und Elektronendonoren der Photosynthese und der Atmung

Plastocyanin und Cytochrom  $c_6$  sind zwei kleine, lösliche Elektronencarrier, die sich im intrathylakoiden Raum der Cyanobakterienzelle befinden. Ihre Rolle als intrathylakoider Ein-Elektronenshuttle in der Photosynthese zwischen dem Membrankomplex Cytochrom  $b_6f$  und PSI ist geklärt [89]: PC und Cyt  $c_6$  fungieren als alternierende Elektronendonoren, ihre Expression wird über die Kupferverfügbarkeit reguliert. Bei Anwesenheit von Kupfer wird PC produziert, bei Kupfermangel Cyt  $c_6$ . Obwohl sie unterschiedliche Strukturen aufweisen, können sie sich gegenseitig ersetzen und die gleichen Funktionen in PET übernehmen [18, 90].

Die Aufklärung der Elektronentransportwege in der Atmung in Cyanobakterien ist jedoch durch die verzweigte Atmungskette, typisch für alle prokaryotischen Organismen, erschwert [27]. Die mögliche Rolle von PC bzw. Cyt  $c_6$  als Donor im periplasmatischen Raum für Cox in der CM, welche nur Komponenten von RET aber keine von PET aufweist, ist noch ungeklärt [4, 94]. Es konnte zwar periplasmatisches Cyt  $c_6$  als potenzieller Donor für CM-gebundene Cox identifiziert werden, der Nachweis von PC im periplasmatischen Raum konnte jedoch noch nicht erbracht werden [95, 96].

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde nachgewiesen, dass die lösliche  $Cu_A$  Domäne der Untereinheit II durch die mobilen Elektronencarrier PC und Cyt  $c_6$  reduziert werden kann [27, 87]. Selbiges wurde auch in *Nostoc* sp. PCC 7119 gezeigt, allerdings mit der vollständigen Cytochrom  $c$  Oxidase [88]. Weiters zeigten Mutationsversuche mit *Synechocystis* sp. PCC 6803, dass die Anwesenheit von entweder PC oder Cyt  $c_6$  für die effiziente Funktion der cyanobakteriellen Atmung absolute Voraussetzung ist [21].

In den bisher publizierten Cox Strukturen, treten die von den mobilen Elektronencarriern transportierten Elektronen über ein konserviertes Tryptophan in die Untereinheit II ein (TrpII-149, Nummerierung nach *P. denitrificans*).

---

Mutationsstudien zeigten, dass bei Abwesenheit von Trp-149 kein Elektronentransfer stattfindet [100, 101].

Plastocyanin, codiert vom Gen *petE*, ein Typ-1, blaues Kupferprotein, besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Kupferion. Diese bildet eine  $\alpha$ -Helix und acht  $\beta$ -Faltblätter, die ein  $\beta$ -Barrel bilden. Das Kupfer wird von zwei Histidinresten koordiniert, dem HisII-39 und HisII-86 (Nummerierung nach *Synechocystis* sp. PCC 6803), wobei HisII-86 die wahrscheinliche Elektroneneintrittsstelle bildet, da es der einzige exponierte Kupferligand ist [91-93].

Cyt  $c_6$  wird von dem *petJ* Gen codiert. Es ist ein typisches Klasse I c-Typ Cytochrom, bestehend aus vier Helices und einem über zwei Cysteinreste kovalent gebundenem Häm, in dem das Eisenatom axial über ein Histidin und ein Methionin koordiniert ist [97-99].

Interessant ist, dass alle heterocystenbildende Cyanobakterien zwei bis vier ORFs für Cyt  $c_6$  besitzen. Die cIPs (berechnete Isoelektrischen Punkte) dieser Cytochrome  $c_6$  können variieren: *Nostoc* sp. PCC 7120, cIPs = 8,1; 8,9. Die Anwesenheit mehrerer Cytochrome  $c_6$  in heterocystenbildenden Cyanobakterien ist vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass auch zwei verschiedene ORFs für Cox vorhanden sind, von Interesse. So könnten die verschiedenen Cytochrome  $c_6$ , ähnlich wie Cox1 und Cox2, unterschiedliche Rollen in RET von Heterocysten und vegetativen Zellen spielen. Die Hypothese liegt nahe, dass Cyt  $c_6$  einen wichtigeren Stellenwert als PC im Elektronentransport in Heterocysten einnimmt [22]. Obwohl die Anwesenheit von zumindest einem Cyt  $c_6$  in Heterocysten von *Anabeana variabilis* nachgewiesen wurde [96], weiß man noch sehr wenig über die physiologischen Rollen der verschiedenen Cytochrome  $c_6$  und ihre Interaktionen mit Cox1 und Cox2 [22].

Nostoc7120_petJ	-----MOKFLKLVLTFLFL--ISTLTPPANAENTINGEQIFSVHCAGCHINGSNII	50
Nostoc7120_cytA	-----MKKIFSLVLLGIALF--TFAFSSPALAADSVNGAKIFSANCASCHAGGKNLV	50
Synechocystis	<u>MFKLFNQASRIFFGIALPCLIFLGGIFSLGNTALADLAHGKATFAGNCAACHNGGLNAI</u>	60
	↓	
		↑
	#	
Nostoc7120_petJ	RRGKNIQKKTLLKKGMDSELEAIEAIVTNGKNNISAYKDRLSEQEIQDVAAYVLEQAEKGV	110
Nostoc7119_cytA	QAQKTLKKADLEKYGMYSAEAIIAQVTNGKNAIPAFKGRLLKPEQIEDVAAYVLEKADADW	110
Synechocystis	NPSKTLKMADLEANGKNSVAIIVAQITNGNGAMPFGKGRISDSDMEDVAAYVLEQAEKGV	120
Nostoc7120_petJ	R	111
Nostoc7119_cytA	K	111
Synechocystis	-	120

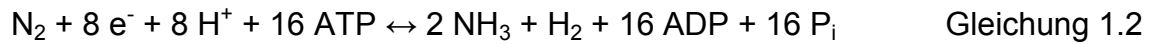
**Abbildung 1.6:** Alignment der Aminosäuresequenzen der beiden Cytochrome  $c_6$  aus *Nostoc* sp. PCC 7120 und aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die vollständig konservierten Aminosäurereste sind rot, die hoch konservierten gelb hinterlegt. # beschreibt die grün dargestellten Hämliganden, während die Pfeile  $\uparrow\downarrow$  auf die Schnittstellen der Klone Cyt  $c_6$  a6 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und Cyt  $c_6$ \_2 aus *Nostoc* sp. PCC 7120 hinweisen.

### 1.3 Stickstofffixierung

Die Stickstofffixierung ist die biologische Reduktion von atmosphärischem  $N_2$ . Sie kann ausschließlich von Prokaryonten durchgeführt werden und wird von einem Metallo-Proteinkomplex, der Nitrogenase katalysiert. Dieser wird durch molekularen Sauerstoff, sowie durch Sauerstoffradikale irreversibel inhibiert. Cyanobakterien sind die einzigen stickstofffixierenden Organismen, die als Nebenprodukt der Photosynthese auch selbst Sauerstoff produzieren [45, 46].

Der Nitrogenase-Komplex besteht aus zwei Proteinen, der Dinitrogenase, einem Fe-Mo-Enzym und dem Fe-Enzym, der Dinitrogenase Reduktase. Dinitrogenase ist ein Tetramer, bestehend aus zwei verschiedenen Untereinheiten ( $2\alpha 2\beta$ ). Es enthält vier (4Fe-4S) Cluster und zwei Mo-Fe Kofaktoren. Ihre Untereinheiten werden von den Genen *nifD* und *nifK* codiert. Die Dinitrogenase Reduktase besteht aus einem Dimer aus zwei identen Untereinheiten, die ein einsames (4Fe-4S) System, welches  $O_2$  sensibel ist, besitzen. Deshalb kann der (4Fe-4S) Cluster irreversibel durch  $O_2$  oxidiert werden. Während der Fe-Mo-Kofaktor für die Bindung und die Reduktion des molekularen Stickstoffs verantwortlich ist,

stellt die Dinitrogenase Reduktase die für die Reduktion benötigten Elektronen zur Verfügung. Die Stickstofffixierung ist ein hoch endergonischer Prozess:



Die energetisch unvorteilhafte Reduktion von Protonen zu  $\text{H}_2$  wird durch die Hydrogenase teilweise wieder rückgängig gemacht, indem ein Teil der Elektronen aus  $\text{H}_2$  wieder an RET und PET zurückfließen [45, 47].

Cyanobakterien haben es geschafft, Mechanismen zu entwickeln, die es ihnen ermöglichen RET und PET sowie die Sauerstoff empfindliche Nitrogenase in einer Zelle bzw. innerhalb von Zellkolonien unterzubringen. Diese Strategien basieren auf der räumlichen und/oder der zeitlichen Trennung der Photosynthese und der Stickstofffixierung [48]. Der Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff ist bei diazotrophen Cyanobakterien von besonders großer Bedeutung, da sie nicht nur mit dem in der Atmosphäre vorhandenem Sauerstoff zu kämpfen haben, sondern auch mit dem intrazellulär am PS II gebildeten  $\text{O}_2$ .

Der erhöhte ATP-Verbrauch während der Stickstofffixierung kann auch als Stresssituation für die Zelle betrachtet werden. Wachstumsstudien der photoautotroph wachsenden Cyanobakterien *Anabaena variabilis* [49] ergaben, dass die Generationszeiten in stickstofffreien Medien wesentlich länger waren, als in Medien mit löslichen Stickstoffverbindungen. Weitere Studien ergaben, dass die RET Raten steil anstiegen, sobald Cyanobakterien auf die Fixierung von atmosphärischem Stickstoff angewiesen waren [50-52]. Außerdem trägt die Respiration dazu bei, die Konzentration des gelösten Sauerstoffs wesentlich zu reduzieren. So könnte Cox wesentlich zum Schutz der Nitrogenase vor  $\text{O}_2$  beitragen [51].

## 1.4 *Nostoc* sp. PCC 7120 und Heterocysten

*Nostoc* sp. PCC 7120 ist ein filamentöses Cyanobakterium, welches in der Lage ist, oxygene Photosynthese und Stickstofffixierung durchzuführen, wobei diese beiden Prozesse bei heterocystenbildenden Cyanobakterien wie *Nostoc* sp. PCC 7120 in verschiedenen Zellen ablaufen. Einerseits läuft die sauerstoffsensitive Stickstofffixierung in den microaeroben Heterocysten ab, während vegetative Zellen oxygene Photosynthese betreiben. Somit entsteht eine räumliche Trennung der beiden inkompatiblen Prozesse [7].

Heterocysten weisen eine hohe metabolische Aktivität auf und entwickeln sich in einem semi-regulären Muster entlang des Filaments, sobald gebundener Stickstoff im Medium fehlt. Etwa jede zehnte Zelle differenziert unter diesen Bedingungen zur Heterocyste. Diese exprimieren unter Mangel gebundenen Stickstoffs den sauerstoffsensitiven Nitrogenase Komplex.

Sie haben Schutzmechanismen entwickelt, um den reibungslosen Ablauf der Stickstofffixierung zu gewährleisten: Das PS II, welches während der oxygenen Photosynthese O<sub>2</sub> bildet, ist in den Heterocysten deaktiviert. Trotzdem bleibt die Aktivität des PS I bestehen. Ebenso bilden die Zellwände der Heterocysten eine für Gase semipermeable Schutzhülle, die aus einer inneren Glycolipid- und einer äußeren Polysaccharidschicht besteht. Die Glycolipidschicht trägt dazu bei, den Sauerstofffluss durch die Membran zu reduzieren, während die Polysaccharidschicht als Schutz für die sehr fragile Glycolipidschicht fungiert. Diese Mechanismen schützen die sauerstoffsensitive Nitrogenase vor molekularem Sauerstoff [7, 53, 54]. Die Van der Waal's Radien von N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> betragen jeweils 1,5 Å beziehungsweise 1,4 Å. Die Schutzhülle reduziert den Eintritt in die Zelle beider Gase soweit, dass noch genügend N<sub>2</sub> eindiffundieren kann, um den physiologischen Anforderungen zu genügen, und dass ausreichend O<sub>2</sub> für die Atmung vorhanden ist [47].

Des Weiteren tragen spezifische Hydrogenasen und Oxidasen dazu bei, dass genügend ATP für den energieaufwendigen diazotrophen Metabolismus zur Verfügung stehen. Diese Oxidasen konsumieren Spuren von O<sub>2</sub>, die es trotz der



verdickten Zellwand schaffen, in die Heterocysten einzudiffundieren [48, 55]. Die Respiration durch Cytochrom *c* Oxidase in Heterocysten spielt eine wichtige Rolle in der Beschaffung von ATP für die Nitrogenase, ebenso wie in der Schaffung eines mikroaeroben Klimas durch erhöhten Sauerstoffverbrauch [62].

Heterocysten und vegetative Zellen sind voneinander abhängig. Einerseits sind Heterocysten auf Kohlenstoffquellen und Reduktionsäquivalente der vegetativen Zellen angewiesen, andererseits versorgen die Heterocysten die im Filament umliegenden Zellen mit gebundenem Stickstoff. In Abwesenheit von gebundenem Stickstoff ist diese Kooperation essentiell, um filamentöses Wachstum zu gewährleisten [7].

Das gesamte Genom von *Nostoc* sp. PCC 7120 wurde sequenziert [56], wobei drei Gen-Cluster für terminale Oxidasen identifiziert wurden [57]. Zwei Cluster, *coxBAC1* und *coxBAC2* codieren für jeweils drei Untereinheiten einer *aa*<sub>3</sub>-Typ Cytochrom *c* Oxidase [58-60]. *coxBAC3* hingegen, wird zu den Quinol Oxidasen, zugeordnet, da die Aminosäuresequenz keine Bindungsstellen für Mg<sup>2+</sup> und das Cu<sub>A</sub>-Zentrum aufweist [28]. *CoxBAC1* wird vor allem in vegetativen Zellen exprimiert, während die Expression von *coxBAC2* und *coxBAC3* in Heterocysten von Bedeutung ist [57, 61].

Dies lässt auf unterschiedliche Rollen der drei terminalen Oxidasen schließen. Untersuchungen zeigten, dass bei der Inaktivierung des *coxBAC2* Operons, noch immer diazotrophes Wachstum zu beobachten war. Wurden jedoch beide Operone, *coxBAC2* und *coxBAC3*, inaktiviert, kam es zu einer deutlichen Reduktion der Nitrogenaseaktivität und zu einer Unterbindung diazotrophen Wachstums. Somit ist sowohl Cox2 als auch Qox an der Respiration in Heterocysten beteiligt, und es zeigt, dass zumindest die Aktivität einer der beiden terminalen Oxidasen für eine signifikante Nitrogenaseaktivität Voraussetzung ist [57]. Des Weiteren wird vorgeschlagen, dass Cox2 und Qox nicht nur für den Schutz der Nitrogenase vor O<sub>2</sub> essentiell sind, sondern auch Einfluss auf die normale Entwicklung von Heterocysten nehmen [48].

### 1.4.1 Heterocystenentwicklung

Die Anwesenheit von Ammonium führt zu einer Inhibierung der Heterocystendifferenzierung in diazotrophe Cyanobakterien. Bei Mangel an gebundenem Stickstoff kommt es jedoch zu einer programmierten Zelldifferenzierung. Dabei kommt es zu einer komplexen Veränderung im Muster der Genexpression [7, 64].

Während der Heterocystenentwicklung wird die Expression von *coxBAC2* und *coxBAC3* hochreguliert. Die nur in den Heterocysten stattfindende Expression von *coxBAC2* ist von den Transkriptionsfaktoren NtcA und HetR abhängig [53, 57, 61, 63]. NtcA ist während der frühen Phase der Heterocystenentwicklung für die vollständige Aktivierung der Gene des Stickstoffmetabolismus notwendig. NtcA ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Proteinfamilie der zyklischen AMP Rezeptoren zählt und als Sensor von 2-Oxyglutarat (2-OG) gehandelt wird. 2-OG fungiert als direktes metabolisches Signal auf Mangel gebundenen Stickstoffs [7, 66]. HetR ist einer der wichtigsten positiven Regulatoren in der Entwicklung von Heterocysten und zeigt eine Abhängigkeit von NtcA in den ersten Phasen der Heterocystendifferenzierung [63, 65].

Außerdem spielt die Verfügbarkeit von Eisen eine wesentliche Rolle. In *Nostoc* sp. PCC 7120 wird die Eisenaufnahme von FurA kontrolliert. Die Expression von FurA wird von NtcA moduliert, was auf eine enge Verbindung zwischen dem Vorhandensein von Eisenreserven und dem Stickstoffmetabolismus hinweist. Es wurde eine signifikante Anzahl NtcA-regulierter Gene gefunden, die Eisenboxen in ihrer upstream-Region aufweisen. Diese Genprodukte sind Proteine, die in der Photosynthese und Respiration, sowie in der Heterocystendifferenzierung, Transkriptionsregulierung und dem Redoxgleichgewicht involviert sind [63].

## 2. Ziel der Arbeit

Die Arbeitsgruppe Metalloproteine beschäftigt sich u.a. mit der Charakterisierung der Cytochrom *c* Oxidase (Cox) in Cyanobakterien, insbesondere mit dem Cu<sub>A</sub>-Zentrum. Der Erforschung des Elektronentransfers zwischen den Redoxcarriern Cytochrom *c*<sub>6</sub> bzw. Plastocyanin und dem Cu<sub>A</sub>-Zentrum cyanobakterieller Cox wird besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Im Rahmen dieses Projekts konnte bereits die Klonierung des löslichen Teils der Untereinheit II der Cox aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, ebenso wie die Rekonstitution dessen Cu<sub>A</sub>-Zentrums erfolgreich durchgeführt werden. Weiters wurden die löslichen Elektronencarrier Plastocyanin und Cytochrom *c*<sub>6</sub> aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 kloniert und Elektronentransferstudien mit dem rekombinanten Cu<sub>A</sub>-Zentrum durchgeführt. Es konnte die Reduktion des Cu<sub>A</sub>-Zentrums sowohl durch reduziertes Plastocyanin, als auch durch reduziertes Cytochrom *c*<sub>6</sub> nachgewiesen werden [9, 27, 87].

*Nostoc* sp. PCC 7120 ist ein filamentöses, heterocystenbildendes und stickstofffixierendes Cyanobakterium, welches zwei ORFs für Cytochrom *c* Oxidasen besitzt. *coxBAC1* codiert Cox1, welche nur in vegetativen Zellen exprimiert wird und *coxBAC2* enthält die genetische Information für Cox2. Diese wurde in Heterocysten nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war die Klonierung, heterologe Expression, Reinigung und Charakterisierung des löslichen Teils der Untereinheiten II (Domäne mit Cu<sub>A</sub>-Zentrum) von Cox1 und Cox2 in *E. coli*. Hierfür wurde ein 642 bp langes Gensegment aus *coxB2* (Sulld7 Cox2) und ein 729 bp langes Fragment aus *coxB1* (Sulld2 Cox1) in *E. coli* kloniert. Das Peptidprodukt Sulld2 Cox1 konnte in löslicher Form in Cytoplasma exprimiert werden. Nach erfolgreicher Reinigung wurde das Cu<sub>A</sub>-Zentrum rekonstituiert. Da bei der Klonierung des 642 bp langen Gensegments *coxB2* (Sulld7 Cox2) Mutationen auftraten, wurde mit einem, bereits im Vorfeld im Rahmen des Projekts hergestellten Klons (Sullj3 Cox2) gearbeitet. Dieser enthält ebenfalls die lösliche Domäne von Cox2, jedoch ein etwas kürzeres Gensegment (579 bp) (Schnittstellen aller Klone siehe Tabelle 2.1 und Abbildungen 1.5 und 1.6).

Das Proteinprodukt dieses Klons Sullj3 Cox2 wurde exprimiert, gereinigt, sein  $\text{Cu}_A$ -Zentrum rekonstituiert und seine Redoxfähigkeit überprüft. Hierfür wurden steady-state Elektronentransferstudien mit Natriumascorbat, Kaliumhexacyanoferrat, Pferedeherz Cytochrom *c* und den löslichen heterolog exprimierten Elektronencarriern Plastocyanin und Cytochrom  $c_6$  aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 [9, 27, 87] durchgeführt. Zusätzlich wurden Stopped-Flow Messungen zwischen dem  $\text{Cu}_A$ -Zentrum aus Sullj3 Cox2 und dem heterolog exprimierten Cytochrom  $c_6$  aus *Nostoc* sp. PCC 7120, welches von der Arbeitsgruppe des „Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis“ von Migel A. De la Rosa, Universidad de Sevilla hergestellt wurde, durchgeführt [5].

Rekombinante Proteine	Nomen- klatur	Molekulargewicht	Aminosäurereste
<b><i>Nostoc</i> sp. PCC 7120</b>			
Cytochrom <i>c</i> Oxidase 2 Untereinheit II	Sullj3 Cox2	20,4 kDa	137-327
Cytochrom <i>c</i> Oxidase 1 Untereinheit II	Sulld2 Cox1	26,4 kDa	113-355
Cytochrom <i>c</i> Oxidase 2 Untereinheit II	Sulld7 Cox2	22,5 kDa	114-327
Cytochrom $c_6$ petJ [YP_322.047.1]/all0161	Cyt $c_6$ _2	9,7 kDa	26-111
<b><i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</b>			
Plastocyanin	PC a8	10,4 kDa	29-126
Cytochrom $c_6$	Cyt $c_6$ a6	8,8 kDa	36-120

**Tabelle 2.1:** Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klone.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Klonierung Cox1 Untereinheit II Lösliche Domäne (Sulld2 Cox1)

#### 3.1.1 Amplifizierung des Sulld2 Cox1 Gens mittels PCR

##### 3.1.1.1 Methodik

Die Amplifizierung des Sulld2 Cox1 Genabschnitts erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sich wiederholende Zyklen, bestehend aus drei verschiedenen Temperaturstufen, ermöglichen es, definierte Genabschnitte enzymatisch zu vervielfältigen. Im ersten Schritt (Denaturation) wird der DNA Doppelstrang thermisch denaturiert. Im zweiten Schritt (Annealing) kommt es zur Anlagerung der antiparallelen Oligonukleotidpaare (Primer) an die DNA-Einzelstränge, während im darauf folgenden, dritten Schritt (Extension) mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, ausgehend von den Oligonukleotiden, ein komplementärer Strang zum Template-Strang synthetisiert wird. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Zyklus liegt der zu vervielfältigende Genabschnitt in hoher Kopienanzahl vor.

Das Prinzip der DNA Gelelektrophorese basiert auf der negativen Ladung der DNA, wodurch es aufgrund eines konstanten Masse-Ladungsverhältnisses zu einer Auftrennung nach Form und Größe der DNA Fragmente kommt. Die Detektion der DNA Banden erfolgte durch den unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoff SYBR Safe™.

##### 3.1.1.2 Durchführung

Folgende Primer wurden für die PCR des Sulld2 Cox1 Genabschnitts verwendet:

##### **Upstream Primer 1: lang\_DG\_veg\_p1**

5' GGGAATTCCATATGAATGACATCGGTGGTTTTGATCCCCACGCGGGTTC3'  
48 Basen

**Downstream Primer 2: lang\_DG\_veg\_p2**

5' CGCGGATCCCTACTTGTGAATGTGATGTAACATCTCTGGTTGAATTCCC3'

49 Basen

Die verwendeten Primer definierten ein 729 bp langes Genstück.

PCR-Reaktionsmix:

Die Herstellung des PCR-Reaktionsmix wurde auf Eis durchgeführt.

Template	5 µL
(Nostoc sp. PCC 7120 von Schrägagarkultur des Pasteur Instituts wurde steril entnommen und in 5 µl dest. H <sub>2</sub> O suspendiert)	
Upstream Primer [10 pmol / µL]	5 µL
Downstream Primer [10 pmol / µL]	5 µL
dNTPs [25 mM]	1 µL
5 x Phusion HF Buffer [7,5 mM MgCl <sub>2</sub> ]	20 µL
PHUSION Hot Start High Fidelity	
DNA Polymerase [2U / µL]	1 µL
Steriles dest. H <sub>2</sub> O	63 µL
	<hr/>
	100 µL

Negativkontrollen wurden ohne Template, mit 68 µL dest. H<sub>2</sub>O durchgeführt.

## Thermocycler Bedingungen:

<u>1 x</u>	<u>98°C</u>	<u>10 min</u>
	98°C	10 sec
30 x	69°C	15 sec
	<u>72°C</u>	<u>15 sec</u>
1 x	72°C	10 min

Die PCR wurde im Techne Thermocycler TC-312 vorgenommen. Es wurde ein Hot Start durchgeführt, wobei die PHUSION Hot Start DNA Polymerase erst nach 9 min des ersten Denaturierungsschritts bei 98°C zugegeben wurde, um ein vollständiges Aufbrechen der cyanobakteriellen Zellen und die Denaturierung der DNA zu gewährleisten.

Der Erfolg der Amplifizierung wurde mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 10 µL des Reaktionsansatzes nach der PCR auf ein Invitrogen Agarosegel 1,2 % mit SYBR Safe™ aufgetragen und in einer Invitrogen E-Gel Powerbase elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.1.1.3 Geräte und Reagenzien

<b><i>Nostoc</i> sp. Kultur PCC 7120</b>	Pasteur Institut, Paris, Frankreich
<b>Primer</b>	GeneExpress, Wr. Neudorf, Österreich
Upstream Primer 1: lang_DG_veg_p1	
Downstream Primer 2: lang_DG_veg_p2	
<b>Techne T-312 Thermocycler</b>	
<b>PHUSION Hot Start High</b>	Finnzymes
<b>Fidelity DNA Polymerase [2U/µl]</b>	
Syntheseleistung: 4000 bp / min	
dNTPs [25 mM]	Fermentas
steriles dest. H <sub>2</sub> O	
DNA ladder 1 kb	Fermentas
<b>E-Gel 1,2 % mit SYBR Safe™</b>	Invitrogen
<b>E-Gel Powerbase</b>	Invitrogen
<b>Transilluminator</b>	

### 3.1.2 Reinigung der DNA mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit

#### 3.1.2.1 Methodik

Das amplifizierte Genprodukt wurde aus dem PCR-Reaktionsansatz für die weitere Behandlung gereinigt. Hierfür wurde die DNA auf einer GeneJet Spin Säule immobilisiert, gewaschen und anschließend eluiert.

#### 3.1.2.2 Durchführung

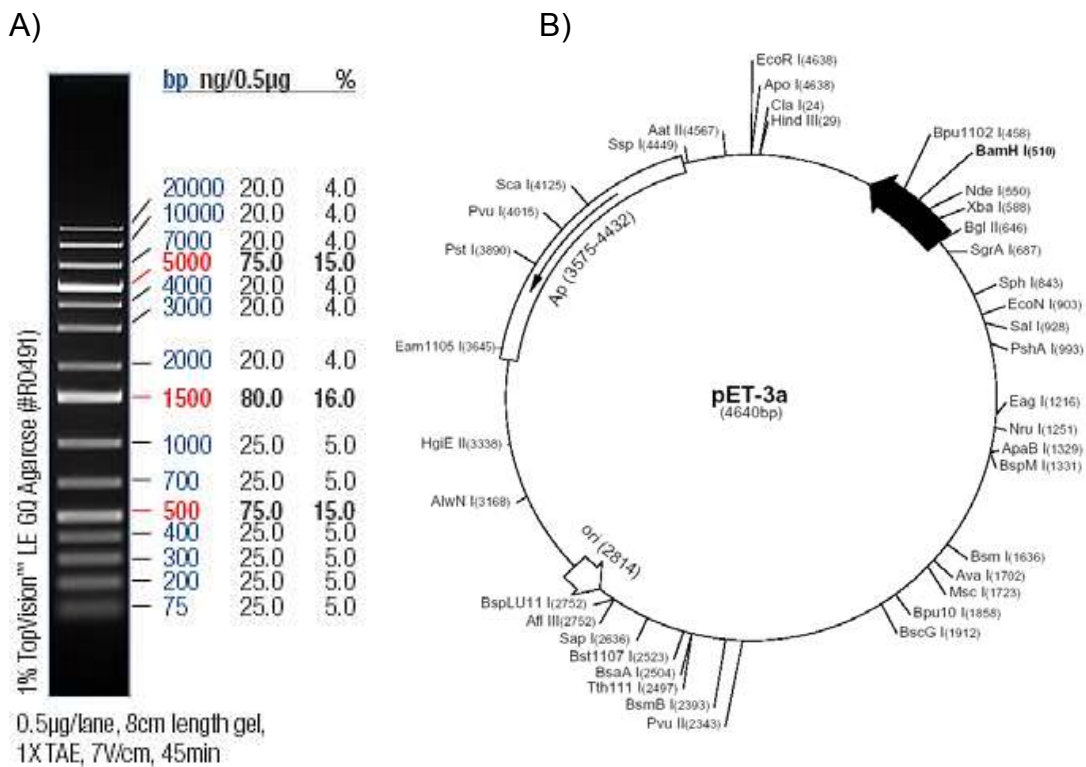
- Es wurden 500 µL Neutralisationslösung vorgelegt und 90 µL der mittels PCR amplifizierten DNA zugegeben. Es erfolgte ein gründliches Durchmischen der Lösung durch mehrmaliges Wenden des Eppendorf Reaktionsgefäßes.
- Die Lösung wurde auf eine GeneJet Spin Säule überführt.
- Zentrifugation, 1 min, 14.000 rpm.
- Der Durchfluss wurde verworfen.
- 500 µL Waschlösung wurde auf die GeneJet Spin Säule pipettiert und 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Wiederholung des Waschschriffs.
- Erneutes Zentrifugieren, um Ethanolreste der Waschlösung von GeneJet Spin Säulchen zu entfernen.
- Die Spin Säule wurde in ein neues Eppendorfhütchen überführt.
- 50 µL steriles dest. H<sub>2</sub>O wurden auf die GeneJet Spin Membran aufgetragen und 2 min inkubiert.
- Zentrifugation, 2 min, 14.000 rpm.
- Im Eluat befand sich die gereinigt DNA.

#### 3.1.2.3 Geräte und Reagenzien

**GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit**                      Fermentas

**Tischzentrifuge**





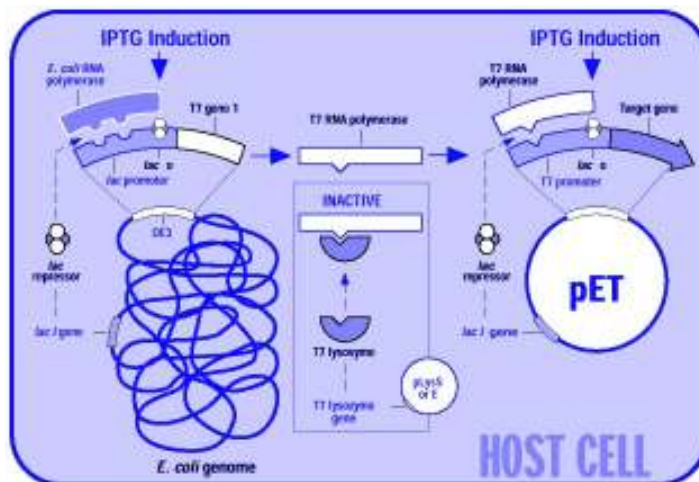
**Abbildung 3.1:** A) DNA Ladder (#R0491) von Fermentas. B) pET-3a Vektor und seine Restriktionsstellen.

### 3.1.3 Präparation des Vektors pET-3a

#### 3.1.3.1 Methodik

Das pET-3a Vektor System wird häufig zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* verwendet. Auf dem pET-3a Vektor befindet sich als Resistenzmarker ein Ampizillinresistenz-Gen, welches für das Enzym  $\beta$ -Lactamase codiert, das wiederum Ampizillin inaktiviert. Das pET-3a Vektor System liegt unter der Kontrolle des starken T7-Promotors. An diesen kann nur die T7 RNA Polymerase binden. Das Gen für die T7 RNA Polymerase wurde ins Genom der Wirtszelle kloniert und steht unter der Kontrolle des *lac* Gens, wodurch die Transkription der T7 RNA Polymerase, und somit auch die des Zielgen auf dem Plasmid, nur durch die Induktion mit IPTG erfolgen kann.

*E. coli* Zellen können zusätzlich ein pLysS Plasmid tragen. Das pLysS Plasmid codiert für das T7-Lysozym, welches ein natürlicher Inhibitor für die T7 RNA Polymerase ist. Somit wird der konstante Basislevel an T7 RNA Polymerase, welches in jeder Zelle vorliegt, abgebaut. Eine noch stärkere Kontrolle der Expression ist möglich. Das pLysS Plasmid trägt zusätzlich ein Chloramphenicol-Resistenzgen als Selektionsmarker.



**Abbildung 3.2:** pET T7 Expressionssystem. Durch Zugabe von IPTG wird die T7 RNA Polymerase im *E. coli* Genom induziert, in weiterer Konsequenz kommt es zur Expression des rekombinanten Proteins.

Die Preparation des Vektors wurde mittels GenJet™ Plasmid Miniprep Kit durchgeführt. Die Vektor DNA wurde auf einer GeneJet™ Säule immobilisiert, gewaschen und anschließend eluiert.

### 3.1.3.2 Durchführung

#### 3.1.3.2.1 Herstellen einer Übernacht-Kultur aus Kryostocks:

- 20 mL  $LB_{Amp}$  wurden steril mit TopF'10'-Zellen einer Kryostock Kultur, welche den Vektor pET-3a enthalten, beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

### **3.1.3.2 Isolierung der Plasmid DNA aus Zellen durch GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit**

- Die pelletierten Zellen wurden in 250 µL Resuspensionslösung im Eppendorf Hütchen durch vortexen resuspendiert.
- Es wurden 250 µL Lysislösung zugegeben. Gründliches Durchmischen durch mehrmaliges Wenden des Eppendorf Reaktionsgefäßes.
- 350 µL Neutralisationslösung wurden zugegeben und durch mehrmaliges Wenden des Eppendorf Reaktionsgefäßes gründlich durchgemischt.
- Zentrifugation 10 min, 14.000 rpm.
- Die Lösung wurde auf eine GeneJet Spin Säule überführt, ohne den weißen Niederschlag aufzuwirbeln.
- Zentrifugation, 1 min, 14.000 rpm.
- Der Durchfluss wurde verworfen.
- 500 µL Waschlösung wurden auf die GeneJet Spin Säule pipettiert und 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen.
- Wiederholung des Waschschriffs.
- Erneutes Zentrifugieren, um Ethanolreste der Waschlösung von GeneJet Spin Column zu entfernen.
- Die Spin Säule wurde in ein neues Eppendorfhütchen überführt.
- 85 µL steriles dest. H<sub>2</sub>O wurden auf die GeneJet Spin Membran aufgetragen und 2 min inkubiert.
- Zentrifugation, 2 min, 14.000 rpm.
- Im Eluat befand sich die gereinigt DNA.

### **3.1.3.3 Geräte und Reagenzien**

#### **LB-Medium:**

Pepton	10 g
NaCl	10 g
<u>Hefeextrakt</u>	<u>5 g</u>
Mit dest. H <sub>2</sub> O	auf 1000 mL

---

Wurde bei 120°C 20 min autoklaviert.

**Kryostocks**

TopF'10 mit pET-3a Vektor

**LB-Medium<sub>Amp</sub>**

LB-Medium

Ampizillin

100 µg / mL

**Ampizillin-Stocklösung**

Na-Ampizillin

100 mg / mL dest. H<sub>2</sub>O

Sterilfiltriert und bei -20°C gelagert

**GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit**

Fermentas

**Tischzentrifuge****Orbital Shaker****3.1.4 Restriktionsverdau des Vektors und der PCR-Produkte****3.1.4.1 Methodik**

Um das Einfügen des DNA Stücks in den Vektor zu ermöglichen, müssen sowohl das Insert als auch der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden. Restriktionsenzyme erkennen spezifische DNA Sequenzen und schneiden die DNA spezifisch an diesen Stellen. Je nach Art des Restriktionsenzymes können entweder 5' Überhänge, 3' Überhänge oder glatte Enden entstehen. Damit sich der Vektor nicht wieder ohne Insert schließt, wird dieser mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (CIAP) behandelt. Dieses Enzym entfernt die 5' Phosphatenden an den Schnittstellen. So können die Enden des Vektors nicht mehr spontan ohne Insert ligieren.

### 3.1.4.2 Durchführung

#### Schneiden des Insert Sulld2 Cox1

- NdeI

Insert Sulld2 Cox1	85 µL
10 x Buffer 0	10 µL
<u>NdeI (10 U / µL)</u>	<u>5 µL</u>
	100 µL

Inkubation auf 37°C, 2h

*NdeI* wurde schrittweise zugegeben: 3 µL zu Beginn, weitere 2 µL nach einer Stunde Inkubation.

- Reinigung der DNA durch GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit. Siehe 3.1.2

- BamHI

Insert Sulld2 Cox1	85 µL
10 x BamHI-Buffer	10 µL
<u>BamHI (10 U / µL)</u>	<u>5 µL</u>
	100 µL

Inkubation auf 37°C, 2h

- Reinigung der DNA durch GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit. Siehe 3.1.2

#### Schneiden des Vektors pET-3a

- NdeI

Vektor pET-3a	85 µL
10 x Buffer 0	10 µL
<u>NdeI (10 U / µL)</u>	<u>5 µL</u>
	100 µL

Inkubation auf 37°C, 2h

*NdeI* wurde schrittweise zugegeben: 3 µL zu Beginn, weitere 2 µL nach einer Stunde Inkubation.

- Reinigung der DNA durch GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit. Siehe 3.1.2 mit folgender Ausnahme:
- Elution in 82 µL sterilem dest. H<sub>2</sub>O.

- ***Bam*HI**

Vektor pET-3a	82 $\mu$ L
10 x <i>Bam</i> HI-Buffer	10 $\mu$ L
<i>Bam</i> HI (10 U / $\mu$ L)	6 $\mu$ L
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	
(1 U / $\mu$ L)	<u>2<math>\mu</math>L</u>
	100 $\mu$ L

Inkubation auf 37°C, 2h

CIAP wurde schrittweise zugegeben: 1  $\mu$ L nach 1 h Inkubation, ein weiterer  $\mu$ L nach 1,5 h Inkubation.

- Reinigung der DNA durch GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit. Siehe 3.1.2.
- 3  $\mu$ L des gereinigten, geschnittenen Plasmids wurden auf ein SYBR- Safe™ Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um den Restriktionserfolg zu überprüfen.

### 3.1.4.3 Geräte und Reagenzien

<b><i>Nde</i>I (10 U / <math>\mu</math>L)</b>	Fermentas
<b>Buffer 0</b>	Fermentas
<b><i>Bam</i>HI (10 U / <math>\mu</math>L)</b>	Fermentas
<b><i>Bam</i>HI-Buffer</b>	Fermentas
<b>CIAP (1 U / <math>\mu</math>L)</b>	Fermentas
<b>GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit</b>	Fermentas
<b>Tischzentrifuge</b>	

### 3.1.5 Ligation

#### 3.1.5.1 Methodik

Insert und Vektor wurden mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nde*I geschnitten, sodass sie gleiche Schnittstellen ergaben und anschließend mit einer Ligase ligiert werden konnten.

### 3.1.5.2 Durchführung

Bei der Ligation sollte das Konzentrationsverhältnis zwischen Vektor und Insert 1:10 betragen, um eine erfolgreiche Ligation zu ermöglichen.

Um festzustellen, wie viel DNA im Vergleich zum Vektor vorhanden ist, wurden sowohl vom Sulld2 Cox1 Insert, als auch vom Vektor 3  $\mu\text{L}$  auf ein SYBR-Safe<sup>TM</sup> Gel aufgetragen. Je länger ein DNA Stück ist, desto intensiver erscheint die DNA Bande am Gel im Transilluminator, da sich mehr Farbstoff an die DNA anlagern kann.

Es wurden drei Ligationsansätze parallel hergestellt, wobei bei Ansatz 1 und 2 die Menge des eingesetzten Insert variiert wurde, während Ansatz 3 als Kontrolle diente und kein Insert enthielt.

Ligationsansätze:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
T4-DNA Ligase (5 U / $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
T4-DNA 10 x Ligase Puffer	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Vektor pET 3a	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Insert Sulld2 Cox1	12 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$	---
Dest. H <sub>2</sub> O, steril	3 $\mu\text{L}$	---	15 $\mu\text{L}$
	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

Die Ligationsansätze wurden 72 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde eine Reinigung mittels GeneJet<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit durchgeführt, und die DNA wurde in 30  $\mu\text{L}$  sterilem dest. H<sub>2</sub>O eluiert. Siehe 3.1.2.

### 3.1.5.3 Geräte und Reagenzien

#### Sulld2 Cox1

#### pET-3a Vektor

T4-DNA Ligase (5 U /  $\mu\text{L}$ ) Fermentas

T4-DNA 10 x Ligase Puffer Fermentas

GeneJet<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit Fermentas

<b>E-Gel 1,2 % mit SYBR Safe™</b>	Invitrogen
<b>E-Gel Powerbase</b>	Invitrogen
<b>Transilluminator</b>	

### 3.1.6 Herstellung elektrokompetenter BL21(DE3)pLysS Zellen

#### 3.1.6.1 Methodik

Um Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen mittels Elektroporation einzuschleusen, benötigt man elektrokompetente Zellen, die mit dem unten angeführten Protokoll hergestellt werden können.

Um zu gewährleisten, dass bei der Elektroporation der Strom über die BL21(DE3)pLysS Zellen, und nicht über die Ionen in der Lösung geleitet wird, müssen sich die Zellen in einer Lösung mit sehr geringer Ionenstärke befinden. Daher wurden sie in 1 mM HEPES Puffer, pH 7 aufkonzentriert, wodurch eine Aufnahme des Plasmids in die Zellen ermöglicht wird.

#### 3.1.6.2 Durchführung

- 20 mL LB-Medium<sub>CM</sub> wurden mit BL21(DE3)pLysS-*E. coli*-Zellen beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm bebrütet.
- 1 L LB-Medium<sub>CM</sub> wurde mit 15 mL Kultur beimpft.
- Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wachsen gelassen, auf 4 sterile GSA-Zentrifugenbecher aufteilt und 15-30 Minuten auf Eis gestellt.
- Es wurde 6 min bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 250 mL 1 mM eisgekühltem HEPES-Puffer resuspendiert und 6 Minuten bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 125 mL 1 mM eisgekühltem HEPES-Puffer resuspendiert und wie oben zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 50 mL 1 mM eisgekühltem HEPES-Puffer resuspendiert und wie oben zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 15 mL 10%igem,



eisgekühltem Glycerin resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert.

- Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 3-5 mL 10%igem Glycerin resuspendiert.
- Die Zellsuspension wurde in 100 µL-Aliquoten auf eiskühlte Eppendorfhütchen aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.
- Die Lagerung erfolgte bei -80°C

### 3.1.6.3 Geräte und Reagenzien

#### 1 mM Hepes Puffer pH 7:

<u>Hepes</u>	238,3 mg
dest. H <sub>2</sub> O	1000 mL

#### 10% Glycerin:

<u>87% Glycerin</u>	5,75 mL
dest. H <sub>2</sub> O	44,25 mL

#### LB-Medium<sub>cm</sub>

LB-Medium	1 L
Siehe 3.1.3.3	
Chloramphenicol	25 µg / mL

#### Chloramphenicol-Stocklösung

25 mg Chloramphenicol / 1 mL 96% Ethanol  
Lagerung bei -20°C

#### Zentrifuge Model RC5C

Sorvall Instruments

#### GSA Zentrifugenbecher

#### Autoklav

Fritz Gössner, Hamburg

### 3.1.7 Elektroporation des Vektors in BL21(DE3)pLysS Zellen

#### 3.1.7.1 Methodik

Elektroporation ermöglicht es, DNA Fragmente in mikrobielle, pflanzliche, aber auch tierische Zellen einzuführen. Kurze Strompulse mit hoher Spannung können zur Bildung temporärer Poren in zellulären Plasmamembranen führen, wodurch externe DNA in die Zelle eingeschleust werden kann. Das Plasmid pET-3a mit dem integrierten Zielgen *SulId2 Cox1* kann somit in die *E. coli* Zellen transferiert werden, wo es vervielfältigt und bei Zellteilungen auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Somit entsteht eine Kolonie rekombinanter Klone.

#### 3.1.7.2 Durchführung

Die Elektroporation wurde bei 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 1000  $\Omega$  durchgeführt.

- 1 mL SOC-Medium wurde pro Ligationsansatz in einem sterilen Eppendorfhütchen auf 37°C vorgewärmt.
- Die beschichteten Elektroporations-Küvetten wurden auf Eis gelegt.
- Je 100  $\mu$ L elektrokompetente Zellen wurden auf -80°C gelagert. Diese wurden kurz vor der Elektroporation schnell aufgetaut. 15  $\mu$ L des Ligationsansatzes wurden zu den Zellen pipettiert, vermischt und dann in die Küvette überführt.
- Die Küvette wurde trocken gewischt, in den Elektroporator gestellt und die Elektroporation durchgeführt.
- Das vorgewärmte SOC-Medium wurde in die Küvette pipettiert und anschließend wieder zurück ins Eppendorfhütchen überführt.
- 30 minütige Inkubation auf 37°C.
- Die Zellen wurden auf LB-Agar<sub>Amp/Cm</sub>-Platten ausgestrichen. (200  $\mu$ L auf eine Platte, der Rest wurde abzentrifugiert, in wenig Medium wieder aufgenommen und auf einer weiteren Platte ausplattiert.)
- Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

**3.1.7.3 Geräte und Reagenzien****Elektrokompetente BL21(DE3)pLysSZellen** (siehe 3.1.6)**Elektroporations-Küvetten****Elektroporator**

BioRad Gene Pulser

**LB-Agar:**

NaCl 10 g

Pepton 10 g

Hefeextrakt 5 g

Agar-Agar 15 gdest. H<sub>2</sub>O 1000 mL

Wurde bei 120°C autoklaviert.

**LB-Agar<sub>Amp/Cm</sub>:**

LB-Agar

Ampicillin 100 µg / mL

Chloramphenicol 25 µg / mL

**Ampicillin-Stocklösung**

siehe 3.1.3.3

**Chloramphenicol**

siehe 3.1.6.2

**SOC Medium:**

Bactotrypton 20 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 0,58 g

KCl 0,19 g

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 2,03 g

Glucose 3,96 g

MgSO<sub>4</sub> 2,46 gdest. H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

Wurde bei 120°C autoklaviert.

### **pET-3a Vektor novagen**

### **Autoklav**

Fritz Gössner, Hamburg

## **3.1.8 Überprüfung der Transformation**

### **3.1.8.1 PCR Screening**

#### **3.1.8.1.1 Methodik**

Um zu überprüfen, ob die Kolonien auf den Platten auch tatsächlich das gewünschte Plasmid enthalten, wurde ein PCR Screening durchgeführt. Hierbei werden einzelne Kolonien von den Platten entnommen und eine PCR mit den Primern lang\_DG\_veg\_p1 und lang\_DG\_veg\_p2 (siehe 3.1.1.3) durchgeführt. Wenn sich das gewünschte Insert Sulld2 Cox1 in den Zellen befindet, wird dieses während der PCR amplifiziert, und anschließend bei der DNA Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht.

#### **3.1.8.1.2 Durchführung**

Das PCR Screening wurde mit 23 Sulld2 cox1-Klonen durchgeführt, ebenso wie eine Positiv- und eine Negativkontrolle.

#### PCR-Reaktionsmix:

Upstream Primer [10 pmol / µL]	15 µL
Downstream Primer [10 pmol / µL]	15 µL
dNTPs [25 mM]	4 µL
10 x Taq Buffer + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75 µL
Taq DNA Polymerase (1 U / µL)	9 µL
MgCl <sub>2</sub>	60 µL
<u>Steriles dest. H<sub>2</sub>O</u>	<u>331 µL</u>
	500 µL
Template	je 10 µL

Es wurden je 20 µL PCR-Reaktionsmix pro PCR Reaktionsgefäß vorgelegt. Die jeweiligen Klone wurden in 50 µL dest. H<sub>2</sub>O suspendiert und je 10 µL davon dienten als Template.

Thermocycler Bedingungen:

1 x	94°C	4 min
	94°C	40 sec
28 x	68°C	30 sec
	72°C	1 min
1 x	72°C	10 min

Für die Positivkontrolle wurden 8 µL dest. H<sub>2</sub>O vorgelegt und 2 µL eines Sull Cox1 PCR Produkts zugegeben.

Für die Negativkontrolle wurden 10 µL dest. H<sub>2</sub>O verwendet.

Die PCR Ansätze wurden nach der Amplifizierung auf ein SYBR<sup>TM</sup> Safe Gel aufgetragen und mit Hilfe der Powerbase aufgetrennt. Die Banden wurden im UV-Illuminator sichtbar gemacht (siehe 3.1.1.2)

### 3.1.8.1.3 Geräte und Reagenzien

<b>Taq DNA Polymerase (1 U / µL)</b>	Fermentas
<b>10x Taq Buffer + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Fermentas
dNTPs [25 mM]	
steriles dest. H <sub>2</sub> O	
<b>Techne T-312 Thermocycler</b>	
<b>E-Gel 1,2 % mit SYBR Safe<sup>TM</sup></b>	Invitrogen
<b>E-Gel Powerbase</b>	Invitrogen

### 3.1.8.2 Restriktionsscreening der Plasmid DNA

#### 3.1.8.2.1 Methodik

Das Restriktionsscreening ist eine weitere Methode, um zu überprüfen, ob die transformierten Zellen auch das richtige Insert enthalten. Hierfür müssen Restriktionsenzyme gewählt werden, die ein eindeutiges Schnittmuster und Genfragmente mit gut unterscheidbaren Längen ergeben.

#### 3.1.8.2.2 Durchführung

- Kolonien wurden von den Agarplatten nach der Transformation entnommen, eine Über-Nacht-Kultur (O/N) in 6 mL LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> angesetzt und bei 37°C und 180 rpm O/N bebrütet.
- Die O/N-Kultur wurde in Eppendorfhütchen überführt und 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
- Die Plasmid DNA wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit wie in Kapitel 3.1.3.2.1 isoliert, mit folgender Ausnahme:
  - Elution in 50 µL dest. H<sub>2</sub>O.

#### Restriktionsscreening mit *Xba*I und *Hind*III:

Plasmid DNA	10 µL
10 x Buffer Tango	5 µL
dest. H <sub>2</sub> O	31 µL
<i>Hind</i> III (10 U / µL)	2 µL
<u><i>Xba</i>I (10 U / µL)</u>	<u>2 µL</u>

Inkubation bei 37°C, 1,5 h

- DNA Purifikation wurde wie im Kapitel 3.1.2 durchgeführt.

### 3.1.8.2.3 Geräte und Reagenzien

#### LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub>:

LB-Medium

siehe (3.1.3.3)

Ampicillin 100 µg / mL

Chloramphenicol 25 µg / mL

<b>Restriktionsenzym <i>Xba</i>I (10 U / µL)</b>	Fermentas
<b>Restriktionsenzym <i>Hind</i>III (10 U / µL)</b>	Fermentas
<b>10 x Buffer Tango</b>	Fermentas
<b>Orbital Shaker</b>	Infors AG, Switzerland
<b>GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit</b>	
<b>Tischzentrifuge</b>	

### 3.1.8.3 Expressionsscreening

#### 3.1.8.3.1 Methodik

Das Expressionsscreening dient zur Überprüfung, ob die Klone, die das gewünschte DNA-Stück enthalten (Sull Cox1), auch tatsächlich das gesuchte Protein exprimieren bzw. in welcher Form das Protein exprimiert wird. Außerdem konnten durch das Expressionsscreening die Expressionsbedingungen (Temperatur, Dauer) optimiert werden. Es sollten jene Klone identifiziert werden, die die größte Menge des gewünschten Proteins in löslicher Form exprimieren.

Der lösliche Teil der Untereinheit II des Gens Sull2 Cox1 wurde im Expressionsvektor pET-3a in BL21(DE3)pLysS Zellen exprimiert. Die heterologe Überexpression von Sull2 Cox1 wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschossen und der Zellinhalt wurde auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

**3.1.8.3.2 Durchführung**

- Als Inokulum wurden je 3 mL LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> mit den Kolonien nach dem PCR-Screening beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm, bebrütet. Als Positivkontrolle wurden 3 mL LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> mit Sullj3 Cox2 beimpft und ebenfalls exprimiert, da dessen Expressionsbedingungen bereits bekannt und etabliert sind.
- Pro Klon wurden 2 mal 20 mL M9ZB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> mit dem Flüssiginokulum beimpft und auf 37°C bebrütet.
- Die Induktion der Expression erfolgte durch die Zugabe von IPTG [1 mM Endkonzentration].
- Pro Klon wurde ein Ansatz 4 h bei 37°C und 180 rpm exprimiert.
- Für die Ernte der Zellen wurden die Expressionsansätze 15 min bei 4500 rpm und 25°C abzentrifugiert (Heraeus).
- Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets auf -80°C gelagert.
- Die Zellpellets wurden aufgetaut und in je 5 mL Lysis Puffer resuspendiert und mit kurzen Ultraschallpulsen behandelt (je 3 mal für 40 sec).
- 1 mL pro Ansatz wurde entnommen, in ein Eppendorfhütchen überführt und 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand, sowie das in 200 µL dest. H<sub>2</sub>O resuspendierte Zellpellet der positiv gescreenten Klone, ebenso wie die Positivkontrolle wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen (siehe 3.4.4).

**Variation der Expressionsbedingungen von Sulld2 Cox1:**

Um die Expressionsbedingungen zu optimieren, wurde Sulld2 Cox1 bei verschiedenen Temperaturen exprimiert. Ebenso wurde die Dauer der Expression verändert. Alle Schritte wurden wie in 3.1.8.3.2 beschrieben durchgeführt, mit folgenden Ausnahmen:

- Expression von Sulld2 Cox1 für 4 h bei 30°C und 180 rpm.
- Expression von Sulld2 Cox1 für 20 h bei 16°C und 180 rpm.



**3.1.8.3.3 Geräte und Reagenzien****LB-Medium**<sub>Amp/Cm</sub>

siehe 3.1.8.2.3

**1 M IPTG Stock-Lösung:**238,3 mg IPTG / mL dest. H<sub>2</sub>O

Sterilfiltriert

Gelagert auf -20°C

**Lysis-Puffer:**

50 mM Tris/HCL pH 8,0      4 mL

2 mM EDTA pH 8,0      329 µL

Triton X-100      80 µL

1 mM PMSF      400 µL

0,5 M DTT      80 µLAuf 80 mL mit dest. H<sub>2</sub>O**Orbital Shaker**

Infors AG, Switzerland

**UV-VIS Spectrophotometer**

Pharmacia LKB

**Zentrifuge**

Beckmann Coulter TM

**Biofuge 17S**

Heraeus

**Zentrifuge**

Sigma, Germany Sigma 1-15

**Ultraschallsonde**

Sonics &amp; Materials Inc.

Vibra-Cell, type CV17

**Autoklave**

Fritz Gössner, Hamburg

**3.1.9 Herstellen einer Kryokultur****3.1.9.1 Methodik**

Um Klone zu lagern, werden Kryokulturen angelegt. Hierfür werden kryoprotektive Agenzien wie Glycerin verwendet.

### 3.1.9.2 Durchführung

- Als Inokulum wurden 5 mL LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> mit Sulld2 Cox1 beimpft und über Nacht auf 37°C bei 180 rpm, bebrütet.
- 2 Kryoröhrchen wurden mit je 900 µL Zellsuspension befüllt.
- In jedes Kryoröhrchen wurden 900 µL 30%iger Glycerol steril zugegeben.
- Glycerol und Zellsuspension wurden durch Pipettieren gut durchmischt.
- Lagerung der Kryokulturen bei -80°C.

### 3.1.9.3 Geräte und Reagenzien

**LB-Medium**<sub>Amp/Cm</sub>

siehe 3.1.8.2.3

**30% Glycerol**

Autoklaviert bei 121°C, 20 min

**Orbital Shaker**

Infors AG, Switzerland

**2 ml Cryo Vials**

Nalgene

**Autoklave**

Fritz Gössner, Hamburg

### 3.1.10 Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass die positiv gescreenten und exprimierenden Klone genetisch auch tatsächlich mit den Wildtyp-Sequenzen ident sind, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die tatsächliche Sequenz von Sulld1 Cox1 wurde mit der Originalsequenz verglichen, um Mutationen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz mit sich bringen, auszuschließen.

#### 3.1.10.1 Vorbereitung der Plasmid DNA für die Sequenzierung

- Es wurden 15 mL LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> mit Sulld2 Cox1 beimpft und über Nacht auf 37°C bei 180 rpm bebrütet.
- Die Plasmid DNA wurde mittels GeneJet<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit gereinigt. Siehe 3.1.3.2.1, mit folgender Ausnahme:
- Elution in 50 µL AD.

### 3.1.10.2 Sequenzierungsreaktion

Die eigentliche Sequenzierungsreaktion wurde von der Firma I.B.L (Wagramerstr. 93/5/13, 1220 Wien) durchgeführt. Als Sequenzierungsprimer wurden die T7-Promotor- und Terminator-Primer verwendet.

### 3.1.10.3 Geräte und Reagenzien

<b>T7-Promoter-Primer [5 pmol / µL]</b>	Novagene
<b>T7-Terminator-Primer [5 pmol / µL]</b>	Novagene
<b>Vektor mit SUIId2 Cox1 Sequenz</b>	
<b>Software</b>	DNASar SeqMan 4.0

## 3.2 Klonierung Cox2

### 3.2.1 Amplifizierung des Sullid7 Cox2

#### 3.2.1.1 Methodik

Siehe 3.1.1.1

#### 3.2.1.2 Durchführung

Folgende Primer wurden für die PCR von Sull Cox2 verwendet:

**Upstream Primer 1: Sull\_DG\_hetero\_p1**

5' GGAATTCCAT ATGAACCAAATGGGAGG '3

28 Basen

**Downstream Primer 2: Sull\_j3\_cox2\_p2**

5' CGGGATCCTGACTACTTGTG '3

20 Basen

Die verwendeten Primer definierten ein 642 bp langes Genstück.

PCR-Reaktionsmix:

Template	5 µL
(Nostoc sp. PCC 7120 von Schrägagarkultur des Pasteur Instituts wurde steril entnommen und in 5 µL AD suspendiert)	
Upstream Primer [10 pmol / µL]	5 µL
Downstream Primer [10 pmol / µL]	5 µL
dNTPs [25 mM]	2 µL
10 x Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	10 µL
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	5 µL
DyNAzyme™ DNA Polymerase von Finnzymes [1U / µL]	2 µL
<u>steriles dest. H<sub>2</sub>O</u>	<u>66 µL</u>
	100 µL

Bei der Negativkontrolle wurde das Template durch dest. H<sub>2</sub>O ersetzt. Als Positivkontrolle diente ein DNA Fragment Sull Cox2 von vorhergehenden Amplifikationen.

## Thermocycler Bedingungen:

<u>1 x</u>	<u>94°C</u>	<u>10 min</u>
	94°C	40 sec
30 x	49°C	30 sec
	72°C	1 min
<u>1 x</u>	<u>72°C</u>	<u>10 min</u>

Die PCR wurde im Techne Thermocycler TC-312 durchgeführt. Es wurde die Hot Start Methode angewandt, wobei die DyNAzyme DNA Polymerase erst nach 8 min des ersten Denaturierungsschritts bei 94°C zugegeben wurde, um eine vollständige Zerstörung der Zellen und Denaturierung der DNA zu gewährleisten.

Der Erfolg der Ampifizierung wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (siehe 3.1.1.2). Die erfolgreichen PCR-Ansätze wurden mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit gereinigt, siehe 3.1.2.

### 3.1.3 Geräte und Reagenzien

<b>Kultur <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120</b>	Pasteur Institut, Paris, Frankreich
<b>Primer</b>	genXpress, Wr. Neudorf, Österreich
Upstream Primer 1: Sull_DG_hetero_p1	
Downstream Primer 2: Sull_j3_cox2_p2	
<b>DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase</b>	Finnzymes
[1 U / µL]	
10 x EXT Puffer + MgCl <sub>2</sub> [1,5 mM]	Finnzymes
10 x EXT Puffer - MgCl <sub>2</sub>	Finnzymes
MgCl <sub>2</sub> -Lösung, [50 mM]	Finnzymes
steriles dest. H <sub>2</sub> O	
<b>25 mM dNTP Mix</b>	Fermentas
<b>Techne T-312 Thermocycler</b>	
<b>E-Gel 1,2 % mit SYBR Safe™</b>	Invitrogen
<b>E-Gel Powerbase</b>	Invitrogen

### 3.2.2 Präparation des Vektors pET3a

Siehe 3.1.3.

### 3.2.3 Restriktionsverdau des Vektors und des PCR-Produkts

Siehe 3.1.4

### 3.2.4 Ligation

#### 3.2.4.1 Methodik

Siehe 3.1.5.1

#### 3.2.4.2 Durchführung

Siehe 3.1.5.2 mit folgender Änderung:

Ligationsansätze:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
T4-DNA Ligase (5 U / $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
T4-DNA 10 x Ligase Puffer	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Vektor pET-3a	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
Insert Sulld7 Cox2	12 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	---
Dest. H <sub>2</sub> O	2 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$	14 $\mu\text{L}$
	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

Die Ligationsansätze wurden 72 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde eine Reinigung mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit durchgeführt. Siehe 3.1.2 mit folgender Ausnahme:

- Elution in 30  $\mu\text{L}$  dest. H<sub>2</sub>O.

#### 3.2.4.3 Geräte und Reagenzien

Siehe 3.1.5.3

### 3.2.5 Herstellung elektrokompenter BL21(DE3)pLysS Zellen

Siehe 3.1.6

### 3.2.6 Elektroporation in BL21(DE3)pLysS Zellen

#### 3.2.6.1 Methodik

Siehe 3.1.7.1

#### 3.2.6.2 Durchführung

Die Elektroporation wurde bei 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 1000  $\Omega$  durchgeführt.

- 1 mL SOC-Medium wurde pro Ligationsansatz in einem sterilen Eppendorfhütchen auf 37°C vorgewärmt.
- Die beschichteten Elektroporations-Küvetten wurden auf Eis gelegt.
- Je 50  $\mu$ L elektrokompente Zellen wurden auf -80°C gelagert. Diese wurden kurz vor Elektroporation schnell aufgetaut. 20  $\mu$ L des Ligationsansatz wurden zu den Zellen pipettiert, vermischt und dann in Küvette überführt.
- Küvette wurde trocken gewischt und in Elektroporator gestellt und die Elektroporation durchgeführt.
- Das vorgewärmte SOC-Medium wurde in die Küvette pipettieren und anschließend wieder zurück ins Eppendorfhütchen überführt.
- 30 minütige Inkubation auf 37°C.
- Die Zellen wurden auf LB-Agar<sub>Amp/Cm</sub>-Platten ausgestrichen. (150  $\mu$ L auf eine Platte. Vom Rest wurden 350  $\mu$ L verworfen und die verbleibenden 500  $\mu$ L wurden zentrifugiert, in wenig Medium wieder aufgenommen und auf einer weiteren Platte ausplattiert.)
- Die Inkubation erfolgte über Nacht auf 37°C.

#### 3.2.6.3 Geräte und Reagenzien

Siehe 3.1.7.3

### 3.2.7 Überprüfung der Transformation

#### 3.2.7.1 PCR Screening

##### 3.2.7.1.1 Methodik

Siehe 3.1.8.1.1

##### 3.2.7.1.2 Durchführung

Das PCR Screening wurde mit 20 Sull *cox2*-Klonen durchgeführt, ebenso wie je eine Positiv- und eine Negativkontrolle.

##### PCR-Reaktionsmix:

Upstream Primer [10 pmol / $\mu\text{L}$ ]	15 $\mu\text{L}$
Downstream Primer [10 pmol / $\mu\text{L}$ ]	15 $\mu\text{L}$
dNTPs [25 mM]	4 $\mu\text{L}$
10x Taq Buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	75 $\mu\text{L}$
Taq DNA Polymerase (1 U / $\mu\text{L}$ )	9 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$	60 $\mu\text{L}$
<u>dest. <math>\text{H}_2\text{O}</math></u>	<u>331 <math>\mu\text{L}</math></u>
	500 $\mu\text{L}$

Template je 10  $\mu\text{L}$

Es wurden je 20  $\mu\text{L}$  PCR-Reaktionsmix pro PCR Reaktionsgefäß vorgelegt. Die jeweiligen Klone wurden in 50  $\mu\text{L}$  sterilem dest.  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert und je 10  $\mu\text{L}$  davon dienten als Template.

##### Thermocycler Bedingungen:

1 x	94°C	4 min
	94°C	40 sec
28 x	68°C	30 sec
	72°C	1 min
1 x	72°C	10 min



Für die Positivkontrolle wurden 8 µL dest. H<sub>2</sub>O vorgelegt und 2 µL ein Genstück Sull Cox2 zugegeben, das mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten wurde (3.2.4).

Für die Negativkontrolle wurden 10 µL dest. H<sub>2</sub>O verwendet.

Die PCR Ansätze wurden nach der Amplifizierung auf ein SYBR™ Safe Gel aufgetragen und mit Hilfe der Powerbase aufgetrennt. Die Banden wurden im UV-Illuminator sichtbar gemacht.

#### **3.2.7.1.3 Geräte und Reagenzien**

Siehe 3.1.8.1.3

#### **3.2.7.2 Expressionsscreening**

Siehe 3.1.8.2

#### **3.2.8 Herstellen einer Kryokultur**

Siehe 3.1.9.

#### **3.2.9 Sequenzierung**

Siehe 3.1.10

### **3.3 Heterologe Expression von Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1**

#### **3.3.1 Methodik**

Die löslichen Proteine Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1 wurden im Cytoplasma von *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit Hilfe des Plasmids pET-3a exprimiert.

### 3.3.2 Durchführung

- Je 30 mL LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> wurden mit Sullj3 Cox1 bzw. Sulld2 Cox1 beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm bebrütet.
- Pro Klon wurden je 15 mL als Inokulum für 1 L M9ZB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> verwendet, welches gleichmäßig und steril auf zwei 2000 mL Erlenmeyer-Kolben aufgeteilt wurde. Insgesamt wurden je 2 L M9ZB- Medium<sub>Amp/Cm</sub> beimpft.
- Die Ansätze wurden bei 37°C und 180 rpm bebrütet bis ein OD<sub>600</sub> von 1,2 erreicht wurde.
- Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von IPTG [1 mM] Endkonzentration.
- Für die Induktion wurden die Ansätze weitere 4 h bei 37°C und 180 rpm bebrütet.
- Für die Ernte der Zellen wurden die Expressionsansätze 15 min bei 4000 rpm und 25°C abzentrifugiert (Beckmann; JA-10 Rotor).
- Die Pellets wurden in wenig Medium resuspendiert, in Falcon-Röhrchen überführt und weitere 15 min bei 4500 rpm zentrifugiert (Heraeus).
- Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets auf -80°C gelagert.

### 3.3.3 Geräte und Reagenzien

**LB-Medium**<sub>Amp/Cm</sub>

Siehe 3.1.8.2.3

**M9ZB-Medium:**

#### Lösung A

Pepton	10 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
<u>NH<sub>4</sub>Cl</u>	<u>1 g</u>
dest. H <sub>2</sub> O	ad 800 mL

**Lösung B**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	12 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	24 g
dest. $\text{H}_2\text{O}$	ad 400 mL

**Lösung C**

Glucose	16 g
dest. $\text{H}_2\text{O}$	ad 400 mL

**Lösung D**

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12,3 g
dest. $\text{H}_2\text{O}$	ad 50 mL

Alle Lösungen wurden bei 120°C autoklaviert.

Mischen der vier Lösungen:

Lösung A	800 mL
Lösung B	100 mL
Lösung C	100 mL
Lösung D	1 mL

**M9ZB-Medium<sub>Amp/Cm</sub>**

M9ZB-Medium

1 mL Ampicillin-Stocklösung [100 mg / mL] (siehe 3.1.3.3)

1 mL Chloramphenicol-Stocklösung [25 mg / mL] (siehe 3.1.6.3)

**1 mL IPTG Stock**

1 M IPTG (siehe 3.1.8.3.3)

**Orbitalschüttler**

Infor AG, Switzerland

**Zentrifuge Beckmann Coulter TM**

JA-10 Rotor

**Biofuge 17S**

Heraeus

**Autoklave**

Fritz Gössner, Hamburg

## 3.4 Proteinreinigung Sullj3 Cox2

### 3.4.1 Zellaufschluss Sullj3 Cox2

#### 3.4.1.1 Methodik

Um die löslichen, rekombinanten Proteine aus dem Cytosol zu befreien wird sowohl die Zellmembran als auch die Cytoplasmamembran der *E. coli*-Zellen aufgebrochen. Um den proteolytischen Verdau der rekombinanten Proteine zu verhindern, werden Proteaseinhibitoren (Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF) zugegeben. Die darauf folgende Ultraschallbehandlung dient zur Zerstörung der freigesetzten DNA. Die festen Zellbestandteile werden durch Zentrifugation von den löslichen Teilen abgetrennt. Anschließend werden sich im Pool befindliche Fremdproteine in weiteren Chromatographie-Schritten (Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose Fast Flow und DEAE, sowie mittels Gelpermeationschromatographie mit Superdex 75) vom rekombinanten Protein getrennt.

Da die Expression ohne Kupfer erfolgt, wird das rekombinante Protein als Apoprotein exprimiert. DTT (Dithiotreitol), ein reduzierendes Agens, wird zugesetzt, um die beiden Cysteinreste im  $\text{Cu}_A$ -Zentrum im reduzierten Zustand zu halten. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die Rekonstitution des aktiven  $\text{Cu}_A$ -Zentrums, welche nach dem ersten Chromatographieschritt durchgeführt wird.

#### 3.4.1.2 Durchführung

- Zellpellets aus 2 L Expressionsmedium wurden aufgetaut und in 80 mL Aufschlusslösung resuspendiert. Der Proteaseinhibitor PMSF und das reduzierende Agens DTT wurden zugegeben.
- Die viskose Lösung wurde 3 mal 40 sec mit einer Ultraschallsonde behandelt. Um eine starke Erwärmung zu verhindern, wurden diese Schritte auf Eis durchgeführt.
- Um die festen Zellbestandteile von den löslichen Proteinen zu trennen, wurde 20 min bei 18.000 rpm zentrifugiert.

- Der Überstand wurde mittels Vakuumpumpe filtriert und entgast.

### 3.4.1.3 Geräte und Reagenzien

<b>Lysis-Puffer</b>		Siehe 3.1.8.3.3
<b>200 mM PMSF-Stocklösung</b>		(Phenylmethylsulfonylfluorid)
<u>PMSF</u>	34,8 mg	Sigma
in Isopropanol	1 mL	
<b>0,5 M DTT-Stocklösung</b>		(Dithiotreitol)
<u>DTT</u>	0,0771 g	Sigma
In dest. H <sub>2</sub> O	1 mL	
<b>Zentrifuge Model RC5C</b>		Sorvall Instruments
<b>SS-34-Rotor</b>		Sorvall Instruments
<b>Ultraschallgerät Vibra-Cell Model CV17</b>		Sonics & Materials Inc.
<b>Membran-Vakuum Pumpe</b>		Vacuubrand CVC 2
<b>Nalgene Filtertrichter</b>		315-0047
<b>Milipore Filter</b>		HVP04700
		(Porengröße 0,45 µm)

## 3.4.2 Chromatographische Reinigung von Sullj3 Cox2

### 3.4.2.1 Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF (Fast Flow)

#### 3.4.2.1.1 Methodik

Q-Sepharose Fast Flow ist ein starker Anionenaustauscher. Die Ionenaustauschergruppen sind quartäre Aminogruppen  $-N^+(CH_3)_3$ . Die positive Ladung ist über einen weiten pH-Bereich gewährleistet. Beim Auftrag des negativ geladenen Proteins Sullj3 Cox2 auf die Säule kommt es zu einer

Interaktion mit den positiv geladenen Gruppen der Q-Sepharose, welche das Protein an die Säule bindet. Die Elution des Proteins kann entweder durch eine Veränderung des pH-Werts oder durch die Variation der Salzkonzentration erfolgen. Ist der pH-Wert auf der Säule höher als der  $pI$  des Proteins, bindet das Protein an einen Anionenaustauscher. Ist der pH-Wert jedoch niedriger als der  $pI$  des Proteins, bindet das Protein an einen Kationenaustauscher. Bei der Elution durch erhöhte Salzkonzentration wird häufig NaCl verwendet. Durch die erhöhte Chloridkonzentration wird das Protein von der Säule verdrängt und wird in einer konzentrierten und gereinigten Form eluiert.

#### **3.4.2.1.2 Durchführung**

Alle Puffer wurden filtriert, 7 min im Ultraschallbad entgast und mit DTT [0,5 mM] versetzt. Alle Chromatographieschritte wurden auf 4°C durchgeführt.

##### **3.4.2.1.2.1 Vorbereitung der Säule**

Vor jeder chromatographischen Reinigung musste die Q-Sepharose FF gereinigt, regeneriert und neu gepackt werden:

- Das Gel wurde in eine Filternutsche überführt und mit dem dreifachen Volumen 1M NaOH regeneriert, um noch am Gel haftenden Proteinreste zu entfernen.
- NaOH wurde mit 5 L dest. H<sub>2</sub>O ausgewaschen.
- Das Gel wurde 15 min im Vakuum entgast.
- Vom Säulenboden wurden einige mL entgastes dest. H<sub>2</sub>O mit Hilfe einer Spritze eingepresst, um Luftblasen zu entfernen.
- Das Gel wurde mit Hilfe eines Glasstabs in die Säule gefüllt.
- Nachdem sich das Gel vollständig abgesetzt hat, wurde der Säule der obere Stempel luftblasenfrei aufgesetzt.
- Eine peristaltische Pumpe wurde angeschlossen, und die Säule wurde mit dest. H<sub>2</sub>O (3 mL / min) gespült, um das Absetzen des Gels zu gewährleisten.

**3.4.2.1.2.2 Proteinreinigung**

- Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen (CV) (300 mL) dest. H<sub>2</sub>O gewaschen (2 mL / min).
- Äuqiblirierung mit 2 CV (300 mL) Puffer A (3 mL / min).
- Die vorbereitete Probenlösung (siehe 3.4.1) wurde aufgetragen (3 mL / min).
- Die Säule wurde mit 2 CV (300 mL) Puffer A gespült, um nicht gebundenes Protein zu entfernen.
- Die Elution des Proteins wurde durch die stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration im Elutionspuffer (3 mL / min) eingeleitet: 150 mL des Stufengradienten 10 % Puffer B und 150 mL des Stufengradienten 20 % Puffer B. Es wurden 6 mL Fraktionen im Fraktionskollektor gesammelt.
- Um auch das restliche Fremdprotein von der Säule zu entfernen, wurde mit 2 CV (300 mL) Puffer B weiter eluiert.
- Die Säule wurde mit 200 mL dest. H<sub>2</sub>O und 200 mL 20 % Ethanol gespült.
- Für längere Lagerungen musste die Säule in 20 % Ethanol gelagert werden.
- Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.4.4) auf das gesuchte Protein getestet. Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten wurden gepoolt, mit PMSF [0,2 mM] und DTT [0,5 mM] versetzt und auf 4 °C gelagert.

**3.4.2.1.3 Geräte und Reagenzien****Puffer A**

50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8 g

dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 mL

pH wurde auf 7,0 eingestellt.

**Puffer B**

500 mL Puffer A + 1 M NaCl

**Stufengradient 10 % Puffer B**

135 mL Puffer A + 15 mL Puffer B

**Stufengradient 20 % Puffer B**

120 mL Puffer A + 30 mL Puffer B

**20 % Ethanol****0,5 M DTT-Stocklösung**

(siehe 3.4.1.3)

**200 mM PMSF-Stocklösung**

(siehe 3.4.1.3)

**1M NaOH**NaOH 39,997 gdest. H<sub>2</sub>O auf 1000 mL**Q-Sepharose Fast Flow**

Amersham Pharmacia Biotech

150 mL (Nr. 17-0510-01)

**Säule**

Pharmacia; D = 2,6 cm;

l = 28 cm; V = 150mL

**Peristaltische Pumpe**

Pharmacia Peristaltic Pump

P-1; Ø = 3.1 mm

**Membran-Vakuum Pumpe**

Vacuumbrand CVC 2

**Nalgene Filtertrichter**

315-0047

**Milipore Filter**

HVP04700

(Porengröße 0,45 µm)

**Ultraschallbad**

Bandelin Sonorex Super RK

510 H

**Quetschpumpe**

Pharmacia Peristaltic Pump

P-1; Ø 3,1 mm

**Fraktionkollektor**LKB 2111 MultiRac (Pharmacia  
Biotech)



### 3.4.2.2 Kupfer Rekonstitution von Sullj3 Cox2 mittels Dialyseverfahren

#### 3.4.2.2.1 Methodik

Bei der rekombinanten Herstellung von Sull Cox in *E. coli*, wird in das aktive Zentrum des Enzyms, das Cu<sub>A</sub>-Zentrum, kein Kupfer eingebaut, da *E. coli* Zellen nicht über die nötigen Chaperone verfügen. Cu<sup>2+</sup> wird in *E. coli* Zellen in andere Proteine eingebaut. Freie Cu<sup>2+</sup> Ionen würden in *E. coli* Zellen durch O<sub>2</sub>-Aktivierung für die Zellen toxische Sauerstoffradikale bilden. Daher muss im Apoprotein das Cu<sub>A</sub>-Zentrum rekonstituiert werden. Da bereits etablierte Methoden [9] bei Sullj3 Cox2 nicht erfolgreich waren, wurde ein alternatives Verfahren entwickelt: das Apoprotein wird durch Zugabe von Harnstoff entfaltet. Anschließend wird das Enzym über schrittweise Entfernung des Harnstoffs durch Dialyse wieder rückgefaltet und Cu(His)<sub>2</sub> zugegeben, um die Kupferionen in das aktive Zentrum einzubauen.

#### Dialyse

Dialyse ist ein konzentrationgetriebener Membranprozess mit dessen Hilfe man niedermolekulare Substanzen aus Lösungen entfernen kann. Niedermolekulare Substanzen diffundieren durch eine semipermeable Membran, wodurch es zu einem Konzentrationsausgleich kommt.

#### 3.4.2.2.2 Durchführung

- 100 mL Proteinlösung wurden nach Reinigung mit Q-Sepharose FF (siehe 3.4.2.1) mit DTT [0,2 mM] versetzt, und 1h bei 4°C mit 3 M Harnstoff inkubiert.
- Die Dialyseschläuche wurden 1 h in dest. H<sub>2</sub>O gekocht.
- Die Proteinlösung wurde gleichmäßig auf zwei Dialyseschläuche aufgeteilt. Die Schläuche wurden mit Clips verschlossen und in Puffer I inkubiert.
- Dialyse:

- I) 5000 mL 20 mM Phosphatpuffer pH 6,5 + 1 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 4 h bei 4°C
- II) 2500 mL 20 mM Phosphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:25  
Inkubation über Nacht bei 4°C
- III) 2000 mL 20 mM Phosphatpuffer pH 6,5 + 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub>**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:20  
Inkubation von 4h bei 4°C

- Um einen ausreichenden Dialyseeffekt zu erreichen, wurden die Lösungen und Schläuche während der Inkubation durch Magnetrührer in Bewegung gehalten.
- Anschließend wurde die Proteinlösung für die folgenden Reinigungsschritte filtriert und entgast.
- Alle Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

#### **3.4.2.2.3 Geräte und Reagenzien**

##### **20 mM Phosphatpuffer (PP), pH 6,5:**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,72 g  
Dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 mL  
pH wurde auf 6,5 eingestellt.

##### **Dialysepuffer I:**

1 M Harnstoff in 20 mM PP, pH 6,5

##### **Dialysepuffer II:**

20 mM PP, pH 6,5

##### **Dialysepuffer III:**

20 mM PP + 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub>, pH 6,5

**100 mM Cu(His)<sub>2</sub>:**

Kupfer(II)acetat	0,199 g
Histidin	0,310 g
Dest. H <sub>2</sub> O auf	10 mL

<b>DTT</b>	(siehe 3.4.1.3)
<b>Dialyseschläuche</b>	Sigma, Zellulosemembran Durchmesser: 25 mm Ausschlussgröße: 12.000 Da
<b>Magnetrührer</b>	IKAMAG RO, Janke & Kunkel, IKA Werk
<b>Glasstab</b>	
<b>Clips</b>	
<b>Membran-Vakuum Pumpe</b>	Vacuubrand CVC 2
<b>Nalgene Filtertrichter</b>	315-0047
<b>Milipore Filter</b>	HVP04700

**3.4.2.2 Anionenaustauschchromatographie mit DEAE****3.4.2.2.1 Methodik**

Diethylaminoethyl (DEAE), bestehend aus einer Polymethylacrylat Matrix, ist ein schwacher Anionenaustauscher und ist stabil bei einem pH zwischen 2 und 9,5. Negativ geladene Proteine binden an die positiv geladene Matrix. Das Protein liegt in seiner anionischen Form vor, wenn der pH-Wert des Arbeitspuffers höher ist als der pI des Proteins. Dementsprechend wird der pH-Wert des Ladepuffers nach dem pI-Wert des zu reinigenden Proteins gewählt.

**3.4.2.2.2 Durchführung**

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden filtriert und 7 min im Ultraschallbad entgast. Die Reinigung wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Das Säulenvolumen (CV) beträgt 75 mL.

**3.4.2.2.1 Vorbereitung der Säule**

Siehe 3.4.2.1.2.2

**3.4.2.2.2 Proteinreinigung**

- Um Ethanol zu entfernen, wurde die Säule mit 2 CV entgastem dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Flussrate wurde auf 2 mL / min eingestellt.
- Die Äquilibration der Säule wurde durch das Auftragen von 2 CV von Puffer A bei einer Flussrate von 3 mL / min erreicht.
- Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 3 mL / min aufgetragen.
- Waschen der Säule mit 2 CV Puffer A.
- Das gebundene Protein wurde durch das schrittweise Erhöhen der NaCl Konzentration in Puffer A erreicht: 90 mL 7 % Stufengradient Puffer B, 90 mL 10 % Stufengradient Puffer B und 90 mL 13 % Stufengradient Puffer B bei einer Flussrate von 2,5 mL / min.
- Es wurden 5 mL Fraktionen händisch gesammelt.
- Um jegliche Proteinreste von der Säule zu entfernen, wurde die Säule mit 2 CV Puffer B, 2 CV dest. H<sub>2</sub>O und 20 % Ethanol bei einer Flussrate von 3 mL / min gewaschen.
- Die Sullj3 Cox2 enthaltenden Fraktionen wurden nach Farbe gepoolt.
- 200 mM PMSF und 0,5 M DTT wurden zum Proteinpool zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,2 mM PMSF und 0,5 mM DTT zu erreichen.
- Der Proteinpool wurde mit Amicon Centripreps aufkonzentriert (3.4.3).

**3.4.2.2.3 Geräte und Reagenzien****Puffer A:****50 mM Phosphatpuffer pH 6,5**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8 g

dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 mL

pH wurde getestet und auf 6,5 eingestellt

**Puffer B:****50 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl pH 6,5:****Stufengradient 7 % B:**

Puffer A 93 mL

Puffer B 7 mL

**Stufengradient 10 % B:**

Puffer A 90 mL

Puffer B 10 mL

**Stufengradient 13 % B:**

Puffer A 87 mL

Puffer B 13 mL

**20% Ethanol****200 mM PMSF und 0,5 M DTT**

Siehe 3.4.1.3.

**Säulenmedium**Merck Fractogel EMD 650s  
DEAE ("tentacle")**Säule**Pharmacia  $\varnothing = 2.6$  cm;  
l = 12 cm; V = 65 ml**Peristaltische Pumpe**Pharmacia Peristaltic Pump  
P-1;  $\varnothing = 3.1$  mm**Membran Vakuumpumpe**

Vacuumbrand CVC2

**Nalgene Filtertrichter**

315-0047

**Millipore filter**

HVP04700

Porengröße 0,45  $\mu$ m**Ultraschallbad**Bandelin Sonorex  
Super RK 510 H

**Amicon Centripreps YM-10**

Maximales Füllvolumen: 15 mL

Endvolumen 0,6 – 0,7 mL

**RC-5C Zentrifuge**

Sorvall Instruments, DuPont

**Rotor GSA**

Sorvall Instruments

**3.4.2.3 Gelpermeationschromatographie mit Superdex 75****3.4.2.3.1 Methodik**

Gelpermeationschromatographie ist eine Methode der Größen-Ausschluss, oder Size-Exclusion Chromatographie. Partikel unterschiedlicher Größe weisen unterschiedliche hydrodynamische Volumina auf und eluieren folglich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch eine stationäre Phase.

Die Proteinprobe wird in möglichst kleinem Volumen auf die Säule aufgetragen und wird durch das Elutionsmedium im Auftrennungsmedium weitertransportiert. Partikel eluieren nach ihrer Größe. Kleine Partikel diffundieren in die Poren des Auftrennungsmediums, welches in Form von Gel beads in der Säule gepackt vorliegt. Größere Partikel können aufgrund ihres Volumenausmaßes nicht in die Poren des Gels diffundieren und werden mit dem Elutionsmedium von der Säule gewaschen, während kleine Partikel, in Reihenfolge ihrer Größe, verspätet eluieren.

Gele, die als Auftrennungsmittel in der Gelpermeationschromatographie dienen, haben eine genaue und sorgfältig überprüfte Porengröße, um einen präzisen Auftrennungserfolg zu erzielen. Weiters weisen die verwendeten Materialien höchste physikalische und chemische Stabilität, sowie Inertheit auf.

**3.4.2.3.2 Durchführung**

Das ÄktaPurifier FPLC System wurde verwendet, um diesen Reinigungsschritt durchzuführen. Der Maximaldruck wurde auf 1,8 MPa, der UV-Detektor auf 280, 480 und 535 nm und die Flussrate auf 0,7 mL / min eingestellt. Alle Puffer und Lösungen wurden filtriert und im Ultraschallbad entgast. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Um Ethanol zu entfernen, wurde die Säule mit 2 CV entgastem dest. H<sub>2</sub>O gewaschen.
- Die Säule wurde mit 2 CV SEC-Puffer äquilibriert.
- Die Proteinlösung wurde 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- 90 µL Proteinlösung wurden pro Lauf auf die Säule aufgetragen, wobei eine 100 µL Probenschleife verwendet wurde.
- 10 mL Fraktionen wurden vor der Elution des Proteins gesammelt. Während der Proteinelution wurde die Fraktionsgröße auf 0,3 mL umgestellt.
- Zwischen den einzelnen Läufen wurde die Säule mit 10 mL SEC-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Lauf wurden 2 CV SEC-Puffer und 2 CV dest. H<sub>2</sub>O über die Säule gepumpt.
- Anschließend wurde die Säule mit 2 CV 20 % Ethanol bei einer Flussrate von 0,5 mL / min gewaschen.
- UV-VIS-Absorptionsspektren der Fraktionen wurden aufgenommen.
- Um den Reinigungserfolg zu überprüfen, wurden die Fraktionen auf eine SDS-PAGE aufgetragen (siehe 3.4.4).
- Die Fraktionen wurden gepoolt und mittels Amicon Centripreps auf 1 mL aufkonzentriert (siehe 3.4.3).

#### **3.4.2.3.3 Geräte und Reagenzien**

##### **SEC-Puffer:**

KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> [67 mM]                      9,12 g

KCl [150 mM]                              11,18 g

dest. H<sub>2</sub>O                                      auf 1000 mL

pH 7,0 wurde durch Zugabe von 6 M NaOH eingestellt

##### **20% Ethanol**

##### **Säulenmedium**

Pharmacia Biotech

Superdex™ 75, 24 mL bed  
volume, code no. 17-1047-01

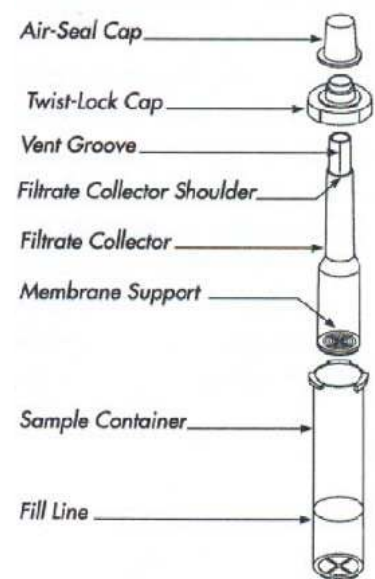
Ausschlussgröße: 100 000 Mr

<b>ÄKTApurifizier</b>	1,8 MPa Maximaldruck Pharmacia Pump P-900 UV-detector UV-900 pH-meter / conductivity cell pH/C-900 Box 900
<b>Fraktionskollektor</b>	Frac-900, Pharmacia
<b>Membran Vakuumpumpe</b>	vacuumbrand CVC2
<b>Nalgene Filtertrichter</b>	315-0047
<b>Millipore filter</b>	HVP04700 Porengröße 0,45 µm
<b>Ultraschallbad</b>	Sonorex Super RK 510 H, Bandelin
<b>Amicon Centripreps YM-10</b>	Maximales Füllvolumen: 15 mL Endvolumen 0,6 – 0,7 mL
<b>RC-5C Zentrifuge</b>	Sorvall Instruments, DuPont
<b>Rotor GSA</b>	Sorvall Instruments, DuPont

### 3.4.3 Aufkonzentration der Proteinlösungen mit Amicon Centripreps

#### 3.4.3.1 Methodik

Zwischen den einzelnen Reinigungsschritten muss das Volumen der Proteinlösungen reduziert werden. Amicon Centripreps basieren auf dem Prinzip der Ultrafiltration. Proteinlösungen können gereinigt, aufkonzentriert und entsalzt werden. Im Gravitationsfeld der Zentrifuge wandern kleinere Moleküle durch eine Zellulosemembran mit definierter Ausschlussgröße, während größere Moleküle im Probenbehälter zurück gehalten werden. Das Maximalvolumen des Probenbehälters beträgt 15 mL.





### 3.4.3.2 Durchführung

- 15 mL der Proteinlösung wurden in Amicon Centripreps überführt.
- Die Centripreps wurden zusammengesetzt und 20 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis das gewünschte Endvolumen erreicht wurde.

### 3.4.3.3 Geräte und Reagenzien

**Amicon Centriprep YM-3 and YM-10**

Maximales Füllvolumen: 15 mL

Endvolumen: 0,6 – 0,7 mL

**RC-5C Zentrifuge**

Sorvall Instruments, Du Pont

**Rotor GSA**

Sorvall Instruments, Du Pont

## 3.4.4 SDS-PAGE

### 3.4.4.1 Methodik

Viele Biomoleküle wandern, wenn sie einem elektrischen Feld ausgesetzt sind. Die Ladung, Größe und Form der ionischen Moleküle bestimmt die Wandergeschwindigkeit. Diese Eigenschaften macht sich die Elektrophorese zu Nutze.

Durch seine Inertheit und Homogenität eignet sich Polyacrylamid hervorragend als elektrophoretisches Trenngel, um Moleküle, die ähnliche Ladungen und unterschiedliche Formen und Größen aufweisen, aufzutrennen. Die Porengröße des Gels kann durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbiacrylamid geregelt und angepasst werden.

Das anionische Detergens Na-Dodecylsulfat (SDS) zerstört die Tertiärstruktur von Proteinen und ermöglicht die Auftrennung nach ihren molekularen Massen, da es Proteine mit einer negativen Ladung, proportional zu ihrer molaren Masse, versetzt. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten, werden die Proben zusätzlich in Anwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol, einem reduzierenden und Disulfidbrücken aufbrechenden Agens, gekocht.

Die molare Masse des Proteins wird durch Vergleich mit der Wanderungstrecke von bekannten Markerproteinen durchgeführt. Die Wanderstrecke ist proportional dem Logarithmus  $\log_{10}$  der molare Masse.

### 3.4.4.2 Durchführung

	Trenngel	Sammelgel
Monomerkonz.	15%	4%
Acrylamid/Bis	5,00 mL	670 $\mu$ L
1,5 M Tris-HCl	2,50 mL	-
0,5 M Tris-HCl	-	1250 $\mu$ L
10% (w/v) SDS	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
10% APS	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
dest. Wasser	2,29 mL	2,97 mL
Total	10,0 mL	5,0 mL

- Das 15%ige Trenngels wurde gegossen und mit wenig 2-Butanol überschichtet. Es wurde 30-45 min zum Polymerisieren stehen gelassen.
- Der Butanol wurde abgeleert, das Gel wurde mit dest. Wasser gespült und mit Filterpapier trockengesaugt.
- Das 4%ige Sammelgel wurde gegossen und der Kammes eingesetzt.
- Das Gel wurde 30-45 min zum Polymerisieren stehen gelassen und der Kamm entfernt.
- Die Elektrophorese-Apparatur wurde zusammengebaut, die Gele in die Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer Laufpuffer gefüllt.
- Die Proben wurden im gleichen Volumen 2 x *Sample buffer* aufgenommen, 4 min gekocht und etwa 1 min zentrifugiert.
- Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze auftragen (15-20  $\mu$ L).
- Die Elektrophoresekammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen (konst. 200 V und max. 70 mA).

**Comassie Blue Färbung:**

- Das Gel wurde entnommen und 30 min in der Färbelösung inkubiert.
- Das Gel wurde mit dest. H<sub>2</sub>O abgespült.
- Abschließend wurde das Gel eine bis drei Stunden, oder bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt ist, in der Entfärbelösung inkubiert.

**3.4.4.3 Geräte und Reagenzien****Acrylamid/Bis (30%T, 2,67%C, 1:37,5):**

Acrylamid 146,0 g

Bis 4,0 g

dest. H<sub>2</sub>O auf 500 mL

Die Lösung wurde filtriert und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

**Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8**

Tris-Base 54,45 g

dest. H<sub>2</sub>O 300 mL

pH 8,8 wurde mit 6 M HCl eingestellt.

**Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8**

Tris-Base 6,00 g

dest. H<sub>2</sub>O 100 mL

pH 6,8 wurde mit 6 M HCl eingestellt.

**10% (w/v) Ammonpersulfat (APS):**

Ammonpersulfat 50 mg

dest. H<sub>2</sub>O 500 µL

**5 x Lauf Puffer pH 8,3:**

Tris-Base 15,15 g

Glycin 72,0 g

SDS 5,00 g

dest. H<sub>2</sub>O                      auf 1000 mL  
bei 4°C lagern und vor Gebrauch 1:5 verdünnen.

**1 x Lauf Puffer pH 8,3:**

5 x Running Puffer                      160 mL  
dest. H<sub>2</sub>O                                      640 mL

**Stock-2 x Proben Puffer:**

0,5 M Tris-HCl pH 6,8                      2,0 mL  
Glycerin (20%)                                1,6 mL  
15% SDS (6%)                                3,2 mL  
0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,4 mL

**2 x Proben Puffer:**

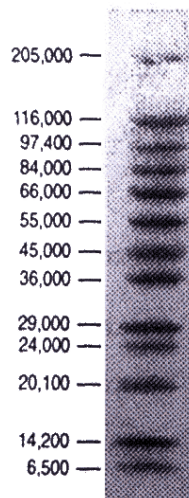
Stock - 2 x Sample buffer                900 µL  
β-Mercaptoethanol                          100 µL

**10% (w/v) SDS:**

SDS    1,0 g  
dest. H<sub>2</sub>O                                      10 mL

**Marker**

Sigma, wide range, M-4038

**Abbildung 3.3:** Sigmamarker, wide range, M-4038

**N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)****Coomassie Blue Färbelösung:**

Coomassie Blue R-2500	1%
Methanol	40%
Eisessig	10%
dest. H <sub>2</sub> O	50%

**Entfärbelösung:**

Methanol	40%
Eisessig	10%
dest. H <sub>2</sub> O	50%

**Elektrophoresezelle**

Mini-Protean II Dual Slab Cell

Bio-Rad

**Spacer**

0,75 mm oder 1,00 mm

**Spannungsquelle**Bio-Rad Power Supply,  
Modell 500/100

## **3.5 Proteinreinigung Sulld2 Cox1**

### **3.5.1 Zellaufschluss**

Siehe 3.4.1

### **3.5.2 Chromatographische Reinigung von Sull Cox1d2**

#### **3.5.2.1 Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF (Fast Flow)**

Siehe 3.4.2.1

#### **3.5.2.2 Kupfer Rekonstitution von Sulld2 Cox1**

##### **3.5.2.2.1 Methodik**

Die Rekonstitution des aktiven Zentrums von Sulld2 Cox1 basiert auf der selben theoretischen Grundlage wie die Rekonstitution von Sullj3 Cox2. Es wurde ebenfalls ein Dialyseverfahren durchgeführt, jedoch mit anderen Puffern und anderen Konzentrations- und Volumenverhältnissen, da jene Methode, die für die Rekonstitution von Sullj3 Cox2 angewandt wurde, bei Sulld2 Cox1 nicht erfolgreich war. Alle Rekonstitutionsverfahren wurden vom selben Proteinpool durchgeführt, dessen Gesamtproteinkonzentration mittels Aufnahme eines UV-VIS Spektrums bestimmt wurde.

##### **3.5.2.2.2 Durchführung**

Es wurden mehrere Rekonstitutionsverfahren im kleineren Maßstab entwickelt, um jenes zu etablieren, welches die größte Rekonstitutionseffizienz aufweist.

**Rekonstitutionsversuch A**

- 15 mL des Proteinpools Sullid2 Cox1 wurden nach der Reinigung mit Q-Sepharose FF (siehe 3.5.2.1) mit DTT [0,2 mM] versetzt, und 1h auf 4°C mit 4 M Harnstoff inkubiert.
- Die Dialyseschläuche wurden 1h in dest. H<sub>2</sub>O gekocht.
- Die Proteinlösung wurde in die Dialyseschläuche gefüllt. Die Schläuche wurden in ein Becherglas mit dem Dialysepuffer gegeben und unter Rühren und Wechseln der Pufferlösungen wurde die Harnstoffkonzentration schrittweise gesenkt.

**Dialyse:**

- I) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 3 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 3 h bei 4°C
- II) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1,5 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 3 h bei 4°C
- III) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation über Nacht bei 4°C
- IV) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1.5 mM Cu(His)<sub>2</sub>**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 4 h bei 4°C

**Rekonstitutionsverfahren B:**

- Siehe Rekonstitutionsversuch A mit folgender Ausnahmen:  
Inkubation in 3 M Harnstoff.

**Dialyse:**

- I) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1,5 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 4 h bei 4°C
- II) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50

Inkubation über Nacht bei 4°C

- III) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub>**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 4 h bei 4°C

#### **Rekonstitutionsverfahren C:**

- Siehe Rekonstitutionsverfahren A mit folgender Ausnahme:  
Inkubation in 3 M Harstoff.

#### **Dialyse:**

- I) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1,5 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 4 h bei 4°C
- II) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation über Nacht bei 4°C
- III) Anstatt des dritten Dialyseschritts wurde 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub> direkt zur Proteinlösung zugegeben.

#### **Dialyseverfahren D:**

- Siehe Rekonstitutionsverfahren A mit folgender Ausnahme:  
Inkubation in 3 M Harstoff.

#### **Dialyse:**

- I) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 4 h bei 4°C
- II) **375 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:25  
Inkubation über Nacht bei 4°C
- III) **300 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub>**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:20  
Inkubation von 4 h bei 4°C



**Dialyseverfahren E:**

- Siehe Rekonstitutionsverfahren A mit folgender Ausnahme:  
Inkubation in 3 M Harstoff.

**Dialyse:**

- I) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 6 h bei 4°C
- II) **375 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:25  
Inkubation über Nacht bei 4°C
- III) **300 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub>**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:20  
Inkubation von 4 h bei 4°C

**Dialyseverfahren F:**

- Siehe Rekonstitutionsverfahren A mit folgender Ausnahme:  
Inkubation in 2 M Harstoff.

**Dialyse:**

- I) **750 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1 M Harnstoff**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:50  
Inkubation von 6 h bei 4°C
- II) **375 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:25  
Inkubation über Nacht bei 4°C
- III) **300 mL 20 mM Posphatpuffer pH 6,5 + 1.5 mM Cu(His)<sub>2</sub>**  
Volumenverhältnis Proteinlösung : Puffer 1:20  
Inkubation von 4 h bei 4°C

Um einen zureichenden Dialyseeffekt zu erreichen, wurden die Lösungen und Schläuche während der Inkubation durch Magnetrührer in Bewegung gehalten. Alle Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Jeder Rekonstitutionsansatz wurde nach Beendigung der Dialyse mit Hilfe von Amicon Centripreps aufkonzentriert und Spektren im UV-VIS Photometer aufgenommen.

### **3.5.2.2.3 Geräte und Reagenzien**

Siehe 3.4.2.2.3

## **3.6 Spektroskopische Messungen**

### **3.6.1 Steady-State Messungen**

#### **3.6.1.1 Photometrische Charakterisierung der gereinigten Proteine**

##### **3.6.1.1.1 Methodik**

Um das Protein charakterisieren zu können, müssen die charakteristischen Peaks im UV-VIS-Spektrum bestimmt werden. Im oxidierten Zustand zeigt die Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 charakteristische Peaks bei 359, 482, 535 und 785 nm [9, 27, 87], während im reduzierten Zustand nur eine Absorption bei 280 nm beobachtet werden kann.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird das Lambert-Beer'schen Gesetz herangezogen. Um die Reinheit des Proteins zu bestimmen, wird das Verhältnis der Absorption der Proteinlösung bei ihren charakteristischen Peaks (480 nm und 535 nm) zur Absorption der gesamten Proteinmenge bei 280 nm berechnet.

Lambert-Beer'sches Gesetz:  $A = c * \epsilon * d$

A....Absorption

c.....Konzentration [mol / L]

$\epsilon$ .....Molarer Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]

d.....Durchmesser der Küvette: 1 cm

**3.6.1.1.2 Durchführung**

- Die Probe wurde 4 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert und wenn nötig vor der Messung verdünnt.
- Spektren der oxidierten Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1 wurden aufgenommen und die Proteinkonzentrationen wurden bestimmt.

**3.6.1.1.3 Geräte und Reagenzien****Sullj3 Cox2**

In 20 mM PP, pH 7

**Sulld2 Cox1**

In 20 mM PP, pH 7

**Spektrofotometer**

Diode Array Specord UV/VIS

S 10, Zeiss Instruments

**Software**

Aspect plus version 1.3

**Küvetten**

Quartz-Küvetten (1 cm)

**Rührkern****3.6.1.2 Reduktion von Sullj3 Cox2 mit Natriumascorbat****3.6.1.2.1 Methodik**

Das oxidierte Cu<sub>A</sub>-Zentrum kann durch Zugabe des Zwei-Elektronendonors Natriumascorbat reduziert werden. Durch schrittweise Titration mit Natriumascorbat kann Sullj3 Cox2 reduziert werden. Bei Zugabe der äquivalenten Menge von Natriumascorbat sollte Sullj3 Cox2 vollständig reduziert vorliegen.

**3.6.1.2.2 Durchführung**

- Die Probe wurde 4 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert und vor der Messung mit 20 mM Phosphatpuffer pH 7 verdünnt, auf eine Proteinkonzentration von 185  $\mu$ M.
- Spektren der oxidierten Sullj3 Cox2 wurden aufgenommen.
- Die Ascorbatkonzentrationen (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900  $\mu$ M, 1 und 1,2 mM) wurden schrittweise erhöht, wobei die Volumenänderungen in Betracht gezogen wurden, und Spektren aufgenommen. Es wurden Spektren direkt nach der Zugabe von Natriumascorbat aufgenommen, sowie nach einer vierminütigen Inkubationszeit.

**3.6.1.2.3 Geräte und Reagenzien****Sullj3 Cox2**

185  $\mu$ M (20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

Proteinmenge: 17,2 mg Gesamtprotein, davon 4,86 mg Holoprotein

**10 mM Natriumascorbat**

Natriumascorbat 0,1981 g

dest. H<sub>2</sub>O 100 mL

Die Lösung wurde frisch hergestellt. Da die Natriumascorbat-Lösung lichtempfindlich ist, wurde sie lichtgeschützt gelagert.

Geräte siehe Kapitel 3.6.1.1.3

### 3.6.1.3 Reoxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III) $K_3Fe(CN)_6$

#### 3.6.1.3.1 Methodik

Es wurde versucht, das durch Natriumascorbat reduzierte  $Cu_A$ -Zentrum durch Zugabe des Ein-Elektronenakzeptors Kaliumhexacyanoferrat (III) zu reoxidieren. Es wurde eine schrittweise Titration durchgeführt, wobei die Kaliumhexacyanoferrat (III) Konzentration bei jedem Schritt erhöht wurde. Es wurden die jeweils doppelten Konzentrationen im Vergleich zu Natriumascorbat verwendet, um stöchiometrische Äquivalenz zu schaffen.

#### 3.6.1.3.2 Durchführung

- Als Probe diente der mit 1,2 mM Natriumascorbat versetzte Proteinpool Sullj3 Cox2 (siehe 3.6.1.2)
- Die Kaliumhexacyanoferrat III Konzentrationen (200; 400; 600; 800  $\mu$ M, 1; 1,2, 1,4; 1,6 und 1,8 mM) wurden schrittweise erhöht, und Spektren aufgenommen. Es wurden Spektren direkt nach der Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat III aufgenommen, sowie nach einer fünfminütigen Inkubationszeit.

#### 3.6.1.3.3 Geräte und Reagenzien

##### Sullj3 Cox2 + 1,2 mM Natriumascorbat

(20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

##### 20 mM Kaliumhexacyanoferrat III

$K_3Fe(CN)_6$	0,6586 g
dest. $H_2O$	100 mL

Geräte siehe Kapitel 3.6.1.1.3

### **3.6.1.4 Reduktion mit Pferdeherz Cyt c (hh Cyt c)**

#### **3.6.1.4.1 Methodik**

Die oxidierte Sullj3 Cox2 wurde durch Zugabe des reduzierten Ein-Elektronendonors Pferdeherz Cyt c reduziert. Bei erfolgreichem Elektronenaustausch sollte das Pferdeherz Cyt c bei Zugabe von äquivalenter Menge Sullj3 Cox2 in oxidierter Form vorliegen.

#### **3.6.1.4.2 Durchführung**

- Spektren der oxidierten Sullj3 Cox2, sowie des reduzierten hh Cyt c wurden aufgenommen.
- Es wurde ein Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  Sullj3 Cox2 und 5  $\mu\text{M}$  hh Cyt c hergestellt und Spektren aufgenommen.

#### **3.6.1.4.3 Geräte und Reagenzien**

##### **Sullj3 Cox2**

(20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

##### **hh Cyt c**

5  $\mu\text{M}$  (20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

Geräte siehe Kapitel 3.6.1.1.3

### **3.6.1.5 Reduktion von Sullj3 Cox2 mit Cyt c<sub>6</sub> a6 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803**

#### **3.6.1.5.1 Methodik**

Die oxidierte Sullj3 Cox2 wurde durch Zugabe des reduzierten Ein-Elektronendonors Cyt c<sub>6</sub> a6 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 reduziert. Bei erfolgreichem Elektronenaustausch sollte Cyt c<sub>6</sub> a6 bei Zugabe von äquivalenter

Menge Sullj3 Cox2 in oxidierter Form vorliegen, welche ein charakteristisches Spektrum aufweist.

#### **3.6.1.5.2 Durchführung**

- Spektren der oxidierten Sullj3 Cox2, sowie des reduzierten Cyt c<sub>6</sub> a6 wurden aufgenommen.
- Es wurde ein Ansatz mit 10 µM Sullj3 Cox2 und 5 µM Cyt c<sub>6</sub> a6 hergestellt und Spektren aufgenommen.

#### **3.6.1.5.3 Geräte und Reagenzien**

##### **Sullj3 Cox2**

10 µM (20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

##### **Cyt c<sub>6</sub> a6**

5 µM (in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

Geräte siehe Kapitel 3.6.1.1.3

#### **3.6.1.6 Titration mit Plastocyanin a8 (PC) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803**

##### **3.6.1.6.1 Methodik**

Verschiedene Konzentrationen des reduzierten PC aus *Synechocystis* sp. PCC 6803) wurden zu 40 µM Sullj3 Cox2 im oxidierten Zustand zugegeben. Bei erfolgreichem Elektronentransfer zwischen den beiden Proteinen sollte sich innerhalb weniger Sekunden ein Gleichgewicht, abhängig von den Anfangskonzentrationen, einstellen.

**3.6.1.6.2 Durchführung**

- 850  $\mu\text{L}$  einer 40  $\mu\text{M}$  Lösung von Sullj3 Cox2 in 20 mM PP, pH 7,0 wurde in eine Küvette mit einem Rührkern überführt und ein Spektrum wurde aufgenommen.
- Plastocyanin (reduziert und entsalzt) wurde schrittweise zugegeben, um Endkonzentrationen von 40, 80, 150, 200, 300, 400, 500, 600 und 700  $\mu\text{M}$  zu erreichen, wobei Volumenänderungen in Betracht gezogen wurden.
- Nach jeder Zugabe von Plastocyanin wurden UV-VIS Spektren aufgenommen.

**3.6.1.6.3 Geräte und Reagenzien****Sullj3 Cox2**

40  $\mu\text{M}$  (20 mM Phosphatpuffer, pH 7)

**Plastocyanin a6**

2,17 mM (20 mM PP, pH 7,0)

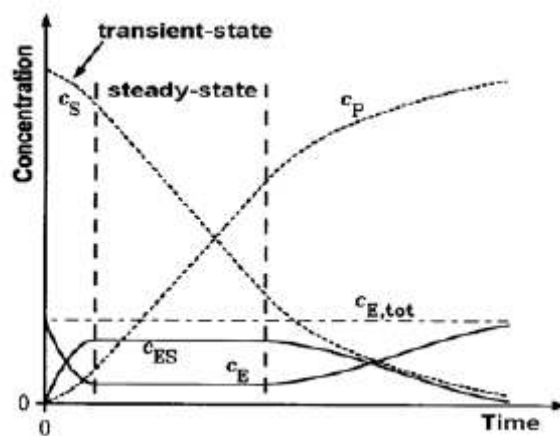
Geräte siehe Kapitel 3.6.1.1.3

**3.6.2 Pre-steady-state Messungen****3.6.2.1 Stopped-Flow Messungen****3.6.2.1.1 Methodik**

Pre-steady-state Messungen wurden durchgeführt, um exakte Daten der kinetischen Konstanten  $k_{\text{for}}$  und  $k_{\text{back}}$ , welche die Redoxreaktion zwischen den Reaktionspartnern beschreiben, zu erhalten. Mit Hilfe von steady-state Messungen ist es nämlich nur möglich, den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des Reaktionswegs zu ermitteln, und

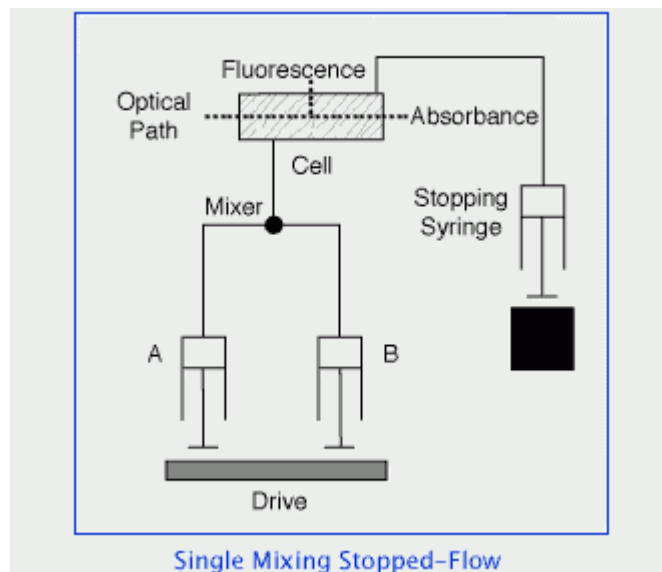


Mit einer Stopped-Flow Apparatur ist es möglich, Messungen im Millisekunden Bereich vorzunehmen. Zwei Lösungen, üblicherweise Enzym und Substrat, werden getrennt voneinander in eine Reaktionsküvette eingespritzt, gemischt und mittels UV-VIS Spektroskopie observiert, bis die steady-state Phase eintritt. Der wesentliche Vorteil einer Stopped-Flow Apparatur liegt in der Fähigkeit zwei Flüssigkeiten innerhalb von Millisekunden miteinander zu vermischen und dadurch schnelle Reaktionen zu verfolgen, bzw. kurzlebige Enzymintermediate zu detektieren.



**Abb. 3.3:** Zeitlicher Ablauf einer enzymkatalysierten Reaktion.  $c_P$ : Produktkonzentration,  $c_S$ : Substratkonzentration,  $c_E$ : Konzentration des freien Enzyms,  $c_{E,tot}$ : Gesamtenzymkonzentration,  $c_{ES}$ : Enzym-Substrat-Komplekonzentration.

Das Funktionsprinzip der Stopped-Flow Apparatur (siehe Abb. 3.4) basiert darauf, dass sehr kleine Volumina getrennt voneinander von Injektionsspritzen in einen hoch effizienten Mixer eingespritzt, und weiter in die Messzelle geleitet werden. Das eingespritzte Volumen der vermischten Reaktanden, welches nur einige Millisekunden alt ist, wird durch eine Stoppspritze limitiert. Die Zeit, die bis zum Eintreten der Lösung in die Messkammer vergeht, wird auch als die Totzeit der Apparatur bezeichnet. Wenn die Lösung die Stoppspritze füllt, verursacht der Kolben das abrupte Abbrechen des Flusses, den Stopped-Flow.



**Abb. 3.4:** Schematisches Diagramm der Funktionsweise des DX.17MV Stopped-Flow Spektrofluorometers (Applied Photophysics). Die beiden Reaktanden werden über die Spritzen A und B in den Mixer und weiter in die optische Messzelle gespritzt, wodurch das sich in der Messzelle befindliche Volumen Richtung Stoppspritze verdrängt wird.

### 3.6.2.1.2 Durchführung

Da nur von Sullj3 Cox2 genügend gereinigtes Material vorhanden war, wurden die Stopped-Flow Messungen nur mit Sullj3 Cox2 durchgeführt. Reaktionen von Sullj3 Cox2 wurde mit Cyt  $c_6_2$  und hh Cyt  $c$ , mit 50 mM KCl und ohne KCl in beide Richtungen durchgeführt, um die biomolekularen Raten ( $k_{\text{for}}$  und  $k_{\text{back}}$ ) des Elektronenaustauschs bestimmen zu können. Das rekombinante Cyt  $c_6_2$  aus *Nostoc* sp. PCC 7120, welches bei den Messungen dem  $\text{Cu}_A$ -Zentrum als Elektronendonator diente, wurde von der Arbeitsgruppe des „Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis“ rund um Migel A. De la Rosa, Universidad de Sevilla hergestellt [5]. Die Reaktionen wurden mittels UV-VIS Spektroskopie bei 554 nm beobachtet.

Alle Messungen wurden bei 22,5°C durchgeführt.

<b>Sullj3 Cox2(ox) mit Cyt c<sub>6</sub>(red)</b>	Vorwärts Reaktion (Physiologisch relevant)	
	$k_{\text{for}}$	
	Sullj3 Cox2	2 $\mu\text{M}$
	Cyt c <sub>6_2</sub>	5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{M}$
	Ionenstärke	10 mM Phosphatpuffer
	pH-Wert	7,0
Wellenlänge	554 nm	

<b>Sullj3 Cox2(red) mit Cyt c<sub>6</sub>(ox)</b>	Rückwärts Reaktion (Physiologisch irrelevant)	
	$k_{\text{back}}$	
	Sullj3 Cox2	2 $\mu\text{M}$
	Cyt c <sub>6_2</sub>	5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{M}$
	Ionenstärke	10 mM Phosphatpuffer
	pH-Wert	7,0
Wellenlänge	554 nm	

<b>Sullj3 Cox2(ox) mit hh Cyt c(red)</b>	Vorwärts Reaktion (Physiologisch relevant)	
	$k_{\text{for}}$	
	Sullj3 Cox2	2 $\mu\text{M}$
	hh Cyt c	5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{M}$
	Ionenstärke	10 mM Phosphatpuffer
	pH-Wert	7,0
Wellenlänge	554 nm	

<b>Sullj3 Cox2(red) mit hh Cyt c(ox)</b>	Rückwärts Reaktion (Physiologisch irrelevant)	
	$K_{\text{back}}$	
	Sullj3 Cox2	2 $\mu\text{M}$
	hh Cyt c	5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{M}$
	Ionenstärke	10 mM Phosphatpuffer
pH-Wert	7,0	

	Wellenlänge	554 nm
--	-------------	--------

<b>Sullj3 Cox2(ox) mit hh Cyt c(red) + 50 mM KCl</b>	Vorwärts Reaktion (Physiologisch relevant)	
	$k_{\text{for}}$	
	Sullj3 Cox2	2 $\mu\text{M}$
	hh Cyt c	5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{M}$
	Ionenstärke	10 mM Phosphatpuffer + 50 mM KCl
	pH-Wert	7,0
	Wellenlänge	554 nm

<b>Sullj3 Cox2(red) mit hh Cyt c(ox) + 50 mM KCl</b>	Rückwärts Reaktion (Physiologisch irrelevant)	
	$K_{\text{back}}$	
	Sullj3 Cox2	2 $\mu\text{M}$
	hh Cyt c	5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{M}$
	Ionenstärke	10 mM Phosphatpuffer + 50 mM KCl
	pH-Wert	7,0
	Wellenlänge	554 nm

### 3.6.2.1.3 Geräte und Reagenzien

#### Sullj3 Cox2

2  $\mu\text{M}$  in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

#### Cyt c<sub>6\_2</sub>

5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{M}$  in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

#### hh Cyt c

5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{M}$  in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

**KCl**

50 mM

**Sequential mixing Stopped-Flow**

Model SX-18MV

**Computersystem und Software**

Applied Photophysics (UK)

**Monochromator****Plastikspritze**

2 mL

## 4. Ergebnisse

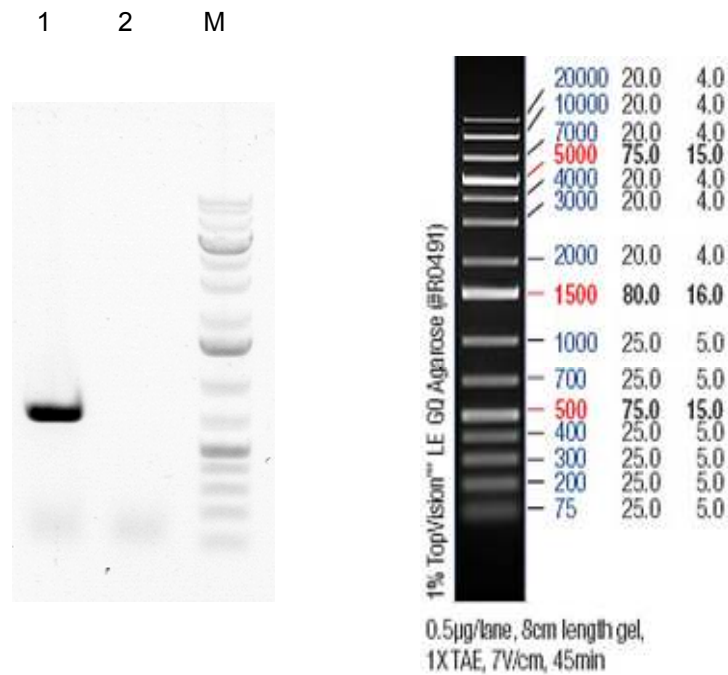
### 4.1 Klonierung Cox1 Subunit II lösliche Domäne (Sulld2 Cox1)

Ein Teil der löslichen Untereinheit Sull der Cytochrom c Oxidase 1 wurde durch PCR amplifiziert. Die Gensequenzen wurden von der Website Cyanobase, einer Cyanobakterien-Genom-Datenbank, entnommen (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/Anabaena>). Die verwendeten Primer lang\_DG\_veg\_p1 und lang\_DG\_veg\_p2 definierten ein 732 bp langes Genstück, welches für die lösliche Domäne von den Aminosäureresten 113 bis 355 der Cytochrom c Oxidase 1 Subunit II kodiert. Durch den Upstream Primer lang\_DG\_veg\_p1 wurde das Startcodon ATG und eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *NdeI* in das amplifizierte Genstück eingeführt. Der Downstream Primer lang\_DG\_veg\_p2 enthielt ein Stopcodon TGA und die Schnittstelle des Restriktionsenzym *BamHI*.

#### 4.1.1 Amplifizierung des Sulld2 Cox1 Gens mittels PCR

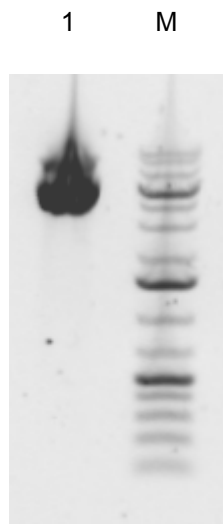
Das amplifizierte Genstück wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit gereinigt und auf ein SYBR-Safe™ Gel aufgetragen und im elektrophoretischen Feld aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Die Länge des amplifizierten Genstücks wurde durch Vergleich mit den DNA-Banden des Markers DNA Ladder von Fermentas abgeschätzt. Die DNA Banden wurden im UV-Detektor visualisiert. Die Intensität der Banden korrespondiert mit der DNA Menge.

Abbildung 4.1 zeigt, dass die tatsächliche Länge des amplifizierten PCR-Fragments mit der theoretischen Länge von 732 bp korrespondierte.



**Abbildung 4.1:** DNA Ladder 1 kb und DNA Bande des amplifizierten Genstücks Sulld2 Cox1, aufgetrennt im elektrophoretischen Feld auf einem SYBR-Safe™ Gel. Lane 1: 10 µL des PCR-Fragments Sulld2 Cox1; 2: Negativkontrolle; M: DNA Ladder (#R0491) von Fermentas.

### 4.1.2 Präparation des Vektors pET3a



Die Plasmid DNA des Vektors wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit isoliert und anschließend auf ein SYBR-Safe™ Gel aufgetragen und in UV-Licht visualisiert, um die Konzentration der Plasmid DNA abzuschätzen. Abbildung 4.2 zeigt eine intensive Bande bei etwa 4000-5000 bp. Da zirkuläre DNA andere Wanderungseigenschaften aufweist als lineare DNA, kann über deren Länge keine Aussage getroffen werden.

**Abbildung 4.2:** SYBR-Safe™-Gelelektrophorese der ungeschnittenen Vektor DNA. Lane 1: 5 µL pET3a-Vektor; Lane M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas.

### 4.1.3 Restriktionsverdau des Vektors sowie des PCR-Produkts und Ligation

Insert und Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI geschnitten. Die Vektor DNA wurde zusätzlich mit dem Enzym Alkalische Phosphatase behandelt, um eine spontane Religation seiner Enden zu verhindern. Da das Mengenverhältnis Vektor zu Insert für die Ligation etwa 1:10 betragen soll, wurden sowohl Insert als auch Vektor auf ein SYBR-Safe<sup>TM</sup>-Gel aufgetragen und im elektrophoretischen Feld aufgetrennt, um ihr Mengenverhältnis abschätzen zu können. Je länger ein DNA-Fragment ist, desto mehr Farbstoff kann sich in die DNA einlagern, und desto intensiver erscheint die Bande im UV Licht.

Intensitätsverhältnis der Banden: 1:4

Längenverhältnis: 1:6

Tatsächliches Verhältnis 1:1,5

Für den Ligationsansatz wurde die sechsfache Menge des Inserts verwendet.

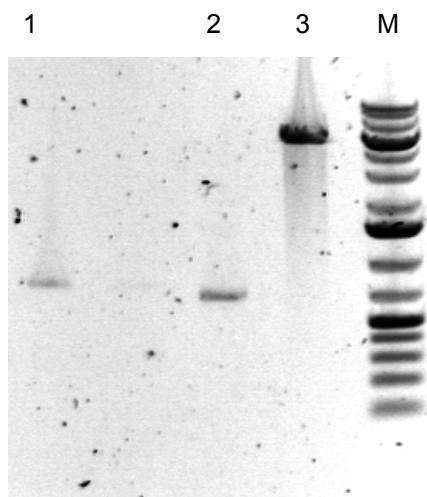


Abbildung 4.3 zeigt in Lane 1 eine Bande bei 750 bp, welche Sulld2 Cox1 repräsentiert. Lane 3 weist eine Bande bei ca 5500 bp auf. Das Intensitätsverhältnis der beiden Banden beträgt etwa 1:4.

**Abbildung 4.3:** SYBR-Safe<sup>TM</sup> Gel des Inserts und des Vektors nach dem Restriktionsverdau. Lane 1: 3 µL Sulld2 Cox1; Lane 2: 3 µL Sulld7 Cox2; Lane 3: 3 µL pET3a Vektor; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas



### 4.1.5 Elektroporation in BL21(D3)pLysS Zellen

Das Ligationprodukt pET3a/SulId2 Cox1 wurde mittels Elektroporation in BL21(DE3)pLysS Zellen transformiert. Die Zellen wurden anschließend auf LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatten kultiviert. Tabelle 4.1 zeigt die pro Elektroporationsansatz resultierende Anzahl der Kolonien und die Zeitkonstanten.

Elektroporations-Experiment	Zeitkonstante	Anzahl der Kolonien (200 µL)	Anzahl der Kolonien (800 µL)
L1	16,7	29	82
L2	17,3	59	150
L3	17,9	15	61
+	17,2	Stark überwachsen	---
-	19,5	0	---

**Tabelle 4.1:** Anzahl der resultierenden Kolonien der Elektroporation und die korrespondierenden Zeitkonstanten. L1: Ligationsansatz 1; L2: Ligationsansatz 2; L3: Ligationsansatz 3 (ohne Insert); +: Positivkontrolle; -: Negativkontrolle (Siehe 3.1.7.2).

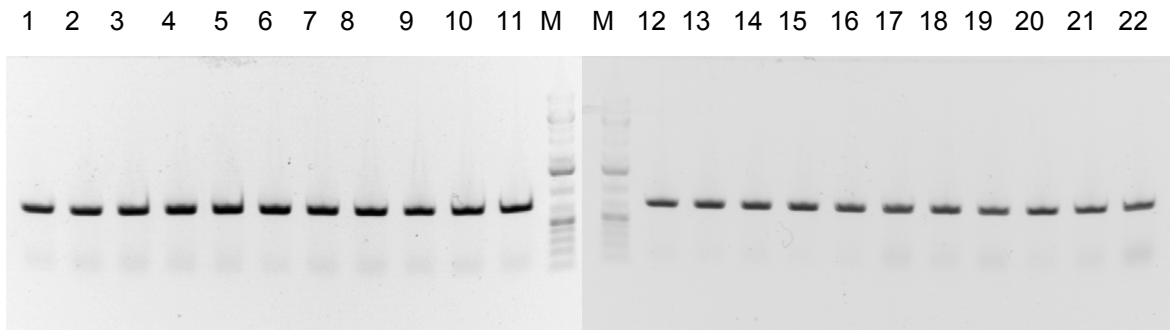
### 4.1.6 Überprüfung der Transformation

Die Überprüfung der Transformation wurde mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt.

#### 4.1.6.1 PCR Screening

Um zu überprüfen ob die transformierten Zellen auch tatsächlich das gewünschte Insert enthalten, wurden Kolonien der LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatten L1 und L2 entnommen und mittels PCR gescreent. Als Primer dienten lang\_DG\_veg\_p1 und lang\_DG\_veg\_p2. Wenn die Zellen das gewünschte Insert enthalten, wird dieses amplifiziert und eine DNA Bande bei 732 bp ist auf dem SYBR-Safe<sup>TM</sup>-Gel sichtbar. Gleichzeitig wurde eine Master-LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatte mit allen gescreenten Klonen angelegt. Wie Abbildung 4.4 zeigt,

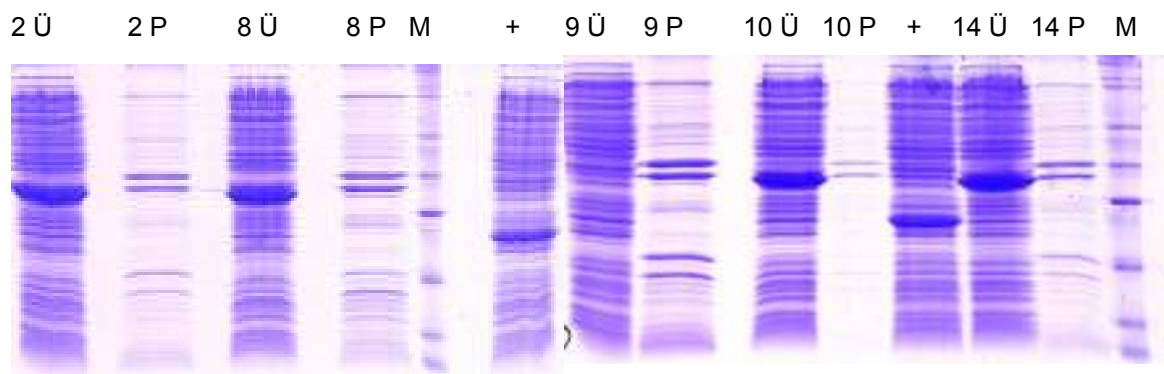
wurden alle gescreenten Klone positiv auf das Insert Sulld2 Cox1 getestet, da bei allen Klonen nach dem PCR-Screening eine DNA-Bande bei 730 bp auf dem SYBR-Safe™-Gel sichtbar war.



**Abbildung 4.4:** SYBR-Safe™-Gel, aufgenommen in UV-Licht. Alle gescreenten Klone weisen das Insert von 732 bp auf. Lane 1-Lane 22: Klone 1-22; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas.

#### 4.1.6.2 Expressionsscreening

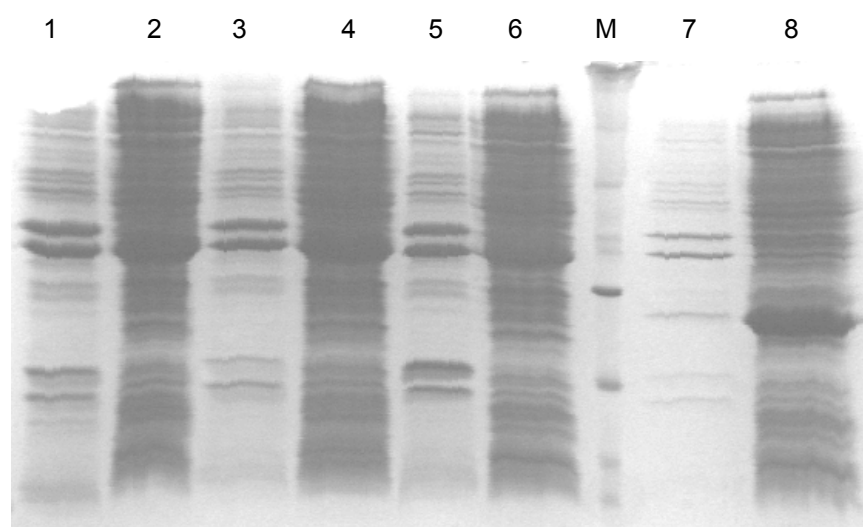
Fünf der positiv auf das Insert gescreenten Klone (Klon 2, 8, 9, 10 und 14) wurden von der Master-LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatte entnommen und in LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> exprimiert. Die Kolonien der positiven Klone wurden aufgeschlossen und die Überstände bzw. die Pellets, ebenso wie der Überstand der Positivkontrolle Sullj3 Cox2, mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 4.5). Klon 2, 8, 10 und 14 zeigten eine Überexpression eines Proteins mit einer molaren Masse von etwa 30000 Da. Die theoretische molare Masse von Sulld2 Cox1 beträgt 26415 Da. Die Positivkontrolle mit einer molaren Masse von 20400 Da zeigt eine Bande bei etwa 24000 Da. Die theoretische molare Masse der löslichen Domäne von Sull aus Cox1 entspricht den in Abbildung 4.5 sichtbaren Banden der überexprimierten Proteine der Klone 2, 8, 10 und 14. Ebenso korrespondiert die molekulare Masse des überexprimierten Proteins der Positivkontrolle mit der molekularen Masse der als Positivkontrolle verwendeten löslichen Domäne Sullj3 Cox2.



**Abbildung 4.5:** SDS-PAGE der gescreenten Klone 2, 8, 9, 10 und 14. Ü: Proteine des Überstands; P: Proteine des Pellets; +: Positivkontrolle Sullj3 Cox2 (M = 20400 Da); M: SigmaMarker, Wide Molecular Weight Range.

#### 4.1.6.2.1 Variation der Expressionsbedingungen

Um die Expressionsbedingungen zu optimieren wurde Klon 2 bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C, 30°C und 16°C) exprimiert. Die Ansätze bei 37°C und bei 30°C wurden 4 h exprimiert, die Ansätze bei 16°C 20 h. Die SDS-PAGE in Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis des Versuchs. Beim Vergleich der Banden des Überstands erscheint die Bande bei 37°C am intensivsten, während sich bei 16°C mehr Protein im Pellet und weniger im Überstand befindet.

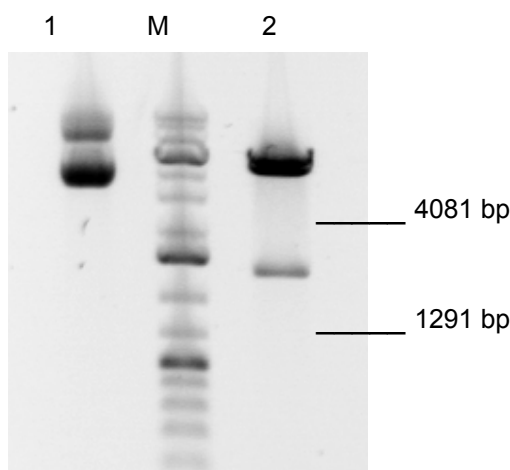


**Abbildung 4.6:** SDS-PAGE der Variation der Expressionsbedingungen: Lane 1: Pellet Sulld2 Cox1 bei 37°C; Lane 2: Überstand Sulld2 Cox1 bei 37°C; Lane 3: Pellet Sulld2 Cox1 bei 30°C; Lane 4: Überstand Sulld2 Cox1 bei 30°C; Lane 5: Pellet Sulld2 Cox1 bei 16°C; Lane 6:

Überstand Sulld2 Cox1 bei 16°C; M: SigmaMarker, Wide Molecular Weight Range; Lane 7: Positivkontrolle (Pellet Sullj3 Cox2 bei 16°C); Lane 8: Positivkontrolle (Überstand Sullj3 Cox2 bei 16°C).

#### 4.1.6.3 Restriktionsscreening der Plasmid DNA

Das Plasmid pET-3a aus Klon 2 wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit aus den Zellen isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xba*I geschnitten. pET-3a weist eine Länge von 4640 bp auf, das Insert 732 bp, in Summe 5372 bp. Das Restriktionsenzym *Hind*III schneidet den Vektor bei Position bp 29, *Xba*I bei bp 588. Keines der beiden Enzyme weist eine Schnittstelle im Insert auf. Befindet sich das Insert im Vektor, so entstehen 2 unterschiedlich lange DNA Fragmente mit 1291 bp und 4081 bp. Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA auf ein SYBR-Safe™-Gel aufgetragen, aufgetrennt und im UV-Licht visualisiert. Abbildung 4.7 weist in Lane 2 eine Bande bei ca 1300 bp und eine bei ca 4000 bp auf, welche aufgrund des Schnittmusters von *Hind*III und *Xba*I die Anwesenheit des Inserts im Plasmid bestätigen. Das ungeschnittene Plasmid pET-3a wurde ebenfalls aufgetragen (Lane 1). Da zirkuläre DNA jedoch unterschiedliche Wanderungseigenschaften aufweist, korrespondiert die Höhe der Bande nicht mit der tatsächlichen Länge des Genstücks.



**Abbildung 4.7:** Geschnittene Plasmid DNA auf SYBR-Safe™-Gel visualisiert in UV-Licht. Lane 1: Ungeschnittenes Plasmid pET-3a; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas, Lane 2: Restriktionsansatz *Hind*III und *Xba*I.

#### 4.1.6.4 Sequenzierung

Die DNA des Inserts des Klons 2 wurde sequenziert, um eventuelle Mutationen ausschließen zu können. Die Plasmid DNA wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit isoliert und auf ein SYBR-Safe™-Gel aufgetragen, um seine Konzentration abschätzen zu können.

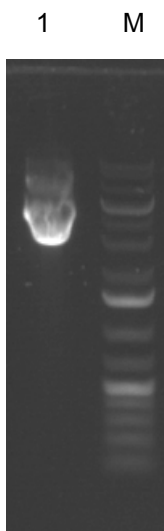


Abbildung 4.8 zeigt die Plasmid DNA im SYBR-Safe™-Gel, visualisiert in UV-Licht. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion wurde von der Firma I.B.L., Dennisgasse 23, 1020 Wien, durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer verwendet, um eine N- und C-terminale Sequenzierung durchzuführen.

**Abbildung 4.8:** Gereinigte Plasmid-DNA des Klons 2 auf einem SYBR-Safe™-Gel. Lane 1: Plasmid-DNA von Klon 2; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas,

Die Software DNASTar SeqMan 4.0 wurde verwendet, um die DNA Sequenz des Klons 2 mit der theoretischen Sequenz zu vergleichen. Das Insert des Klons 2 weist keine Mutationen auf.

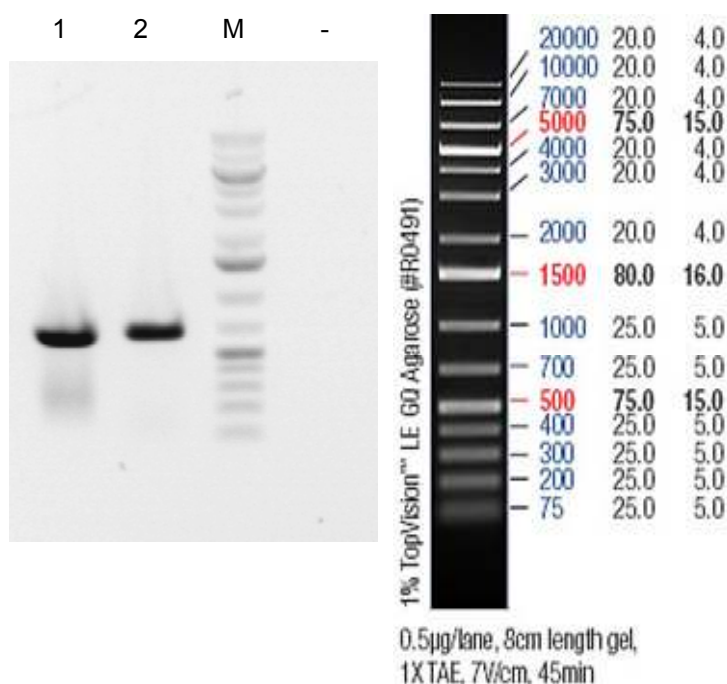
#### 4.2 Klonierung Cox2 Subunit II lösliche Domäne (Sulld7 Cox2)

Das Gen, welches für den löslichen Teil der Untereinheit Sull der Cytochrom c Oxidase 2 (Cox2) kodiert, wurde durch eine PCR amplifiziert. Die Gensequenzen wurden von der Website Cyanobase, einer Cyanobakterien-Genom-Datenbank entnommen (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/Anabaena>). Die verwendeten Primer definierten ein 642 bp langes Genstück, welches für die periplasmatische Domäne von den Aminosäureresten 114 bis 327 der

Cytochrom c Oxidase Subunit II (COX2) kodiert. Durch den Upstream Primer Sull\_DG\_hetero\_p1 wurde das Startcodon ATG und eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *NdeI* in das amplifizierte Genstück eingeführt. Der Downstream Primer Sull\_j3\_cox2\_p2 enthielt ein Stopcodon TGA und die Schnittstelle des Restriktionsenzym *BamHI*.

#### 4.2.1 Amplifizierung des Sulld7 Cox2 Gens mittels PCR

Das amplifizierte Genstück wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit gereinigt und auf ein SYBR-Safe™ Gel aufgetragen und im elektrophoretischen Feld aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Die Länge des amplifizierten Genstücks wurde durch Vergleich mit den DNA-Banden des Markers DNA Ladder von Fermentas abgeschätzt. Die DNA Banden wurden im UV-Detektor visualisiert. Die Intensität der Banden korrespondiert mit der DNA Menge.



**Abbildung 4.9:** DNA Ladder (1 kb) und DNA Bande des amplifizierten Genstücks Sulld7 Cox2, aufgetrennt im elektrophoretischen Feld auf einem SYBR-Safe™ Gel. Lane 1: 10 µL des Positivkontrolle; Lane 2: 10 µL des PCR-Fragments Sulld7 Cox2; M: DNA Ladder von Fermentas; -: Negativkontrolle.

Abbildung 4.9 zeigt, dass die tatsächliche Länge des amplifizierten PCR-Fragments (Lane 2) mit der theoretischen Länge von 642 bp korrespondiert.

#### 4.2.2 Präparation des Vektors pET3a

Siehe 4.1.2

#### 4.2.3 Restriktionsverdau des Vektors sowie des PCR-Produkts und Ligation

Insert und Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Die Vektor DNA wurde zusätzlich mit dem Enzym Alkalische Phosphatase behandelt, um eine spontane Religation seiner Enden zu verhindern. Da das Mengenverhältnis Vektor : Insert für die Ligation etwa 1:10 betragen soll, wurden sowohl Insert als auch Vektor auf ein SYBR-Safe<sup>TM</sup>-Gel aufgetragen und im elektrophoretischen Feld aufgetrennt, um ihr Mengenverhältnis abschätzen zu können. Je länger ein DNA-Fragment ist, desto mehr Farbstoff kann sich in die DNA einlagern, und desto intensiver erscheint die Bande im UV Licht.

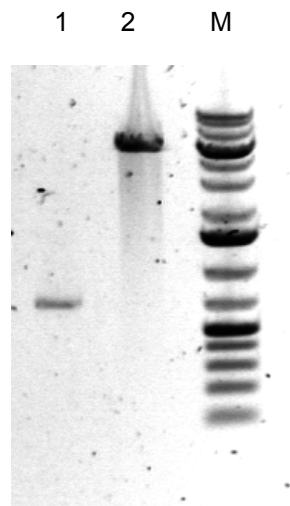
Abbildung 4.10 zeigt eine Bande des PCR-Fragments bei 650 bp (Lane 1) und eine Bande des Vektors bei ca 5000 bp (Lane 2). Die Intensität der Bande des Vektors ist zwei- bis dreimal intensiver als die des Inserts.

Intensitätsverhältnis der Banden: 1:2,5

Längenverhältnis: 1:7

Tatsächliches Verhältnis 1:3

Für den Ligationsansatz wurde die drei- bis vierfache Menge des Inserts verwendet.



**Abbildung 4.10:** SYBR-Safe<sup>TM</sup> Gel Inserts und des Vektors nach dem Restriktionsverdau. Lane 1: 3  $\mu$ L Sulld7 Cox2; Lane 2: 3  $\mu$ L pET3a Vektor; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas.

#### 4.2.4 Elektroporation in BL21(DE3)pLysS Zellen

Das Ligtationsprodukt pET-3a/Sulld7 Cox2 wurde mittels Elektroporation in BL21(DE3)pLysS Zellen transformiert. Die Zellen wurden anschließend auf LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatten kultiviert. Tabelle 4.2 zeigt die pro Elektroporationsansatz resultierende Anzahl der Kolonien und die Zeitkonstanten.

Elektroporations-Experiment	Zeitkonstante	Anzahl der Kolonien (150 $\mu$ L)	Anzahl der Kolonien (500 $\mu$ L)
L1	18,3	154	Stark überwachsen
L2	19,1	180	Stark überwachsen
L3	17,9	19	56
+	17,2	Stark überwachsen	---
-	19,5	0	---

**Tabelle 4.2:** Anzahl der resultierenden Kolonien der Elektroporation und die korrespondierenden Zeitkonstanten. L1: Ligtationsansatz 1; L2: Ligtationsansatz 2; L3: Ligtationsansatz 3 (ohne Insert); +: Positivkontrolle; -: Negativkontrolle (Siehe 3.2.6.2)

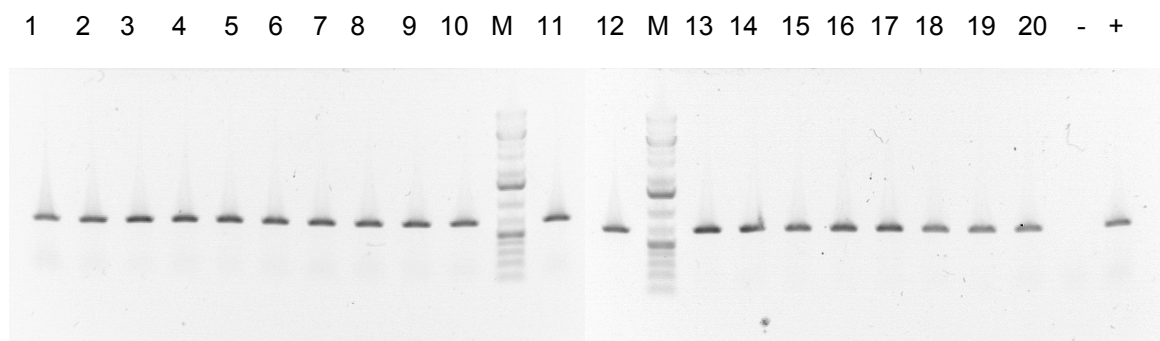


### 4.2.5 Überprüfung der Transformation

Die Überprüfung der Transformation wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

#### 4.2.5.1 PCR Screening

Um zu überprüfen ob die transformierten Zellen auch tatsächlich das gewünschte Insert enthalten, wurden Kolonien der LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatten L1 und L2 entnommen und per PCR gescreent. Als Primer dienten Sull\_DG\_hetero\_p1 und Sull\_j3\_cox2\_p2. Wenn die Zellen das gewünschte Insert enthalten, wird dieses amplifiziert und eine DNA Bande bei 642 bp ist auf dem SYBR-Safe<sup>TM</sup>-Gel sichtbar. Gleichzeitig wurde eine Master-LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatte mit allen gescreenten Klonen angelegt. Wie Abbildung 4.11 zeigt, wurden alle gescreenten Klone positiv auf das Insert Sull d7 Cox2 getestet, da bei allen Klonen nach dem PCR-Screening eine DNA-Bande bei ca 650 bp auf dem SYBR-Safe<sup>TM</sup>-Gel sichtbar war.



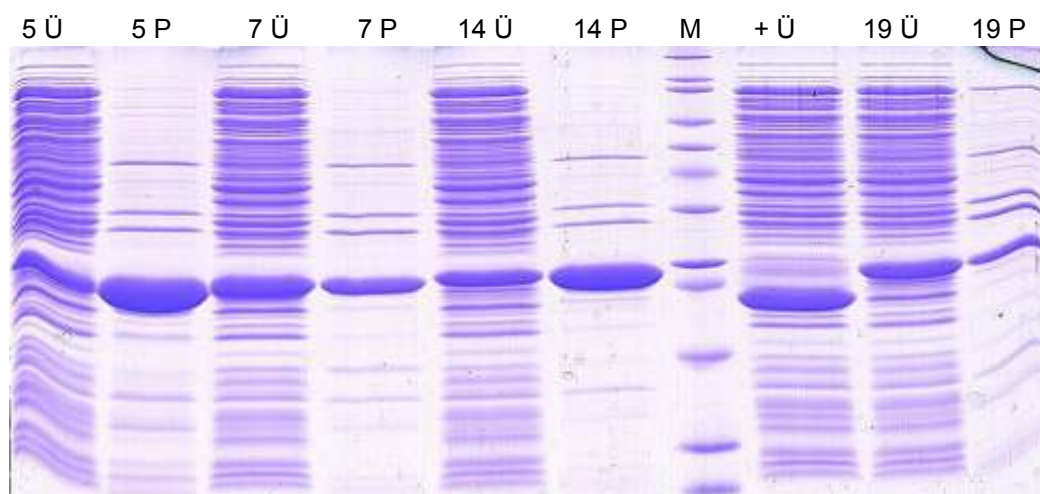
**Abbildung 4.11:** SYBR-Safe<sup>TM</sup>-Gel, aufgenommen in UV-Licht. Alle gescreenten Klone weisen das Insert von 642 bp auf. Lane 1-Lane 20: Klone 1-20; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas; -: Negativkontrolle; +: Positivkontrolle.

#### 4.2.5.2 Expressionsscreening

Vier der positiv auf DNA gescreenten Klone (Klon 5, 7, 14 und 19) wurden von der Master-LB<sub>AmpCm</sub>-Agarplatte entnommen und in LB-Medium<sub>Amp/Cm</sub> exprimiert. Die exprimierten Proteine der Klone wurden mittel SDS-PAGE aufgetrennt

(siehe Abbildung 4.12). Sowohl Überstand als auch Pellet wurden aufgetragen, ebenso wie die Positivkontrolle. Alle Klone zeigten eine Überexpression bei etwa 24000 Da. Die berechnete molare Masse von Sulld7 Cox2 beträgt 22480 Da. Die Positivkontrolle mit einem Massengewicht von 20400 Da zeigt eine Bande bei etwa 22000 Da. Die theoretische molare Masse der löslichen Domäne von Sulld7 Cox2 entspricht den in Abbildung 4.12 sichtbaren Banden der überexprimierten Proteine der Klone 5, 7, 14 und 19. Ebenso korrespondiert die molekulare Masse des überexprimierten Proteins der Positivkontrolle mit der molekularen Masse der als Positivkontrolle verwendeten löslichen Domäne Sullj3 Cox2.

Neben der Überproduktion des rekombinanten Proteins im Überstand, weisen alle Klone eine starke Anreicherung des Proteins im Pellet auf, allen voran Klon 5 und 14.



**Abbildung 4.12:** SDS-PAGE der gescreenten Klone 5, 7, 14 und 19. Ü: Proteine des Überstands; P: Proteine des Pellets; +: Positivkontrolle Sullj3 Cox2 (M = 20400 Da); M: SigmaMarker, Wide Molecular Weight Range.

#### 4.2.5.3 Sequenzierung

Die DNA des Inserts des Klons 7 wurde sequenziert, um eventuelle Mutationen ausschließen zu können. Die Plasmid DNA wurde mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit isoliert und auf ein SYBR-Safe™-Gel aufgetragen, um seine Konzentration abschätzen zu können.

1 M

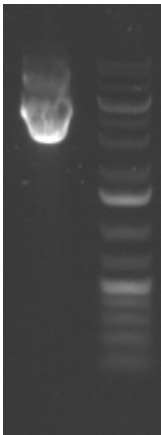
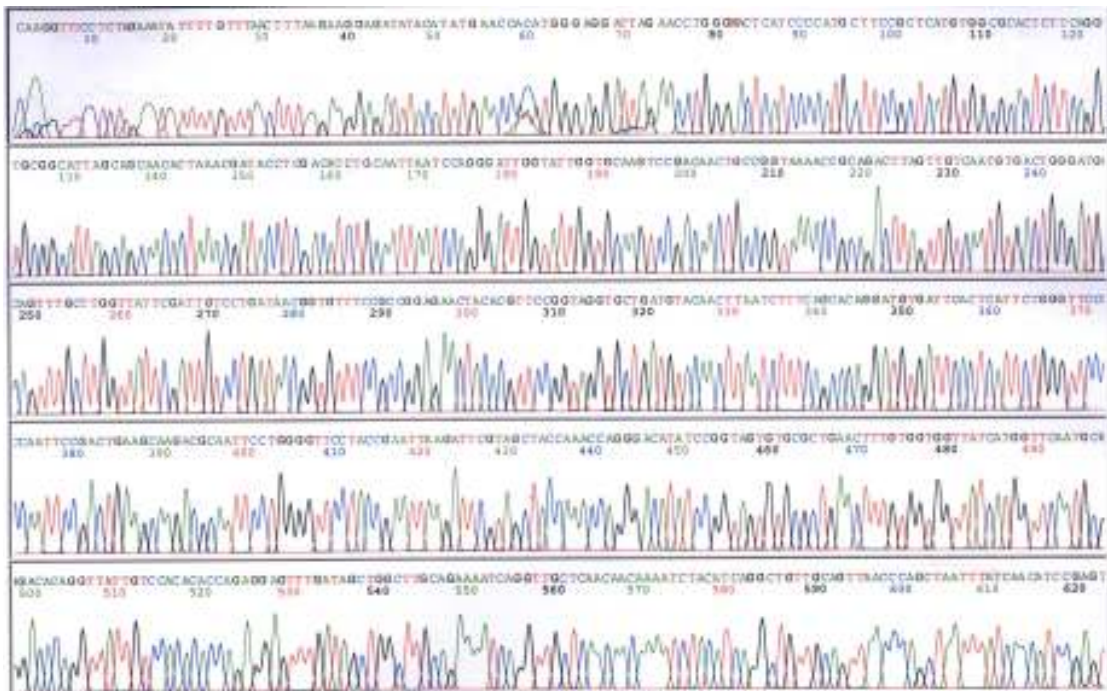


Abbildung 4.13 zeigt die Plasmid DNA im SYBR-Safe™-Gel, visualisiert in UV-Licht. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion wurde von der Firma I.B.L., Dennisgasse 23, 1020 Wien, durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer verwendet, um eine N- und C-terminale Sequenzierung durchzuführen.

**Abbildung 4.13:** Gereinigte Plasmid-DNA des Klons 7 auf einem SYBR-Safe™-Gel. Lane 1: Plasmid-DNA von Klon 7; M: DNA Ladder 1 kb von Fermentas.

Die Software DNASTar SeqMan 4.0 wurde verwendet, um die DNA Sequenz des Klons 7 (Abbildung 4.14) mit der theoretischen Sequenz zu vergleichen. Das Insert des Klons 7 wies zwei Mutationen auf, eine davon war eine stille Mutation. Diese trat bei Base 78 des Inserts auf und wies ein Cystein statt einem Thyrosin auf. Bei Base 215 wurde ebenfalls ein Cystein statt einem Thyrosin vorgefunden. Diese Mutation führte jedoch zur Transkription einer anderen Aminosäure, nämlich Threonin (ACA) statt Isoleucin (ATA).



**Abbildung 4.14:** Ergebnis der Sequenzierung des Klons Sullid7 Cox2.

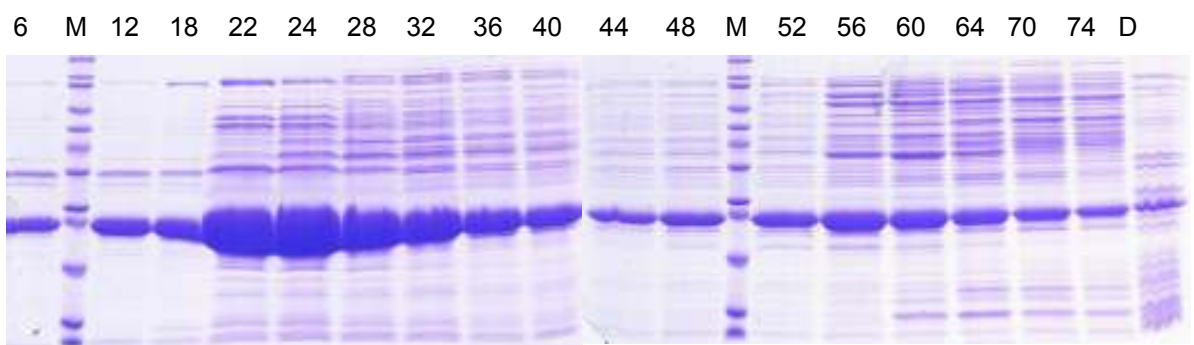
## 4.3 Proteinreinigung Sullj3 Cox2 und photometrische Charakterisierung

### 4.3.1 Proteinreinigung

Das Protein Sullj3 Cox2 wurde in BL21(DE3)pLysS heterolog überexprimiert, und durch Zellaufschluss aus dem Cytosol gereingt. Um proteolytischen Verdau zu verhindern, wurden Proteaseinhibitoren zugegeben. Weiters wurde das reduzierende Agens DTT zugegeben, um das aktive  $\text{Cu}_A$ -Zentrum im reduzierten Zustand zu halten.

#### 4.3.1.1 Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF

Nach der Zell-Lyse wurde der Überstand aus zwei L *E. coli* Kultur chromatographisch mit Q-Sepharose Fast Flow (FF) gereingt. Das eluierte Protein wurde in 6 mL Fraktionen gesammelt. Diese wurden auf eine 15% SDS-PAGE aufgetragen und aufgetrennt.

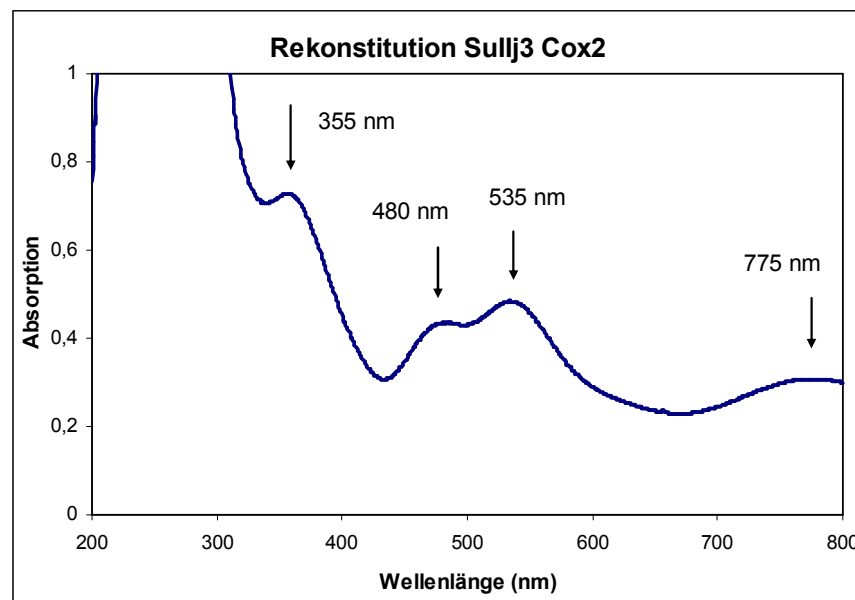


**ung 4.15:** 15% SDS-PAGE mit den gesammelten Sullj3 Cox2 Fraktionen nach der Reinigung mit Q-Sepharose FF. 6 – 74: Fraktionen 6 – 74; M: SigmaMarker, Wide Molecular Weight Range; D: Durchfluss Puffer A.

Jene Fraktionen, die große Mengen Sullj3 Cox2 enthielten wurden gepoolt (Fraktionen 6 – 74).

#### 4.3.1.2 Kupfer Rekonstitution von Sullj3 Cox2

Der Proteinpool wurde mit 3 M Harnstoff 1 h inkubiert und einer dreistufigen Dialyse unterzogen (siehe 3.4.2.2). Im letzten Dialyseschritt wurde dem Dialysepuffer 1,5 mM Cu(His)<sub>2</sub> zugegeben. Nach der vierstündigen Inkubation veränderte sich die Farbe des Proteinpools von grünlich-gelb auf violett. Die Rekonstitution wurde durch Aufnahme von UV-VIS Spektren im Bereich von 200 – 800 nm überprüft. Abbildung 4.16 zeigt, dass auch die rekonstituierte Cu<sub>A</sub>-Domäne Sullj3 Cox2 aus *Nostoc* sp. PCC 7120 die für *Synechocystis* sp. PCC 6803 charakteristischen Peaks aufweist [9, 27, 87].



**Abbildung 4.16:** Charakteristisches UV-VIS-Spektrum der rekonstituierten Cu<sub>A</sub>-Domäne von Sullj3 Cox2. Rekonstitutionsverfahren siehe 3.4.2.2. Charakteristische Peaks bei 355 nm, 480 nm, 535 nm und 775 nm.

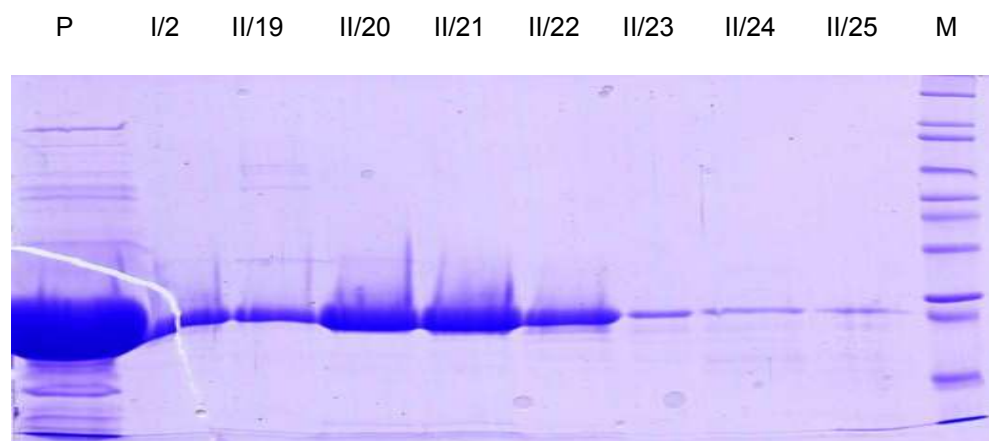
#### 4.3.1.3 Anionenaustauschchromatographie mit DEAE

Beim Auftragen der Probe bildete sich ganz oben auf der Säule kein rosa Ring, was darauf hindeutet, dass das rekonstituierte Protein Sullj3 Cox2 nicht ausreichend an der Säule haftete. Während des Probenauftrags begann das rekonstituierte Protein Sullj3 Cox2 schon zu eluieren. Die ganze Säule war lila gefärbt. Daher wurde die Probe schrittweise aufgetragen, zwischendurch wurde

mit Puffer A eluiert, um zu verhindern dass die Probe in den Durchfluss eluiert. Im Durchfluss, welcher eine starke Blaufärbung aufwies, reicherte sich das nicht eingebaute Kupfer an. Es wurden drei Fraktionen zu je 30 mL händisch nach Farbe gesammelt. Die drei Fraktionen wurden zu einem Pool zusammengeführt und wiesen eine intensive Violettfärbung auf. Der Pool wurde auf 1,3 mL mittels Amicon Centripreps aufkonzentriert.

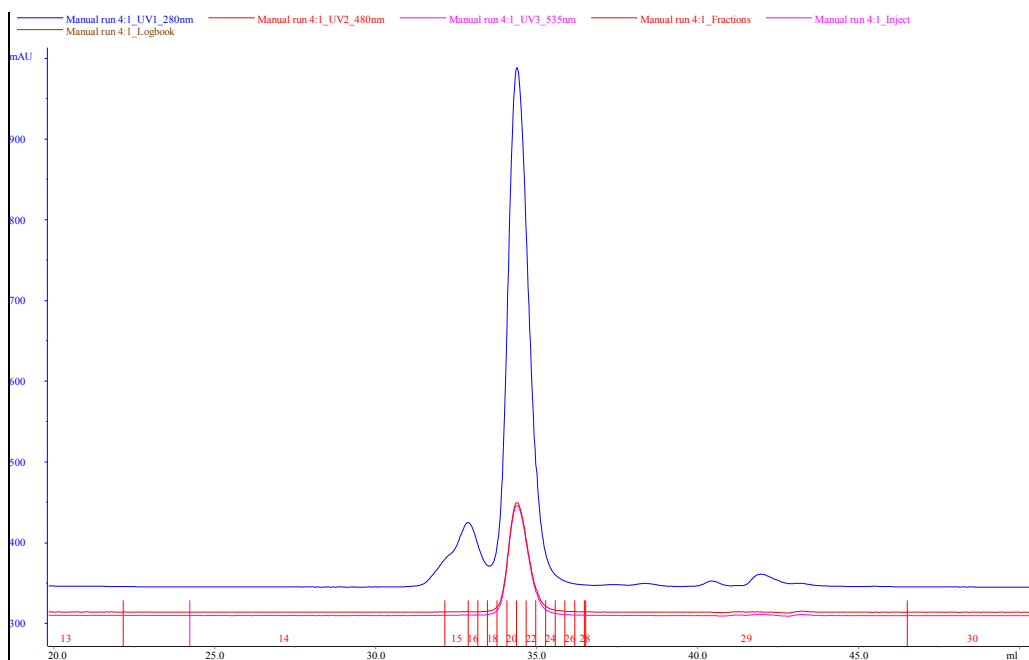
#### 4.3.1.4 Gelpermeationschromatographie mit Superdex 75

90  $\mu$ L der Probe wurden pro Lauf aufgetragen, wobei eine 100  $\mu$ L Schleife verwendet wurde. Die Fraktionen 19 – 25 (entspricht Fraktion 2 – 7 von Lauf II) wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um den Reinigungseffekt und das Verhältnis zum Fremdproteinanteil zu überprüfen. Die ausgewählten Fraktionen der 13 Läufe wurden gepoolt und mittels SDS-PAGE untersucht.



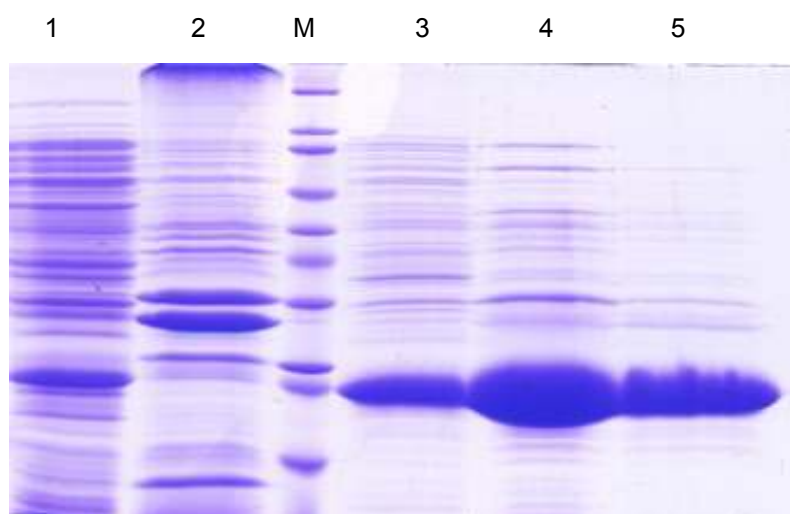
**Abbildung 4.17:** SDS-PAGE von Sullj3 Cox2 nach Gelpermeationschromatographie mit Superdex 75. P: Pool (1:2 Verdünnung) nach DEAE; I/2: Fraktion 2 von Lauf I; II/19 – II/25: Fraktionen 19 – 25, entsprechen den Fraktionen 2 – 8 von Lauf II.

Von Lauf II wurden die Fraktionen 19 bis 25 gepoolt. Die Fraktionen 23, 24 und 25 wurden ebenfalls gepoolt, obwohl sehr wenig Sullj3 Cox2 vorhanden war, da der Fremdproteinanteil minimal war. Diese Vorgehensweise wurde auch bei den restlichen Läufen angewandt.



**Abbildung 4.18:** Chromatogramm von Sullj3 Cox2 mit den aufgezeichneten Peaks bei 280 nm, 480 nm und 535 nm.

Es wurde ein Reinigungsgel (siehe Abbildung 4.19) angefertigt, um den Reinigungserfolg der drei Chromatographieschritte, bestehend aus Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF, Anionenaustauschchromatographie mit DEAE und Gelpermeationschromatographie mit Superdex 75 zu beurteilen.



**Abbildung 4.19:** SDS-PAGE von Sullj3 Cox2. Lane 1: Sullj3 Cox2 Überstand nach Zellaufschluss; 2: Sullj3 Cox2 Pellet nach Zellaufschluss; 3: Sullj3 Cox2 Pool nach Reinigung



mit Q-Sepharose; 4: Sullj3 Cox2 Pool nach Reinigung mit DEAE; 5: Sullj3 Cox2 Pool nach Reinigung mit Superdex 75.

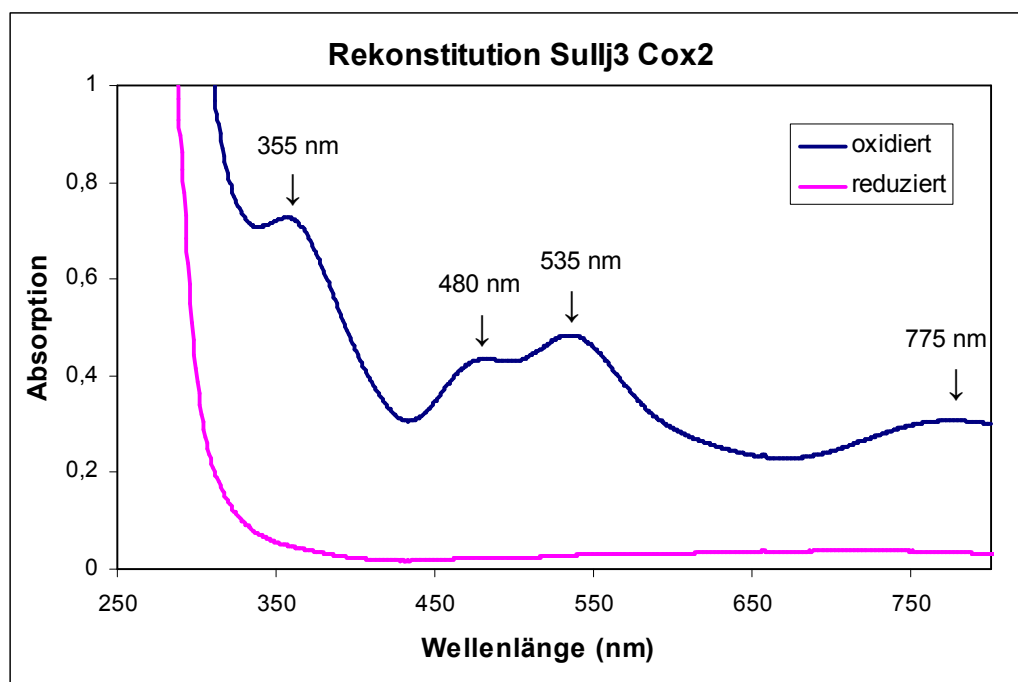
In Abbildung 4.19 ist zu beobachten, dass der Anteil an Fremdprotein nach jedem Reinigungsschritt etwas verringert wurde, während der relative Anteil an Sullj3 Cox2 kontinuierlich ansteigt. Des weiteren sind keine Abbauprodukte von Sullj3 Cox2 zu beobachten.

### 4.3.2 Photometrische Charakterisierung Sullj3 Cox2

#### 4.3.2.1 Spektroskopische Eigenschaften der oxidierten und reduzierten

#### Sullj3 Cox2

Im oxidierten Zustand weist das rekonstituierte  $\text{Cu}_A$ -Zentrum eine intensive Violettfärbung auf, während die reduzierte Form farblos ist. Bei pH 6,5 erscheinen vier charakteristische Peaks im UV-VIS Spektrum bei 355, 480, 535 und 775 nm, welche auf das oxidierte  $\text{Cu}_A$ -Zentrum zurück zu führen sind [9, 27,87].

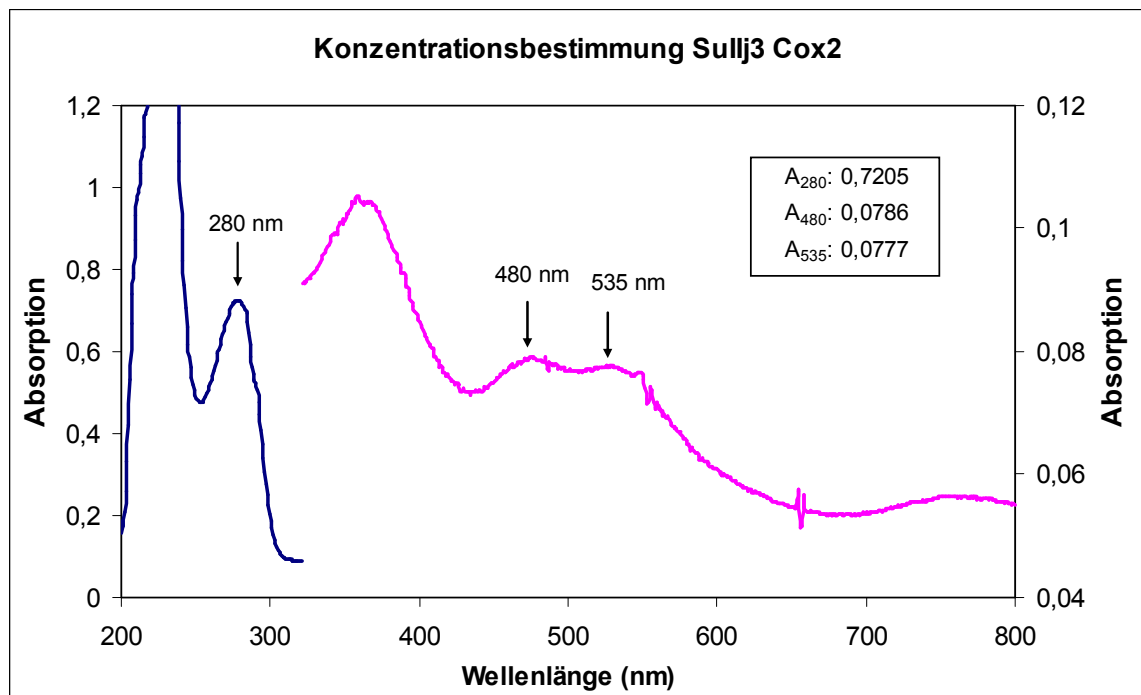


**Abbildung 4.20:** Sullj3 Cox2 im oxidierten (blaue Linie) und im reduzierten (violette Linie) Zustand. Die oxidierte Sullj3 Cox2 in 20 mM PP bei pH 6,5 zeigt charakteristische Peaks bei 355, 480, 535 und 775 nm.



### 4.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach dem letzten Reinigungsschritt mit Superdex 75 wurde der Proteinpool aufkonzentriert und die Proteinkonzentration durch Aufnahme eines UV-VIS Spektrums bestimmt.



**Abbildung 4.21:** Charakteristische Peaks der oxidierten, gereinigten und aufkonzentrierten Sullj3 Cox2 in SEC-Puffer, pH 7,0 im UV-VIS Spektrum.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Peaks bei 280, 480 und 535 nm herangezogen. Da keine experimentellen Daten zu den Extinktionskoeffizienten bei diesen Wellenlängen vorhanden waren, wurde der theoretische Extinktionskoeffizient bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) mit dem Programm ExPASy ([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)) berechnet. Weiters wurden die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{480}$  und  $\epsilon_{535}$  der Sullj3 von *Synechocystis* sp. PCC 6803 herangezogen [9, 27, 87].

Der Peak bei 280 nm repräsentiert die gesamte Proteinmenge, während die Peaks bei 480 und 535 nm spezifisch für Sullj3 Cox2 sind. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz

herangezogen:  $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ . Die Proteinmenge wurde folgendermaßen berechnet:  $m \text{ [g]} = c \text{ [mol / L]} \cdot V \text{ [L]} \cdot M \text{ [Da]}$ .

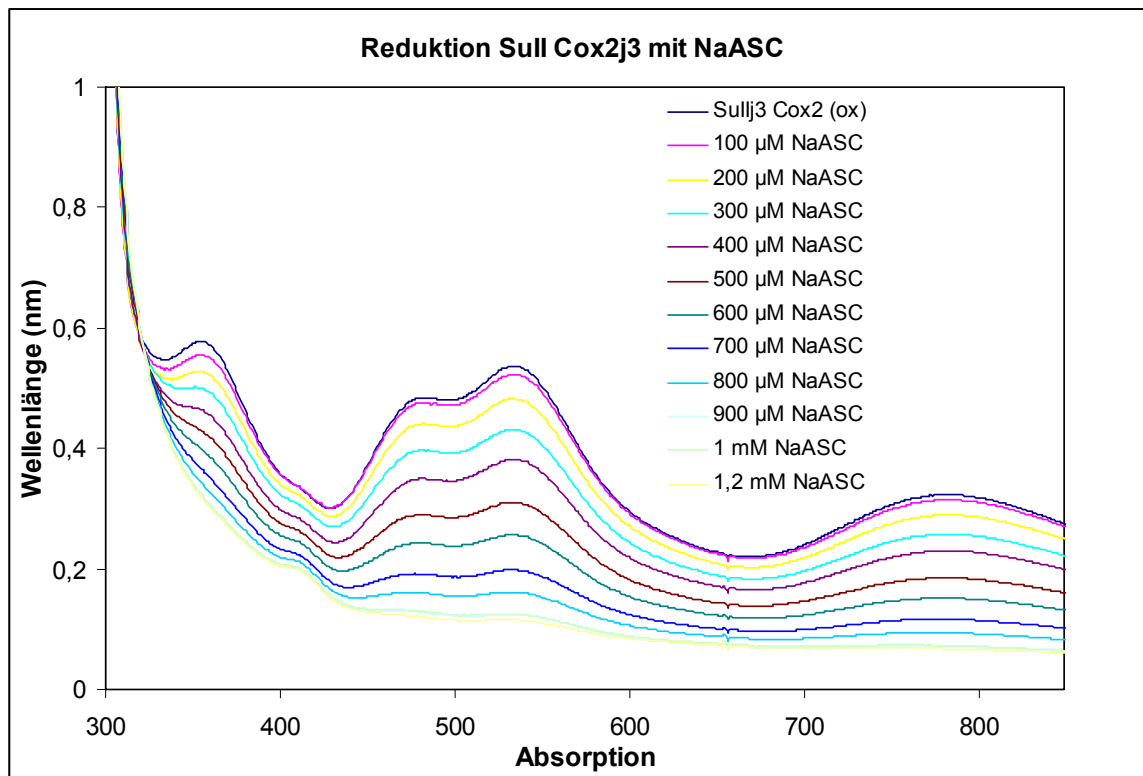
Die Schwankungen der rekonstituierten Proteinkonzentrationen bzw. -mengen ist einerseits darauf zurück zu führen, dass die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{480}$  und  $\epsilon_{535}$  jene von Sull3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 sind, und daher nicht eins zu eins auf Sull3 Cox2 übertragbar sind. Andererseits unterliegt die Effizienz des Kupfereinbaus Schwankungen.

Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient $\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	Proteinkonzentration [mM]	Proteinmenge / L <i>E. coli</i> Kultur [mg]
280	21000	1,029	20,79
480	2820	0,836	16,89
535	3080	0,757	15,29
<b>Kupfereinbaurrate</b>			<b>77,40 %</b>

**Tabelle 4.3:** Bestimmung der Proteinkonzentration und der Menge an Sull3 Cox2 / L *E. coli* Kultur.

#### 4.3.2.3 Reduktion der oxidierten Sull3 Cox2 mit Natriumascorbat

Die oxidierte Sull3 Cox2 konnte durch schrittweise Titration mit Natriumascorbat reduziert werden. Dies wurde durch die Reduktion der Intensität der Violettfärbung, bis hin zur völligen Entfärbung, beobachtet. Abbildung 4.23 zeigt die Spektren nach jedem Titrationsschritt mit steigender Menge Natriumascorbat.



**Abbildung 4.22:** Spektrum von Sullj3 Cox2 (185 µM) während der Reduktion mit steigenden NaAsc Konzentrationen. Sullj3 Cox2 in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7. Die Spektren wurden jeweils vier min nach der Zugabe von NaASC aufgenommen.

#### 4.3.2.4 Reoxidation der reduzierten Sullj3 Cox2 mit Kaliumhexacyanoferrat (III)

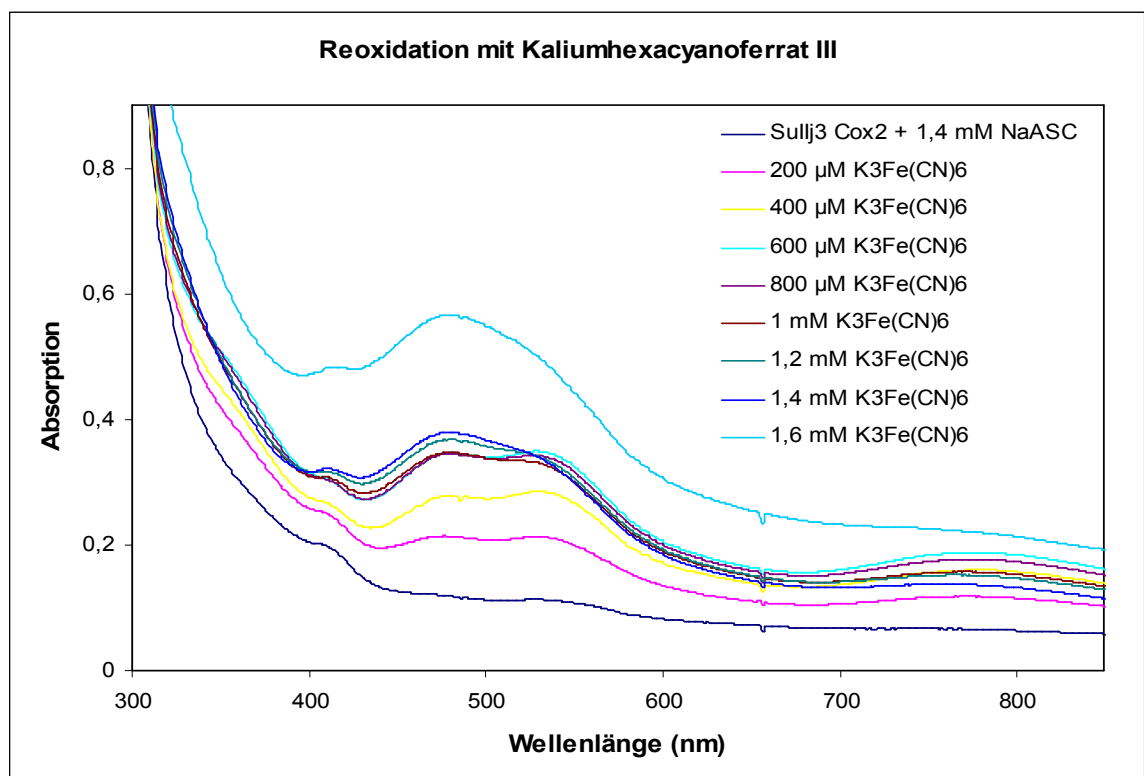
Es wurde versucht, die mit Natriumascorbat reduzierte Sullj3 Cox2 durch schrittweise Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III) wieder zu reoxidieren. In Abbildung 4.23 ist zu erkennen, dass anfangs, während der Zugabe von kleineren Mengen Kaliumhexacyanoferrat(III) eine deutliche Zunahme der charakteristischen Peaks des oxidierten  $\text{Cu}_A$  Zentrums auftritt. Mit steigenden Konzentrationen von Kaliumhexacyanoferrat(III), etwa ab einer Konzentration von 1 mM bzw. 1,2 mM, werden die Spektren jedoch eindeutig diffuser, die charakteristischen Peaks sind nicht genau erkennbar, obwohl die Absorption ansteigt. Die Absorption des Oxidationsmittel trägt dann maßgeblich zum Spektrum bei.

Die Konzentrationsbestimmung von Sullj3 Cox2 bei Reoxidationspunkt mit 0,8 mM Kaliumhexacyanoferrat III brachte folgendes Ergebnis:

$$A_{480} = 0,3453 \rightarrow c = 1,22 \cdot 10^{-4} \text{ mol / L; } m = 2,7 \text{ mg Holoprotein}$$

$$A_{535} = 0,3417 \rightarrow c = 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol / L; } m = 2,47 \text{ mg Holoprotein}$$

Bei einer Anfangsproteinkonzentration von 185  $\mu\text{M}$ , einer Gesamtproteinmenge von 17,2 mg, davon 4,86 mg Holoprotein ergibt dies einen reoxidierten Anteil an Holoprotein von 53,2 %. Allerdings ist hier die Eigenabsorption von Kaliumhexacyanoferrat noch nicht berücksichtigt, welche mit der hellblauen Linie dargestellt ist.

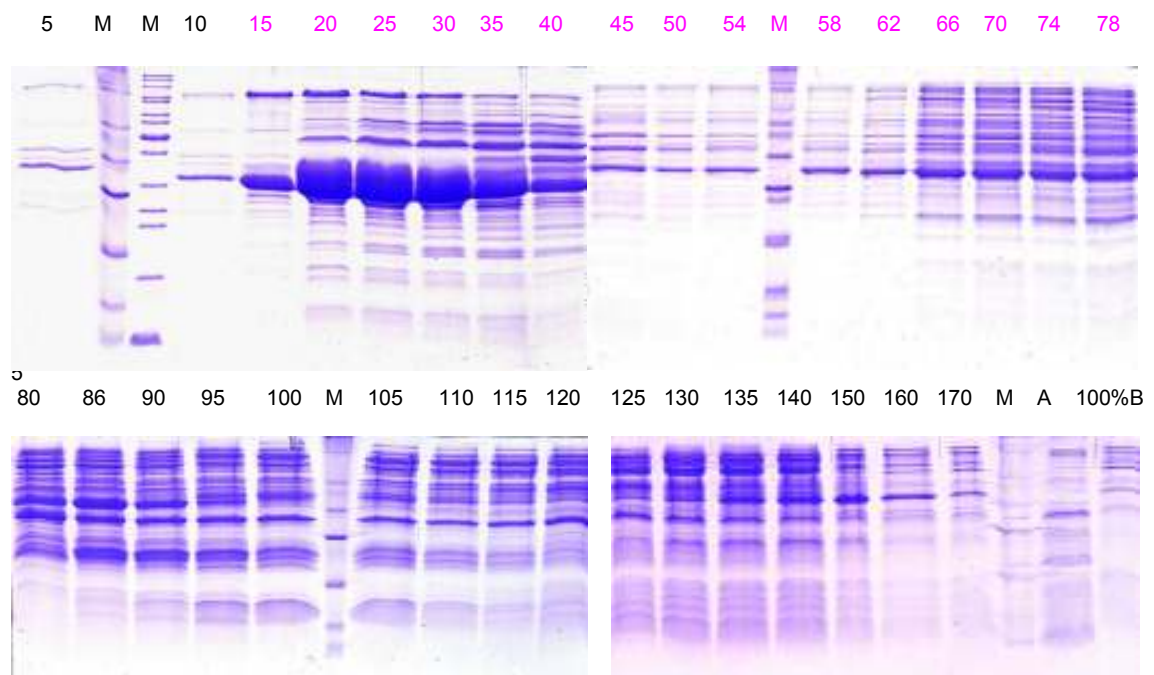


**Abbildung 4.23:** Spektrum während der Reoxidation der mit 1,4 mM NaASC reduzierten Sullj3 Cox2 mit steigenden Konzentrationen von Kaliumhexacyanoferrat III. Sullj3 Cox2 in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7. Die Spektren wurden direkt nach der Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat III aufgenommen.

## 4.4 Proteinreinigung Sulld2 Cox1

### 4.4.1 Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF

Nach der Zellyse wurde der Überstand aus zwei L *E. coli* Kultur chromatographisch mit Q-Sepharose Fast Flow (FF) gereinigt. Das eluierte Protein wurde in 6 mL Fraktionen gesammelt. Diese wurden auf eine 15% SDS-PAGE aufgetragen und aufgetrennt.



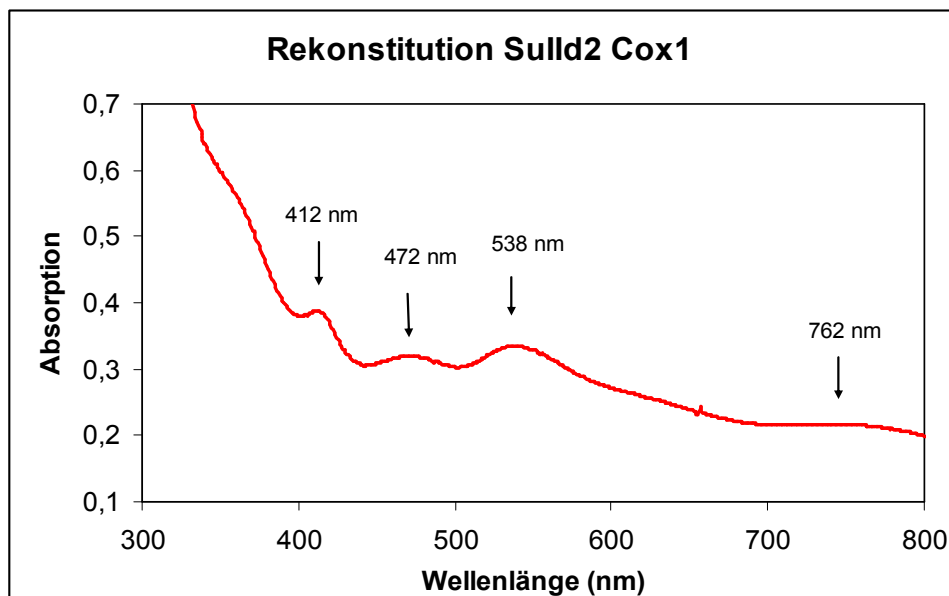
**Abbildung 4.24:** 15% SDS-PAGE mit den gesammelten Sulld2 Cox1 Fraktionen nach der Reinigung mit Q-Sepharose FF. 5 – 170: Fraktionen 5 – 170; M: SigmaMarker, Wide Molecular Weight Range; W: Waste; A: Durchfluss Puffer A.

Abbildung 4.24 zeigt, dass der Großteil des rekombinanten Proteins bereits zu Beginn eluiert. Die Fraktionen 15 bis 40 weisen sehr dicke Proteinbanden bei rund 30000 Da auf. Diese korrelieren mit der berechneten molaren Masse von Sulld2 Cox1. Die Fraktionen 15 bis 78 wurden gepoolt.

#### 4.4.2 Kupfer Rekonstitution von Sulld2 Cox1 und Bestimmung der Proteinkonzentration

Wie in Abschnitt 3.5.2.2 beschrieben, wurden verschiedene Rekonstitutionsverfahren entwickelt, um jenes zu etablieren, welches die größte Ausbeute an rekonstituiertem Protein aufweist.

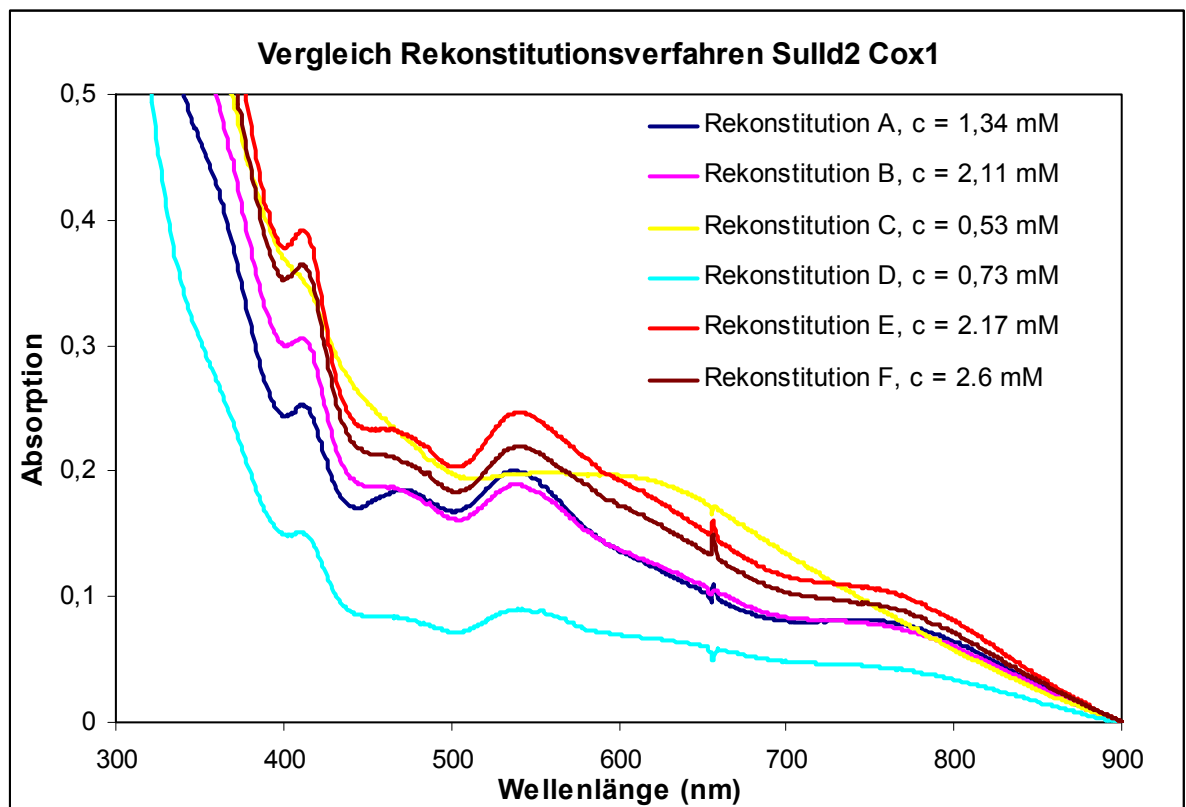
Das Rekonstitutionsverfahren A stellte sich diesbezüglich als am erfolgreichsten heraus. Der Proteinpool wurde mit 4 M Harnstoff 1 h inkubiert und einer vierstufigen Dialyse unterzogen (siehe 3.5.2.2). Im letzten Dialyseschritt wurde der Dialysepuffer mit 1,5 mM  $\text{Cu}(\text{His})_2$  versetzt. Nach vierstündiger Inkubation veränderte sich die Farbe des Proteinpools von grünlich-gelb auf violett. Die Rekonstitution wurde durch Aufnahme von UV-VIS Spektren im Bereich von 200 – 800 nm überprüft. Abbildung 4.25 zeigt die charakteristischen Peaks der rekonstituierten  $\text{Cu}_A$ -Domäne (Holoprotein) Sulld2 Cox1. Charakteristische Peaks sind bei 412, 472, 538 und 762 nm zu erkennen. Eine Schulter liegt bei etwa 350 nm vor. Da nach der Reinigung mit Q-Sepharose FF jedoch noch ein relativ hoher Fremdproteinanteil vorhanden ist, ist dieser nur sehr schlecht erkennbar.



**Abbildung 4.25:** Aufgenommenes UV-VIS-Spektrum der rekonstituierten  $\text{Cu}_A$ -Domäne von Sulld2 Cox1 nach dem Rekonstitutionsverfahren A; in 20 mM PP, pH 6,5. Peaks bei 412 nm, 472 nm, 538 nm und 762 nm. Ein Schulter liegt bei etwa 335 nm vor.

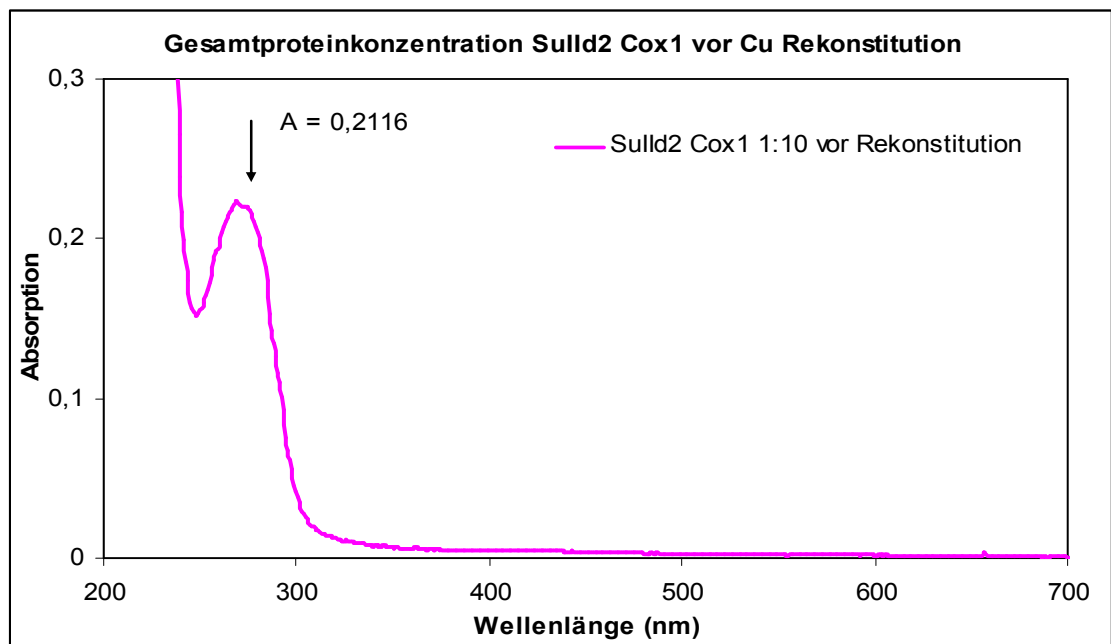
In Abbildung 4.26 zeigt den Vergleich der verschiedenen Rekonstitutionsverfahren dargestellt. Die Absorptionswerte der Ansätze wurden bei 900 nm auf 0 gestellt, um einen besseren Vergleich der relativen Werte zu erhalten. Jeder Ansatz wurde nach dem Dialyseverfahren aufkonzentriert. Da jedoch nicht jeder Ansatz auf dasselbe Volumen reduziert werden konnte, und Verluste während der Dialyse auftraten, wies jeder Ansatz eine unterschiedliche Konzentration an Gesamtprotein auf. Daher müssen die absoluten Absorptionswerte relativ betrachtet werden. Um die Effizienz des Kupfereinbaus zu veranschaulichen, wurde für jeden Rekonstitutionsansatz der Prozentsatz des Holoproteins berechnet (Siehe Tabelle 4.6).

Bei den Ansätzen A, B, D, E und F sind charakteristische Peaks bei 412, 472, 538 und 762 nm zu erkennen, während Ansatz C kein für die Rekonstitution des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums charakteristisches Spektrum aufweist.



**Abb. 4.26:** UV-VIS Spektren der unterschiedlichen Rekonstitutionsverfahren im Vergleich. Die Spektren wurden bei 900 nm auf 0 gesetzt.

Da bei jedem Rekonstitutionsversuch ein Proteinpool mit unterschiedlicher Gesamtproteinkonzentration verwendet wurde, wurde mit Hilfe der Absorptionswerte bei 480 und 535 nm und der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{480}$  bzw.  $\epsilon_{535}$  von Sulld3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 die Proteinkonzentration der rekonstituierten  $\text{Cu}_A$ -Domäne berechnet. Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde mit Hilfe des Programms ExPASy ([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)) der theoretische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  berechnet ( $\epsilon_{280} = 24075 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Der Peak bei 280 nm repräsentiert die gesamte Proteinmenge, während die Peaks bei 480 und 535 nm spezifisch für rekonstituierte Sulld2 Cox1 sind. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz herangezogen:  $A = \epsilon * c * d$ . Die Proteinmenge wurde folgendermaßen berechnet:  $m [\text{g}] = c [\text{mol} / \text{L}] * V [\text{L}] * M [\text{Da}]$ .



**Abb. 4.27:** UV-VIS Spektrum der  $\text{Cu}_A$ -Domäne von Sulld2 Cox1 nach der Reinigung mit Q-Sepharose FF und vor der Rekonstitution des aktiven Kupferzentrums. 1:10 Verdünnung in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5.



Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient $\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	Proteinkonzentration [ $\mu$ M]	Gesamtproteinmenge / L <i>E. coli</i> Kultur [mg]
280	24075	87,89	232

**Tabelle 4.4:** Berechnung der Gesamtproteinkonzentration und der Gesamtproteinmenge pro L *E. coli* Kultur.

	Gesamtprotein- konzentration vor Dialyse	Volumen nach Dialyse	Volumen nach Aufkonzentration	<b>Gesamtprotein- konzentration nach Dialyse</b>
A	87,89 $\mu$ M	15 mL	1 mL	<b>1,34 mM</b>
B	87,89 $\mu$ M	12 mL	0,5 mL	<b>2,11 mM</b>
C	87,89 $\mu$ M	3 mL	0,5 mL	<b>0,527 mM</b>
D	87,89 $\mu$ M	15 mL	1,8 mL	<b>0,732 mM</b>
E	87,89 $\mu$ M	15 mL	0,6 mL	<b>2,17 mM</b>
F	87,89 $\mu$ M	15 mL	0,5 mL	<b>2,6 mM</b>

**Tabelle 4.5:** Berechnungen der Proteinkonzentrationen in den einzelnen Rekonstitutionsansätzen.

Die Proteinkonzentrationen der rekonstituierten Sulld2 Cox1 wurden mit der Gesamtproteinkonzentration in Relation gesetzt, die Kupfereinbaurrate berechnet und somit eine Vergleichbarkeit der Effizienz der Rekonstitutionsverfahren hergestellt. Da es sich bei den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{480}$  und  $\epsilon_{535}$  um jene der Untereinheit Sull3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 handelt, und nicht eins zu eins auf Sulld2 Cox1 übertragbar sind, müssen die Konzentrationen und die Kupfereinbaurrate als Näherungswerte gesehen werden.

	Gesamt Konz. (mM)	A <sub>480</sub> (nm)	C <sub>480</sub> (mM)	A <sub>535</sub> (nm)	C <sub>535</sub> (mM)	Mittelwert C <sub>480</sub> und C <sub>535</sub>	% Cu- Einbau
A	<b>1,34</b>	0,319	0,113	0,334	0,108	<b>0,1110</b>	<b>8,29 %</b>
B	<b>2,11</b>	0,321	0,114	0,324	0,105	<b>0,1097</b>	<b>5,20 %</b>
C	<b>0,53</b>	n.d.	-	n.d.	-	-	<b>n.d.</b>
D	<b>0,73</b>	0,148	0,052	0,154	0,050	<b>0,0515</b>	<b>7,06 %</b>
E	<b>2,17</b>	0,356	0,126	0,371	0,120	<b>0,1234</b>	<b>5,67 %</b>
F	<b>2,6</b>	0,323	0,114	0,332	0,108	<b>0,1113</b>	<b>4,28 %</b>

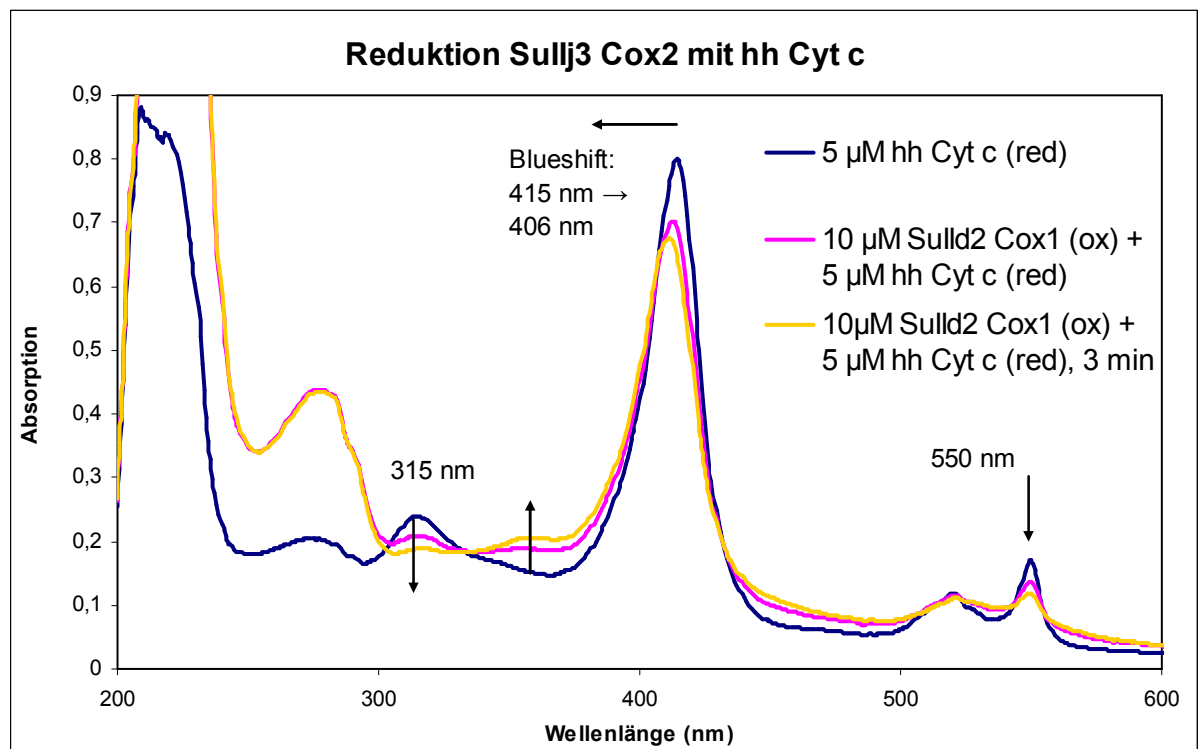
**Tabelle 4.6:** Absorptionswerte im UV-VIS Spektrum, Proteinkonzentrationen und Kupfereinbauanteilen der unterschiedlichen Rekonstitutionsverfahren, Sulld2 Cox1 in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5. A<sub>480</sub>: Absorptionswert bei 480 nm; A<sub>535</sub>: Absorptionswerte bei 535 nm.  $\epsilon_{480}$  und  $\epsilon_{535}$ : Extinktionskoeffizienten von Sull3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803.

## 4.5 Messungen des Elektronentransfers (ET)

### 4.5.1 Steady-state Messungen

#### 4.5.1.1 Reduktion von Sullj3 Cox2 mit hh Cyt c

Die oxidierte Sullj3 Cox2 wurde durch Zugabe des reduzierten Ein-Elektronendonors Pferdeherz Cyt c (hh Cyt c) reduziert. Zu 10 mM Sullj3 Cox2 wurde hh Cyt c (5  $\mu$ M Endkonzentration) zugegeben. Es wurde ein Spektrum direkt nach der Zugabe von hh Cyt c aufgenommen, ebenso nach dreiminütiger Wartezeit. Es konnte eine deutliche Reduktion der Intensität der Violett-färbung beobachtet werden. Das Spektrum zeigt die durch Reaktion mit Sullj3 Cox2 verringerte Intensität der charakteristischen Banden von reduziertem hh Cyt c. Bei vollständiger Oxidation von hh Cyt c verändert sich die Wellenlänge der Soretbande von 415 auf 406 nm (Blueshift).



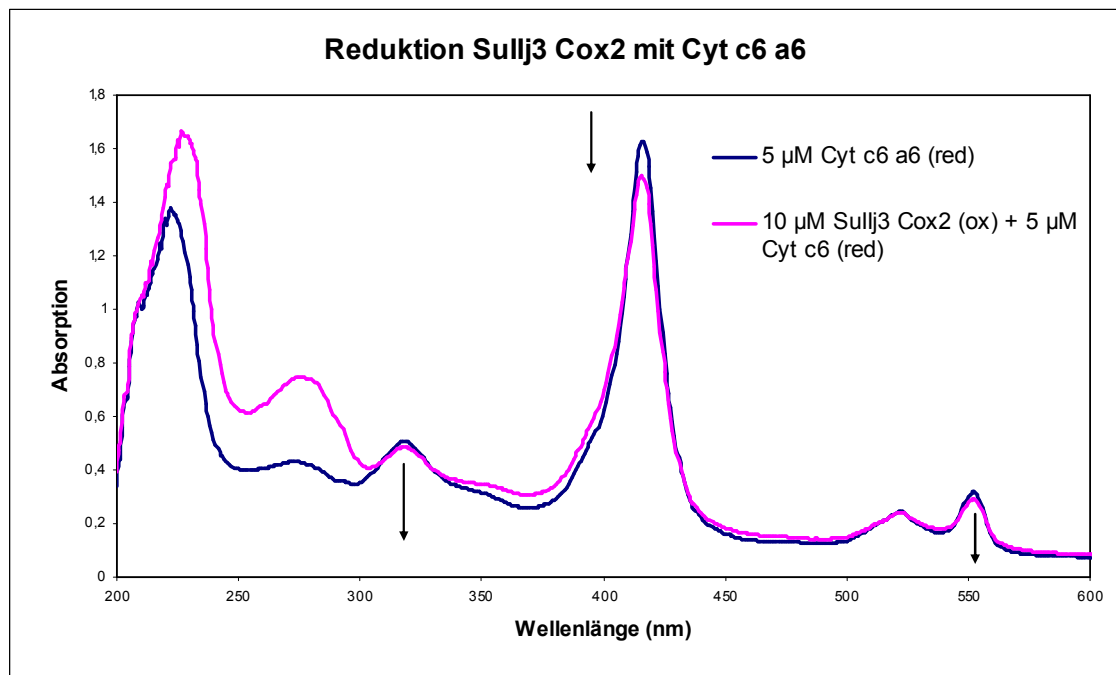
**Abbildung 4.28:** Spektren von 10 µM Sullj3 Cox2 in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7 mit 5 µM hh Cyt c.

Im reduzierten Zustand weist hh Cyt c ein charakteristisches Spektrum mit Peaks bei 315, 415 und 550 nm auf. Bei Reaktion mit der oxidierten Sullj3 Cox2 ist im Spektrum deutlich zu erkennen, dass sich die Intensität der Absorption bei besagten Wellenlängen wesentlich verringert, ebenso wie der Blueshift der Soretbande, was auf einen Elektronenaustausch zwischen den beiden Proteinen hinweist (Reduktion von Sullj3 Cox2 und Oxidation von hh Cyt c).

#### 4.5.1.2 Steady-state Titration von Sullj3 Cox2 mit Cyt $c_6$ a6 aus

##### *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die oxidierte Sullj3 Cox2 wurde durch Zugabe des reduzierten Ein-Elektronendonors Cyt  $c_6$  a6 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 reduziert. Zu 10 mM Sullj3 Cox2 wurde Cyt  $c_6$  a6 (5 µM Endkonzentration) zugegeben. Es wurde ein Spektrum direkt nach der Zugabe von hh Cyt c aufgenommen.



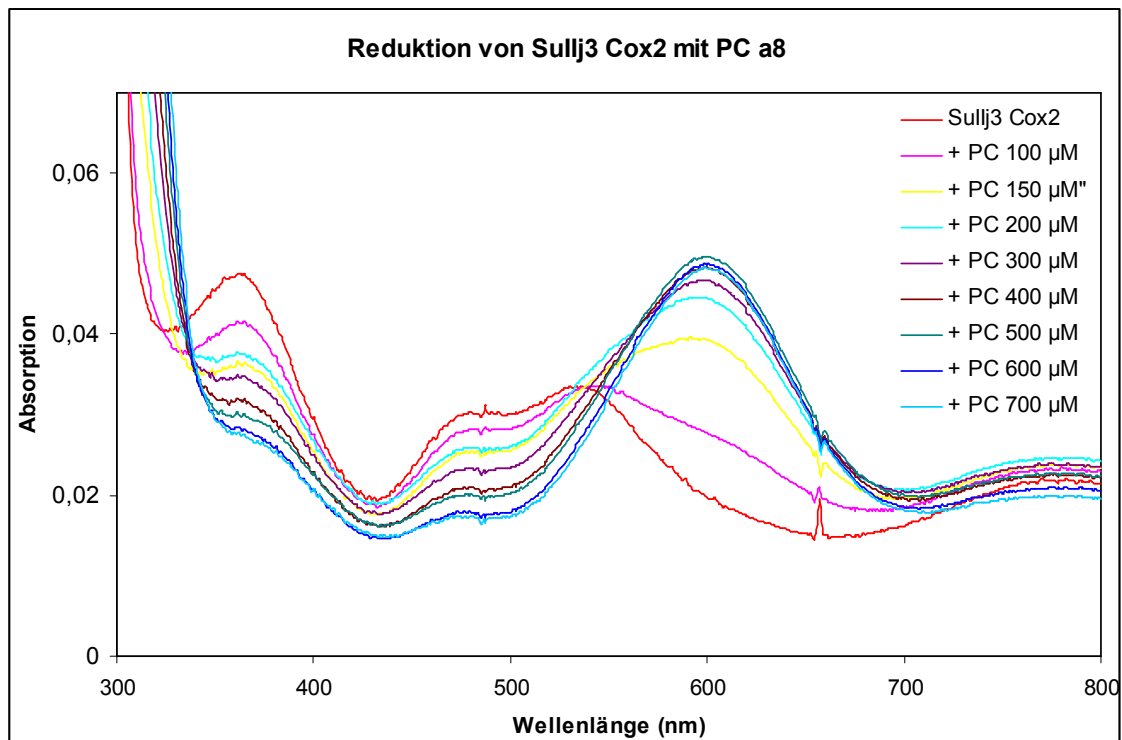
**Abb. 4.29:** UV-VIS Spektrum der Reduktion der Sullj3 Cox2 mit Cyt c<sub>6</sub> a<sub>6</sub> in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7.

Das reduzierte Cyt c<sub>6</sub> a<sub>6</sub> weist ein charakteristisches UV-VIS Spektrum auf, mit Peaks bei 318, 415 und 552 nm, deren Intensität sich bei Zugabe von oxidiertem Sullj3 Cox2 verringert, was auf einen teilweisen Elektronenaustausch zwischen den beiden Proteinen hinweist.

#### 4.5.1.3 Steady-state Titration von Sullj3 Cox2 mit Plastocyanin a8 aus

##### *Synechocystis* sp. PCC 6803

Verschiedene Konzentrationen des reduzierten PC aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 und 700 µM) wurden zu 40 µM Sullj3 Cox2 im oxidierten Zustand zugegeben und ein UV-VIS Spektrum aufgenommen.

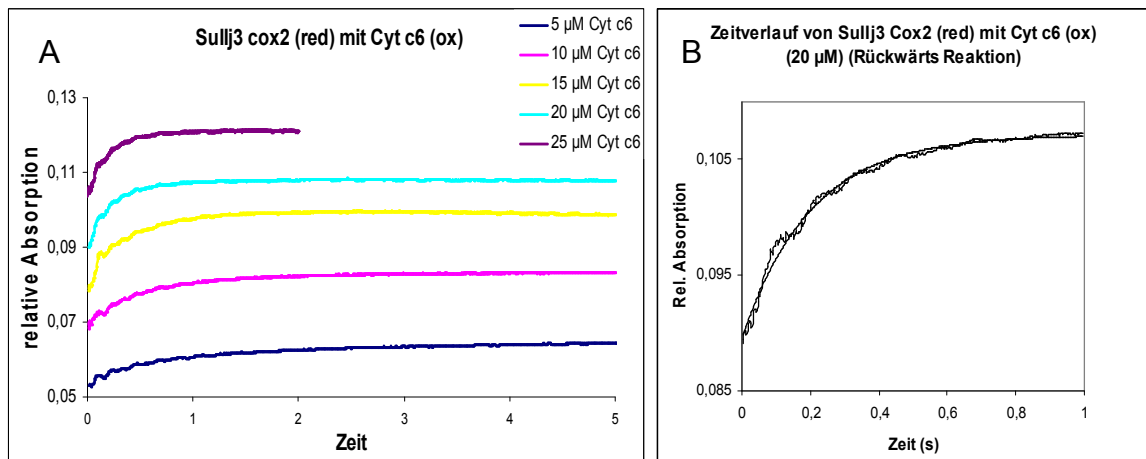


**Abb. 4.30:** UV-VIS Spektrum der Reduktion von Sullj3 Cox2 mit Plastocyanin a8 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7.

In Abbildung 4.30 ist eine deutliche Reduktion von Sullj3 Cox2 zu erkennen. Mit steigender Konzentration von Plastocyanin a8 nehmen die charakteristischen Peaks der oxidierten Sullj3 Cox2 ab, während der charakteristische Peak des oxidierten Plastocyanins a8 bei 603 nm schrittweise ansteigt.

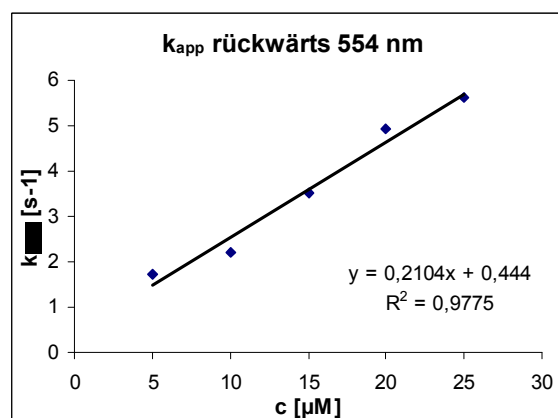
#### 4.5.2 Pre-steady-state Messungen

Um die kinetischen Daten des Elektronentransfers zwischen dem rekombinanten  $\text{Cu}_A$ -Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase Sullj3 Cox2 aus *Nostoc* sp. PCC 7120 und Cyt  $c_{6\_2}$  aus *Nostoc* sp. PCC 7120 bzw. hh Cyt *c* ermitteln zu können, wurden Stopped-Flow Messungen durchgeführt. Die Reaktion wurde mittels UV-VIS Spektroskopie bei 554 nm beobachtet. Abbildung 4.32 A zeigt die typischen Zeitverläufe der Absorptionsänderungen der Oxidation von Sullj3 Cox2 [2 µM] durch oxidiertes Cyt  $c_{6\_2}$  [5 - 25 µM].



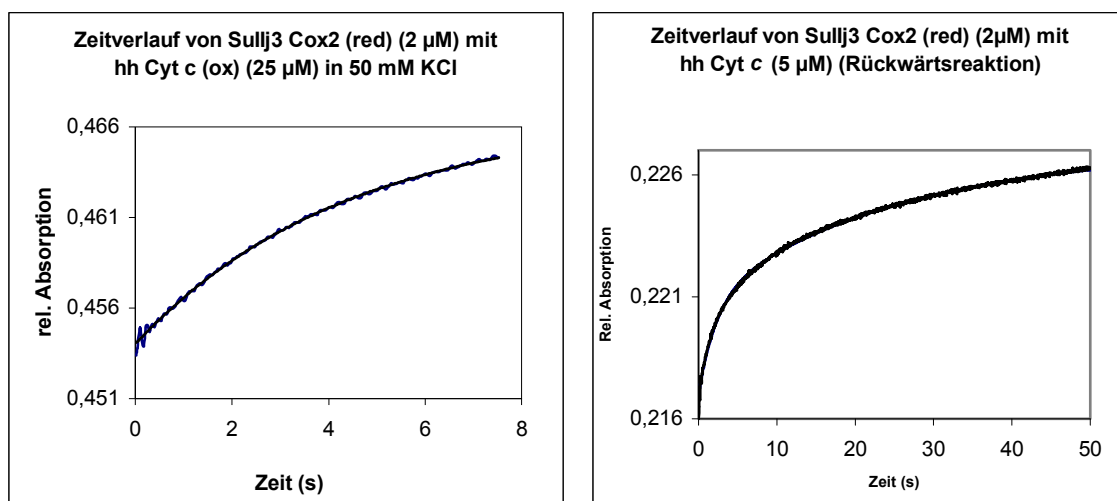
**Abb. 4.31:** **A:** Der Zeitverlauf der Absorptionsänderungen der Rückwärtsreaktion von Sullj3 cox2 (red) mit Cyt  $c_{6\_2}$  (ox). 2 μM Sullj3 Cox (red) und 5 – 25 μM Cyt  $c_{6\_2}$ . **B:** Gefitteter Zeitverlauf der Absorptionsänderung der Rückwärtsreaktion von Sullj3 Cox2 (red) mit Cyt  $c_{6\_2}$  (ox) bei 2 μM Sullj3 Cox2 und 20 μM Cyt  $c_{6\_2}$ .

Die erste Reaktionsphase wurde mit Hilfe einer einfach exponentiellen Gleichung gefittet, wodurch  $k_{\text{obs}}$ , die pseudo-first order Ratenkonstante, bestimmt wurde. In Abbildung 4.32 wurden die „gefitteten“  $k_{\text{obs}}$  Rate der Rückwärtsreaktion gegen die Cyt  $c_{6\_2}$  Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Funktion wurde herangezogen, um  $k_{\text{app}}$ , die biomolekulare Ratenkonstante, zu berechnen. In 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7 betrug diese  $2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , wobei die Reduktion von Cytochrom  $c_6$  durch die Absorption bei 554 nm beobachtet wurde.

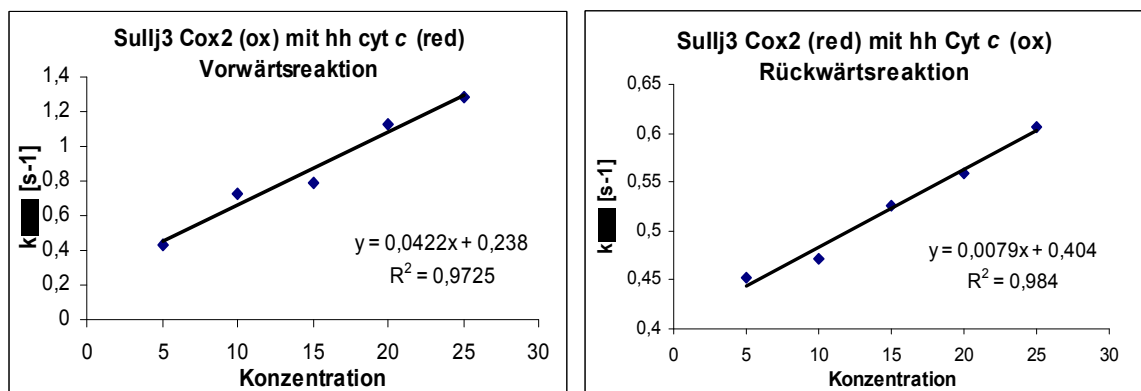


**Abb. 4.32:** Plot von  $k_{\text{obs}}$  gegen die Cyt  $c_{6\_2}$  Konzentration der Rückwärtsreaktion. Reaktionsbedingungen: 2 μM Sullj3 Cox2 (red), 5 – 25 μM Cyt  $c_{6\_2}$  (ox) in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.

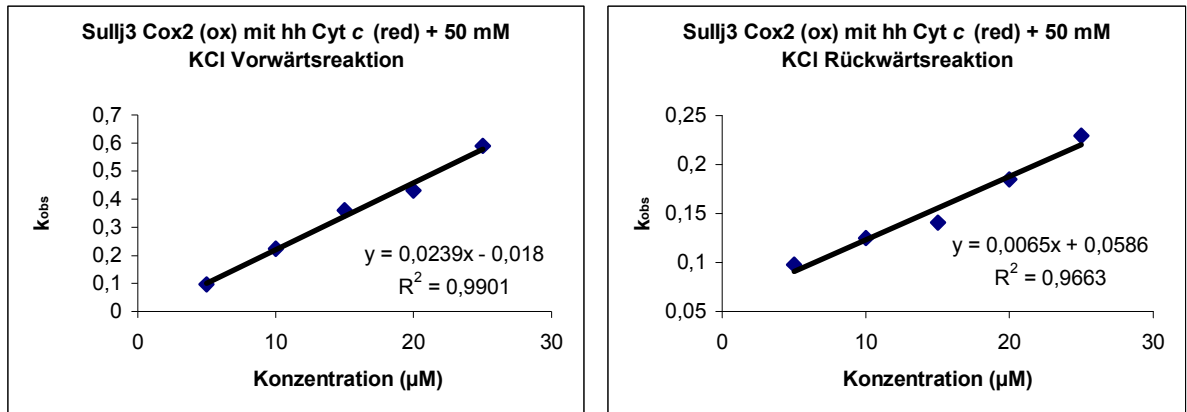
Dasselbe Verfahren wurde auf die Reaktion mit hh Cyt c angewandt. Die Reaktion lief jedoch wesentlich langsamer ab, was auf die sehr ähnlichen Redoxpotentiale der beiden Reaktionspartner zurückzuführen ist. In 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7 betrug  $k_{app}$  der Vorwärtsreaktion  $4,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , der Rückwärtsreaktion  $7,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Siehe Abb. 4.34). Weitere Messungen wurden bei Anwesenheit von 50 mM KCl durchgeführt. Die entsprechenden berechneten  $k_{app}$  Werte betragen  $2,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Vorwärtsreaktion und  $6,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Rückwärtsreaktion (Abb. 4.36).



**Abb. 4.33:** Links: Zeitverlauf der Absorptionsänderung der Rückwärtsreaktion von Sullj3 Cox2 (red) mit hh Cyt c (ox) bei 2 µM Sullj3 Cox2 und 25 µM hh Cyt c + 50 mM KCl. Rechts: Rückwärtsreaktion von Sullj3 Cox2 (red) mit hh Cyt c (ox) bei 2 µM Sullj3 Cox2 und 5µM hh Cyt c.



**Abb. 4.34:** Plot von  $k_{obs}$  gegen die hh Cyt c Konzentrationen der Vorwärts- (links) und der Rückwärtsreaktion (rechts). Reaktionsbedingungen: 2 µM Sullj3 Cox2, 5 – 25 µM hh Cyt c in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.



**Abb. 4.35:** Plot von  $k_{\text{obs}}$  gegen die hh Cyt c Konzentrationen der Vorwärts- (links) und der Rückwärtsreaktion (rechts). Reaktionsbedingungen: 2 µM Sullj3 Cox2, 5 – 25 µM hh Cyt c in 10 mM Phosphatpuffer + 50 mM KCl, pH 7.



Protein	$E^{\circ'}$ [mV]	$k_{app}$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ]		$k_{app}$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ]		$E^{\circ'}$ [mV]	Protein
<b>Sulla3</b>		Vorw. SYN 6803	Rückw. SYN 6803	Vorw. N 7120	Rückw. N 7120	<b>Sullj3 Cox2</b>	
Cyt $c_6$	324	$(3,3 \pm 0,3) * 10^5$	$(3,9 \pm 0,1) * 10^6$	n.d.	$2,1 * 10^5$	335	Cyt $c_6_2$ (cydA)
Pc	360	$(5,1 \pm 0,2) * 10^4$	$8,5 \pm 0,4) * 10^4$	n.d.	n.d.	360	Pc
hh Cyt $c$	251	$2,1 * 10^4$	n.d.	$4,2 * 10^4$	$7,9 * 10^3$	251	hh Cyt $c$
hh Cyt $c^1$		$1,4 * 10^4$	n.d.	$2,4 * 10^3$	$6,5 * 10^3$		hh Cyt $c^2$
hh Cyt $c^3$		$5,6 * 10^3$	n.d.				
Cyt cM	150	$(2,4 \pm 0,1) * 10^5$	n.d.				

**Tabelle 4.7:** Vergleich der mittels Stopped-Flow Messungen berechneter  $k_{app}$  Werte. Bei *Synechocystis* sp. PCC 6803 diente jeweils Sulla3 als Elektronenakzepter der ganz links angeführten Reaktionspartner. Alle Reaktionen mit Proteinen aus *Nostoc* sp. PCC 7120 (rechte Spalte) wurden mit Sullj3 Cox2 durchgeführt. Reaktionsbedingungen: Reaktionen mit Proteinen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803: 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0. Reaktionen mit Proteinen aus *Nostoc* PCC 7120: 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0. <sup>1)</sup> 20 mM Phosphatpuffer + 17,5 mM KCl; <sup>2)</sup> 10 mM Phosphatpuffer + 50 mM KCl; <sup>3)</sup> 20 mM Phosphatpuffer + 50 mM KCl.

## 5. Diskussion

### 5.1 Klonierung von Sulld2 Cox1 und Sulld7 Cox2

Die Klonierung des 732 bp langen Genfragments aus *coxB1*, Sulld2 Cox1, wurde erfolgreich durchgeführt. Hierfür wurden ein 48 Basen langer upstream Primer und ein 49 Basen langer Downstream Primer verwendet. Die Polymerasekettenreaktion wurde mit der DNA-Polymerase PHUSION Hot Start High Fidelity bei einer Annealingtemperatur von 69°C durchgeführt. Es konnte eine mutationsfreie Kopie des gewünschten Genabschnitts in das pET-3a Plasmid eingeführt, und dieses in BL21(DE3)pLysS Zellen durch Elektroporation eingeschleust werden. Die Expression der Plasmid DNA wurde durch Zugabe von IPTG induziert und das Proteinprodukt mittels SDS-PAGE auf seine Größe überprüft.

Im Gegensatz dazu konnte kein mutationsfreier Klon, der das 642 lange bp Genstücks aus *coxB2* enthält, Sulld7 Cox2, hergestellt werden. Mögliche Gründe dafür sind (i) die wesentlich kürzeren Primer (28 und 20 bp), mit denen die Polymerasekettenreaktion durchgeführt wurde. Daher musste für die PCR eine wesentlich niedrigere Annealingtemperatur gewählt werden (49°C), wodurch die Wahrscheinlichkeit der Bildung unspezifischer Basenpaare und somit das Auftreten von Mutationen wesentlich erhöht wurde. Außerdem wurde (ii) mit einer anderen DNA Polymerase gearbeitet, der DyNAzyme™ DNA Polymerase von Finnzymes. Diese besitzt eine höhere Fehlerrate als PHUSION Hot Start DNA Polymerase, welche ein extrem niedrige Fehlerrate von nur  $4,4 \cdot 10^{-7}$  aufweist.

Obwohl der Sulld7 Cox2 Klon Mutationen aufwies, wurde ein der Größe des erwarteten Proteins entsprechendes Expressionsprodukt erhalten. Die Sequenzierung zeigte jedoch, dass zwei Mutationen, davon eine stille, im Insert aufgetreten sind.

---

## 5.2 Zellaufschluss und Reinigung von Sullj3 Cox2 und Sulld2

### Cox1

Der Klon Sullj3 Cox2 wurde im Vorfeld im Rahmen der Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Metalloproteine hergestellt. Der Klon enthält ein 579 bp langes Insert. Die erfolgreiche Expression und Reinigung wurde bereits in einer früheren Arbeit dokumentiert [107].

Nach der Expression von Sullj3 Cox2 in BL21(DE3)pLysS wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die anschließende Reinigung mittels Q-Sepharose Fast Flow erfolgte nach der etablierten Methode für *Synechocystis* sp. PCC 6803 [9]. Die Elution des Proteins begann bereits direkt nach dem Auftrag des ersten Stufengradientens. Eine kleine Menge Protein eluierte bereits während des Spülens mit Puffer A (siehe Abb. 4.15).

Die Reinigung mit DEAE war schwieriger, da das Protein Sullj3 Cox2 nicht ausreichend auf der Säule haftete. Bereits während des Probenauftrags begann das Protein zu eluieren. Die ganze Säule war violett gefärbt und der Probenauftrag musste immer wieder unterbrochen werden, um das eluierende Protein händisch zu sammeln.

Dieses Verfahren wurde im Rahmen der Reinigung von Cu<sub>A</sub> aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 entwickelt [9]. Die aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Reinigung von Sullj3 Cox2 weisen darauf hin, dass Sullj3 Cox2 einen unterschiedlichen theoretischen pI-Wert aufweist (pI = 4,7), als die Sull aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (pI = 4,5).

Trotzdem wurde ein relativ guter Reinigungserfolg erzielt (siehe Abb. 4.19). Dies wurde auch bei der anschließenden Gelpermeationschromatographie mit Superdex 75 deutlich, da hier bereits der Fremproteinanteil sehr gering war (siehe Abb. 4.18).

Bei der Reinigung von Sulld2 Cox1 wurde nur die Anionenaustauschromatographie mit Q-Sepharose Fast Flow durchgeführt, da der Proteinpool nach dem ersten Reinigungsschritt aufgeteilt wurde und verschiedenste Rekonstitutionsansätze des Cu<sub>A</sub>-Zentrums durchgeführt wurden.

### 5.3 Rekonstitution von Cu<sub>A</sub> aus Sullj3 Cox2 und Sulld2 Cox1

Die Rekonstitution rekombinanter Cu<sub>A</sub>-Domänen verschiedener Organismen (*Synechocystis* sp. PCC 6803 [9], *Paracoccus denitrificans* [102], *E. coli* [103,104], *Thermus thermophilus* [105] und *Sulfolobus acidocaldarius* [106]) wurde bereits erfolgreich durchgeführt.

Frühere Versuche, das Cu<sub>A</sub>-Zentrum von Sullj3 Cox2 zu rekonstituieren, zeigten jedoch dass es unter den beschriebenen Bedingungen für *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu keiner Besetzung des Redoxzentrums mit Kupfer kam [107]. Ausgehend von den etablierten Methoden für die Rekonstitution des Cu<sub>A</sub>-Zentrums von *Synechocystis* sp. PCC 6803 [9], wurden verschiedenste Verfahren angewandt, die jedoch zu keinem erfolgreichen Ergebnis führten [107].

Lappalainen et al [102] zeigt, dass das Fragment der löslichen Untereinheit II von *Paracoccus denitrificans* bei der Expression im Periplasma von *E. coli* modifiziert und somit falsch gefaltet wird. Deshalb wurde das Protein entfaltet und wieder rückgefaltet. Dies wurde durch Zugabe von Urea und darauf folgende schrittweise Entfernung des Harnstoffs durch Dialyse bei Anwesenheit von DTT erreicht. Erst danach wurde die Rekonstitution durch Zugabe von CuCl<sub>2</sub> durchgeführt, da die Rekonstitution während des Rückfaltens zu einem farblosen Produkt führte.

Dasselbe Prinzip wurde nun bei der Rekonstitution von Sullj3 Cox2 aus *Nostoc* sp. PCC 7120 angewandt. Zuerst wurde das Protein in 3 M Urea inkubiert, danach die Harnstoffkonzentration durch dreistufige Dialyse schrittweise verringert (1 M Harnstoff) und schlussendlich vollkommen entfernt. Im

Anschluss erfolgte der Kupfereinbau. Dadurch konnte eine teilweise Rekonstitution des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums erreicht werden. Problematisch gestalten sich jedoch noch die Ausbeuten. Im Zuge dieser Arbeit konnte zwar ein Rekonstitutionsansatz mit einer Kupfereinbaurrate von 77,4% erreicht werden, Ausbeute in diesem hohen Ausmaß konnten jedoch nicht reproduziert werden.

Derselbe Versuchsansatz führte bei Sulld2 Cox1 zu keinem positiven Ergebnis. Erst durch schrittweise Veränderungen der einzelnen Dialyseschritte und der Harnstoffkonzentrationen (siehe 4.4.2) konnte ein messbarer Einbau des Kupfers erzielt werden. Bei Sulld2 Cox1 sind die Kupfereinbauraten jedoch sehr gering. Diese schwanken zwischen 4,3 und 8,3%. Mögliche Ursachen für die schlechte Cu-Besetzung im Redoxzentrum könnten auf eine unzureichende Entfaltung oder eine fehlerhafte Rückfaltung zurückzuführen sein.

Um jedoch erfolgreiche und aufschlussreiche Elektronentransferstudien zwischen dem  $\text{Cu}_A$ -Zentrum und seinen potenziellen Elektronendonoren durchführen zu können, sind Cu-Einbauraten >80 % des rekonstituierten Proteins notwendig. Daher ist eine weitere Optimierung im Hinblick auf die Steigerung des Holoproteinanteils bei den Rekonstituierungsverfahren von Sulld2 Cox1 wie auch von Sullj3 Cox2 notwendig.

## **5.4 Messungen zur Überprüfung der Redoxaktivität von Sullj3**

### **Cox2**

Es konnte die Redoxaktivität des rekombinant hergestellten  $\text{Cu}_A$ -Zentrums nachgewiesen werden.

So wurde das oxidierte  $\text{Cu}_A$ -Zentrum durch Natriumascorbat reduziert, und anschließend durch Kaliumhexacyanoferrat(III) teilweise wieder reoxidiert. Bei steigenden Konzentrationen von Kaliumhexacyanoferrat(III) wurden die Peaks zunehmend diffuser. Die Reoxidationsrate betrug 53,2 %. Weiters konnte ein Elektronenaustausch mit Pferdeherz Cytochrom *c* (hh Cyt *c*), Cytochrom  $c_6$  a6 und Plastocyanin a8 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 nachgewiesen werden.

## 5.5 Stopped-Flow Messungen (Vorläufige Ergebnisse)

Die erhaltene biomolekulare Reaktionskonstante zeigt, dass ein Elektronenaustausch zwischen Cyt  $c_{6\_2}$  [Cyanobase: alr4251] und  $Cu_A$  aus Sullj3 Cox2 stattfindet. Es konnte nur  $k_{app}$  für die Rückwärtsreaktion bestimmt werden. Dieser Wert von  $2,1 \cdot 10^5 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{]}$  ist niedriger als erwartet. Diese Reaktion ist mit den rekombinanten Proteinen ( $Cu_A$ -Domäne und Cyt  $c_6$ ) aus *Synechocystis* um eine Zehnerpotenz schneller. Des Weiteren wäre für eine profunde Interpretation, die Bestimmung von  $k_{app}$  für die physiologisch relevantere Vorwärtsreaktion notwendig, sowie weitere Messungen, um auf einer breiteren Grundlage von Daten die Ergebnisse analysieren zu können.

Da die Redoxpotentiale von hh Cyt  $c$  und Sullj3 Cox2 sehr ähnlich sind, ist keine schnelle Oxidation von hh Cyt  $c$  zu erwarten. Trotzdem ist klar ersichtlich, dass ein Elektronenaustausch stattgefunden hat.

Bei der Interpretation des erhaltenen Werts für  $k_{app}$  zwischen  $Cu_A$  und Cyt  $c_{6\_2}$  ist außerdem in Betracht zu ziehen, dass die physiologische Rolle von Cyt  $c_{6\_2}$  aus *Nostoc* sp. PCC 7120, mit dem die Messung durchgeführt wurde, noch vollkommen im Dunklen liegt. Wie in 1.2.2.3 beschrieben, weist *Nostoc* sp. PCC 7120 zwei ORFs für Cyt  $c_6$  auf. Es wird spekuliert, dass die beiden Cytochrome  $c_6$  unterschiedliche physiologische Rollen haben könnten. So wäre es möglich, dass die beiden Cytochrome  $c_6$ , ähnlich wie Cox1 und Cox2, unterschiedliche Aufgaben in RET von stickstofffixierenden Heterocysten und vegetativen Zellen einnehmen könnten [22]. Da jedoch noch keinerlei wissenschaftliche Erkenntnisse, über die Lokalisierung und physiologische Bedeutung des Cyt  $c_{6\_2}$  vorliegen, ist unklar ob beide Proteine *in vivo* Reaktionspartner sind [57, 61].

Trotzdem deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass Cyt  $c_{6\_2}$  als potentieller Elektronendonator für  $Cu_A$  in *Nostoc* sp. PCC 7120 fungieren kann.

Um jedoch genaueren Aufschluss über die physiologischen Rollen von Plastocyanin und den beiden Cytochromen  $c_6$  in *Nostoc* sp. PCC 7120 in RET zu erhalten, müssten weitere Messungen des Elektronentransfers zwischen den mobilen Elektronencarriern und den beiden  $Cu_A$ -Zentren, sowohl aus Cox1 als auch aus Cox2 durchgeführt werden.

Auch wäre die Bestimmung der Abhängigkeit des Elektronentransfers von der Ionenstärke und dem pH-Wert interessant. Vor allem im Hinblick auf die physiologische Rolle der cyanobakteriellen Atmung unter Stresssituationen, wie erhöhter Salzkonzentration [12], da angenommen wird, dass die Ionenstärke im intrathylakoiden Raum als Signal zur Umschaltung auf RET dienen könnte [108].

---

## 6. Referenzen

- [1] Jones, W., Meyers, J. (1963) *Nature* **199**, 670-672.
- [2] Nitschke, W., and Rutherford, A. W. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**, 241-245.
- [3] Blankenship, R. E. (2001) *Trends Plant Sci.* **6**, 4-6.
- [4] Peschek, G. A., Obinger C., Paumann, M. (2004) *Physiol. Plant.* **120**, 358-369.
- [5] Molina-Heredia F. P., Hervás M, Navarro J. A., De la Rosa M. A., (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* **243**, 302-306.
- [6] Bermann-Frank, I., Lundgren, P., Falkovski, P. (2003) *Res. Microbiol.* **154**, 157-164.
- [7] Zhang, C.-C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., Bedu, S. (2006) *Mol. Microbiol.* **59**, 367-375.
- [8] Broda, E., Peschek, G. A. (1979) *J. Theor. Biol.* **81**, 201-212.
- [9] Paumann, M., Lubura, B., Regelsberger, G., Feichtinger, M., Köllensberger, G., Jakopitsch, C., Furthmüller, P.G., Peschek, G.A., Obinger, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10293-10303.
- [10] Pils, D., Schmetterer, G. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 217-222.
- [11] Navarro, J. A., Durán, R. V., De la Rosa, M. A., Hervás, M. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 3565-3568.
- [12] Peschek, G. A., Zoderer, R. (2001) Temperature Stress and basic bioenergetic strategies for stress defence. In *Algal Adaption to Environmental Stresses, Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. (Rai, L. C., Gaur, J. P., eds.) pp 203-258, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, ISBN 3540419381
- [13] Peschek, G. A., Obnger, C., Fromwald, S., Bergman, B. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 431-438.
- [14] Fry, I., Huflejt, M., Erber, W., Peschek, G. A., Packer, L. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 686-691.
- [15] Stryer, L. (1999) aus *Biochemie*, W. H. Freeman and Company, New York
- [16] Peschek, G. A. (1984) *Subcell. Biochem.* **10**, 85-191.



- 
- [17] Hervás, M., Navarro, J. A., Díaz, A., Bottin, H., De la Rosa, M. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 11321-11326.
- [18] Sandmann, G., Böger, P. (1980) *Plant. Sci. Lett.* **17**, 417-424.
- [19] Zhang, L., McSpadden, B., Pakrasi, H. B., Whitmarsh, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19054-19059.
- [20] Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Murata, N. (1999) *FEBS Lett.* **444**, 281-284.
- [21] Duran, R. V., Hervás, M., De la Rosa, M. A., Navarro, J. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 7229-7233.
- [22] Bernroither, M., Zamocky, M., Pairer, M., Furtmüller, P. G., Peschek, G. A., Obinger, C. (2008) *Chem. Biodivers.* **5**, 1927-1961.
- [23] Pereira, M., Teixeira, M., (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1655**, 340-346.
- [24] Lockau, W., (1981) *Arch. Microbiol.* **128**, 336.
- [25] Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A. (1998) *Annu. Rev. Biophys.* **27**, 329-356.
- [26] Lubbern, M., Arnaud, S., Castresana, J., Warne, A., Albracht, S. P., Saraste, M. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 151-159.
- [27] Paumann, M., Bernroither, M., Lubura, B., Peer, M., Jakopitsch, C., Furtmüller, P., Obinger, C. (2004) *FEMS Microbiol. Lett.* **239**, 301-307.
- [28] Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Laakkonen, L., Puustinen, A. Iwata, S., Wikström, M. (2000) *Nature* **7**, 910.
- [29] Musser, S. M., Stowell, M. H. B., Chan, S. I. (1993) *FEBS Lett.* **327**, 131-126.
- [30] Howitt, C. A., Vermaas, W. F. J. (1998) *Biochemistry* **36**, 17944-17951.
- [31] Howitt, C. A., Vermaas, W. F. J. (1998) *Biochemistry* **36**, 17944-17951.
- [32] Wikström, M. (1988) *FEBS Lett.* **231**, 247-252
- [33] Wikström, M. K. F. (1977) *Nature* **266**, 271-273.
- [34] Williams, M., Lappalainen, P., Kelly, M., Sauer-Eriksson, E., Sarastre, M. (1995) *Biochemistry*, **92**, 11955-11959.
- [35] Sarastre, M.m (1990) *Q. Rev. Biophys.* **23**, 331-366.
- [36] Malström, B. G., Aasa, R. (1993) *FEBS Lett.* **325**, 49-52.
- [37] Hill, B. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2419-2425.
-

- 
- [38] Pereira, M. M., Santana, M., Teixeira, M., (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 185-208.
- [39] Svensson-Ek, M., Abramson, J. Larrson, G., Törnroth, S., Brezesinski, P., Iwata, S. (2002) *J. Mol. Biol.* **321**, 329-339.
- [40] Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H., (1995) *Nature* **376**, 660-669.
- [41] Pereira, M. M., Gomes, C.M., Teixeira, M. (2002) *FEBS Lett.* **522**, 14–18.
- [42] Paumann, M., Regelsberger, G., Obinger, C., Peschek, G. A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1707**, 231-253.
- [43] Kannt, A., Michel, H. (2001) in *Handbook of Metalloproteins* (Messerschidt, A. Huber, R., Poulos, T., Wieghardt, K., eds.), 331-347, John Wiley and sons, LTD.
- [44] Malatesta, F., Nicoletti, F., Zickermann, V., Ludwig, B., Brunori, M. (1998) *FEBS Lett.* **434**, 322-324.
- [45] Fay, P. (1992) *Microbiol. Rev.* **56**, 340-73
- [46] Postgate, J. R., In *Nitrogen Fixation*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998
- [47] Bryant, D. A. (edt.) (1994) in *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [48] Valladeres, A., Maldener, I., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., Herrero, A. (2007) *J. Mol. Biol.* **189**, 4425-4430.
- [49] Van Balen, C.(1987) in *Nitrogen Fixation*, Eds. Fay, P., Van Balen, C., Elsevier, Amsterdam.
- [50] Wastyn, M., Achatz, A., Molitor, V., Peschek, G. A.(1988) *Biochim. Biophys. Acta* **935**, 217.
- [51] Peschek, G. A., Villgrater, K., Wastyn, M. (1991) *Plant Soil* **137**, 17.
- [52] Bergmann, B., Siddiqui, P. J. A., Carpenter, E. J., Peschek, G. A. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3239.
- [53] Jones, K. M., Buikema, W. J., Haselkorn, R. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 2306-2314.
- [54] Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J. M., Tiwari, D. N., Wolk, C. P. (1992)
-

---

*J. Bacteriol.* **174**, 6025-6032.

[55] Wolk, C. P., Ernst, A., Elhai, J. (1994) In D. A. Bryant (ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

[56] Keneko, T., Nakamura Y., Wolk C. P., Kuritz T., Sesamoto S., Watanab, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (2001) *DNA Res.* **8**, 205-213.

[57] Valladeres, A., Herrero, A., Pils, D., Schmetterer, G., Flores, E. (2003) *Mol. Microbiol.* **47**, 1239-1249

[58] Pils, D., Wilken, A., Valladeres, E., Flores, E., Schmetterer, G., (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 32-45.

[59] Schmetterer, G., Alge, D., Gregor, W. (2001) *Photosynthesis Res.* **42**, 43-50.

[60] Schmetterer, G., Valladeres, A., Pils, D., Steinbach, S., Pacher, M., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., Herrero, A. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6429-6434.

[61] Jones, K. M., Haselkorn, R. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 2491.

[62] Häfele, U., Scherer, S., Bäger, P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **934**, 186.

[63] López-Gomollón S., Hernandez, J. A., Pellicer, S., Espinosa, V., Paleato, M.L., Fillat, M. F. (2007) *J. Mol. Biol.* **374**, 267-281.

[64] Mulligan, M. E., Haselkorn, R. (1989) *J. Mol. Chem.* **264**, 19200-19207.

[65] Muro-Pastor, A. M., Valladeres, A., Flores, E., Herrero, A., (2002) *Mol. Microbiol.* **44**, 1377-1385.

[66] Valladeres, A. Flores, E., Herrero, A. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 6126-6133.

[67] Hart, S. E., Schlarb-Ridley, D. S., Bendall, D. S., Howe, C. J. (2005) *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 832-835.

[68] Gennis, R.B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 241-248.

[69] Gennis, R.B. (1998) *Science* **280**, 1712-1713.

[70] Karpefors, M., Adelroth, P., Aagaard, A., Sigurdson, H., Ek, M.S., Brzezinski, P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 159-169.

[71] Wikström, M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 185-192.

[72] Wikström, M. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 480-488.

[73] Mills, D.A. and Ferguson-Miller, S. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 46-52.

- 
- [74] Tsukihara, T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074.
- [75] Tsukihara, T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136-1144.
- [76] Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, Y., Michel, H., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10547-10553.
- [77] Wilkström, M., Krab, K., Sarastre, M., (1981) in *Cytochrome Oxidase A Synthesis*, Academic Press, New York.
- [78] Sarastre, M., (1999) *Science* **283**, 1488-1493.
- [79] Nagle, J.F., Morowitz, H. J., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 298-302.
- [80] Nagle, J. F., Mille, M., Morowitz, H. J., (1980) *J. Chem. Phys.* **72**, 3959-3971.
- [81] Nagle, J. F., Tristram-Nagel, S., (1983) *J. Membr. Biol.* **74**,1-14.
- [82] N. Agmon, (1995) *Chem. Phys. Lett.* **244**, 456-462.
- [83] Hofacker, I., Schulten, K., (1998) *Proteins Struct. Func. Genet.* **30**, 100-107.
- [84] Gunner, M. R., Alexov E., (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 63-87.
- [85] Binder, A., Hauser, R., Krogmann, D. (1984) *Arch. Microbiol.* **128**, 336-340.
- [86] Manna, P., Vermaas, W. (1997) *Plant. Mol. Biol.* **35**, 407-416.
- [87] Paumann, M., Feichtinger, M., Bernroitner, M., Goldfuhs, J., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Regelsberger, G., Peschek, G. A., Obinger, C. (2004) *FEBS Lett.* **576**, 101-106.
- [88] Navarro, J. A., Duran, R. V., De la Rosa, M. A., Hervas, M (2005) *FEBS Lett.* **579**, 3565-3568.
- [89] Kerfeld, C. A., Krogmann, D. W., (1998) *Annu. Rev. Plant Biol.* 397-425.
- [90] Wood, P. M. (1978) *Eur. J. Biochem.* **87**, 9.
- [91] Bertini, I., Ciurli, S., Dikiy, A., Fernandez, C. O., Luchinat, C., Safarov, N., Shumilin, S., Vila, A. J. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2405.
- [92] Guss, J. M., Freeman, H. C., (1983) *J. Mol. Biol.* **169**, 521.
- [93] Guss, J. M., Harrowell, P. R., Murata, M., Norris, V. A., Freeman, H. C. (1986) *J. Mol. Biol.* **192**, 361.
- [94] Peschek, G. A. (1996) *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 729-733.
-

- 
- [95] Obinger, C., Knepper, J.-C., Zimmermann, U., Peschek, G. A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 492-501.
- [96] Serrano, A., Gimenez, P., Scherer, S., Böger, P. (1990) *Arch. Microbiol.* **154**, 614-618.
- [97] Sawaya, M. R., Krogmann, D. W., Serag, A., Ho, K. K., Yeates, T. O., Kerfeld, C. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 9215.
- [98] Frazao, C., Soares, C. M., Carrondo, M. A., Pohl, E., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hervas, M., Navarro, J. A., De la Rosa, M. A. (1995) *Structure* **3**, 1159.
- [99] Kerfeld, C. A., Anwar, H. P., Interrante, R., Merchant, S., Yeates, T. O. (1995) *J. Mol. Biol.* **250**, 627.
- [100] Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M., Ludwig, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5132.
- [101] Zhen, Y., Hoganson, C. W., Babcock, G. T., Ferguson-Miller, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 38032.
- [102] Lappalainen, P., Aasa, R., Malmström, B. G., Saraste, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26416-26421.
- [103] Van der Oost, J., Lappalainen, P., Musacchio, A., Warne, A., Lemieux, L., Rumbley, J., Gennis, R. B., Aasa, R., Pascher, T., Malmström B. G., Saraste, M. (1992) *EMBO J.* **11**, 3209-3217.
- [104] Kelly, M., Lappalainen, P., Talbo, G., Haltia, T., van der Oost, J., Saraste, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16781-16787.
- [105] Slutter, C. E., Sanders, D., Wittung, P., Malmström, B. G., Aasa, R., Richards, J. H., Gray, H. B., Fee, J. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 3387-3395.
- [106] Komorowski, L., Anemüller, S., Schäfer, G. (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 27-34.
- [107] Schachinger, J., *Copper A Domain in Cytochrome c Oxidases of Cyanobacterium Nostoc sp. PCC 7120*, 2007.
- [108] Nicholls, P., Obinger, C., Niederhauser, H., Peschek, G. A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* **1098**, 184-190.