

Spektroskopische und elektrochemische Studien der neuartigen Clusterkoordination in Proteinen mit C-terminaler Thioredoxin-Ferredoxin-Domäne

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

Dissertation

D 386

vorgelegt von
Dipl. Chem. Kathrin Stegmaier

Betreuer: Prof. Dr. A. J. Pierik

Technische Universität Kaiserslautern
Oktober 2017

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum Oktober 2013 bis Oktober 2017 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Antonio J. Pierik an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie.

Bild auf dem Cover: Dargestellt sind ESR-Röhrchen mit aufgetauten Proben, die bei der Bestimmung eines Redoxpotentials unter Verwendung eines Mediatorcocktails eingesetzt wurden, nach Sauerstoffkontakt.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 11.01.2017

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16.11.2017

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. J. Pierik
2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Schünemann

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Eisen-Schwefel-Cluster	1
1.1.1 Struktur der Eisen-Schwefel-Cluster	1
1.1.2 Funktionen der Eisen-Schwefel-Cluster	3
1.2 Ferredoxine.....	5
1.2.1 [4Fe-4S]-Ferredoxine	5
1.2.2 [2Fe-2S]-Ferredoxine	6
1.3 mitoNEET	9
1.4 Rieske-Zentren	12
1.4.1 <i>bc</i> ₁ - und <i>b₆f</i> -Rieske-Proteine	12
1.4.2 Dioxygenasen	15
1.5 Aim32 und Apd1	18
1.6 Zielsetzung	20
2. Ergebnisse	23
2.1 Klonierung der Proteine	23
2.2 Proteinisolierung und -charakterisierung	25
2.2.1 Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.....	25
2.2.2 Aufreinigung der Rieske-Proteine ohne Tag.....	28
2.2.3 Charakterisierung des Fe/S-Clusters	32
2.2.4 Molekülmassenbestimmung der Proteine.....	33
2.2.5 Massenspektrometrie von Apd1	35
2.2.6 Stabilität des Apd1-Proteins	38
2.3 Mutagenese der vermuteten Clusterliganden	39
2.3.1 Vergleich der UV/Vis-Spektren mit Wildtyp-Apd1.....	40
2.3.2 Fe/S-Cluster-Gehalt der Mutanten.....	41

2.4	ESR-Spektroskopie.....	41
2.4.1	Spektren der verschiedenen Apd1-Varianten	41
2.4.2	Stabilität des reduzierten [2Fe-2S]-Clusters	43
2.4.3	ESR-Spektren von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten.....	44
2.4.4	Vergleich mit einer ⁵⁷ Fe-angereicherten Apd1-Probe	45
2.5	pK _S -Wert-Bestimmung.....	45
2.5.1	Apd1 und die Mutanten	46
2.5.2	Rieske-Protein.....	49
2.6	Mössbauerspektroskopie	50
2.6.1	Oxidiertes Apd1	51
2.6.2	Reduziertes Apd1.....	52
2.6.3	Apd1-Spektren bei verschiedenen pH-Werten	53
2.6.4	Untersuchung der Mutanten	55
2.6.5	Spektren des Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten.....	56
2.7	Elektrochemie.....	58
2.7.1	Apd1	58
2.7.2	Mutanten.....	60
2.8	Modifikation der Histidinliganden mit DEPC.....	61
2.8.1	DEPC-Behandlung von Apd1.....	61
2.8.2	DEPC-Behandlung der Mutanten.....	64
2.9	Kristallisation	64
2.10	Bioinformatik	65
3.	Diskussion und Ausblick	69
4.	Materialien	83
4.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	83
4.2	Chemikalien.....	85
4.3	Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien	87
4.4	Puffer und Lösungen	87
4.5	Zellstämme und Plasmide.....	88
4.6	Oligonukleotide	90
4.7	Säulen und Säulenmaterialien	92
4.8	Größenstandards	92

4.9	Proteine und Enzyme.....	92
4.10	Software.....	92
4.11	Sonstige Materialien.....	93
5.	Methoden	95
5.1	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	95
5.1.1	Steriles Arbeiten	95
5.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	95
5.1.3	Messung der optischen Dichte.....	96
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	96
5.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	96
5.2.2	Agarosegelelektrophorese	97
5.2.3	Reinigung von DNA.....	98
5.2.4	Restriktionsverdau von DNA	98
5.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	99
5.2.6	Transformation von <i>E.-coli</i> -Zellen	99
5.2.7	Herstellung kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen	99
5.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA	100
5.2.9	Gezielte Mutagenese.....	101
5.3	Expression und Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	102
5.3.1	Heterologe Genexpression.....	102
5.3.2	Ernte und Aufschluss.....	103
5.3.3	Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	103
5.3.4	Entsalzen von Proteinen	104
5.3.5	Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie.....	104
5.3.6	Ammoniumsulfatfällung.....	105
5.3.7	Gel-Permeationschromatographie	106
5.3.8	Proteinaufkonzentrierung durch Zentrifugation	107
5.4	Quantitative und qualitative Analysemethoden	107
5.4.1	UV/Vis-Spektroskopie	107
5.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-Biuret-Methode	107
5.4.3	Bestimmung des Eisen- und säurelabilen Schwefelgehaltes.....	108
5.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	110
5.4.5	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR).....	112
5.4.6	pK _S -Wert-Bestimmung von Histidin-Liganden in [2Fe-2S]-Proteinen	112

5.4.7	Probenvorbereitung für die Mössbauerspektroskopie	113
5.4.8	Redoxtitration	114
5.4.9	Bioinformatik.....	115
6.	Anhang.....	117
6.1	Vektorkarten	117
6.2	DNA- und Aminosäuresequenzen der Proteine	119
6.3	Größenstandards	123
7.	Literaturverzeichnis	125
	Danksagung	139
	Lebenslauf.....	141
	Eidesstattliche Erklärung	143

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-Cluster bilden eine Klasse der vielseitigsten anorganischen Cofaktoren in der Natur und sind in allen Domänen des Lebens zu finden. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben in verschiedensten Bereichen, wie beispielsweise Elektronentransport, regulatorische Funktionen oder enzymatische Aktivität. Da verschiedene Krankheiten auf Defekte von Eisen-Schwefel-Proteinen oder deren Biogenese zurückgeführt werden können, ist es von größtem Interesse unbekannt Fe/S-Proteine zu charakterisieren und ihre Wirkungsweisen zu erforschen.

In den beiden häufigsten Clustertypen (der rhombische [2Fe-2S]- und der kubische [4Fe-4S]-Cluster) werden zur Koordination der Eisenionen neben anorganischen Sulfidionen in der Regel vier Cysteine des Proteins verwendet. Daneben existieren jedoch auch Proteine, in denen andere Aminosäuren als Liganden fungieren.

Für das Rieske-Protein, welches in dieser Arbeit als Referenzprotein fungierte, wurden Mössbauerspektren bei drei passenden pH-Werten aufgenommen. Dadurch konnten zum ersten Mal die drei verschiedenen Zustände des Clusters mit diprotonierten, monoprotinierten bzw. deprotonierten Histidinen mittels Mössbauerspektroskopie untersucht und die entsprechenden Parameter ermittelt werden.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurden die beiden weitgehend unerforschten Proteine Apd1 und Aim32 aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert. Durch eine anschließende Charakterisierung mittels UV/Vis-, ESR- und Mössbauerspektroskopie konnte der enthaltene [2Fe-2S]-Cluster identifiziert und eine Koordination durch zwei Cysteine und zwei Histidine festgestellt werden, wobei die Proteine keine Rieske-Faltung besitzen. Nach Entdeckung des hochkonservierten **HXGGH**-Motivs, welches an ähnlicher Stelle zum dritten und vierten Cystein in der Primärstruktur von TLF's (*thioredoxin-like ferredoxins*) vorliegt, wurden Mutationen dieser Histidine durchgeführt. In Untersuchungen an diesen Mutanten konnten Änderungen in den UV/Vis-, ESR- und Mössbauerspektren der variierten Fe/S-Cluster beobachtet werden. Bei der pK_s-Wert-Bestimmung wurde nach jeder Mutation der vorhandenen Histidine zu Cysteinen, jeweils ein (De-)Protonierungsschritt weniger detektiert. Ebenso zeigten die Mutanten niedrigere Redoxpotentiale als der Wildtyp, dessen Redoxpotential pH-abhängig ist. Es handelt sich hierbei also um eine neuartige Klasse von Proteinen, die eine C-terminale Domäne mit einer Faltung ähnlich zu TLF's besitzt, die aber gleichzeitig ein Rieske-artiges Zentrum beinhaltet. Eine Funktion bei Elektronentransfers liegt deshalb nahe, allerdings ist dazu noch nichts genaueres bekannt. Die Identifikation der genauen Wirkweise sowie der Reaktionspartner der beiden Proteine ist also weiterhin ein spannendes Forschungsgebiet. Ebenso wird der Nachweis über die Art der Bindung der Histidine durch eine Kristallstruktur wichtige Erkenntnisse über die Proteinklasse liefern.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Verschiedene Typen von Fe/S-Clustern	1
Abbildung 1.2: [8Fe-7S]-Cluster (P-Cluster) der Nitrogenase	2
Abbildung 1.3: Cluster in TLF-Ferredoxinen	7
Abbildung 1.4: UV/Vis-Spektren und ESR-Spektrum eines Ferredoxins	8
Abbildung 1.5: Koordination des [2Fe-2S]-Clusters in mitoNEET	9
Abbildung 1.6: Charakteristische Spektren des mitoNEET-Proteins	11
Abbildung 1.7: Koordination des [2Fe-2S]-Clusters in Rieske-Proteinen	12
Abbildung 1.8: UV/Vis- und ESR-Spektrum eines Rieske-Proteins	13
Abbildung 1.9: ESR-Spektren eines Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten	14
Abbildung 1.10: Mössbauerspektren eines Rieske-Proteins	15
Abbildung 1.11: Komponenten eines Rieske-Dioxygenase-Systems	16
Abbildung 1.12: Strukturen einer Dioxygenase	17
Abbildung 1.13: Spektroskopie von Rieske-artigen Clustern	18
Abbildung 2.1: Klonierte Varianten des Rieske-Proteins	24
Abbildung 2.2: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von Apd1	26
Abbildung 2.3: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von His ₆ -TEV-Apd1	27
Abbildung 2.4: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von Aim32	27
Abbildung 2.5: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von His ₆ -TEV-TTRieske	28
Abbildung 2.6: Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie	29
Abbildung 2.7: Verlauf der Ammoniumsulfatfällung des Rieske-Proteins	30
Abbildung 2.8: Chromatogramm der Gel-Permeationschromatographie	31
Abbildung 2.9: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Isolierung des TTRieske_short	32
Abbildung 2.10: Molekülmassenbestimmung von Apd1	33
Abbildung 2.11: Molekülmassenbestimmung von Aim32	34
Abbildung 2.12: Eichgerade der Molekülmassenbestimmung.	35
Abbildung 2.13: Massenspektrum von His ₆ -TEV-Apd1	36
Abbildung 2.14: Stabilität des Apd1 in verschiedenen pH-Werten	39
Abbildung 2.15: Sequenzvergleich des TLF (<i>A. aeolicus</i>) mit Apd1 und Aim32	39
Abbildung 2.16: Vergleich der Histidinmutanten mit dem Wildtyp-Protein	40
Abbildung 2.17: ESR-Spektren von Apd1	42
Abbildung 2.18: Stabilität des reduzierten [2Fe-2S]-Clusters von Apd1	43

Abbildung 2.19: ESR-Spektren von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten.....	44
Abbildung 2.20: Verbreiterung des ESR-Signals von Apd1 durch ⁵⁷ Fe-Hyperfeinkopplung.....	45
Abbildung 2.21: UV/Vis-Spektren von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten und Differenzspektren....	46
Abbildung 2.22: UV/Vis-Differenzspektren der Mutanten.....	47
Abbildung 2.23: pK _S -Wert-Bestimmung von Apd1 und seinen Mutanten.....	48
Abbildung 2.24: pK _S -Wert-Bestimmung des verkürzten Rieske-Proteins.....	49
Abbildung 2.25: Mössbauerspektrum des oxidierten Apd1.....	51
Abbildung 2.26: Möglicher Clusteraufbau des Apd1.....	52
Abbildung 2.27: Protonierungszustände der Histidinreste von Apd1.....	53
Abbildung 2.28: Mössbauerspektren der Proben von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten.....	54
Abbildung 2.29: Mössbauerspektren der Apd1-Mutanten.....	56
Abbildung 2.30: Mössbauerspektren der Proben des Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten ...	57
Abbildung 2.31: Redoxtitration von Apd1 bei pH=8,5.....	58
Abbildung 2.32: pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials von Apd1.....	59
Abbildung 2.33: Redoxtitrationen der Apd1-Einzelmutanten bei pH 8,5.....	61
Abbildung 2.34: Vorversuche zur Modifikation mit DEPC.....	62
Abbildung 2.35: Modifikation von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten.....	63
Abbildung 2.36: g _y -Werte des [2Fe-2S] ¹⁺ -Clusters von Apd1 nach DEPC-Behandlung.....	64
Abbildung 2.37: Erhaltene Kristalle des Apd1-Proteins.....	65
Abbildung 2.38: Phylogenetischer Baum von Aim32- und Apd1-ähnlichen Proteinsequenzen.....	66
Abbildung 2.39: Strukturuntersuchungen in Apd1 und Aim32.....	67
Abbildung 3.1: UV/Vis-Spektren der Einzelmutanten bei verschiedenen pH-Werten.....	70
Abbildung 3.2: Gibson Plot.....	72
Abbildung 3.3: Vergleich der Mössbauerspektren von mitoNEET und dem der Einzelmutanten.....	75
Abbildung 3.4: Vergleich der Mössbauerspektren zweier Ferredoxine und dem der Doppelmutante....	76
Abbildung 3.5: Übersicht der Redoxpotentiale von Fe/S-Zentren.....	77
Abbildung 6.1: Karten der Leervektoren.....	117
Abbildung 6.2: Karten der Vektoren, die für das Protein Apd1 kodieren.....	117
Abbildung 6.3: Karten der Vektoren, die für das Protein Aim32 kodieren.....	118
Abbildung 6.4: Karten der Vektoren, die für das Rieske-Protein aus <i>T. thermophilus</i> kodieren.....	118
Abbildung 6.5: Karte des Vektors mit dem synthetischen Gen von GeneArt AG.....	119
Abbildung 6.6: SDS-PAGE Größenstandards.....	123
Abbildung 6.7: Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese.....	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Fe/S-Proteine mit nicht-Cystein-Liganden	3
Tabelle 1.2: Parameter der Mössbauerspektren des Rieske-Proteins	14
Tabelle 2.1: Proteinausbeuten, Eisen- und säurelabiler Schwefelgehalt der enthaltenen Fe/S-Cluster..	32
Tabelle 2.2: Peaks des Massenspektrums und ihre Zuordnungen	37
Tabelle 2.3: Charakterisierung der Fe/S-Cluster in den Mutanten	41
Tabelle 2.4: Vergleich der g -Werte der Apd1-Varianten mit Referenzproteinen.....	43
Tabelle 2.5: pK_S -Werte von Apd1 und seinen Mutanten.....	48
Tabelle 2.6: pK_S -Werte der verschiedenen Varianten des Rieske-Proteins.....	50
Tabelle 2.7: Parameter der Mössbauerspektren der Proben von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten ..	54
Tabelle 2.8: Parameter der Mössbauerspektren der Apd1-Mutanten	55
Tabelle 2.9: Parameter der Mössbauerspektren der Proben des Rieske-Proteins bei verschiedenen pH- Werten	58
Tabelle 3.1: Vergleich der g_{av} -Werte	71
Tabelle 3.2: Vergleich der Parameter von mitoNEET mit denen der Histidinmutanten von Apd1	75
Tabelle 3.3: Vergleich der Parameter zweier Ferredoxine mit denen der Doppelmutante.	75
Tabelle 4.1: Verwendete Plasmide	88
Tabelle 4.2: Verwendete Oligonukleotide	90
Tabelle 5.1: Verwendete Antibiotika und ihre Konzentrationen	96
Tabelle 5.2: Pipettierschema für einen Mutageneseansatz	101
Tabelle 5.3: Proteine zur Eichung der Gel-Permeationssäule.....	107
Tabelle 5.4: Pipettierschema der Probenansätze der Micro-Biuret-Methode	108
Tabelle 5.5: Pipettierschema der Probenansätze zur Bestimmung des Eisengehaltes	109
Tabelle 5.6: Pipettierschema der Probenansätze zur Bestimmung des säurelabilen Schwefelgehaltes..	110
Tabelle 5.7: Pipettierschema für gängige Trenn- und Sammelgele	111
Tabelle 5.8: Verwendete Puffer für die pK_S -Wert-Bestimmung	113
Tabelle 5.9: Chemikalien im Mediatormix und ihre Redoxpotentiale.....	115
Tabelle 5.10: In Redox titrationen verwendete Puffer	115

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Asn; N	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
Cys; C	Cystein
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat)
DMPD	<i>N,N</i> -Dimethyl-1,4-phenylendiamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOC	Desoxycholsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
engl.	englisch
ESR	Elektronenspinresonanz
<i>et al.</i>	und andere
Fa	Firma
Fd	Ferredoxin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gly; G	Glycin
Glu; E	Glutaminsäure

h	Stunde
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HiPIPs	<i>High Potential Iron-Sulfur Proteins</i>
His; H	Histidin
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilodalton
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
Lys; K	Lysin
M	molar
m	milli bzw. Meter
μ	mikro
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
n	nano bzw. Anzahl
Ni-NTA	Nickel(II)-Nitrilotriacetat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	säurelabiler Schwefel (in Fe/S oder [2Fe-2S])
Ser; S	Serin
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-Methionin

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat/Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat
SHE	<i>standard hydrogen electrode</i>
T	Tesla oder Temperatur
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Tab.	Tabelle
TAPS	<i>N</i> -Tris-(hydroxymethyl)-methyl-3-amino-propansulfonsäure
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N''</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase</i>
Thr; T	Threonin
TLF	<i>thioredoxin-like-ferredoxin</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vs.	versus
v/v	<i>volume per volume</i>
Vis	<i>visible</i>
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) sind eine Klasse der weitest verbreiteten und vielseitigsten anorganischen Cofaktoren in der Natur. Sie wurden erstmals 1960 entdeckt, als bei der Untersuchung von Reduktasen und Dehydrogenasen bis dahin unbekannte ESR-Signale auftraten (Beinert & Sands, 1960; Meyer, 2008; Lill, 2009). Diese wurden später den Fe/S-Clustern zugeschrieben (Beinert *et al.*, 1997). Sie sind in allen Domänen des Lebens zu finden und Teil vieler Fe/S-Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen (Lill & Mühlhoff, 2008). Unter den ersten untersuchten Fe/S-Proteinen befanden sich pflanzliche und bakterielle Ferredoxine, sowie die Komplexe I-III der Atmungskette (Lill *et al.*, 2006). Durch die Beteiligung der Fe/S-Proteine an vielen verschiedenen Prozessen wie z.B. Elektronentransport, Katalyse, Eisenregulation, Proteintranslation, DNA-Replikation oder DNA-Reparatur (Pandey *et al.*, 2015; Paul & Lill, 2015) werden mehrere neurodegenerative und hämatologische Krankheiten mit Defekten in Fe/S-Proteinen oder ihrer Biogenese in Zusammenhang gebracht (Lill & Mühlhoff, 2008; Lill, 2009; Rouault, 2012).

1.1.1 Struktur der Eisen-Schwefel-Cluster

Fe/S-Cluster sind Komplexe, welche aus Eisenionen, Cysteinen und verbrückenden säurelabilen Sulfidionen aufgebaut sind (Beinert *et al.*, 1997). Die Cluster können unterschiedliche Strukturen annehmen. Die häufigsten Vertreter sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

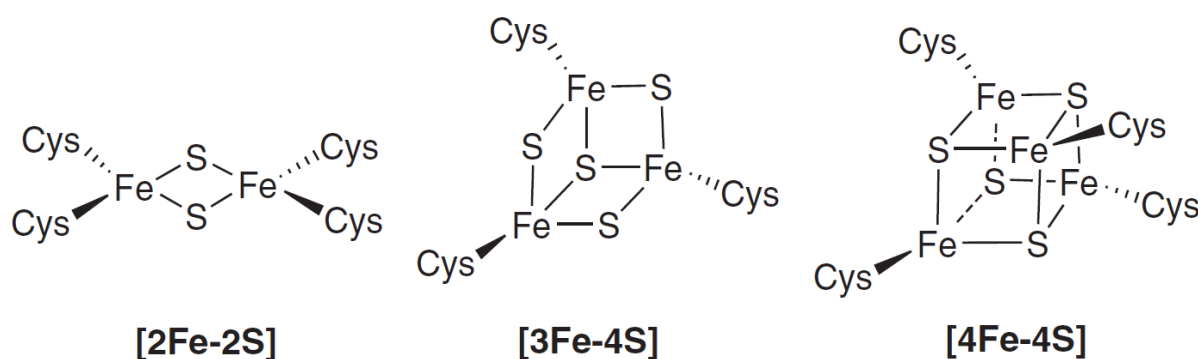


Abbildung 1.1: Verschiedene Typen von Fe/S-Clustern. Die häufigsten vorkommenden Fe/S-Clustertypen sind der rhombische [2Fe-2S]-, der [3Fe-4S]- und der kubische [4Fe-4S]-Cluster (Fontecave, 2006).

Die beiden am meisten vorkommenden Clustertypen sind der rhombische [2Fe-2S]- und der kubische [4Fe-4S]-Cluster. Aus letzterem kann durch Verlust eines Eisenions der [3Fe-4S]-Cluster entstehen, der in manchen Proteinen ebenfalls stabil ist. Die Schwefelionen sind in der Regel in den genannten Clustern tetraedrisch um die Eisenionen angeordnet. Der einfachste Eisen-Schwefel-Cluster wird durch das mononukleare Rubredoxin repräsentiert. Dieser besteht aus einem Eisenion, welches durch vier Cysteine koordiniert ist. Da bei Rubredoxin jedoch keine säurelabilen Sulfidionen zu finden sind, gehört es im engeren Sinne eigentlich nicht zur Gruppe

der Fe/S-Cluster (Meyer, 2008). Ein seltener vorkommender Fe/S-Clustertyp ist der doppelkubane [8Fe-7S]-Cluster (P-Cluster), welcher in Nitrogenasen zu finden ist (Abb. 1.2). Er setzt sich zusammen aus zwei [4Fe-4S]-Clustern mit einem gemeinsamen Sulfidion. In solchen komplexeren Clustern in Hydrogenasen oder Nitrogenasen können Eisenionen auch durch andere Metallionen, wie z. B. Nickel oder Molybdän ersetzt werden (Rees, 2002; Meyer, 2008).

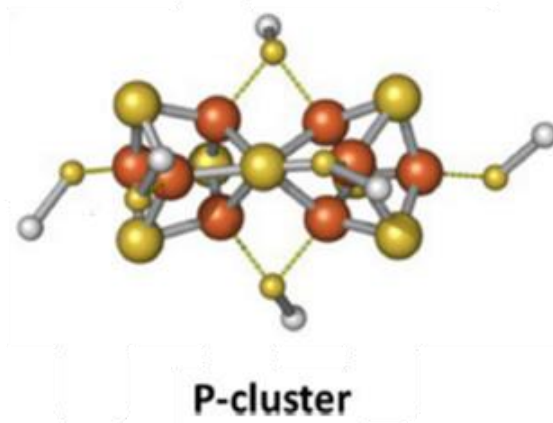


Abbildung 1.2: [8Fe-7S]-Cluster (P-Cluster) der Nitrogenase. Die Eisenkationen sind braun, die Sulfidationen sind gelb dargestellt. Die kleineren gelben und weißen Kugeln sind die Schwefel- und Methyleinheiten der Cysteinreste. Die beiden [4Fe-4S]-Cluster sind neben den zwei Schwefelatomen der zwei Cysteinreste durch ein verbindendes Sulfidion verbunden. Abbildung modifiziert nach (Hu & Ribbe, 2013).

In der Natur gibt es in vielen Fällen nicht nur einen einzelnen Fe/S-Cluster, sondern mehrere Cluster in einem Protein. So enthält der Komplex I der Atmungskette (NADH: Coenzym Q Oxidoreduktase) beispielsweise in Eukaryoten acht und in Bakterien neun Fe/S-Cluster (Hinchliffe & Sazanov, 2005). Komplex II (Succinat : Ubichinon-Oxidoreduktase) enthält drei verschiedene Fe/S-Cluster: je einen [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- und [4Fe-4S]-Cluster (Sun *et al.*, 2005).

In den meisten Fällen werden Fe/S-Cluster durch Cysteine gebunden. Daneben können aber auch andere Aminosäuren an Eisenionen koordinieren wie z. B. Histidin, Aspartat, Arginin, Serin, Glutamin oder Tyrosin. Außerdem können Koordinationsstellen von anderen Molekülen wie H₂O oder Substraten besetzt werden (Beinert, 2000; Fontecave, 2006; Lill, 2009). In Tabelle 1.1 sind Beispiele von Proteinen gegeben, die solche nicht-Cystein-Liganden an einen Fe/S-Cluster binden.

Tabelle 1.1: Fe/S-Proteine mit nicht-Cystein-Liganden

Protein	Ligandentyp	Cluster-typ	Quelle
mitoNEET (Kap. 1.3)	Histidin	[2Fe-2S]	(Paddock <i>et al.</i> , 2007)
Rieske-Proteine (Kap. 1.4)	Histidin (2 x)	[2Fe-2S]	(Link, 1999)
IscR (<i>iron-sulfur cluster regulator</i>)	Histidin	[2Fe-2S]	(Fleischhacker <i>et al.</i> , 2012)
Fra2 (Teil der Eisenregulation in Hefen)	Histidin	[2Fe-2S]	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Cluster N5 in NuoG (Untereinheit im Komplex I der Atmungskette)	Histidin	[4Fe-4S]	(Nakamaru-Ogiso <i>et al.</i> , 2008)
WOR5 (Aldehyd-Oxidoreduktase)	Aspartat	[4Fe-4S]	(Bevers <i>et al.</i> , 2005)
FNR (<i>fumarate and nitrate reduction</i>)	Aspartat	[4Fe-4S]	(Gruner <i>et al.</i> , 2011)
Succinat-Dehydrogenase	Aspartat	[2Fe-2S]	(Werth <i>et al.</i> , 1992)
P-Cluster (Nitrogenase)	Serin	[8Fe-7S]	(Peters <i>et al.</i> , 1997)
Lipoat-Synthase	Serin	[4Fe-4S]	(Harmer <i>et al.</i> , 2014)
P-Cluster (Nitrogenase)	Tyrosin	[8Fe-7S]	(Owens <i>et al.</i> , 2016)
IspG (Enzym der Biosynthese von Isoprenoiden)	Glutamat	[4Fe-4S]	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
(R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase	H ₂ O/OH ⁻	[4Fe-4S]	(Knauer <i>et al.</i> , 2011)
DHAD (<i>Dihydroxy-acid Dehydratase</i>)	OH ⁻ /Substrat	[4Fe-4S]	(Flint & Allen, 1996)

1.1.2 Funktionen der Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster können eine Vielzahl an verschiedenen Funktionen ausführen. Die wichtigste und bekannteste Funktion stellt dabei der Elektronentransfer dar. Während die meisten Fe/S-Cluster Ein-Elektronentransporter sind, kann der P-Cluster als Zwei-Elektronentransporter fungieren. Außerdem findet in ihnen eine Kopplung des Elektronen- und Protonentransfers statt (Peters *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2005). Der Elektronentransport basiert auf der Fähigkeit des Eisens zwischen den Oxidationszuständen +II und +III wechseln zu können, wodurch Fe/S-Zentren sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor fungieren können (Beinert *et al.*, 1997). Sie können dabei je nach ihrer Proteinumgebung, Clustertypen und den gebundenen Liganden unterschiedliche Redoxpotentiale zwischen -700 mV (z. B. bei

bakteriellen [4Fe-4S]-Clustern) und +400 mV (z. B. bei *high-potential iron-sulfur proteins*, HiPIP's) annehmen (Meyer, 2008). Diese Eigenschaft äußert sich am deutlichsten bei Elektronentransportprozessen wie z. B. in den Komplexen I-III der bakteriellen und mitochondrialen Atmungskette.

Fe/S-Cluster können außerdem als Cofaktoren bei der Enzymkatalyse mitwirken. Das beste Beispiel stellt die Aconitase, ein Enzym des Citratzyklus, dar. Das Enzym enthält einen [4Fe-4S]-Cluster, welcher ein nicht protein-koordiniertes Eisenatom besitzt. Dieses ist statt mit einem Cystein aus dem Protein mit einer Hydroxylgruppe (aus Wasser oder dem Substrat) verknüpft. Dadurch kann es als Lewis-Base dienen und bewirkt somit die Abspaltung von Wasser bei der Umwandlung von Citrat zu cis-Aconitat und die abschließende Wiederanlagerung des Wassermoleküls unter Bildung von Isocitrat (Beinert *et al.*, 1996; Lill, 2009). Eine zweite Klasse innerhalb der Fe/S-Cluster-Enzyme bilden die Radikal-SAM-Enzyme (SAM = S-Adenosyl-Methionin). Die bekanntesten Vertreter sind die Lipoat- und die Biotin-Synthase. Die Biotin-Synthase beinhaltet zwei verschiedene Fe/S-Cluster, einen [4Fe-4S]-Cluster, dessen Reduktion zu einer Spaltung von SAM in ein 5'-Desoxyadenosylradikal führt, welches für die Abstraktion der Wasserstoffatome von Desthiobiotin verantwortlich ist und einen [2Fe-2S]-Cluster, der vermutlich als Schwefel-Donor fungiert (Fontecave *et al.*, 2003; Berkovitch *et al.*, 2004; Jarrett, 2005).

Als dritte Funktion können Fe/S-Cluster auch als Sensor und Regulator bei der Genexpression dienen. Dabei reagieren sie auf intra- und extrazelluläre Bedingungen, wie die Konzentrationen von Eisenionen, Sauerstoff, ROS (*reactive oxygen species*) und Stickstoffmonoxid. Ein Beispiel ist das bakterielle SoxR, das der erste Transkriptionsfaktor in der MerR-Familie mit einem Fe/S-Cluster ist. SoxR setzt sich zu einem Homodimer mit einem [2Fe-2S]-Cluster in jedem Monomer zusammen. Unter normalen Bedingungen liegen diese Cluster in der inaktiven reduzierten Form vor. Detektiert die Zelle Stress durch Superoxid, kommt es zu einer Oxidation des Clusters im Regulator, was anschließend zur Expression von SoxS führt. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert ca. 45 Gene, u. a. das für die Superoxid-Dismutase kodierende Gen, was den Abbau von Superoxid und die Reparatur der Auswirkungen des oxidativen Stresses zur Folge hat. Außerdem kann SoxR als Sensor für Stickstoffmonoxid fungieren (Kiley & Beinert, 2003).

FNR (*fumarate and nitrate reduction*) ist ein weiteres Beispiel für einen Sauerstoffsensoren in Bakterien. Mit Hilfe dieses Proteins ist es der Zelle möglich aerobe bzw. anaerobe Bedingungen zu detektieren. Unter anaeroben Bedingungen kommt FNR als Homodimer mit je einem [4Fe-4S]-Cluster in jedem Monomer vor. Als Homodimer bindet FNR an DNA und fungiert als Transkriptionsfaktor. Ist die Zelle Sauerstoff ausgesetzt, kommt es zum Abbau des Clusters zu einem [2Fe-2S]-Cluster. Dies führt zur Bildung von zwei Monomeren und die Bindung an die DNA wird inhibiert. Eine Rekonstitution des [4Fe-4S]-Clusters ist durch Rückkehr zu anaeroben Bedingungen ebenso möglich (Khoroshilova *et al.*, 1997; Beinert, 2000; Kiley & Beinert, 2003).

IRP1 (*iron regulatory protein 1*) ist ein cytosolisches Protein, welches für die Regulation des Eisenstoffwechsels von höheren eukaryotischen Zellen, wie beim Mensch, zuständig ist. Verfügt

die Zelle über eine ausreichende Menge an Eisen, liegt das IRP1 als cytosolische Aconitase mit einem gebundenen [4Fe-4S]-Cluster vor und fungiert auch als solche. Kommt es zu einem Eisenmangel in der Zelle, führt dies zu einem Verlust des Fe/S-Clusters und zu einer Bindung an IREs (*iron-responsive elements*). Diese IREs sind Haarnadelstrukturen von mRNAs von Genen, die für verschiedene Proteine kodieren, die für die Eisenaufnahme, -speicherung und -verteilung verantwortlich sind. Sie kommen z. B. in der mRNA von Ferritin (ein IRE in der 5`-nicht-translatierten Region) oder vom Transferrinrezeptor (fünf IREs in der 3`-nicht-translatierten Region) vor. IRP1 bindet in seiner Apoform mit hoher Affinität an diese IREs. Bindet IRP1 an das IRE von Ferritin, kommt es zu einer Blockierung dessen Translation und es werden keine weiteren Eisenspeicherproteine gebildet. Durch die Bindung von IRP1 an mindestens drei der fünf IREs des Transferrinrezeptors wird der Abbau der mRNA verhindert, sodass weiterhin Translation stattfindet und somit der Eisengehalt in der Zelle erhöht werden kann. Die beiden Systeme werden also gegensätzlich zueinander gesteuert und können somit sowohl auf Eisenmangel als auch auf einen Eisenüberschuss in der Zelle reagieren (Beinert *et al.*, 1997; Beinert, 2000; Rouault, 2006).

In einigen Proteinen ist die Rolle des Fe/S-Clusters bisher noch nicht geklärt, sodass statt einer enzymatischen, regulatorischen oder Elektronentransfer-Rolle auch eine strukturgebende Rolle möglich sein könnte. Dies ist beispielsweise in Helikasen, Nukleasen und DNA-Polymerasen der Fall. In Helikasen bildet die Fe/S-Domäne einen „Pin“ aus, der als strukturelles Element die verschiedenen DNA-Stränge voneinander trennt (Rudolf *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; White & Dillingham, 2012). In DNA-Polymerasen stabilisiert der Fe/S-Cluster die C-terminale Domäne, trägt damit zur Komplexbildung bei und hilft außerdem bei der Aufrechterhaltung der katalytischen Polymerase-Untereinheit und ihren entsprechenden Begleitproteinen (Netz *et al.*, 2011). Neben einer stabilisierenden Wirkung besitzen die beiden [4Fe-4S]-Cluster im Rli1-Protein (ABCE1-Homolog in der Bäckerhefe) eine wichtige Rolle in der späten Phase der mRNA Translation. Dabei ist es beteiligt bei der Spaltung und dem Recycling der Ribosomen sowie der Regulierung der Translation. Der genaue Mechanismus, wie die Fe/S-Cluster-Domäne die Kaskade von Konformationsänderungen verschiedener Proteine bewerkstelligt, wird allmählich aufgeklärt (Barthelme *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2012; Heuer *et al.*, 2017).

1.2 Ferredoxine

Als erstes Ferredoxin (Fd) wurde 1962 ein „Eisen-Protein“ aus *Clostridium pasteurianum* isoliert und als eisenenthaltendes Protein ohne Häm oder Flavin, welches eine elektronenübertragende Fähigkeit besitzt, beschrieben (Mortenson *et al.*, 1962). Es wurde in verschiedenen anaeroben Bakterien sowie phototrophen Organismen identifiziert (Valentine, 1964).

1.2.1 [4Fe-4S]-Ferredoxine

Historisch werden eigentlich nur Proteine mit niedriger molekularer Masse und mit einem Fe/S-Cluster mit niedrigem Potential als Ferredoxine bezeichnet. Üblicherweise werden aber

auch HiPIPs zur Klasse der Ferredoxine gezählt. Dies sind kleine Proteine (55-85 Aminosäuren) mit einer Molekülmasse zwischen 6 und 10 kDa, die einen $[4\text{Fe-4S}]^{2+/3+}$ -Cluster enthalten (Liu *et al.*, 2002). Ihre Redoxpotentiale liegen zwischen +50 und +450 mV. Sie unterscheiden sich von den Niedrig-Potential-Ferredoxinen durch ihre Sequenzen und ihre Strukturen (Cammack *et al.*, 1981).

Eine wichtige Klasse von Ferredoxinen wurde zuerst aus anaeroben Bakterien isoliert. Sie haben eine Größe von 55 bis 100 Aminosäuren und können einen oder zwei $[4\text{Fe-4S}]$ - oder $[3\text{Fe-4S}]$ -Cluster enthalten (Meyer, 2001). Das erste $2 \times [4\text{Fe-4S}]$ -Ferredoxin wurde aus *Clostridium pasteurianum* isoliert (Mortenson *et al.*, 1962). Diese Proteine besitzen im Vergleich zu den HiPIPs ein relativ niedriges Redoxpotential von ca. -420 mV (Cammack *et al.*, 1981).

1.2.2 $[2\text{Fe-2S}]$ -Ferredoxine

Die erste Gruppe der $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster enthaltenden Ferredoxine umfasst die pflanzlichen und Adrenodoxin-ähnlichen Ferredoxine. Sie bestehen in der Regel aus 90-130 Aminosäuren (10-14 kDa) und kommen in phototrophen Bakterien, Cyanobakterien, Algen, Pflanzen und in den Mitochondrien aller Eukaryoten vor (Cammack *et al.*, 1981; Grinberg *et al.*, 2000; Meyer, 2001). Sie sind an verschiedenen Elektronentransferprozessen, wie z. B. der Photosynthese oder der Elektronentransportkette in Dioxygenasen (Kap. 1.4.2) beteiligt. Das bekannteste Beispiel dieser Ferredoxine stellt dabei das Adrenodoxin dar. Es empfängt Elektronen von der Adrenodoxin Reduktase (AdR), welche durch Reduktion von NADPH erhalten werden. Diese werden vom Adrenodoxin anschließend auf Mitglieder der mitochondrialen P450-Proteinfamilie (CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2) übertragen, welche an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt sind (Grinberg *et al.*, 2000; Miller, 2005; Sheftel *et al.*, 2010). Das zweite menschliche Ferredoxin Fdx2 und das entsprechende Homolog Yah1 aus der Hefe *S. cerevisiae* hingegen übernehmen durch den Elektronentransfer von der Ferredoxin-Reduktase zu Nfs1/Isu1 eine Rolle in der Fe/S-Cluster-Biogenese (Lange *et al.*, 2000; Sheftel *et al.*, 2010; Weibert *et al.*, 2014). Eine weitere Funktion des Yah1 besteht in der Beteiligung an der ersten Hydroxylierungsreaktion während der Coenzym Q-Biosynthese in Hefen (Pierrel *et al.*, 2010). Ein weiteres pflanzenähnliches $[2\text{Fe-2S}]$ -Ferredoxin ist das Shethna-Protein II aus *Azotobacter vinelandii* (Shethna *et al.*, 1968). Durch die Oxidation des Fe/S-Clusters wird im Protein eine Konformationsänderung ausgelöst. Dadurch kommt es zu einer Komplexbildung mit dem MoFe-Protein und dem labilen Fe-Protein der Nitrogenase, wodurch diese reversibel inaktiviert und sauerstoffunempfindlicher werden (Schlesier *et al.*, 2016).

Als erster Vertreter der zweiten Gruppe innerhalb der $[2\text{Fe-2S}]$ -Ferredoxine wurde 1964 in *Azotobacter vinelandii* das Shethna-Protein I gefunden (Shethna *et al.*, 1964). Diese Ferredoxine werden seit der Aufklärung ihrer Primärstruktur (Meyer *et al.*, 1986) und aufgrund ihrer andersartigen spektroskopischen Eigenschaften als eigenständige Gruppe angesehen. Homologe zum 1986 sequenzierten Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* stellen die Ferredoxine aus *Azotobacter vinelandii* und *Aquifex aeolicus* dar. Durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu Thioredoxin

werden sie seit dem Jahr 2000 (Yeh *et al.*, 2000) als „*thioredoxin-like ferredoxins*“ (TLF's) bezeichnet. Das Ferredoxin aus *Aquifex aeolicus* (AaFd4) liegt als Homodimer vor und besteht aus fünf β -Faltblättern, zwei langen α -Helices und mehreren kürzeren 3_{10} -Helices. Der Vergleich mit dem Thioredoxin (Abb. 1.3 a)) zeigt eine hohe Ähnlichkeit in der gesamten Struktur. Auch der oberflächennahe Cluster des TLF's mit den beiden Cysteinliganden Cys9 und Cys22 ist an ähnlicher Stelle im Protein positioniert wie die beiden Cysteine Cys32 und Cys35 des aktiven Zentrums im Thioredoxin (Yeh *et al.*, 2000). Der Clusteraufbau des TLF aus AaFd4 ist in Abbildung 1.3 b) dargestellt. Es werden vier Cysteine gebunden.

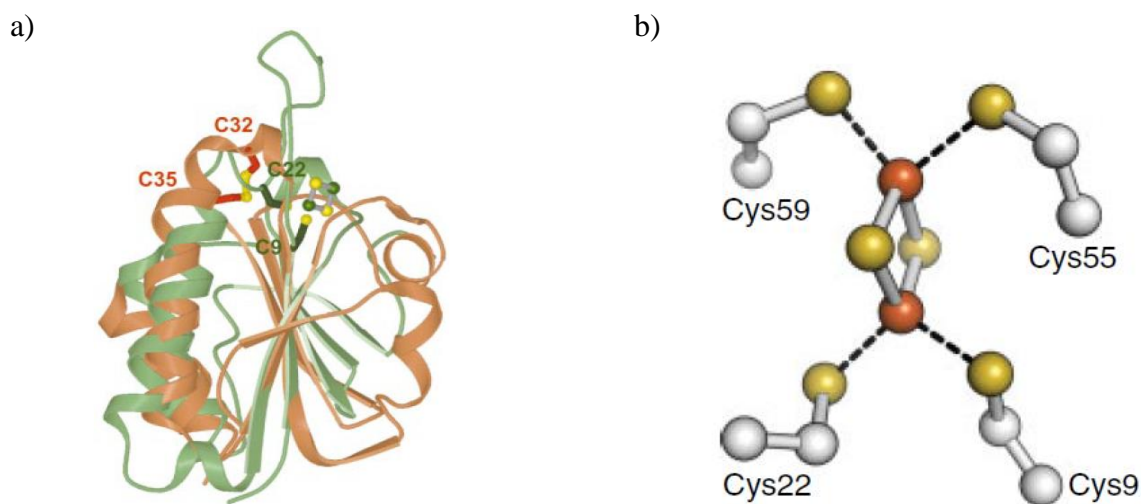


Abbildung 1.3: Cluster in TLF-Ferredoxinen. a) Überlagerung der Strukturen des Thioredoxin-2 aus *Anabaena sp.* PCC 7120 (orange) und dem TLF aus *Aquifex aeolicus* (grün) (Yeh *et al.*, 2000); b) Koordination des [2Fe-2S]-Clusters in *Aquifex aeolicus* (Meyer *et al.*, 2008). Der [2Fe-2S]-Cluster wird von den vier Cysteinen Cys9, Cys22, Cys55 und Cys59 gebunden (PDB-Code 1M2A).

Im reduzierten Protein wurde durch wellenlängenabhängige crystallographische Verfeinerungen nachgewiesen, dass das Eisenion, welches an die Cysteine Cys55 und Cys59 gebunden ist, als Fe^{2+} vorliegt (Einsle *et al.*, 2007). Das Protein besitzt außerdem in seiner Struktur einen Loop mit einer hohen Flexibilität. Durch Studien mit Mutanten im TLF aus *Clostridium pasteurianum*, in denen clusterbindende Cysteine durch Serine oder Alanine ersetzt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass dieser Loop Cysteine, welche zwischen den Positionen 14 und 26 eingebracht wurden, nahe genug an den Cluster bringen kann, dass sie als Ligand fungieren können (Yeh *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2008). Im TLF aus *Aquifex aeolicus* wurden von Forschern Varianten des Proteins erzeugt, in denen Serin als Ligand fungierte. Die Kristallstrukturen der beiden stabilen Proteine (C55S und C59S) zeigten eine sehr starke Ähnlichkeit der beiden Mutanten zu denen des Wildtyp-Proteins. Es kam jedoch zu geringen strukturellen Änderungen sowohl im Proteingerüst als auch im Fe/S-Cluster selbst, die wahrscheinlich auch für die andersartigen spektroskopischen Eigenschaften des [2Fe-2S]-Clusters verantwortlich sind (Yeh *et al.*, 2002).

Die UV/Vis-Spektren von oxidierten [2Fe-2S]-Ferredoxinen weisen in allen Fällen die für die [2Fe-2S]-Cluster typischen Peaks (Abb. 1.4 a)) bei 340, 420, 460 und 540 nm auf (Chatelet *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002).

ESR-spektroskopische Untersuchungen wurden sowohl für das pflanzenähnliche Fd1 als auch für das TLF-artige Fd4 aus *A. aeolicus* durchgeführt und ergeben aufgrund der verschiedenen Proteinstrukturen unterschiedliche Werte. Diese Ferredoxine zeigen beide nach Reduktion rhombische Spektren, Fd1 mit den g -Werten 2,046, 1,952 und 1,896 ($g_{av}=1,965$), wohingegen das TLF-Fd (Abb. 1.4 b)) die g -Werte 2,006, 1,950 und 1,918 ($g_{av}=1,958$) besitzt (Chatelet *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002; Cutsail *et al.*, 2012).

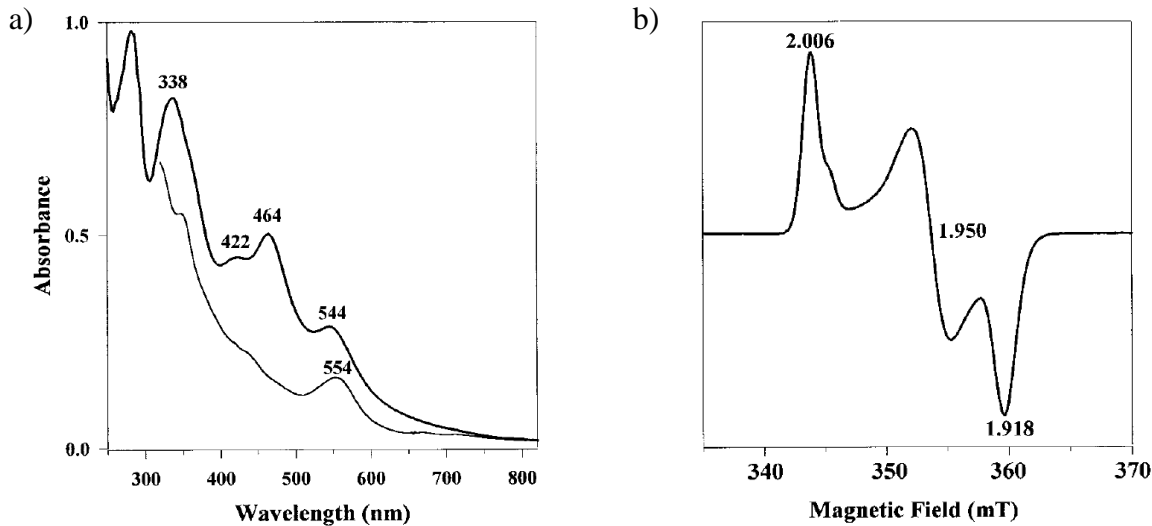


Abbildung 1.4: UV/Vis-Spektren und ESR-Spektrum eines Ferredoxins. Dargestellt sind jeweils die Spektren des TLF-Ferredoxins aus *Aquifex aeolicus* (AaFd4) (Chatelet *et al.*, 1999). a) UV/Vis-Spektrum des oxidierten (dick) und reduzierten (dünn) Ferredoxins; b) ESR-Spektrum einer mit Dithionit reduzierten Probe bei 10 K.

Für die beiden Ferredoxine aus dem Organismus *A. aeolicus* sind Mössbauerspektren bisher nur für das pflanzenähnliche Fd1 aufgenommen worden. Das Spektrum des oxidierten Proteins (4,2 K) besteht aus zwei Dubletts, welche sich mit den Parametern $\delta_1=0,26 \text{ mms}^{-1}$ und $\delta_2=0,28 \text{ mms}^{-1}$ für die Isomerieverschiebungen und $\Delta E_{Q1}=0,62 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q2}=0,76 \text{ mms}^{-1}$ für die Quadrupolaufspaltungen der beiden Eisenkerne simulieren lassen. Im Spektrum des reduzierten Proteins (4,2 K) werden ebenfalls zwei Dubletts mit einem Fe^{2+} mit $\delta=0,62 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q=3,0 \text{ mms}^{-1}$ und einem Fe^{3+} mit $\delta=0,30 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q=1,0 \text{ mms}^{-1}$ detektiert (Meyer *et al.*, 2002). Bei den TLF's wurde der reduzierte Cluster z. B. in *Clostridium pasteurianum* bei 4,2 K untersucht. Dabei ergaben sich die im folgenden aufgeführten Parameter: $\delta_{\text{Fe}^{3+}}=0,34 \text{ mms}^{-1}$ und $\delta_{\text{Fe}^{2+}}=0,65 \text{ mms}^{-1}$ bzw. $\Delta E_{Q\text{Fe}^{3+}}=-1,0 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q\text{Fe}^{2+}}=3,2 \text{ mms}^{-1}$ (Achim *et al.*, 1999). Die Werte eines oxidierten Clusters eines TLF's sind bekannt von HydC, der TLF-artigen Fe-Hydrogenase-Untereinheit von *Thermotoga maritima*. Das Spektrum (80 K) kann simuliert werden durch zwei Dubletts mit den Parametern $\delta_1=0,29 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q1}=0,54 \text{ mms}^{-1}$ sowie $\delta_2=0,31 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q2}=0,86 \text{ mms}^{-1}$ (Birrell *et al.*, 2016).

Das Redoxpotential von Ferredoxinen liegt allgemein bei ca. -350 mV, das vom pflanzenähnlichen AaFd1 hat beispielsweise ca. -375 mV (Meyer *et al.*, 2002). TLF's besitzen ein Redoxpotential von etwa -300 mV (Meyer *et al.*, 2008).

1.3 mitoNEET

Im Jahr 2004 wurde ein neues mitochondriales [2Fe-2S]-Protein, das mitoNEET, als Bindungspartner des Pioglitazons, einem Medikament zur Behandlung von Diabetes Typ 2, gefunden (Colca *et al.*, 2004). Der Name mitoNEET geht zurück auf die Lokalisierung des Proteins, in den Mitochondrien, sowie seine Aminosäureabfolge Asn-Glu-Glu-Thr (NEET) im C-terminalen Bereich. MitoNEET ist ein 12,2 kDa großes Protein, welches als Homodimer mit je einem [2Fe-2S]-Cluster vorliegt und über eine Transmembran-Helix an die cytosolische Seite der äußeren mitochondrialen Membran bindet. Es besteht aus zwei Regionen: der „ β -Cap“-Domäne und der helikalen „cluster-binding“-Domäne (Paddock *et al.*, 2007). Zusätzlich besitzt mitoNEET eine CDGSH-Domäne, die aus 39 Aminosäuren (Aminosäuren 55-93 im mitoNEET) besteht und ursprünglich als Zinkfinger bezeichnet wurde. Diese Domäne wurde in mitoNEET allerdings als eisenbindendes Element identifiziert (Wiley *et al.*, 2007a). In weiteren Studien konnte belegt werden, dass mitoNEET einen [2Fe-2S]-Cluster bindet, welcher von drei Cysteinen und einem Histidin koordiniert wird (vgl. Abb. 1.5). Dieses Histidin ist verantwortlich für die pH-Labilität und den Verlust des Clusters bei einem pH-Wert von unter 7,0 (Wiley *et al.*, 2007b).

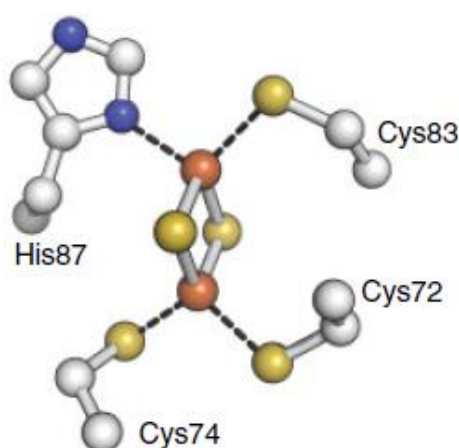


Abbildung 1.5: Koordination des [2Fe-2S]-Clusters in mitoNEET (Meyer *et al.*, 2008). Der [2Fe-2S]-Cluster wird von einem Histidin (His87) und drei Cysteinen (Cys72, Cys74 und Cys83) gebunden (PDB-Code 2QH7).

Die Funktion des mitoNEETs ist noch nicht eindeutig identifiziert, es wurden allerdings schon viele verschiedene Möglichkeiten prognostiziert. Durch die CDGSH-Domäne, welche Richtung Cytoplasma zeigt, könnte mitoNEET beispielsweise als Signalüberträger zwischen den Mitochondrien und dem Rest der Zelle fungieren (Wiley *et al.*, 2007a; Bak & Elliott, 2013; Tamir *et al.*, 2015). Ebenso wird mitoNEET in Verbindung gebracht mit der Reparatur von IRP1 nach oxidativen Schäden. Demnach kann es nach oxidativem Stress ein inaktives IRP1 durch Clustertransfer reaktivieren (Ferecatu *et al.*, 2014). Diese Reparatur des IRP1 wird ausgelöst durch einen Wechsel des Redoxzustandes des Fe/S-Clusters in mitoNEET. Oxidativer Stress führt zu einer Oxidation des Clusters, wodurch der Transfer zu IRP1 eingeleitet und das IRP1 reaktiviert wird. Um den Cluster von mitoNEET wieder einzubauen, kommt es zu einer Komplexbildung

mit Anamorsin und Ndor1 (*NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1*), wodurch nach Elektronentransfer der [2Fe-2S]-Cluster des Anamorsins auf mitoNEET übertragen werden kann (Camponeschi *et al.*, 2017). Eine weitere Funktion wird dem mitoNEET im Rahmen der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Netzwerks zugesprochen. Zellen, in denen das Gen für mitoNEET inaktiviert war, zeigten weniger Ausbildungen von intermitochondrialen Knotenpunkten als Wildtyp-Zellen. Eine Überexpression von mitoNEET in den entsprechenden Zellen konnte diesen Effekt aufheben. Außerdem wurde auch in dieser Studie eine verbesserte Stabilität der Mitochondrien gegenüber oxidativem Stress festgestellt (Vernay *et al.*, 2017).

Mit Histidin als seinem ungewöhnlichen Clusterliganden sowie der enthaltenen CDGSH-Domäne ist mitoNEET (*CISD1*-Gen; *CDGSH Iron-Sulfur Domain*) das Gründungsmitglied der mitoNEET-Familie. Zu dieser Familie gehören außerdem zwei weitere humane Proteine namens Miner1 und Miner2 (*mitoNEET-related 1 und 2*), die ebenfalls eine CDGSH-Domäne enthalten, Miner2 beinhaltet sogar zwei solcher Domänen. Sie sind codiert durch die Gene *CISD2* und *CISD3*. Miner1, welches unter anderem auch unter dem Namen NAF-1 bekannt ist, ist an der Mitochondrien-assoziierten Membran, welche das endoplasmatische Retikulum und die äußere Mitochondrienmembran verbindet, lokalisiert. Eine Mutation im Gen *CISD2* führt zu der neurodegenerativen Erkrankung Wolfram Syndrom 2. Durch diese Mutation kommt es zu einem Verlust von 75 % des Miner1-Proteins, u. a. auch des Fe/S-Clusters. Das Fehlen des Proteins führt zu verschiedenen Krankheitssymptomen wie z. B. Diabetes, Nervendegeneration, Sehstörungen und Verlust des Hörvermögens. Miner2 ist das am wenigsten untersuchte Protein der mitoNEET-Familie (Wiley *et al.*, 2007a; Tamir *et al.*, 2015).

Das UV/Vis-Spektrum von mitoNEET im oxidierten Zustand enthält Maxima bei 340 und 460 nm sowie eine Schulter bei 540 nm, welches charakteristische Merkmale für einen [2Fe-2S]²⁺-Cluster sind (Abb. 1.6 a)). Im reduzierten Zustand (Abb. 1.6 a) Inset) zeigt das Protein einen Peak bei 540 nm (Bak & Elliott, 2013).

Das ESR-Spektrum von mitoNEET im reduzierten Zustand zeigt ähnlich wie die [2Fe-2S]-Ferredoxinspektren ein rhombisches Signal (Abb. 1.6 b)). Es unterscheidet sich jedoch in seinen g -Werten. Diese sind im Fall des mitoNEET 2,007, 1,937 und 1,897. Der Mittelwert beträgt $g_{av} = 1,947$ (Dicus *et al.*, 2010), deutlich niedriger als der Mittelwert von [2Fe-2S]-Ferredoxinen ($g_{av} = 1,96$; Link *et al.*, 1996).

Das Mössbauerspektrum des oxidierten Proteins wurde bei 4,2 K und 60 mT aufgenommen (Abb. 1.6 c)). Dabei ergaben sich die folgenden Parameter zur Simulation der zwei Dubletts: $\delta_1 = 0,26 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q1} = 0,47 \text{ mms}^{-1}$ für den ersten Eisenkern sowie $\delta_2 = 0,30 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q2} = 0,96 \text{ mms}^{-1}$ für den zweiten, das Histidin bindenden Eisenkern. Die Messung bei 7 T bestätigte für mitoNEET einen $S = 0$ Grundzustand (Ferecatu *et al.*, 2014). Im reduzierten Protein lässt sich das Spektrum (4,2 K und 60 mT) durch zwei Dubletts mit den Parametern $\delta = 0,32 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q = 1,07 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{3+} und $\delta = 0,68 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q = 3,15 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{2+} simulieren (Golinelli-Cohen *et al.*, 2016).

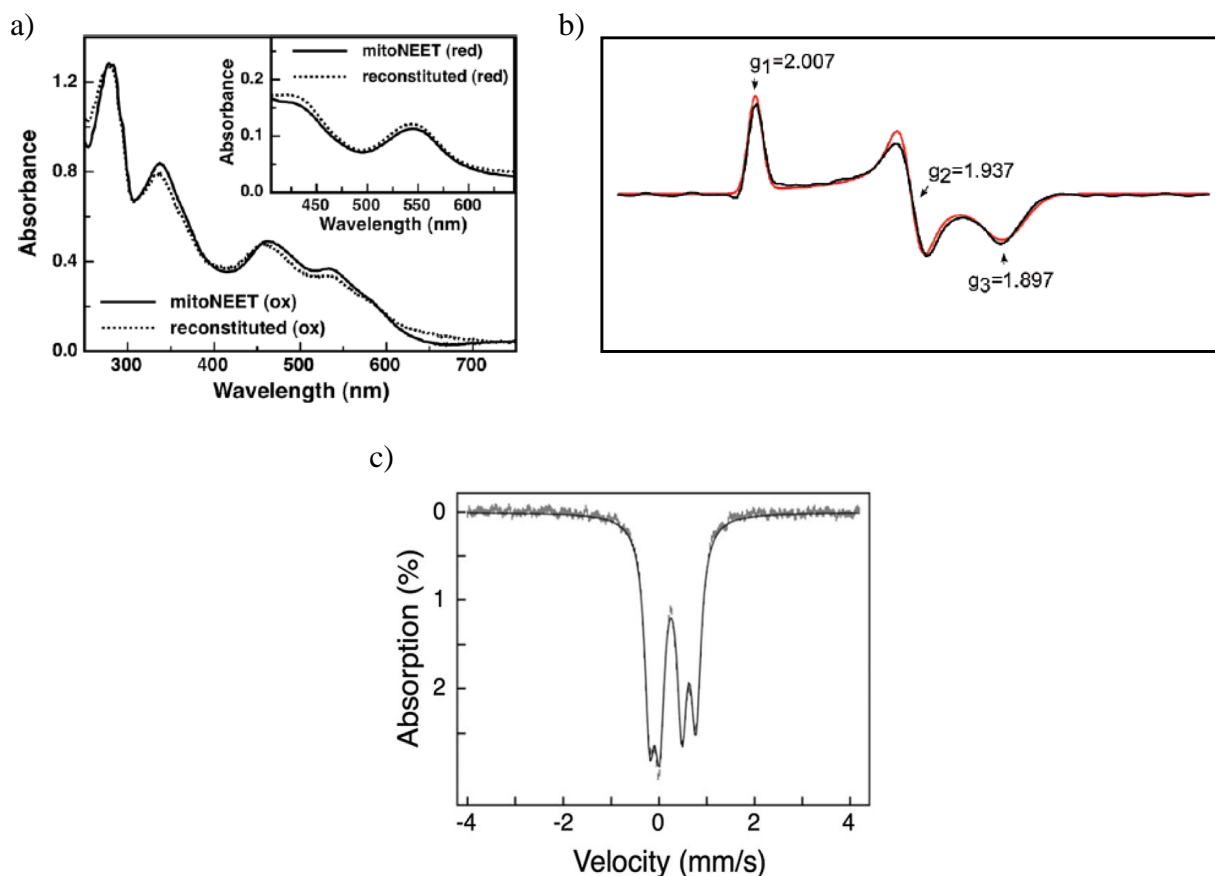


Abbildung 1.6: Charakteristische Spektren des mitoNEET-Proteins. a) UV/Vis-Spektren des isolierten (durchgezogen) und rekonstituierten (gestrichelt) oxidierten mitoNEET-Proteins. Inset: sichtbarer Bereich der UV/Vis-Spektren des isolierten (durchgezogen) und rekonstituierten (gestrichelt) reduzierten mitoNEET-Proteins (Bak & Elliott, 2013); b) ESR-Spektrum des mitoNEET-Proteins (12 K) mit den g -Werten 2,007, 1,937 und 1,897. Rot dargestellt ist eine Simulation (Dicus *et al.*, 2010); c) Mössbauerspektrum des mitoNEET-Proteins (oxidiert) bei 4,2 K und 60 mT (Ferecatu *et al.*, 2014).

Das Redoxpotential von mitoNEET liegt bei einem pH von 7,0 bei +25 mV. Es lässt sich allerdings durch Mutationen des Clusterliganden Histidin sowie einiger anderer Aminosäuren in der Nähe des Fe/S-Clusters über einen breiten Bereich (ca. 700 mV) verändern. Es kann dabei Werte zwischen -360 mV und +305 mV annehmen (Zuris *et al.*, 2010). Der pK-Wert für das gebundene Histidin am mitoNEET wurde zunächst über die pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials bestimmt. Dabei wurde zuerst ein Einelektronenprozess gekoppelt mit zwei Protonierungen angenommen, obwohl eine 1:1 Stöchiometrie ebenfalls als gutes Modell beschrieben wurde (Bak *et al.*, 2009). Ein Jahr später wurde dieses Modell nach der Bestimmung des pK-Wertes mittels UV/Vis-Spektrometrie korrigiert und nur eine Protonierung, resultierend aus dem gebundenen Histidinliganden des Fe/S-Clusters, ermittelt (Zuris *et al.*, 2010). Der pK-Wert liegt für den Wildtyp im oxidierten Zustand bei $pK_{ox}=6,8\pm 0,2$ und im reduzierten Zustand bei $pK_{red}=12,4\pm 0,2$. Wird eine Aminosäure in der Nähe des Fe/S-Clusters, wie z. B. Lysin durch eine andere Aminosäure ersetzt, kommt es nicht nur beim Redoxpotential, sondern auch beim pK_{ox} -Wert zu großen Veränderungen. In der K55E-Mutante liegt z. B. der pK_{ox} -Wert des Histidins ca. drei Einheiten höher als im Wildtyp, bei etwa $9,2\pm 0,2$ und das Redoxpotential verschiebt sich zu einem Wert von +200 mV (Zuris *et al.*, 2010).

1.4 Rieske-Zentren

Vor der Entdeckung der mitoNEET-Familie waren die Rieske-Proteine neben den Ferredoxinen die zweite große bekannte Gruppe innerhalb der [2Fe-2S]-Proteine. Sie wurden erstmals 1964 im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette entdeckt und daraus isoliert (Rieske *et al.*, 1964). Sie wurden nach ihrem Entdecker als Rieske-Proteine bezeichnet und sind Bestandteile der bc_1 Komplexe in Mitochondrien und Bakterien sowie der b_6f Komplexe in Chloroplasten (vgl. Kap. 1.4.1). Außerdem sind Rieske-artige Cluster in Dioxygenasen (vgl. Kap. 1.4.2) zu finden. In Abbildung 1.7 ist der Aufbau von [2Fe-2S]-Clustern in Rieske-Proteinen dargestellt. Ein Eisenion wird durch die beiden S^{2-} und zwei Cysteine gebunden und das andere Eisenion wird von den S^{2-} und zwei Histidinresten koordiniert.

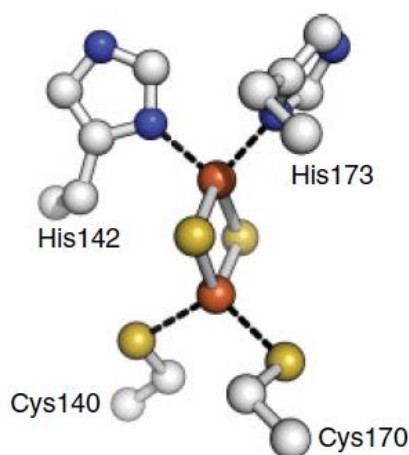


Abbildung 1.7: Koordination des [2Fe-2S]-Clusters in Rieske-Proteinen (Meyer *et al.*, 2008). Dargestellt ist der Rieske-artige Cluster des Sox F^{86} aus *Sulfolobus solfataricus*. Die Eisenionen werden durch zwei Histidine (His142 und His173) und zwei Cysteine (Cys140 und Cys170) gebunden (PDB-Code 1JM1).

Die ersten Hinweise darauf, dass statt vier Cysteine, wie in Ferredoxinen, zwei andere Liganden an den Cluster binden müssen, wurden erst 1984 gefunden (Fee *et al.*, 1984). ENDOR-Messungen (ENDOR = electron nuclear double resonance) zeigten später die ersten Beweise für eine Koordination von Histidinen (Cline *et al.*, 1985; Gurbiel *et al.*, 1989), bevor die erste Kristallstruktur eines löslichen, proteolytischen Fragments des Rieske-Proteins des bc_1 -Komplexes aus Rinderherz den endgültigen Nachweis brachte (Iwata *et al.*, 1996).

1.4.1 bc_1 - und b_6f -Rieske-Proteine

bc_1 Komplexe sind Membranproteine, welche vier Redoxzentren beinhalten. Die Cofaktoren des Komplexes III der Atmungskette sind das Rieske-Fe/S-Zentrum, ein Cytochrom b (b_6 in b_6f -Komplexen), welches zwei Häm- b -Zentren (b_L und b_H) enthält und ein Cytochrom c_1 (f in b_6f -Komplexen) (Link, 1999; Berry *et al.*, 2000). Die Rieske-Proteine fungieren als erste Elektronenakzeptoren während der Oxidation von Ubihydrochinon (bzw. Plastochinon) im Q-Zyklus. Die bc_1 Komplexe übertragen dabei die Elektronen an ihre jeweiligen Akzeptoren Cytochrom c

bzw. Plastocyanin. Außer der Beteiligung am Elektronentransport interagieren die Rieske-Proteine zusätzlich direkt mit dem Chinon-Substrat, da dieses in der Nähe der exponierten Histidinreste binden kann (Link, 1999).

Rieske-Proteine unterscheiden sich durch ihre Histidinliganden deutlich in ihren spektroskopischen Eigenschaften von anderen [2Fe-2S]-Proteinen. In Abbildung 1.8 a) ist ein UV/Vis-Spektrum des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus* dargestellt. Das oxidierte Protein zeigt Peaks bei 325 und 458 nm und eine Schulter bei 560 nm. Beim reduzierten Protein hingegen sind Peaks bei 380, 425 und 550 nm zu erkennen. Das ESR-Spektrum (Abb. 1.8 b)) des reduzierten *T. thermophilus*-Proteins zeigt ein rhombisches Signal mit den g -Werten 2,02, 1,90 und 1,80 (Fee *et al.*, 1984). Typische Werte für g_{av} liegen für Rieske-Proteine zwischen 1,88 und 1,92 (Link, 1999), deutlich niedriger als für mitoNEET (1,947; Dicus *et al.*, 2010) oder [2Fe-2S]-Ferredoxine (1,96; Link *et al.*, 1996).

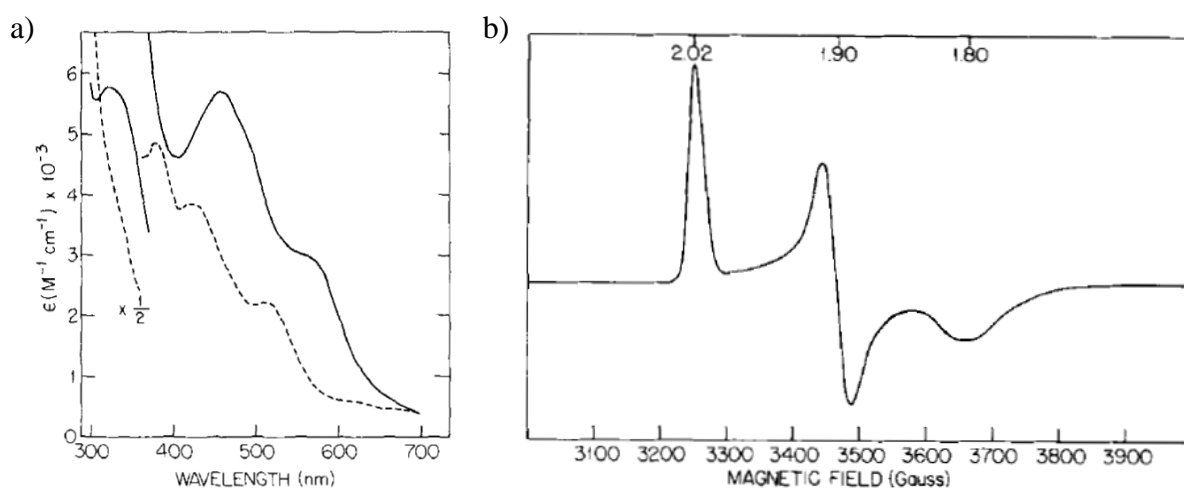


Abbildung 1.8: UV/Vis- und ESR-Spektrum eines Rieske-Proteins (Fee *et al.*, 1984). Dargestellt sind die Spektren des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus*. a) UV/Vis-Spektrum des oxidierten (durchgezogen) und reduzierten (gestrichelt) Rieske-Zentrums; b) ESR-Spektrum des reduzierten Rieske-Proteins bei $T = 25$ K mit den g -Werten 2,02, 1,90 und 1,80.

Für den reduzierten Rieske-Cluster wurde ein ESR-Spektrum bei pH 14 aufgenommen (Abb. 1.9 unten). Im Vergleich zum Spektrum bei pH 7 (Abb. 1.9 oben) lässt sich eine Verbreiterung des Signals feststellen und die g -Werte verschieben sich zu den Werten 2,14, 1,94 und 1,81 (Tiago de Oliveira *et al.*, 2004). Diese Veränderung des Signals könnte allerdings auch mit einer partiellen Denaturierung des Proteins und dementsprechend veränderten spektroskopischen Eigenschaften erklärt werden. Außerdem würden aufgrund der pK_{red} -Werte des Proteins von etwa 12,5 (Zu *et al.*, 2003) beide Histidinliganden bei pH 14 im deprotonierten Zustand vorliegen. Auch dies könnte eine entsprechende Signalverbreiterung zur Folge haben. Mössbauerstudien wurden für das Protein bei pH 14 bisher nicht veröffentlicht.

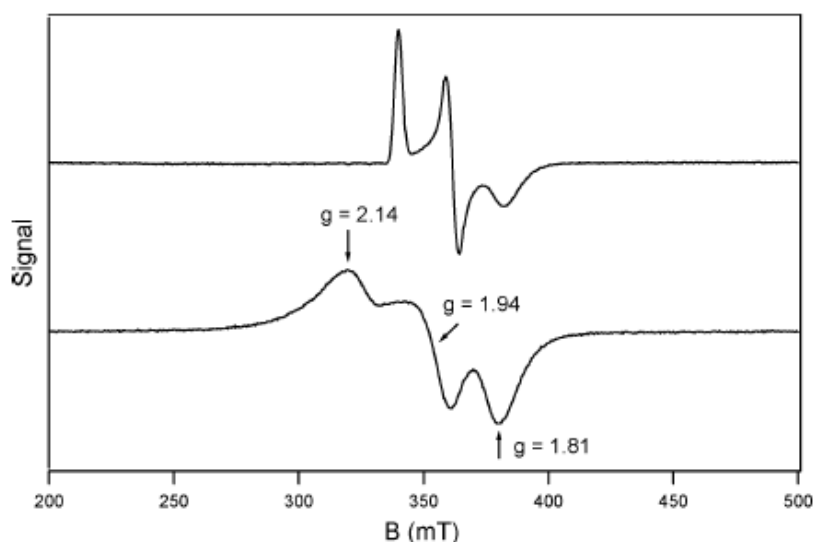


Abbildung 1.9: ESR-Spektren eines Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt sind die Spektren des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus*. ESR-Spektrum bei pH=7 (oben) und pH=14 (unten). Es ergeben sich für pH 14 die g-Werte 2,14, 1,94 und 1,81 (Tiago de Oliveira *et al.*, 2004).

Die veröffentlichten Mössbauerspektren für dieses Protein sind in Abbildung 1.10 zu sehen. Für das oxidierte Protein (Abb. 1.10 a)) wurden Proben mit den pH-Werten 10 und 7,8 gemessen (Kuila & Fee, 1986). Da die clusterbindenden Histidine je nach pH-Wert protoniert oder deprotoniert vorliegen, können im Mössbauerspektrum ihre Zustände unterschieden werden. Beide pH-Werte enthalten unglücklicherweise ein Gemisch zweier Spezies. Bei pH 7,8, was dem ersten pK_S -Wert des Rieske-Proteins von *T. thermophilus* (7,87; Konkle *et al.*, 2009) nahezu genau entspricht, ist das Gemisch fast äquimolar zwischen der diprotonierten (54%) und monoprotinierten (46%) Form. Bei pH 10 sind 41% des Proteins monoprotiniert und 59% des Gemischs enthält zwei deprotonierte Histidine. Die Parameter für die Simulationen der gemessenen Spektren, die deswegen Mischungen von zwei Spezies darstellen, sind in Tabelle 1.2 aufgeführt. Dabei können für das mit Cysteinen koordinierte Eisenzentrum für die Isomerieverschiebungen keine signifikanten Unterschiede zwischen pH 7,8 und pH 10 festgestellt werden. Das zweite Eisenzentrum zeigt nach Erhöhung des pH-Wertes niedrigere Werte für die Isomerieverschiebung und die Quadrupolaufspaltung, was auf den Protonierungsgrad der Histidine zurückzuführen ist (Kuila & Fee, 1986).

Tabelle 1.2: Parameter der Mössbauerspektren des Rieske-Proteins. Aufgelistet sind die Parameter des Proteins aus *T. thermophilus* bei den pH-Werten 7,8 und 10 (Kuila & Fee, 1986).

	pH 7,8		pH 10	
	FeS ₄	FeS ₂ N ₂	FeS ₄	FeS ₂ N ₂
δ (mm/s)	0,24	0,32	0,24	0,28
ΔE_Q (mm/s)	0,52	0,91	0,44	0,70

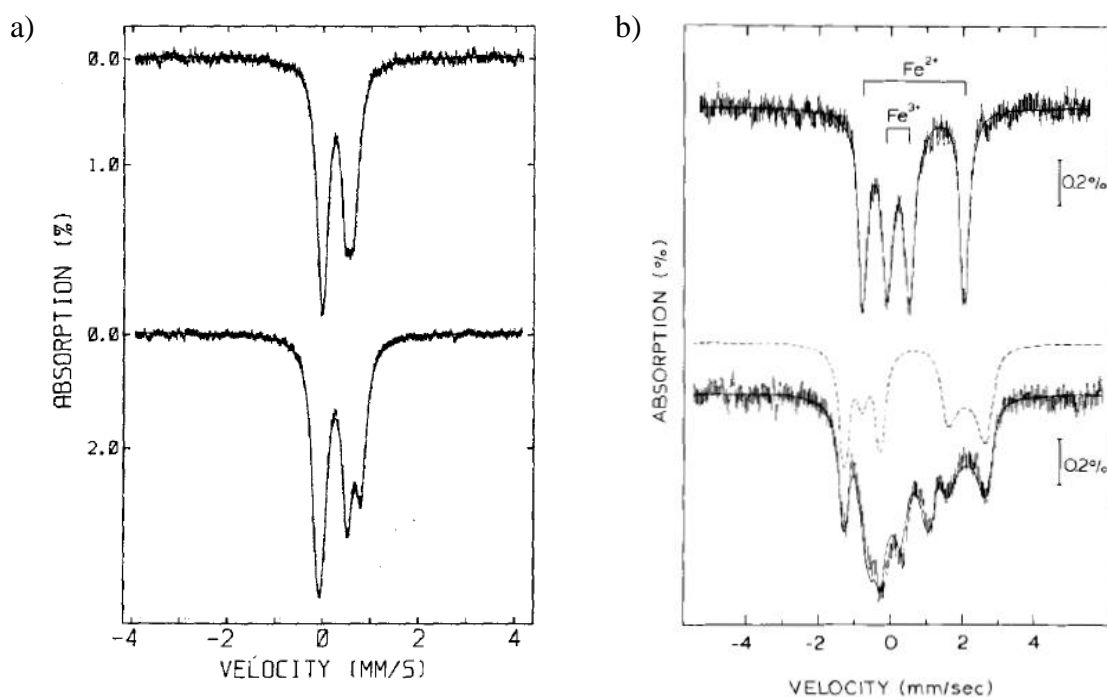


Abbildung 1.10: Mössbauerspektren eines Rieske-Proteins. Dargestellt sind die Spektren des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus*. a) Mössbauerspektren des oxidierten Proteins bei 4,2 K bei pH 10 (oben) und pH 7,8 (unten) (Kuila & Fee, 1986); b) Mössbauerspektren des reduzierten Proteins bei 230 K ohne Magnetfeld (oben) und bei 200 K und 4 T (unten) (Fee *et al.*, 1984).

Das Mössbauerspektrum des reduzierten Proteins (230 K und 0 T) kann durch zwei Dubletts mit $\delta = 0,22 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q = 0,61 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{3+} und $\delta = 0,65 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q = 2,81 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{2+} simuliert werden (Fee *et al.*, 1984).

Die Redoxpotentiale ($[2\text{Fe-2S}]^{2+/1+}$) liegen für Rieske-Proteine der bc_1 -Komplexe zwischen +265 und +310 mV, in b_6f -Komplexen sind sie mit ca. +320 mV etwas höher. In beiden Fällen ist das Redoxpotential stark pH-abhängig (Link, 2006). Im löslichen Fragment des Rieske-Proteins aus dem bc_1 -Komplex aus dem Rind wurde für den $[2\text{Fe-2S}]^{1+}/[2\text{Fe-2S}]^0$ -Übergang ein Redoxpotential von -730 mV (pH 7) bestimmt (Leggate *et al.*, 2004).

Die pK_S -Werte der Rieske-Proteine unterscheiden sich leicht je nach Organismus, aus welchem sie stammen. So sind die pK_S -Werte des bc_1 -Komplexes aus dem Rinderherzen beispielsweise 7,6 und 9,2 (Link *et al.*, 1992) und aus *T. thermophilus* 7,87 und 9,84 (Konkle *et al.*, 2009). Die kleinen Unterschiede könnten allerdings auch auf die Methoden, wie sie bestimmt wurden, zurückgeführt werden, wodurch verschiedene Messgenauigkeiten erzielt werden und somit leichte Abweichungen ebenfalls erklärt werden können. Bei Link *et al.* (1992) wurden elektrochemische Studien und CD-Spektroskopie durchgeführt, wohingegen Konkle *et al.* (2009) UV/Vis-Spektroskopie einsetzten.

1.4.2 Dioxygenasen

Rieske-artige Cluster sind auch in Dioxygenase-Systemen zu finden. Dabei treten sie in der katalytischen Untereinheit in der Oxygenase auf. Außerdem sind sie manchmal auch in einem

Transport-Ferredoxin, welches etwa 90-110 Aminosäuren lang ist, zu finden (Boxhammer *et al.*, 2008). Oxygenasen sind Enzyme, welche 1955 erstmals entdeckt wurden. Sie sind verantwortlich für den Einbau von einem oder mehreren Atomen aus dem Luftsauerstoff in aromatische Verbindungen (Wackett, 2002). Sie können in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Dabei enthalten sie entweder ein mononukleares Eisen kombiniert mit einem Rieske-Fe/S-Cluster, ein Häm oder nur ein mononukleares Eisen. Erstere können entsprechend ihrer α -Untereinheiten, welche die Substratspezifizität bestimmen, weiter unterteilt werden (Wackett, 2002; Meynet *et al.*, 2015). Rieske-Dioxygenasen sind aus mehreren Komponenten aufgebaut (Abb. 1.11). Sie enthalten eine Reduktase, an der NAD(P)H zu NAD(P)⁺ oxidiert wird. Im zweiten Schritt werden die daraus erhaltenen Elektronen vom Flavincofaktor auf ein Transport-Ferredoxin übertragen, welches entweder einen pflanzen- oder Rieske-artigen [2Fe-2S]-Cluster beinhaltet. Als letztes werden die Elektronen zur Oxygenase transportiert, wo die Substrate dann am mononuklearen Eisenzentrum umgesetzt werden. Ist kein Transport-Ferredoxin im System enthalten, werden die Elektronen direkt von der Reduktase auf die Oxygenase übertragen (Ferraro *et al.*, 2005; Colbert *et al.*, 2000).

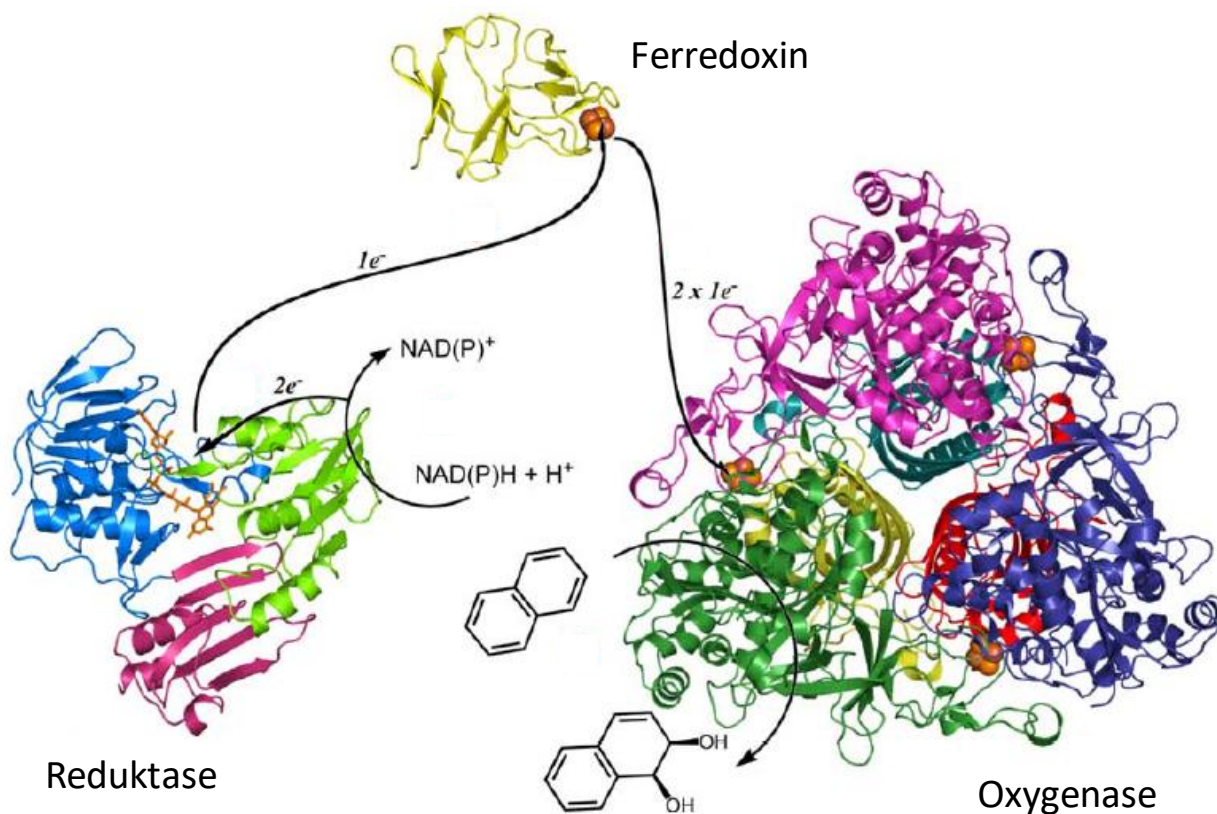


Abbildung 1.11: Komponenten eines Rieske-Dioxygenase-Systems. Rieske-Dioxygenase-Systeme bestehen aus bis zu drei verschiedenen Einheiten: einer Reduktase, einem Ferredoxin und der Rieske-Dioxygenase, wobei das Ferredoxin nicht in allen Systemen zu finden ist. In dieser Abbildung ist das System der Biphenyl-Dioxygenase dargestellt. Abbildung modifiziert nach (Ferraro *et al.*, 2005).

In der Oxygenase-Einheit sind zwei verschiedene Arten von Redoxzentren enthalten. Neben [2Fe-2S]-Clustern sind mononukleare Eisenzentren gebunden. Da die Entfernung innerhalb einer α -Untereinheit etwa 44–45 Å zwischen diesen beiden Zentren beträgt und somit zu lang ist

für einen Elektronentransfer, werden in der Regel mehrere α -Untereinheiten zusammengeslossen. Als Beispiel ist in Abbildung 1.12 a) ein Trimer der Carbazol-1,9a-Dioxygenase dargestellt. Die beiden Redoxzentren innerhalb einer Untereinheit sind an den jeweils entgegengesetzten Enden lokalisiert. Durch die Trimerisierung wird erreicht, dass die mononuklearen Eisen- und Rieske-Zentren benachbarter Untereinheiten in eine Nähe von ca. 12 Å zueinanderkommen, sodass ein Elektronentransfer gewährleistet werden kann. Das aktive Zentrum, welches so gebildet wird, ist in Abbildung 1.12 b) gezeigt. Ein Histidin des [2Fe-2S]-Clusters einer Untereinheit wird durch eine verbrückende Asparaginsäure mit dem Histidinliganden des mononuklearen Eisens der anderen Untereinheit verbunden (Wackett, 2002; Ferraro *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2016). Mutationen dieser Asparaginsäure führten zu einer stark verringerten oder nicht zu messenden Enzymaktivität, woraus geschlossen werden kann, dass sie eine essentielle Rolle besitzt (Parales *et al.*, 1999).

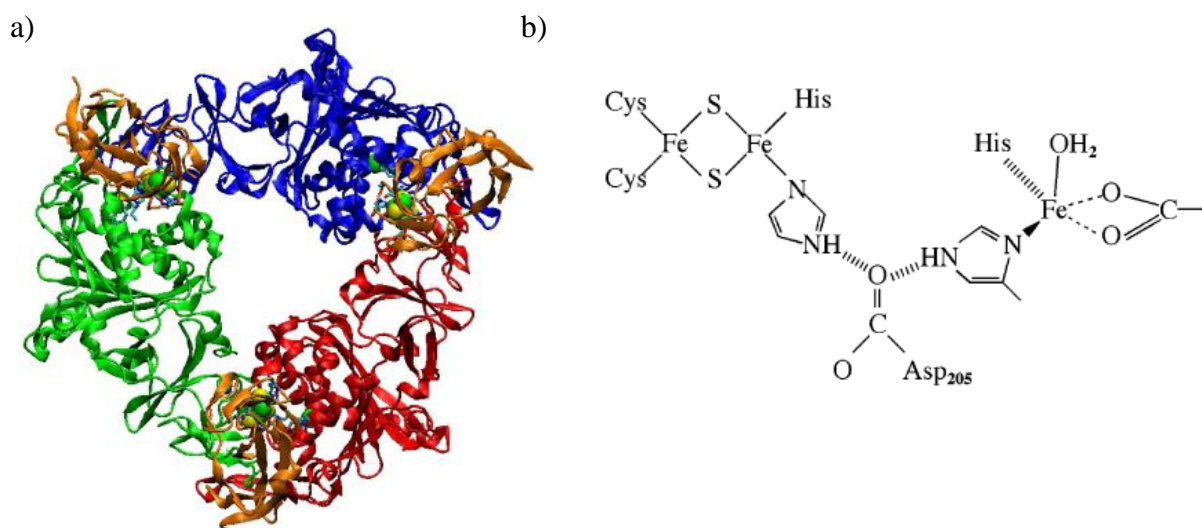


Abbildung 1.12: Strukturen einer Dioxygenase. a) Trimer der Carbazol-1,9a-Dioxygenase in einem Holoenzym. Die gebundenen Ferredoxine sind in braun dargestellt (Dawson *et al.*, 2016); b) Aktives Zentrum der Naphthalin-Dioxygenase (Wackett, 2002).

Die UV/Vis-Spektren der Rieske-artigen Cluster in Oxygenasen bzw. Rieske-Ferredoxinen unterscheiden sich kaum von denen der Rieske-Proteine. Die oxidierten Proteine zeigen ebenso Peaks im Bereich von 325 und 460 nm, sowie die Schulter bei ca. 570 nm. Im reduzierten Protein sind zwei Peaks bei 380 und 520 nm zu erkennen (Pikus *et al.*, 1996; Abb. 1.13 a)).

Auch die ESR-Spektren sind sehr ähnlich zu denen von bekannten Rieske-Proteinen. Die g -Werte betragen im Fall einer oxidierten Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* 2,01, 1,91 und 1,76 (Rosche *et al.*, 1995; Abb. 1.13 b)).

Das Mössbauerspektrum (90 K, ohne Magnetfeld) einer oxidierten Toluol/o-Xylol-Monooxygenase ist in Abbildung 1.13 c) gezeigt. Die Parameter der beiden Dubletts betragen $\delta_1 = 0,24 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q1} = 0,55 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{3+} -Ion mit den Cysteinliganden sowie $\delta_2 = 0,34 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_{Q2} = 1,10 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{3+} -Ion mit den Histidinliganden. Im reduzierten Protein (230 K, ohne Magnetfeld) ergeben sich als Parameter für die Dubletts $\delta = 0,23 \text{ mms}^{-1}$ und

$\Delta E_Q = 0,69 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{3+} und $\delta = 0,65 \text{ mms}^{-1}$ und $\Delta E_Q = 2,92 \text{ mms}^{-1}$ für das Fe^{2+} (Tinberg *et al.*, 2010).

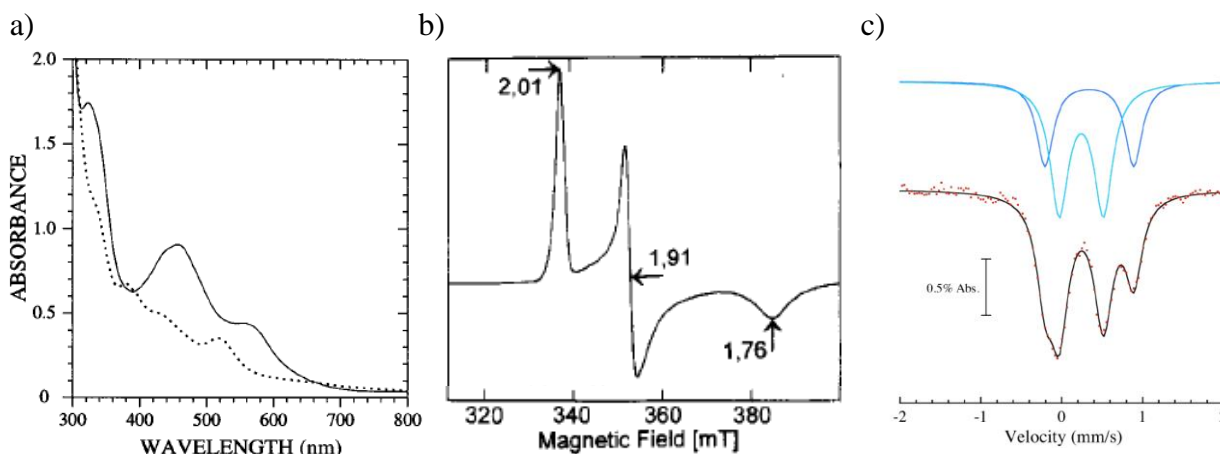


Abbildung 1.13: Spektroskopie von Rieske-artigen Clustern. a) UV/Vis-Spektrum der oxidierten (durchgezogenen) bzw. reduzierten (gestrichelt) Form des Rieske-Ferredoxins einer Toluol-4-monooxygenase (Pikus *et al.*, 1996); b) ESR-Spektrum der reduzierten 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase aus *Pseudomonas putida* 86 (15 K) mit den g -Werten 2,01, 1,91 und 1,76. Abbildung modifiziert nach (Rosche *et al.*, 1995); c) Mössbauerspektrum einer oxidierten Toluol/o-Xylol-Monooxygenase bei 90 K (Tinberg *et al.*, 2010). In blau sind die jeweiligen Subspektren, in schwarz der Fit des gemessenen Spektrums (rote Punkte) dargestellt.

Obwohl die spektroskopischen Eigenschaften relativ ähnlich zu Rieske-Proteinen aus bc_1 - bzw. b_6f -Komplexen sind, unterscheiden sich die Redoxpotentiale erheblich. Sie betragen in Dioxygenasesystemen zwischen -175 und -100 mV (Link, 1999; Elsen *et al.*, 2007) und liegen damit etwa 400 mV niedriger. Außerdem sind sie bis etwa $\text{pH } 10$ unabhängig vom pH -Wert. Dies ist zurückzuführen auf die höheren pK_s -Werte der clusterbindenden Histidinreste im oxidierten Zustand, welche bei $9,8$ und $11,5$ liegen, also jeweils etwa zwei pH -Einheiten höher im Vergleich zu den Rieske-Proteinen (Zu *et al.*, 2003). Die Mössbauerspektren im oxidierten Zustand (Abb. 1.13 c)) sind deswegen mit dem diprotonierten Zustand des *T. thermophilus*-Proteins zu vergleichen.

1.5 Aim32 und Apd1

In der vorliegenden Arbeit werden die Proteine Aim32 und Apd1 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* näher untersucht. Diese sind bisher weitgehend unerforscht. Trotzdem gibt es eine Reihe von Beobachtungen, welche im folgenden Kapitel dargelegt werden.

Aim32

Hess *et al.* publizierten im Jahr 2009 eine Studie, in der durch computergestützte Voraussagen und anschließender Analyse neue Proteine, welche an mitochondrialen Prozessen beteiligt sind, gefunden wurden (Hess *et al.*, 2009). Drei verschiedene Computerprogramme wurden genutzt, um aus verschiedenen Quellen, meistens veröffentlichte Hochdurchsatzscreens, mögliche Kandidaten auszusuchen, welche dann mit unterschiedlichen Verfahren getestet wurden. Zusätzlich wurden 106 Gene, welche bekanntermaßen in der mitochondrialen Organisation und Biogenese

involviert sind, in diesen Datensatz eingespeist. Die daraus bestätigten beteiligten Gene wurden zu einem neuen Datensatz zusammengestellt und auf diesem basierend eine zweite Vorhersage für neue mitochondriale Proteine getroffen, welche abschließend ebenfalls wieder getestet wurden. Die 183 vielversprechendsten Proteine aus der ersten Voraussage enthielten 42 Proteine, für die eine mitochondriale Rolle bereits bekannt war. Aus den restlichen 141 Proteinen konnten weitere 83 (59 %) identifiziert werden, die in der Biogenese der Mitochondrien mitwirken. Aus den 52 Proteinen der zweiten Vorhersage wurden weitere 17 (33 %) als mitochondriale Proteine bestimmt. Insgesamt konnten die Forscher durch diesen Ansatz 109 neue Proteine finden, welchen teilweise ursprünglich bereits andere Funktionen zugeordnet waren.

Eines der Verfahren, die zur Überprüfung der computergestützten Voraussagen verwendet wurden, war der „Petite-Frequency-Assay“. Dabei werden alle Deletionsstämme zunächst auf Medium mit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle, in diesem Fall Glycerin, 48 Stunden lang kultiviert. Alle Zellen, welche unter diesen Bedingungen wachsen können, müssen eine normale Atmungskette besitzen und über funktionsfähige Mitochondrien verfügen. Die gewachsenen Zelllinien werden auf einer glucosehaltigen Platte ausgestrichen und wachsen gelassen. Ab diesem Punkt können auch Tochterzellen überleben, welche keine funktionsfähigen Mitochondrien enthalten. Nach 48 Stunden werden einzelne Kolonien gepickt, in Wasser resuspendiert und für weitere 48 Stunden auf einer neuen glucosehaltigen Platte ausgestrichen. Nach dieser Inkubationszeit wird Agar, welcher Tetrazolium enthält, auf die Zellen gegeben. Die Stämme, welche über funktionstüchtige Mitochondrien verfügen, nehmen das Tetrazolium auf und haben dadurch große rot gefärbte Kolonien. Die Stämme mit Defekten in den Mitochondrien bleiben klein und weiß. Im Vergleich zum Wildtyp kann dann eine Einstufung der Stämme erfolgen. In Zellen, die mehr kleine weiße Kolonien bilden, liegen entweder eine defekte Biogenese der Mitochondrien oder Störungen in der Stabilität oder Vererbung vor. Ein solcher Stamm mit einem sehr schwachen Phänotyp war der Δ Aim32-Stamm (*Altered Inheritance rate of Mitochondria*). Das Gen scheint also an der stabilen Übertragung der Mitochondrien zwischen Mutter- und Tochterzelle beteiligt zu sein.

In einer zweiten Veröffentlichung wurde festgestellt, dass Δ sod2-Hefezellen eine Anfälligkeit gegenüber dem Antimalariamedikament Primaquin haben. Anschließend wurde beobachtet, dass eine Überexpression von zwei Proteinen, von denen eines Aim32 ist, diese Sensibilität verringert und die Zellen somit schützt (Lalève *et al.*, 2016).

Apd1

Apd1 wurde 1999 erstmals in einer Studie von 150 Deletionsmutanten von Genen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erwähnt (Entian *et al.*, 1999). Dabei wurden die Deletionsmutanten verschiedenen Tests unterzogen, in denen sie unter anderem verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt oder auf ihre Chromosomenverteilung, Zellteilung oder Fehlfunktionen im Kohlenhydratstoffwechsel untersucht wurden. Ein Teil dieses Screenings waren Kupfer-Toxizitätstests. Kupfer ist ein wichtiger Nährstoff für Hefen, allerdings kann es in höheren Konzentrationen schädliche Wirkungen hervorrufen. Kommt es in Hefen zu einer Fehlfunktion, kann dies zu einer

höheren Sensitivität oder Resistenz gegenüber Kupfer führen. Um dies zu überprüfen, wurden 121 Deletionsmutanten auf Medium mit ansteigendem Kupfersulfatgehalt ausplattiert und ihr Wachstumsverhalten studiert. Nur zehn davon zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Kupfer im Medium, wovon eine der Δ Apd1-Stamm war. Eine weitere Auffälligkeit wurde in der Aktinfilamentverteilung festgestellt. Δ Apd1 war einer von drei Stämmen, welcher weniger oder anders verteilte Aktinfilamente beinhalten. Ca. 10% der Zellen führte zu gestreckten Tochterzellen während der Zellteilung und die Aktinfilamente wurden hauptsächlich fern von der Mutterzelle gefunden. Dieser Umstand führte zur Benennung des Gens als Apd1 (*Actin patches distal*).

Die Sensitivität gegenüber Kupfer wurde in einer späteren Untersuchung bestätigt. Darin wurden die Auswirkungen von verschiedenen Metallen im Medium auf das Wachstum von Deletionsstämmen untersucht. Zunächst wurden für die einzelnen Metalle die EC_{50} -Konzentrationen bestimmt, was bedeutet, dass die Konzentration des Metallions im Medium ermittelt wird, bei welcher nach 20 Stunden Inkubation der OD_{600} -Wert um die Hälfte reduziert ist. Für Kupfer wurde hier für den Wildtyp eine EC_{50} -Konzentration von 7 mM Kupfersulfat gefunden. Anschließend wurde der GIF (*Growth Inhibition Factor*) bei 7 mM Kupfersulfat ermittelt. Dabei ergab sich für Δ Apd1 ein GIF von 2,4. Somit besitzt der Stamm im Vergleich zu den Wildtypzellen bei 7 mM Kupfersulfat im Medium ein 2,4-fach schlechteres Wachstum (Jin *et al.*, 2008).

Eine aktuellere Veröffentlichung, welche im Laufe dieser Arbeit erschienen ist, beschreibt die Beteiligung von Apd1 an einer Sensitivität gegenüber Hydroxyharnstoff (Tang *et al.*, 2015). Dieser ist ein Inhibitor der DNA-Synthese und -reparatur und kann verschiedene Bereiche der zellulären Antwort auf Stress aktivieren. Dadurch wird es auch als Mittel gegen Krebs verwendet. Δ Apd1-Zellen zeigten in dieser Studie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hydroxyharnstoff, wodurch eine schützende Funktion des Apd1 gegen diesen Stoff bzw. seine Angriffspunkte in Hefen angenommen wurde. Der genaue Mechanismus konnte allerdings nicht aufgeklärt werden. Apd1 wurde ohne ESR-, Mössbauer- und zuverlässige UV/Vis-spektroskopische Daten als [2Fe-2S]-Protein der Familie der thioredoxinartigen Ferredoxine beschrieben. Als Liganden des Clusters wurden von den Autoren nach Mutagenese ohne spektroskopische Nachweise für eine Histidinkoordination die Cysteine an den Positionen 44 und 48 sowie die Histidine an den Positionen 255 und 259 postuliert.

1.6 Zielsetzung

Eisen-Schwefel-Proteine stellen in der Klasse der Metalloproteine einige der wichtigsten Vertreter dar. Sie sind in allen Domänen des Lebens zu finden und erfüllen vielfältige Aufgaben in verschiedensten Bereichen, wie beispielsweise Elektronentransport, regulatorische Funktionen oder enzymatische Aktivität.

Ende der 1960-er Jahre herrschte die Meinung, die Übertragung der Fe/S-Cluster auf Apoproteine würde spontan verlaufen. Dazu würden allerdings Mengen an Eisen und Schwefel benötigt, die für die Zellen *in vivo* toxisch sind (Johnson *et al.*, 2005). Heutzutage ist bekannt, dass an der Biogenese von Fe/S-Clustern in Eukaryoten mehr als 20 Komponenten in verschiedenen Maschinerien beteiligt sind (Johnson *et al.*, 2005; Lill *et al.*, 2006; Lill & Mühlenhoff, 2008). Obwohl diese beteiligten Maschinerien in der Zwischenzeit recht gut bekannt sind, gibt es immer noch Punkte, die unklar sind. So ist zum Beispiel ungeklärt, wie in der eukaryotischen CIA-(*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*) Maschinerie der Clustertransfer auf Apoproteine initiiert wird.

In bioinformatischen Untersuchungen wurde von Prof. A. J. Pierik festgestellt, dass verschiedene cytosolische Fe/S-Proteine, darunter auch an der CIA-Maschinerie von Hefen beteiligte Proteine, über ein konserviertes C-terminales Tryptophan verfügen. Da Tryptophan eine Aminosäure ist, die in Proteinen allgemein sehr selten vorkommt, ist das gehäufte Vorkommen dieser Aminosäure am C-Terminus von Fe/S-Proteinen eine bemerkenswerte Beobachtung (Gatto & Berg, 2003).

Basierend auf dem gefundenen konservierten C-terminalen Tryptophan, wird im Arbeitskreis von Prof. A. J. Pierik die „Tryptophan-Hypothese“ untersucht. Dabei wird vermutet, dass dieses C-terminale Tryptophan als Erkennungssequenz oder zumindest als Teil einer solchen für die Interaktion mit dem CIA-Targeting-Komplex fungieren könnte. Besitzt ein Protein dieses endständige Tryptophan, so kann es von der CIA-Maschinerie als Apoprotein erkannt werden und es wird ein Fe/S-Cluster übertragen (Greth, persönliche Mitteilung).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden in der Literatur bereits verschiedene Aspekte bezüglich eines C-terminalen Tryptophans beobachtet. So wird beispielsweise über seine maßgebliche Rolle bei der antiviralen Aktivität des menschlichen Fe/S-Proteins Viperin gegen TBEV (*tick-borne encephalitis virus*) berichtet. Gleichzeitig wird postuliert, dass es an der Bindung von Viperin an CIAO1, einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes im Menschen, beteiligt ist (Upadhyay *et al.*, 2014).

Ein anderes Beispiel ist das Protein Lto1, welches vermutlich zusammen mit Yae1 für eine Fe/S-Clusterübertragung auf Rli1 verantwortlich ist. Auch hier scheint ein C-terminales Tryptophan eine Rolle zu spielen und essentiell für die Interaktion des Lto1 mit den Faktoren Cia1, Cia2 und Mms19 der CIA-Maschinerie zu sein (Paul *et al.*, 2015).

Mit Hilfe der Tryptophan-Hypothese wurde im Genom der Bäckerhefe *S. cerevisiae* nach weiteren bisher unbekanntem Fe/S-Proteinen gesucht. Dabei wurde das cytosolische Protein Apd1 (316 Aminosäuren, C-terminales Tryptophan) und ein dem Apd1 sehr ähnliches Protein in den Mitochondrien, Aim32 (311 Aminosäuren), gefunden. Bei beiden Proteinen wird in Datenbanken durch Algorithmen die Proteinfamilie „Sucrase/ferredoxin like“ bzw. „pfam06999“ annotiert. Diese Benennung geht zurück auf eine Studie von 1994, in der ein neues pflanzliches Protein mit Sucrase-Aktivität aus Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) beschrieben wird (Machray *et*

al., 1994). Es wurde in einem cDNA-Screening mithilfe von Antikörpern gegen Proteine mit Sucrase-Aktivität gefunden. Das im Screening gefundene Protein besitzt in seiner zentralen Domäne Sequenzähnlichkeiten mit dem TLF-Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum*. Es gibt jedoch keine Hinweise für eine hydrolytische Funktion dieses Proteins. Deswegen muss angenommen werden, dass im Sucrase-Präparat Verunreinigungen waren, die von den im Screening verwendeten Antikörpern detektiert wurden.

Ein weiteres Protein, welches diese Annotation besitzt, ist Fmi1 (*functional gene of Magnaporthe infection 1*) aus dem Organismus *Magnaporthe grisea*. Es wurde von einer Forschungsgruppe um T. Teraoka von der „Tokyo University of Agriculture and Technology“ entdeckt. Es war eines von zwei neu entdeckten Genen, die in Keimfäden exprimiert werden und bei der Ausbildung von Appressorien und in der frühen Phase einer Infektion durch *Magnaporthe grisea* beteiligt sind. Bis heute wurden dazu keine weiteren Informationen veröffentlicht.

Da verschiedene Krankheiten auf Defekte von Eisen-Schwefel-Proteinen oder deren Biogenese zurückgeführt werden können, ist es von größtem Interesse sowohl bereits bekannte Fe/S-Proteine und ihre Funktionen besser kennen zu lernen als auch unbekannte Fe/S-Proteine zu charakterisieren und ihre Wirkungsweisen zu erforschen. Daher sollten in dieser Arbeit die beiden Proteine Apd1 und Aim32 zunächst kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob es sich bei den beiden Proteinen tatsächlich um Fe/S-Proteine handelt. Dazu sollten ihre Eisen- und säurelabilen Schwefelgehalte analysiert und UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt werden. Falls es sich bei den Proteinen um Fe/S-Proteine handelt, sollte der enthaltene Cluster genauer charakterisiert werden. Dazu können Methoden wie ESR- und Mössbauerspektroskopie eingesetzt werden. Um den genauen Clustertyp und die entsprechenden gebundenen Liganden zu untersuchen, können durch zielgerichtete Mutagenese andere clusterbindende Aminosäuren in die Sequenz eingebracht und so der Effekt des Austausches auf den Fe/S-Cluster untersucht werden. Weitere mögliche Untersuchungen, die am Fe/S-Cluster durchgeführt werden können, sind die Bestimmung von pK-Werten, falls eine Koordination durch Histidine vorliegt, sowie elektrochemische Studien. Um einen Einblick in die Proteinstruktur zu bekommen, sollten für die Proteine außerdem Ansätze zur Kristallisation für zukünftige Röntgenkristallographie durchgeführt werden.

2. Ergebnisse

2.1 Klonierung der Proteine

Um Proteine und die darin enthaltenen Clustertypen charakterisieren zu können, ist es von Vorteil, schnell und einfach große Mengen Protein isolieren zu können. Dies ist mittels heterologer Genexpression möglich. Dafür wurden in diesem Fall Gene aus *S. cerevisiae* bzw. *T. thermophilus* in Expressionsvektoren kloniert (Kap. 5.2.1-5.2.6), anschließend in *E. coli* überexprimiert und die entsprechenden Proteine isoliert (Kap. 5.3). Alle Plasmide wurden vor Verwendung durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Vektorkarten sowie die DNA- und Aminosäuresequenzen sind im Anhang (Kap. 6.1 und 6.2) zu finden.

In der Vorbereitung des Projektes wurden sowohl Apd1 als auch Aim32 auf die Wahrscheinlichkeit untersucht, ob sie mit N-terminalen mitochondrialen Targetpeptiden ausgestattet sind, was dann einen Transport der Proteine in die Mitochondrien nach sich zieht. Dort werden durch Signalpeptidasen die Targetpeptide von den Proteinen abgespalten. Für Apd1 ist der Mitoprot score 0,0641, was eher auf ein cytosolisches Protein hindeutet. Für Aim32 jedoch liegt dieser Wert bei 0,9793, was auf eine Lokalisierung innerhalb der Mitochondrien hinweist (<http://ihg.gsf.de/>). Zunächst wurde von Catharina Blinn in ihrer Diplomarbeit (Blinn, 2014) mit einer um 21 Aminosäuren gekürzten Version von Aim32 gearbeitet, um einen Export des Proteins ins Periplasma von *E. coli*, eingeleitet durch dieses Signalpeptid, zu verhindern. Allerdings wurde in der Arbeit unter Anderem nachgewiesen, dass auch mit der vollen Länge des Aim32-Proteins keinerlei solcher Exportprobleme auftraten und außerdem bessere Proteinausbeuten zu erreichen waren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der vollen Länge von Aim32 gearbeitet.

Klonierung von Apd1 bzw. Aim32 in pETDuet-1

Für die Klonierung der beiden Proteine wurden die codierenden Sequenzen mittels PCR aus chromosomaler DNA von *S. cerevisiae* (W303) amplifiziert und in die MCS I (*multiple cloning site*) von pETDuet-1 zwischen die Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall kloniert. Außerdem ist im Plasmid ein Gen enthalten, das für eine Ampicillinresistenz kodiert sowie das *lacI*-Gen zur Induktion der Genexpression mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid). Unter den Bezeichnungen Apd1 und Aim32 werden in der folgenden Arbeit immer die hier beschriebenen mit einem N-terminalen His₆-Tag versehenen Proteine verstanden.

Klonierung von Apd1 bzw. Aim32 in pET-28a_TS

Auch hier wurden aus chromosomaler DNA von *S. cerevisiae* (W303) die entsprechenden Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und zwischen die Restriktionsschnittstellen NdeI und Sall kloniert. Zwischen dem N-terminalen His₆-Tag und der Proteinsequenz liegt hier außerdem eine Spaltstelle für die TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase*) vor. Die Erkennungssequenz ist die Aminosäureabfolge ENLYFQ/G (Cabrita *et al.*, 2007) und ermöglicht eine Abspaltung des Histidintags vom Protein zwischen den Aminosäuren Glutamin

und Glycin. Ebenso enthält der Vektor ein Gen, welches für eine Kanamycinresistenz kodiert sowie das *lacI*-Gen zur Induktion der Genexpression mit Hilfe von IPTG. Zur Unterscheidung der Proteine werden die hier beschriebenen Proteine in der folgenden Arbeit als His₆-TEV-Apd1 bzw. His₆-TEV-Aim32 abgekürzt. His₆-TEV-Apd1 wurde für die Kristallisation sowie für die Massenspektrometrie verwendet.

Klonierung des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus* in pETDuet-1

Für die Klonierungen des Rieske-Proteins wurde statt chromosomaler DNA ein synthetisches Gen für die PCR-Amplifikation verwendet, welches codonoptimiert für die Expression in *E. coli* von der Firma GeneArt AG bezogen wurde. Kloniert wurde das Gen zwischen die Restriktionschnittstellen NcoI und BamHI in der MCS I von pETDuet-1. Dadurch wurde der im Vektor enthaltene His-Tag, der genau zwischen diesen Schnittstellen lokalisiert ist, entfernt und das Protein konnte ohne Tag exprimiert werden. Es wurden zwei verschiedene Varianten des Proteins in pETDuet-1 kloniert (Abb. 2.1). Dabei enthielt TTRieske die Aminosäuren (AS) 38-210 des natürlichen Rieske-Proteins. Bei den Aminosäuren 1-37 handelt es sich um den Membrananker des Proteins, welcher im löslichen Fragment nicht enthalten ist (Gatti *et al.*, 1998). Bei der kürzeren Variante (TTRieske_short) wurden außerdem die ersten acht sowie die letzten neun Aminosäuren des ersten Konstruktes entfernt, da diese in den Kristallstrukturen sehr unstrukturiert vorlagen (Hunsicker-Wang *et al.*, 2003; Konkle *et al.*, 2009). In beiden Fällen wurde durch die Klonierung zwischen das Start-Methionin und die erste reguläre Aminosäure des *T. thermophilus* Rieske-Proteins ein zusätzliches Alanin eingefügt. Der Vektor enthält das *lacI*-Gen zur Induktion der Genexpression sowie ein Gen, das für eine Ampicillinresistenz kodiert.

TTRieske



TTRieske_short



Abbildung 2.1: Klonierte Varianten des Rieske-Proteins. Die Indices an den Aminosäuren entsprechen den Positionen der Aminosäuren des natürlichen Proteins. Blau markierte Aminosäuren sind in der kürzeren Version entfernt worden, rot markiert ist jeweils das zusätzliche Alanin, unterstrichen sind jeweils Start- und End-Aminosäure des TTRieske_short. Abbildung modifiziert nach (Konkle *et al.*, 2009).

Klonierung des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus* in pET-28a_TS

Die Amplifikation des Rieske-Proteins (AS 38-210) fand wie im vorigen Abschnitt mittels PCR statt, jedoch mit dem synthetischen Gen von GeneArt AG als Template. Kloniert wurde in den Leervektor pET-28a_TS, welcher durch PCR in linearer und sehr reiner Form erhalten wurde,

zwischen die Schnittstellen NdeI und BamHI. Damit ist auch hier eine Schnittstelle für die TEV-Protease zwischen N-terminalem His₆-Tag und der Proteinsequenz vorhanden. Zusätzlich sind auf dem Plasmid ein Gen, das für eine Kanamycinresistenz kodiert, sowie das *lacI*-Gen zur Induktion der Genexpression vorhanden. Dieses Protein wird mit His₆-TEV-TTRieske abgekürzt.

2.2 Proteinisolierung und -charakterisierung

Nach Transformation der entsprechenden Plasmide in *E.-coli*-Zellen wurden mit drei Kolonien Kleinkulturen angeimpft und am folgenden Tag zwei Liter LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 37 °C inkubiert (Kap. 5.3.1). Danach erfolgte die Induktion durch IPTG und eine Expression über Nacht bei 18 °C. Dabei konnten in der Regel zwischen 6,5 und 13 g Zellen aus zwei Liter Kultur erhalten werden. Anschließend wurden die Zellen mittels French Press aufgeschlossen (Kap. 5.3.2).

2.2.1 Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose

Verfügen die exprimierten Proteine über einen Histidin-Tag, so wurden sie über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt (Kap. 5.3.3) und anschließend entsalzt (Kap. 5.3.4).

Apd1

In diesem Fall wurde bei der Expression nur mit dem Zusatzplasmid pRKISC gearbeitet. Zu Beginn wurde mit Puffern analog zu Kapitel 5.3.2 bis 5.3.4 gearbeitet, mit dem Unterschied, dass sie einen pH-Wert von 8,0 hatten. Da bei der Verwendung der Puffer mit pH 9 ein besserer Einbau von Fe/S-Clustern in Apd1 detektiert werden konnte, wurden diese in allen anschließenden Isolierungen verwendet. Nach der Bindung des Proteins an das Säulenmaterial und dem Waschen (20mM Imidazol) wurde das Protein mit einem Puffer mit einem höheren Imidazolgehalt (250mM) eluiert. Apd1 hatte eine deutliche rötlich-braune Färbung (Abb. 2.2 a) Inset), sodass die Elution leicht verfolgt werden konnte. Die Farbe der Proteine lieferte bereits einen ersten Hinweis auf einen enthaltenen Fe/S-Cluster. Nach dem Entsalzen der Proteinlösung, was der Entfernung des Imidazols dient, wurde sofort ein UV/Vis-Spektrum des Proteins in einer Verdünnung von 1:10 aufgenommen, um die ungefähre Konzentration für spätere Experimente abzuschätzen (Abb. 2.2 a)). Als Blindwert diente der Entsalzungspuffer. Anhand des Spektrums kann der enthaltene Cluster als [2Fe-2S]-Cluster vermutet werden, da das Protein Maxima bei 330nm, 450nm, sowie eine Schulter bei 550nm zeigt. Wäre im Protein ein [4Fe-4S]-Cluster gebunden, würde das Spektrum nur eine Schulter bei ca. 420nm enthalten.

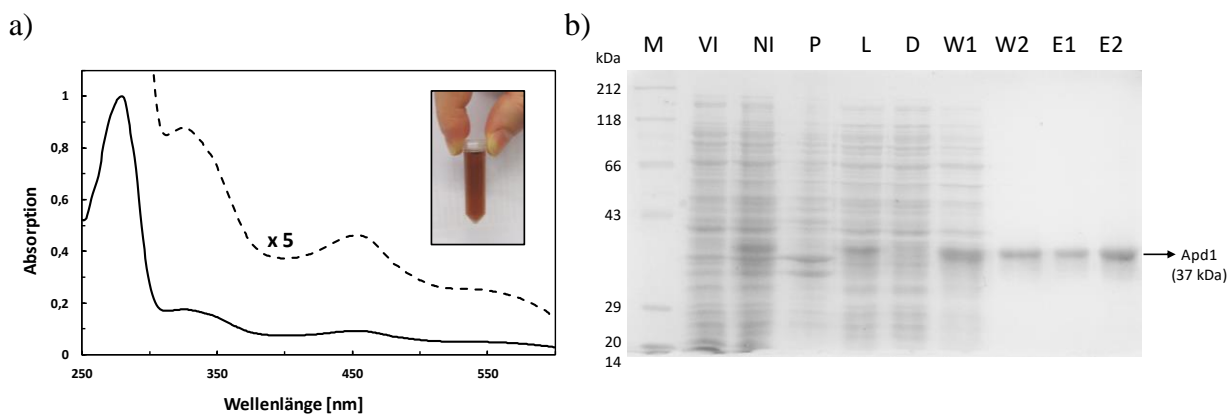


Abbildung 2.2: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von Apd1. a) UV/Vis-Spektrum von Apd1 (1:10 mit Entsalzungspuffer verdünnt), normiert bei 280 nm, gestrichelt: 5-fache Vergrößerung, Inset: isoliertes Apd1; b) SDS-PAGE (12%): M: Marker (Roti®-Mark Standard, Roth) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa, VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W1: 1. Waschfraktion, W2: 2. Waschfraktion, E1: Eluat 1 µl (1:10), E2: Eluat 2 µl (1:10).

Die während einer Isolierung und Aufreinigung zu verschiedenen Zeitpunkten genommenen Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE untersucht, um den Erfolg einer Isolierung überprüfen zu können. Das Ergebnis einer SDS-PAGE (12%) für Apd1 ist in Abbildung 2.2 b) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach der Induktion mit IPTG (NI) eine stärkere Bande zwischen 43 und 29 kDa vorhanden ist als vorher (VI), welche das Zielprotein mit der Molekülmasse von ca. 37 kDa repräsentiert. Die Bande im Pellet (P) auf gleicher Höhe kann entweder auf nicht vollständig aufgeschlossene Zellen hindeuten oder Teile des Proteins sind aufgrund der großen Proteinmengen durch die Überexpression nicht löslich. Die Banden in den beiden Waschfraktionen (W1 und W2) bei 37 kDa zeigen, dass die Kapazität des Säulenmaterials überschritten worden ist. In den Elutionsfraktionen (E) ist klar erkennbar, dass das Protein erfolgreich isoliert werden konnte.

Auf den Gelen waren in den Elutionsfraktionen von Apd1 und Aim32 gelegentlich zwei sehr nahe beieinanderliegende Banden (im Bereich von ca. 2-3 kDa) zu erkennen. Dies könnte ein Hinweis auf eine stattfindende Proteolyse sein. Deshalb wurden die Proteine im Anschluss durch Massenspektrometrie (Kap. 2.2.5) näher untersucht.

His₆-TEV-Apd1

Analog konnte auch His₆-TEV-Apd1 aufgereinigt werden. In Abbildung 2.3 sind das UV/Vis-Spektrum und die SDS-PAGE (12%) dargestellt. In diesem Beispiel wurde kein zusätzliches Plasmid für die Expression verwendet. Das eluierte Protein zeigte ebenso eine rötlich-braune Farbe. Das Spektrum lässt durch seinen Verlauf einen [2Fe-2S]-Cluster vermuten. Die erhöhte Molekülmasse (38 kDa) im Vergleich zu Apd1 ergibt sich aus den zusätzlichen Aminosäuren der TEV-Protease-Schnittstelle in der Proteinsequenz. Auch dieses Protein konnte erfolgreich isoliert werden.

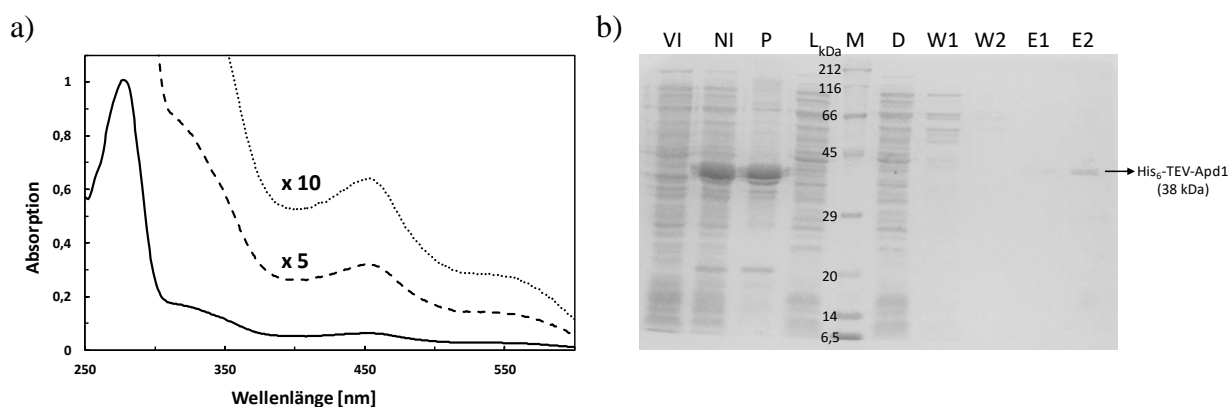


Abbildung 2.3: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von His₆-TEV-Apd1. a) UV/Vis-Spektrum von His₆-TEV-Apd1 (1:10 mit Entsalzungspuffer verdünnt), normiert bei 280 nm, gestrichelt: 5-fache Vergrößerung, gepunktet: 10-fache Vergrößerung; b) SDS-PAGE (12 %): VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, M: Marker (Protein Marker III, AppliChem) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa, D: Durchlauf, W1: 1. Waschfraktion, W2: 2. Waschfraktion, E1: Eluat 1 µl (1:10), E2: Eluat 2 µl (1:10).

Aim32

Aufgrund der Erfahrungen mit Apd1 wurde in den folgenden Aufreinigungen sofort mit den Puffern mit dem pH-Wert 9,0 gearbeitet. Die Isolierung und die Reinigung von Aim32 lief analog zum beschriebenen Prozedere der Reinigung des Proteins Apd1 ab. Bei der Expression wurde mit den beiden zusätzlichen Plasmiden pRKISC und GroEL/ES gearbeitet. Das erhaltene Protein war ebenfalls rötlich-braun gefärbt (Abb. 2.4 a) Inset). In Abbildung 2.4 sind entsprechend das UV/Vis-Spektrum sowie die erhaltene SDS-PAGE (12 %) gezeigt.

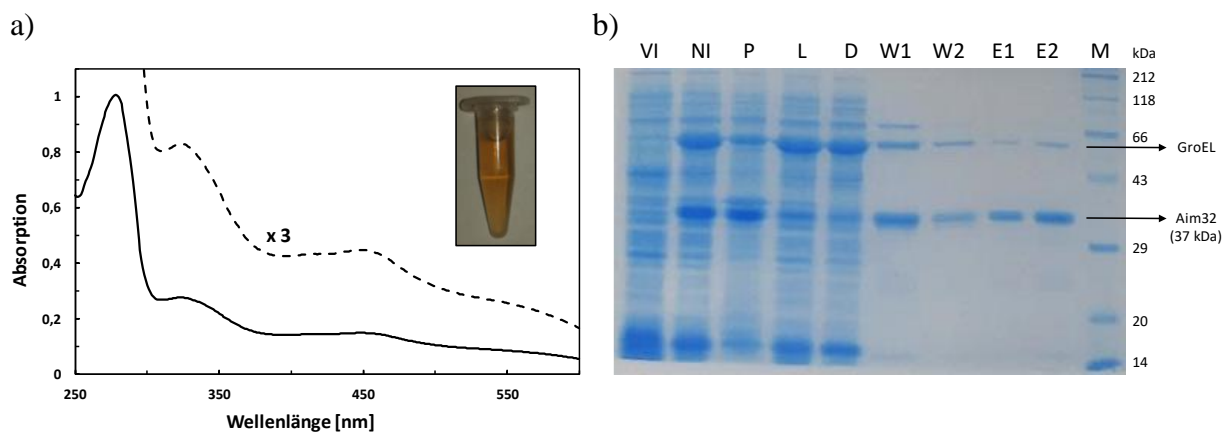


Abbildung 2.4: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von Aim32. a) UV/Vis-Spektrum von Aim32 (1:10 mit Entsalzungspuffer verdünnt), normiert bei 280 nm, gestrichelt: 3-fache Vergrößerung, Inset: isoliertes Aim32; b) SDS-PAGE (12 %): VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W1: 1. Waschfraktion, W2: 2. Waschfraktion, E1: Eluat 2 µl (1:10), E2: Eluat 3 µl (1:10), M: Marker (Roti®-Mark Standard, Roth) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa.

Auch hier sind Indizien für einen enthaltenen [2Fe-2S]-Cluster im UV/Vis-Spektrum, welches ähnlich ist zu dem von Apd1, zu erkennen. In der SDS-PAGE ist eine Bande im Bereich 37 kDa zu erkennen, welche das Protein Aim32 darstellt. Wieder befindet sich zusätzliches Protein in der Pelletfraktion und eine Übersättigung des Säulenmaterials hat stattgefunden (D, W1 und W2). In den Eluatfraktionen sind neben Aim32 zusätzliche Banden im Bereich von 60 kDa zu sehen. Diese sind auf das coexpressierte Protein GroEL zurückzuführen, welches zusammen mit

GroES zu einer besseren Faltung des gewünschten Proteins beitragen soll. Da die Proteine auch ohne die Coexpression von GroEL/ES erfolgreich zu isolieren waren (vgl. Abb. 2.2) und es mit diesem Plasmid zu starken Verunreinigungen kam, wurde in der weiteren Arbeit, auch bei der Expression von Apd1, auf dessen Verwendung verzichtet.

His₆-TEV-Aim32 wurde kloniert, bisher aber nicht isoliert.

His₆-TEV-TTRieske

Das Rieske-Protein His₆-TEV-TTRieske wurde ebenfalls mit der beschriebenen Methode aufgereinigt. Auch hier konnte rötlich-braunes Protein eluiert werden. In Abbildung 2.5 sind das UV/Vis-Spektrum und die SDS-PAGE (15 %) dargestellt. In den Eluatfraktionen sind eindeutig die Banden des His₆-TEV-TTRieske (21 kDa) zu erkennen.

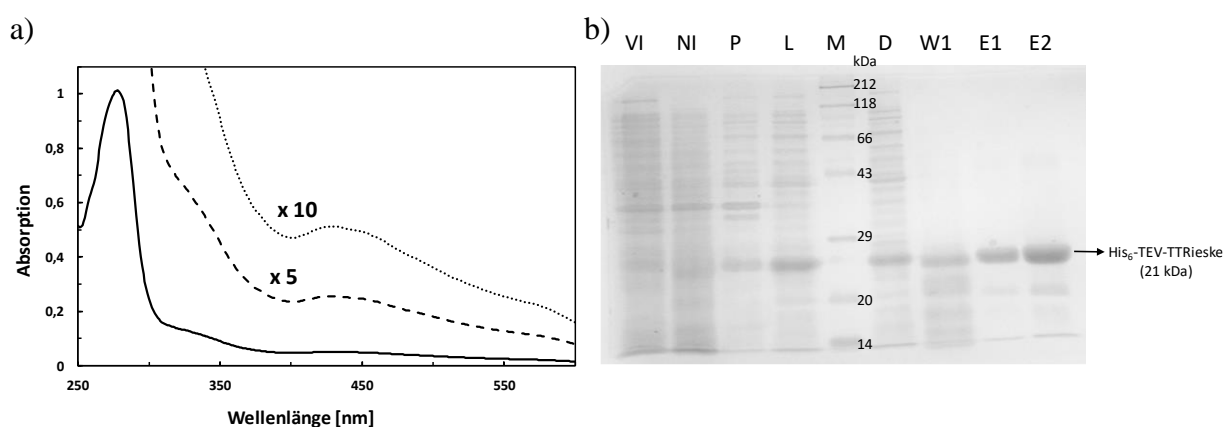


Abbildung 2.5: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Reinigung von His₆-TEV-TTRieske. a) UV/Vis-Spektrum von His₆-TEV-TTRieske (1:10 mit Entsalzungspuffer verdünnt), normiert bei 280 nm, gestrichelt: 5-fache Vergrößerung, gepunktet: 10-fache Vergrößerung; b) SDS-PAGE (15 %): VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, M: Marker (Roti[®]-Mark Standard, Roth) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa, D: Durchlauf, W1: 1. Waschfraktion, W2: 2. Waschfraktion, E1: Eluat 1 µl (1:10), E2: Eluat 2 µl (1:10).

2.2.2 Aufreinigung der Rieske-Proteine ohne Tag

Bei der Aufreinigung von Proteinen können zur einfacheren Isolierung verschiedenartige Tags angehängt werden, die an entsprechende Säulenmaterialien binden können. Somit kann das Zielprotein spezifisch binden und eluiert werden. Da diese Tags allerdings Einfluss auf die Proteine und ihre Eigenschaften haben können, kann es von Vorteil sein, Proteine ohne Tag zu isolieren. Dies ist vor allem bei kleinen Proteinen wie dem Rieske-Protein der Fall, da hier zusätzliche Aminosäuren größere Unterschiede hervorrufen können als bei großen Proteinen. Da in dieser Arbeit das Rieske-Protein als Referenz für pK_S-Wert-Bestimmungen und in der Mössbauerspektroskopie fungiert, wurde versucht bereits bekannte Ergebnisse aus der Literatur zu reproduzieren. Dafür wurden zwei Varianten des Rieske-Proteins ohne Tag isoliert (vgl. Kap. 2.1). Da in beiden Fällen die Prozedur identisch war und für Mössbauerproben und pK_S-Wert-Bestimmungen in dieser Arbeit nur das TTRieske_{short} verwendet wurde, wird im Folgenden nur dessen Reinigung dargestellt.

Nach dem Zellaufschluss mittels French Press (Kap. 5.3.2), wurde das Lysat zuerst auf einen mit Puffer A äquilibrierten Anionenaustauscher (Q Sepharose Fast Flow, Kap. 5.3.5) aufgetragen (Abb. 2.6: 0–52 min).

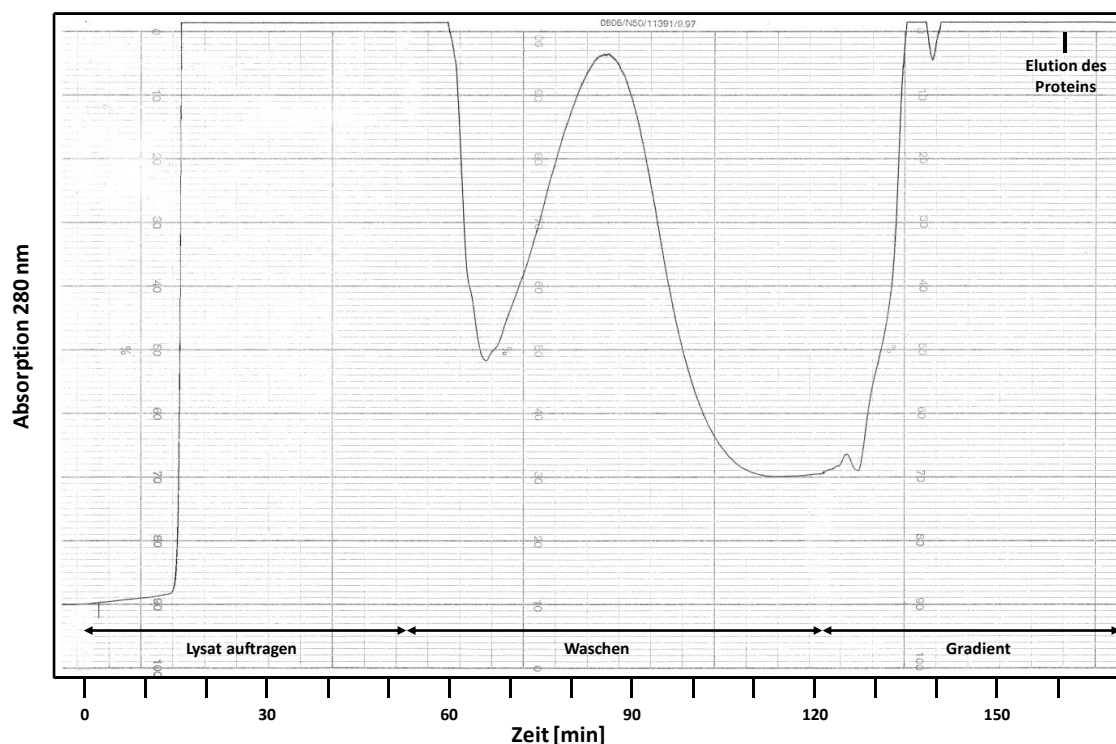


Abbildung 2.6: Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie. 0–52 min: Auftragen des Lysats, 52–122 min: Spülen mit Puffer A, ab 122 min: Anlegen des Gradienten und Fraktionierung, ca. 163 min: Elution des Proteins. Dargestellt ist das Chromatogramm einer Reinigung von TTRieske_short.

Da das N-terminal gekürzte Rieske-Protein (TTRieske_short) einen pI-Wert von 4,93 besitzt, konnte das bei pH 8 negativ geladene Protein an die positiv geladene Säulenmatrix binden. Im ersten Schritt wurden alle nicht gebundenen Proteine mit Puffer A von der Säule gewaschen (Abb. 2.6: 52–122 min). Nachdem die UV-Absorption die Elution der ungebundenen Proteine anzeigte, wurde ein Gradient von Natriumchlorid (1M, Puffer B) angelegt (Abb. 2.6: ab 122 min), um so nach und nach gebundene Proteine von der Säule zu eluieren. Die erhaltenen braunen Fraktionen, die etwa bei 0,3-0,4M NaCl eluierten (Abb. 2.6: ca. 163 min), wurden nun vereinigt und einer Ammoniumsulfatfällung (Kap. 5.3.6) unterzogen.

Durch diese Fällung sollten die Fraktionen (ca. 30 ml), die das Rieske-Protein enthielten, weiter aufgereinigt sowie aufkonzentriert werden. In Abbildung 2.7 ist ein Beispiel der Absorptionsänderungen bei 456 nm und 280 nm während einer Ammoniumsulfatfällung dargestellt. Dafür wurden 1-ml-Portionen des Rieske-Proteins mit Ammoniumsulfat gefällt und die Überstände anschließend bei den angegebenen Wellenlängen gemessen. Daraus ging hervor, dass erst ab einer Konzentration von 55 % Ammoniumsulfat geringe Mengen des Fe/S-Proteins anfangen auszufallen. Im Vergleich zur Absorption bei 280 nm nimmt bei dieser Konzentration die Absorption bei 456 nm, die für Fe/S-Cluster charakteristisch ist, nur gering ab. Durch die starke Abnahme

der Absorption bei 456 nm im gemessenen Überstand nach einer Erhöhung auf 75 % Ammoniumsulfat liegt das Fe/S-Protein im Pellet vor. Da der Überstand nach dieser Erhöhung immer noch braunes Rieske-Protein enthielt, wurde bei Reinigungen eine höhere Konzentration (80 %) verwendet, um das Rieske-Protein vollständig auszufällen.

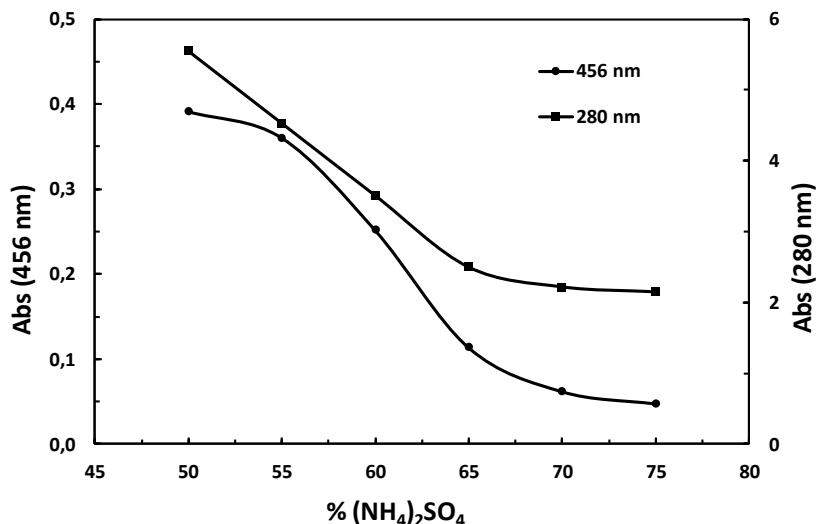


Abbildung 2.7: Verlauf der Ammoniumsulfatfällung des Rieske-Proteins. Dargestellt sind die Absorptionen der Überstände von 1-ml-Portionen des Rieske-Proteins bei 280 nm (Quadrate) bzw. 456 nm (Kreise) nach Fällung mit unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen. Die Absorption bei 280 nm wurde 1:10 verdünnt gemessen.

Daher wurde bei einer Reinigung zunächst eine Ammoniumsulfatkonzentration von 55 % eingestellt. Durch Zentrifugation wurden die ersten anderen Proteine als Pellet entfernt. Anschließend wurde die Konzentration auf 80 % erhöht und das ausgefallene Rieske-Protein konnte nach Zentrifugation in einem für die Gel-Permeationschromatographie geeigneten Volumen von Puffer A (1,9 ml) aufgenommen werden. Der verbleibende Überstand war farblos.

Der dritte und letzte Reinigungsschritt war eine Gel-Permeationschromatographie (Kap. 5.3.7) mit einer „HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade“-Säule von Pharmacia Biotech. Dabei werden die unterschiedlichen Molekülradien von Proteinen ausgenutzt, um verbliebene Verunreinigungen zu entfernen. Außerdem dient dieser Schritt auch der Entfernung des restlichen Ammoniumsulfates. In Abbildung 2.8 ist ein Beispiel eines Chromatogramms dieses Reinigungsschrittes dargestellt.

Es wurde für eine gute Trennung mit einer Flussrate von 1 ml/min gearbeitet. Zuerst wurde die erhaltene braune Proteinlösung aus der Ammoniumsulfatfällung auf die Säule aufgetragen (Abb. 2.8: 0 ml). Nach 100 Minuten (Abb. 2.8: 100 ml) wurde der Fraktionssammler eingeschaltet und Fraktionen von 3 ml aufgefangen. Die Peaks zwischen 145 und 182 ml im Chromatogramm waren farblose Lösungen von Proteinverunreinigungen. Anhand der Farbe wurden die Rieske-Protein enthaltenden Fraktionen (Abb. 2.8: 185–210 ml) ausgewählt und ihre Absorptionen sowohl bei 456 nm, als auch 280 nm (1:10 verdünnt) gemessen. Die Fraktionen, bei denen der Quotient $A_{456}/A_{280} > 0,22$ war ($A_{456}/A_{280} = 0,23$ in Hunsicker-Wang *et al.*, 2003 bzw. $A_{460}/A_{280} = 0,27$ in Fee *et al.*, 1984), wurden vereinigt und mit einem Vivaspin Konzentrator mit

einer Ausschlussgröße von 10kDa aufkonzentriert (Kap. 5.3.8). Zur Lagerung (-80 °C) wurde das Protein aliquotiert und schockgefroren.

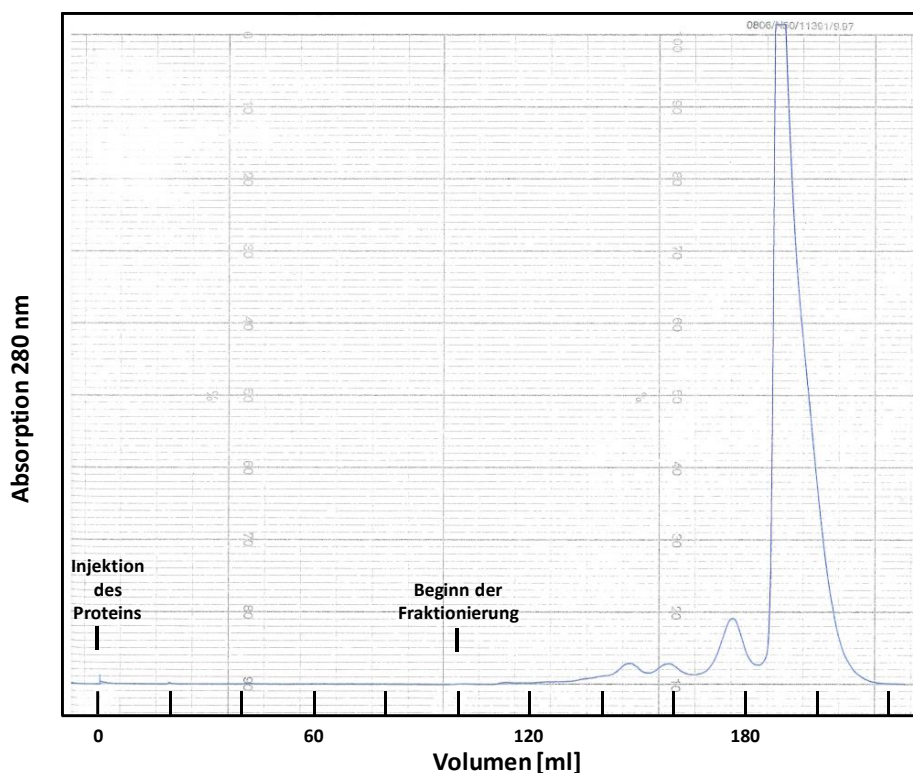


Abbildung 2.8: Chromatogramm der Gel-Permeationschromatographie. 0 ml: Injektion des Proteins, 100 ml: Beginn der Fraktionierung, 145–182 ml: Peaks von Verunreinigungen, 185–210 ml: Rieske-Protein. Dargestellt ist das Chromatogramm einer Reinigung von TTRieske_short.

Abschließend wurde auch nach dieser Reinigungsmethode ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen sowie zur Überprüfung der Reinheit eine SDS-PAGE (15 %) durchgeführt (Abb. 2.9). Das isolierte Rieske-Protein zeigt im UV/Vis-Spektrum die in der Literatur beschriebenen Merkmale eines [2Fe-2S]-Clusters mit mehreren Peaks und Schultern im sichtbaren Bereich. Die SDS-PAGE bestätigt ebenfalls den Erhalt eines relativ reinen Rieske-Proteins. Die Induktion durch IPTG hatte den gewünschten Effekt, eine Bande im Bereich von 17 kDa war anschließend (NI) deutlich intensiver zu erkennen. Des Weiteren ist ein Verlust des Rieske-Proteins im ersten Pellet der Ammoniumsulfatfällung (PASf) zu beobachten. Trotzdem wurde in Hinblick auf ein reineres Protein auf eine Veränderung des Reinigungsprotokolls verzichtet. Im Überstand nach der Ammoniumsulfatfällung (Ü) ist kein Protein mit der Molekülmasse des Rieske-Proteins mehr zu sehen. Im Vergleich zur Probe vor der Gel-Permeationschromatographie (VG) ist das eluierte Protein (E) deutlich von vielen Verunreinigungen befreit und wurde so für die weiteren Experimente verwendet.

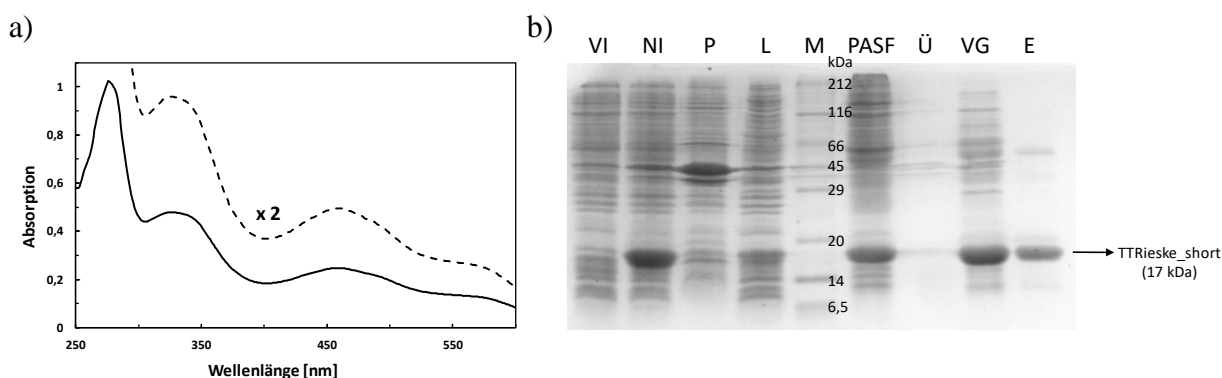


Abbildung 2.9: UV/Vis-Spektrum und SDS-PAGE der Isolierung des TTRieske_short. a) UV/Vis-Spektrum (1:10 mit Puffer A verdünnt), normiert auf 280 nm, gestrichelt: 2-fache Vergrößerung; b) SDS-PAGE (15 %): VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, M: Marker (Protein Marker III, AppliChem) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa, PASF: 1. Pellet der Ammoniumsulfatfällung, Ü: Überstand nach Ammoniumsulfatfällung, VG: vor Gel-Permeationschromatographie, E: Eluat 3 µl (1:100).

2.2.3 Charakterisierung des Fe/S-Clusters

Aufgrund von bioinformatischen Studien im Vorfeld dieser Arbeit wurde vermutet, dass es sich bei den Proteinen Apd1 und Aim32 um Fe/S-Proteine handelt. Da die isolierten Proteinlösungen durch ihre braun-rötliche Farbe diese Vermutung unterstützten, wurden neben einer Bestimmung der Proteinkonzentration auch der Gehalt von Eisen sowie säurelabilem Schwefel untersucht. Bei den Methoden zur Bestimmung des Eisen- bzw. des säurelabilen Schwefelgehaltes (Kap. 5.4.3) werden ausschließlich die im Cluster gebundenen Ionen detektiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Proteinausbeuten, Eisen- und säurelabiler Schwefelgehalt der enthaltenen Fe/S-Cluster

gereinigtes Protein	mg Protein aus 2l Kultur	Eisen pro Protein	S ²⁻ pro Protein
Apd1 (n=12)	30-50	1,64±0,45	1,76±0,44
His ₆ -TEV-Apd1 (n=6)	7-35	1,32±0,38	1,69±0,52
Aim32 (n=2)	10-14	1,72±0,11	2,16±0,01
His ₆ -TEV-TTRieske (n=4)	40-50	0,49±0,18	0,18±0,03
TTRieske (n=2)	7-8	2,28±0,06	0,73±0,06
TTRieske_short (n=3)	10-31	1,69±0,25	0,46±0,08

Zusätzlich zu den UV/Vis-Spektren kann aus den erhaltenen Daten vermutet werden, dass in den Proteinen ein [2Fe-2S]-Cluster enthalten ist. In Apd1, His₆-TEV-Apd1 und Aim32 ist eine Fe/S-Stöchiometrie von 1:1 zu finden. Im His₆-TEV-TTRieske sind die Werte niedriger (0,49 Eisen und 0,18 Schwefel). In einem Präparat konnte eine höhere Fe/S-Cluster-Besetzung mit 0,67 Eisen und 0,21 Schwefel erreicht werden als das zusätzliche Plasmid pRKISC verwendet wurde und während der Großkultur Ammoniumeisen(III)-Citrat und Cysteinhydrochlorid zur Unterstützung des Einbaus der Cluster ins Medium gegeben wurden. Wurde TTRieske bzw.

TTRieske_short aufgereinigt, waren bei 2,28 (bzw. 1,69) eingebauten Fe ebenfalls nur 0,73 (bzw. 0,46) S^{2-} gebunden. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Aufreinigung ohne Tag eine deutlich längere Zeit benötigt, was zu einem Verlust des Schwefels im Cluster führen kann. Da es sich bei diesem Rieske-Protein um ein Protein aus einem thermophilen Organismus handelt, könnte der enthaltene Fe/S-Cluster außerdem stabiler und somit das Freisetzen der S^{2-} zur Detektion erschwert sein. Eine Ursache des erhöhten Eisens könnten auch nicht entfernte Fe-Verunreinigungen im Proteinpräparat sein, die durch Denaturierung von anderen Rieske-Proteinen freigesetzt worden sind. Für solche Fe-Verunreinigungen konnten in der Mössbauerspektroskopie (Kap. 2.6) allerdings keine Hinweise gefunden werden.

Außerdem ist in Tabelle 2.1 klar zu erkennen, dass im Falle von Aim32 etwa dreifach weniger Protein aus zwei Liter Bakterienkultur isoliert werden konnte als bei Apd1. Daher wurde für die Arbeit der Fokus weitestgehend auf Apd1 und die Untersuchung des dort gebundenen Clusters gelegt.

2.2.4 Molekülmassenbestimmung der Proteine

Um die Quartärstruktur der Proteine Apd1 und Aim32 zu untersuchen, wurden mittels einer Gel-Permeationssäule (Kap. 5.3.7) ihre nativen Molekülmassen bestimmt. Ebenso wurde versucht eine Erklärung für die zwei Banden in den SDS-Gelen zu finden. In den Abbildungen 2.10 a) und 2.11 a) sind die erhaltenen Chromatogramme dargestellt. Die verwendete Säule war eine „HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade“ von Pharmacia Biotech. Es wurde konstant mit einem Fluss von 1 ml/min gearbeitet und der Entsalzungspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 9,0) verwendet. Die Fraktionsgrößen wurden auf 2 ml eingestellt.

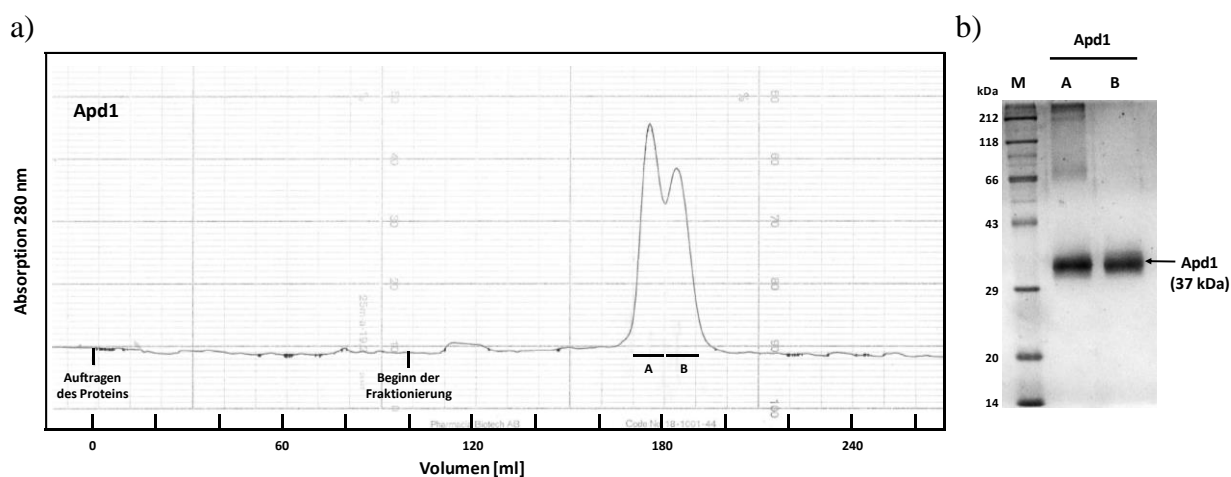


Abbildung 2.10: Molekülmassenbestimmung von Apd1. a) Chromatogramm von Apd1. 0 ml: Injektion des Proteins, 100 ml: Beginn der Fraktionierung, A: Peak nach 178 min, B: Peak nach 186 min; b) SDS-PAGE (12 %) der erhaltenen Peaks (je 10 μ l mit 10 μ l Probenpuffer). M: Marker (Roti[®]-Mark Standard, Roth) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa, A: Peak nach 178 min, B: Peak nach 186 min.

Nach der Injektion des jeweiligen Proteins auf die Säule (0 ml) wurde nach 100 Minuten die Fraktionierung gestartet (100 ml). Für Apd1 (Abb. 2.10 a)) sind klar zwei unterschiedliche Peaks zu erkennen (A und B), welche allerdings nicht vollständig voneinander zu trennen waren. Diese

beiden Peaks wurden anschließend auf einer SDS-PAGE (12%) genauer untersucht (Abb. 2.10 b)). In beiden Peaks ist eine deutliche Bande im Bereich von 37kDa zu erkennen, wobei der erste Peak noch Kontaminationen enthält. Durch die Überladung der Gele und der daraus resultierenden Breite der Banden konnte jedoch nur eine sehr ungenaue Abschätzung der Molekülmasse durchgeführt werden.

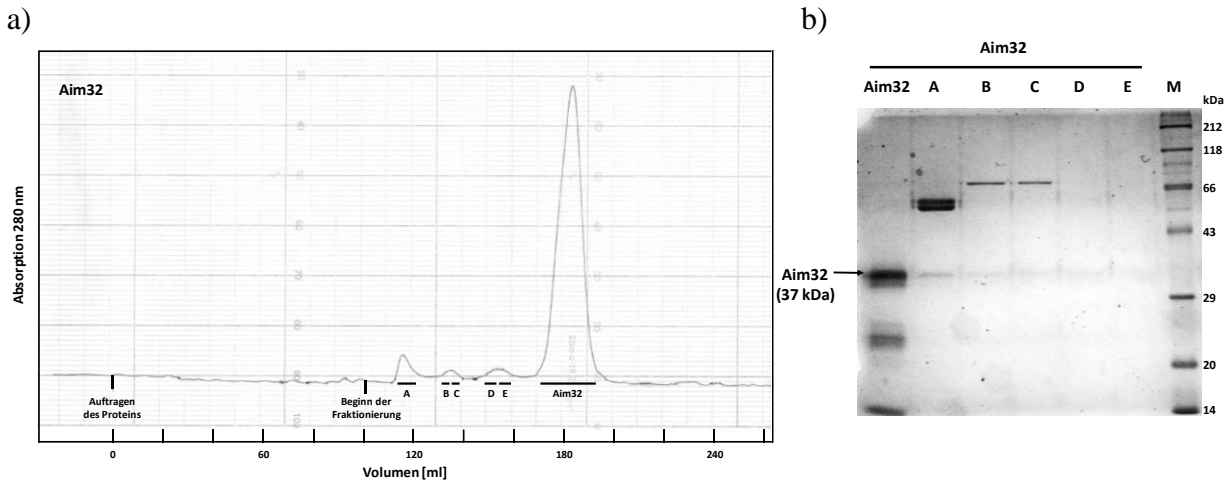


Abbildung 2.11: Molekülmassenbestimmung von Aim32. a) Chromatogramm von Aim32. 0 ml: Injektion des Proteins, 100 ml: Beginn der Fraktionierung, A: Peak nach 116 min, B und C: Peak nach 135 min, D und E: Peak nach 153 min, Aim32: Hauptpeak nach 181,5 min; b) SDS-PAGE verschiedener Fraktionen innerhalb der markierten Bereiche des Chromatogramms (je 10 µl mit 10 µl Probenpuffer). M: Marker Roti®-Mark Standard (Roth) mit den Molekülmassen der Proteine in kDa.

Das Chromatogramm von Aim32 zeigt dagegen mehrere kleine Peaks (A - E), bevor der Hauptpeak nach 181,5 Minuten eluiert wurde (Abb. 2.11 a)). Auch die erhaltenen Fraktionen von Aim32 wurden mittels SDS-PAGE (Abb. 2.11 b)) untersucht. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Hauptanteil des Proteins (37 kDa) im Hauptpeak des Chromatogramms (Aim32) enthalten war. In der gleichen Fraktion sind aber auch Nebenbanden zu beobachten, welche möglicherweise Abbauprodukten zugeschrieben werden können. In den restlichen Fraktionen, die aus den verschiedenen Peaks entnommen wurden, sind nur geringe Mengen von Aim32 enthalten. In diesen wurden also Verunreinigungen, z. B. das Protein GroEL in Peak A abgetrennt.

Um die nativen Molekülmassen der Proteine zu bestimmen, wurden verschiedene Proteine mit bekannter molekularer Masse als Standards verwendet (Tab. 5.3). Jedes Protein wurde auf die Gel-Permeationssäule aufgetragen und die jeweilige Elutionszeit bestimmt. Mit dieser Elutionszeit konnte dann der K_{av} -Wert bestimmt werden. Für K_{av} gilt folgende Formel:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

mit: K_{av} = Verteilungskoeffizient
 V_e = Elutionsvolumen der Proteine
 V_o = Porenvolumen der Säule (106 ml)
 V_t = Gesamtvolumen der Säule (320 ml)

Bei einer Auftragung der Verteilungskoeffizienten K_{av} gegen die Molekülmassen der verwendeten Proteine ergab sich die in Abbildung 2.12 dargestellte Abhängigkeit.

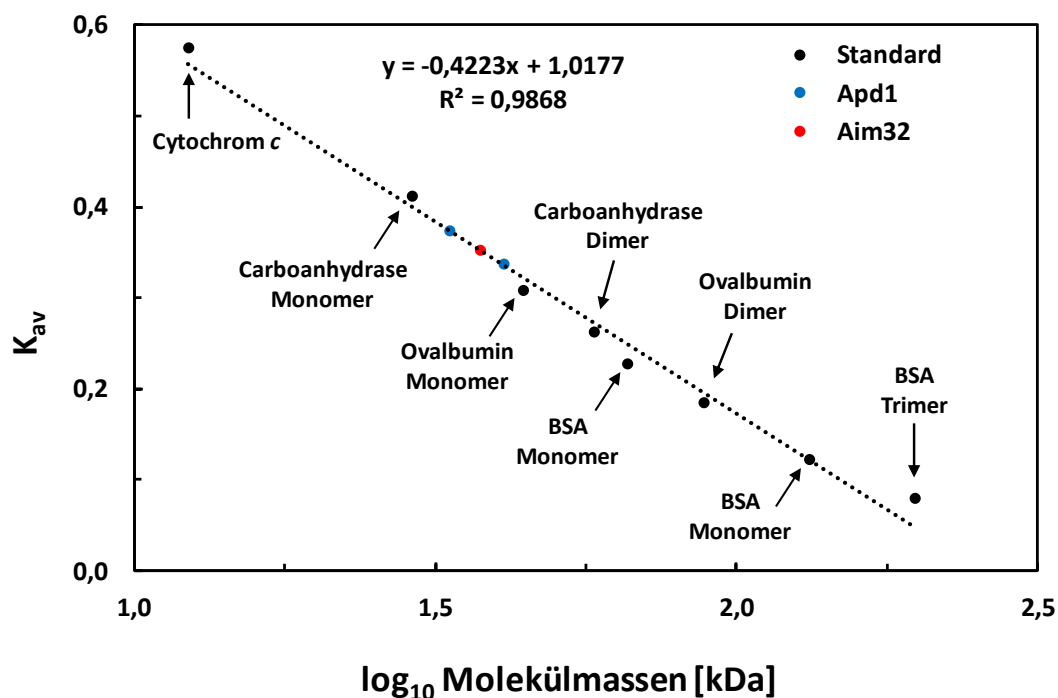


Abbildung 2.12: Eichgerade der Molekülmassenbestimmung. Auftragung der Verteilungskoeffizienten gegen den dekadischen Logarithmus der Molekülmassen der Proteine. Schwarz: Standardproteine, blau: Apd1, rot: Aim32.

Mit der sich ergebenden Formel (Abb. 2.12) können nun für Apd1 und Aim32 die nativen Molekülmassen berechnet werden. Für die beiden Peaks von Apd1 ergeben sich demnach Massen von 41,0 bzw. 33,5 kDa. Da bei einer Gel-Permeationschromatographie neben der Größe auch die Form der Proteine eine Rolle spielt, handelt es sich hierbei vermutlich um das Apo- und das Holoprotein. Das Holoprotein ist mit seinem gebundenen Fe/S-Cluster sehr kompakt, das Apoprotein dagegen liegt aufgrund des fehlenden Clusters möglicherweise leicht entfaltet vor. Für Aim32 kann eine Masse von 37,5 kDa errechnet werden. Bei einer erwarteten Molekülmasse von ca. 37 kDa liegen beide Proteine somit als Monomer vor.

2.2.5 Massenspektrometrie von Apd1

Eine weitere Möglichkeit, die molekulare Masse zu bestimmen, ist die Massenspektrometrie. In dieser Arbeit wurde ein sogenanntes MALDI-TOF (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse engl. *time-of-flight*) Massenspektrum von Apd1 aufgenommen. Dabei werden zunächst die Proteinmoleküle in einer Matrix auf einem Träger fixiert. Anschließend gehen durch eine Laserbestrahlung einzelne Moleküle als ionisierte Teilchen in die Gasphase über. Diese können nun in einem Massenspektrometer beschleunigt und ihre Flugzeit gemessen werden. Dadurch können die verschiedenen Ionen hinsichtlich ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses aufgefangen und analysiert werden. Das Spektrum wurde in der Arbeitsgruppe von Prof.

Dr. Holger Dobbek (Strukturelle Biologie / Biochemie) an der Humboldt-Universität zu Berlin aufgenommen.

Für das Massenspektrum wurde das Protein His₆-TEV-Apd1 nach einer TEV-Protease-Behandlung verwendet. Bei der Spaltung wird der His-Tag sowie die Schnittstelle abgetrennt und es bleibt das natürliche Apd1 mit zwei zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren (Glycin und Histidin) übrig. Dafür wurden 24 mg His₆-TEV-Apd1 mit TEV-Protease (1:100, w:w) über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese Mischung wurde am nächsten Tag auf eine äquilibrierte Ni-NTA-Agarosesäule gegeben. Dadurch sollte nicht gespaltenes Apd1 sowie die abgeschnittenen His-Tags der Proteinmoleküle am Säulenmaterial binden und eine ungetaggte Apd1-Proteinlösung eluieren. Diese wurde für die Massenspektrometrie in einen Puffer aus 20 mM HEPES pH 8,0 mit 50 mM NaCl überführt, da das im Entsalzungspuffer enthaltene Tris sowie die hohe Salzkonzentration die Messung stören würden. Die Konzentration der Probe lag nach dem Umpuffern bei 8,7 mg/ml. Es ergab sich folgendes Spektrum (Abb. 2.13).

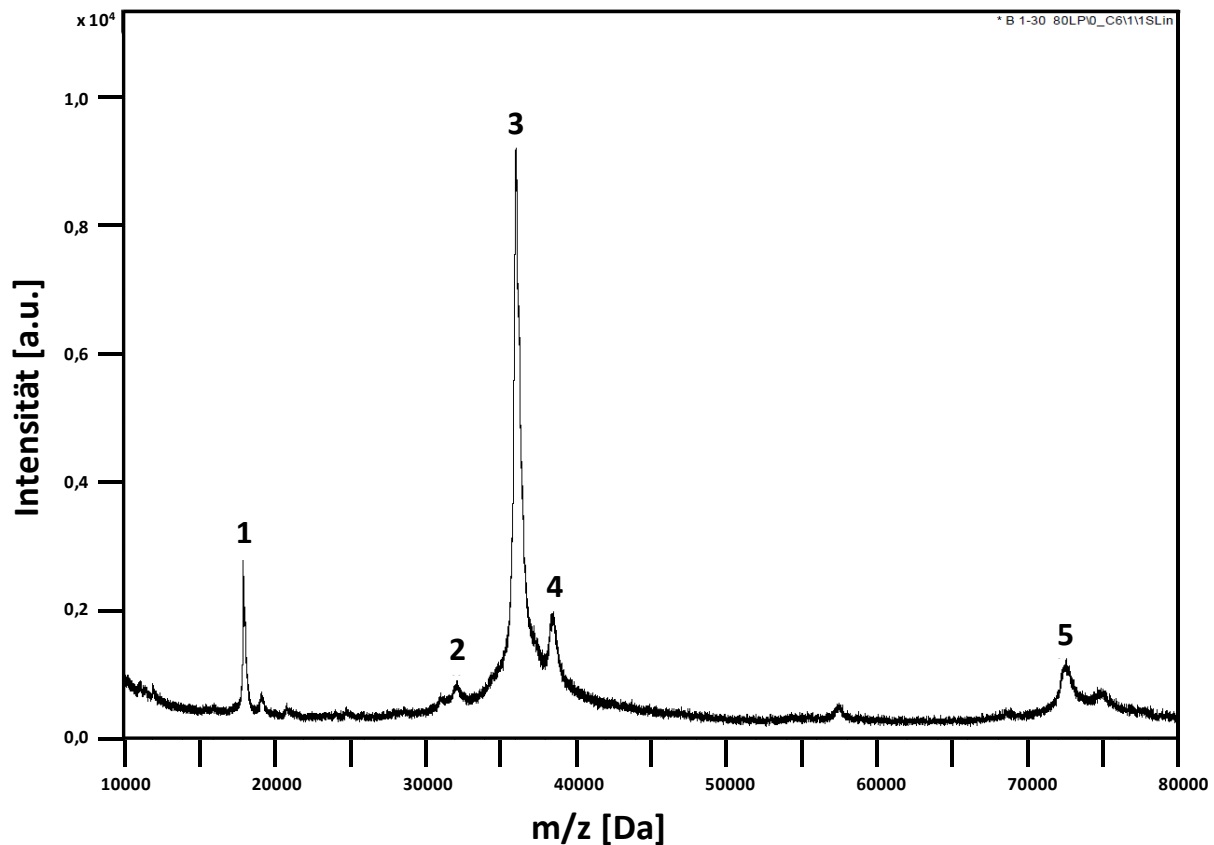


Abbildung 2.13: Massenspektrum von His₆-TEV-Apd1. Der Tag wurde vorher durch Behandlung mit TEV-Protease entfernt. Am natürlichen Apd1 sind dann nur noch zwei zusätzliche N-terminale Aminosäuren gebunden.

Die gemessenen m/z -Werte für die Peaks sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Wird die Linibreite der einzelnen Peaks im Spektrum berücksichtigt, kann ein Fehler von ± 50 Da abgeschätzt werden.

Tabelle 2.2: Peaks des Massenspektrums und ihre Zuordnungen

Peak	m/z gemessen [Da]	Ion	TEV-Protease-Spaltung	Beschreibung	m/z theoretisch [Da]
1	17997	$[M+2H]^{2+}$	ja		17979
2	32106	$[M+H]^+$	ja	GH + AS 1-283	32093
			nein	AS 1-262	32096
3	35999	$[M+H]^+$	ja		35953
4	38537	$[M+H]^+$	nein		38376
		$[M+H]^+$	nein	ohne Startmethionin	38245
		$[M+H]^+$	nein	+ Gluconoylierung - PO_4^{2-} (178 Da)	38554
		$[M+H]^+$	nein	ohne Startmethionin + Gluconoylierung - PO_4^{2-} (178 Da)	38423
		$[M+H]^+$	nein	+ Gluconoylierung + PO_4^{2-} (258 Da)	38634
		$[M+H]^+$	nein	ohne Startmethionin + Gluconoylierung + PO_4^{2-} (258 Da)	38503
5	72308	$[2M+H]^+$	ja		71907

Der Hauptpeak (3) lässt sich ganz eindeutig His₆-TEV-Apd1 zuordnen, nachdem das Protein mit der TEV-Protease behandelt und so am N-Terminus gekürzt vorliegt. Ebenso lassen sich somit Peak 1 ($[M+2H]^{2+}$) und Peak 5 ($[2M+H]^+$) erklären. Der zweite Peak kann einem verkürzten Molekül zugeordnet werden. Entweder handelt es sich um ungespaltenes Protein, welches den Tag, die TEV-Spaltstelle und die Aminosäuren 1–262 umfasst (32096 Da). Ein zweites mögliches Fragment wäre ein C-terminal gekürztes Protein nach einer TEV-Spaltung. Die TEV-Protease spaltet am N-Terminus nach einer klar definierten Sequenz (ENLYFQ/G) ab, so dass sich am Protein nur noch die zusätzlichen Aminosäuren Glycin und Histidin befinden. Es könnte sich hierbei folglich auch um ein Protein handeln, bei dem nach GH die natürlichen Aminosäuren 1-283 enthalten sind (32093 Da). Peak 4 könnte aus vielen Möglichkeiten entstehen. Generell wird bei Proteinen sehr häufig das Startmethionin abgespalten, wodurch sich für His₆-TEV-Apd1 bereits zwei verschiedene Massen ergeben (38376 Da bzw. 38245 Da). Diese sind allerdings zu niedrig für den gemessenen Wert. In der Literatur wurde eine solche erhöhte Masse in Massenspektren bereits mehrmals festgestellt (Geoghegan *et al.*, 1999). Dort wurden Erhöhungen um 178 Da, seltener auch um 259 Da beobachtet. Es handelt sich dabei um eine posttranslationale Modifikation des His-Tags, welcher die Sequenz GSSHHHH beinhaltet. Im

Pentosephosphatweg wird 6-Phosphoglucono-1,5-lacton gebildet, welches dann in der Zelle eine Gluconoylierung des Proteins zur Folge haben kann. Diese Modifikation bringt eine zusätzliche Masse von 258 Da. Wird das Addukt anschließend durch eine Phosphatase in der Zelle dephosphoryliert, bleiben nur noch 178 Da am Peptid gebunden. Werden diese Feststellungen berücksichtigt, kommen weitere vier Möglichkeiten zur Erklärung des vierten Peaks dazu, da bei beiden Modifikationen ebenfalls das Startmethionin abgespalten sein kann oder nicht. Im Fall von His₆-TEV-Apd1 würde eine Modifikation von 178 Da zu einer Masse von 38554 Da bzw. 38423 Da führen, wohingegen durch die phosphorylierte Variante Massen von 38634 Da bzw. 38503 Da zu messen wären. Bei einer Abweichung von ± 50 Da sind zwei dieser Varianten also gute Annäherungen an die gemessene Masse des vierten Peaks mit 38537 Da (38554 und 38503 Da).

2.2.6 Stabilität des Apd1-Proteins

Ein wichtiger Punkt bei der Untersuchung von Fe/S-Proteinen ist die Stabilität des Clusters. Da manche Untersuchungsmethoden längere Zeit bei Raumtemperatur benötigen oder das Protein bei verschiedenen pH-Werten gemessen werden muss, wurde in dieser Arbeit getestet, ob Apd1 und speziell der enthaltene Cluster nach verschieden langen pH-Schocks zerstört wird. Dafür wurde das Protein zuerst durch Gelfiltration in einen 5 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 9 Puffer überführt. Anschließend wurden 10 μ l des Proteins mit 10 μ l eines 75 mM Puffers (Good's Puffer, analog zu Tab. 5.8) mit definiertem pH-Wert (zwischen 5,0 und 11,0 in 0,5-er Schritten) gemischt und für 30 s, 150 s oder 750 s inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 180 μ l eines 150 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 9 Puffers zugegeben, um den pH-Wert des Proteins wieder zurück zu \approx pH 9 zu titrieren. Von dieser Lösung wurde dann in einem Mikroplatten-Spektrophotometer jeweils ein Spektrum zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Die pH-Werte nach den beiden pH-Schocks wurden jeweils mit einer Mikroelektrode überprüft und hatten eine Abweichung von $< 0,15$ pH-Einheiten. Um eine Aussage über die Stabilität treffen zu können, wurden die Messwerte im Bereich des Peaks bei 450 nm ausgewertet. Dabei wurde ein Mittelwert der Absorptionen bei 400 und 500 nm gebildet und dieser Wert vom Absorptionswert bei 450 nm abgezogen. Würde der Cluster durch diese Behandlung mit für Proteine teilweise extremen pH-Werten zerstört werden, müsste eine deutliche Abnahme des Peaks bei 450 nm zu verzeichnen sein. In Abbildung 2.14 sind die Resultate der Messungen dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Absorption über den gesamten pH-Bereich relativ konstant bleibt. Daraus lässt sich schließen, dass der Cluster des Proteins nicht zerstört wird, wenn bei pH-Werten zwischen 5,0 und 11,0 inkubiert wird. Außerdem scheint auch die Inkubationslänge nur von geringer Bedeutung zu sein. Selbst nach 750 Sekunden bei extremen pH-Werten ist der Cluster im Puffer mit pH 9 stabil geblieben und zeigt nur geringe Änderungen, was auch auf kleine Konzentrationsunterschiede zurückzuführen sein kann. Wichtig ist, dass das Protein auch bei niedrigen pH-Werten nicht irreversibel denaturiert und aufgetretene Präzipitate durch die Titration des Proteins zurück zu pH 9 wieder in Lösung gebracht werden konnten.

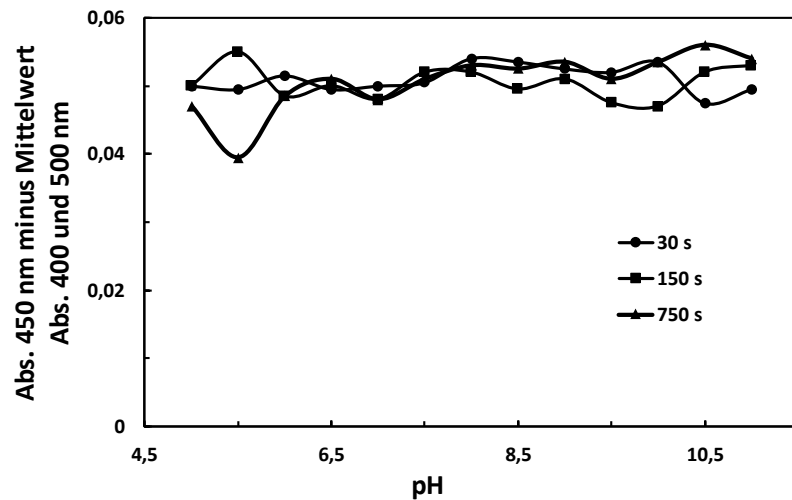


Abbildung 2.14: Stabilität des Apd1 in verschiedenen pH-Werten. Dargestellt sind die Absorptionswerte nach den unterschiedlichen Zeiten, während derer das Protein einem pH-Schock ausgesetzt war, bevor es erneut auf pH 9 gebracht wurde: 30 s (Kreise), 150 s (Quadrate) und 750 s (Dreiecke). Es wurde jeweils die Differenz zwischen 450 nm und einem Mittelwert von 400 nm und 500 nm ermittelt.

2.3 Mutagenese der vermuteten Clusterliganden

Durch bioinformatische Studien wurden Ähnlichkeiten des C-terminalen Bereichs der Proteine Apd1 und Aim32 zu TLF's (*thioredoxin-like ferredoxins*) festgestellt. Apd1 besitzt in seiner Aminosäuresequenz neun Cysteine, wovon drei in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind. Die Cysteine C207 und C216 entsprechen dabei den beiden ersten Cysteinen in TLF's. In Aim32 liegen insgesamt fünf Cysteine vor. Von den drei Cysteinresten in der C-terminalen Domäne sind die Cysteine C213 und C222 die Aminosäuren, die C207 und C216 in Apd1 entsprechen. An den Positionen der Cysteine drei und vier in der Primärstruktur der TLF's sind in Apd1 und Aim32 hingegen Histidine zu finden (Abb. 2.15).

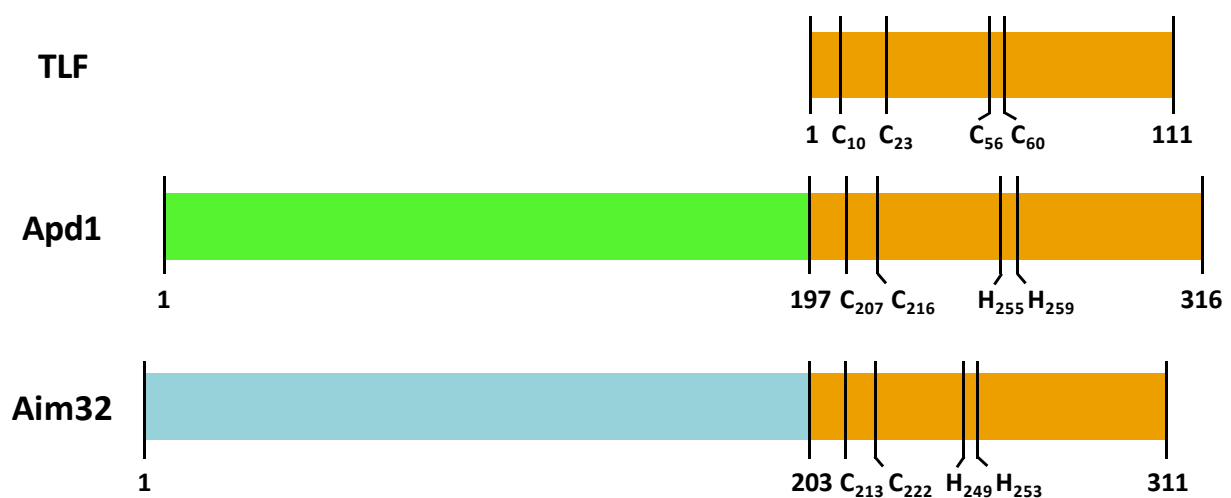


Abbildung 2.15: Sequenzvergleich des TLF (*A. aeolicus*) mit Apd1 und Aim32. Markiert sind die bekannten Clusterliganden im TLF sowie die potentiellen Liganden in Apd1 und Aim32.

Um eine mögliche Histidinkoordination des Clusters zu untersuchen, wurden durch Mutagenese in dieser Arbeit verschiedene Varianten des Proteins Apd1 erzeugt. Die Mutationen wurden gemäß Kapitel 5.2.9 über gezielte Mutagenesen eingeführt. Da bei einer Ersetzung durch Alanine oft durch fehlenden Clustereinbau instabile Proteine erzeugt werden, wurden die Histidine an den Positionen 255 und 259 jeweils einzeln oder gleichzeitig durch ein Cystein ersetzt, welche(s) ebenso als neue(r) Clusterligand(en) fungieren könnte(n).

Die Mutanten waren analog zum Wildtyp-Protein mit einem N-terminalen His-Tag ausgestattet und wurden mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt.

2.3.1 Vergleich der UV/Vis-Spektren mit Wildtyp-Apd1

In der Arbeitsgruppe wurden bereits im Rahmen einer Diplomarbeit unter meiner Anleitung verschiedene Untersuchungen an den Mutanten sowie verkürzten Apd1-Proteinen durchgeführt (Jakob, 2015). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind jedoch außer Abbildung 2.16 a) innerhalb der vorliegenden Arbeit entstanden.

Nach der Isolation und Aufreinigung der Mutanten waren bereits anhand der Farbe der Proteinlösungen Unterschiede zu erkennen. Das natürliche Apd1 zeigte eine deutlich rötliche Farbe, die Einzelmutanten H255C und H259C waren rot-braun und die Doppelmutante (H255C/H259C) war braun (Abb. 2.16 a)). Es wurden UV/Vis-Spektren der jeweiligen Proteinlösungen aufgenommen. Ein Vergleich mit dem Wildtyp-Protein ist in Abbildung 2.16 b) dargestellt.

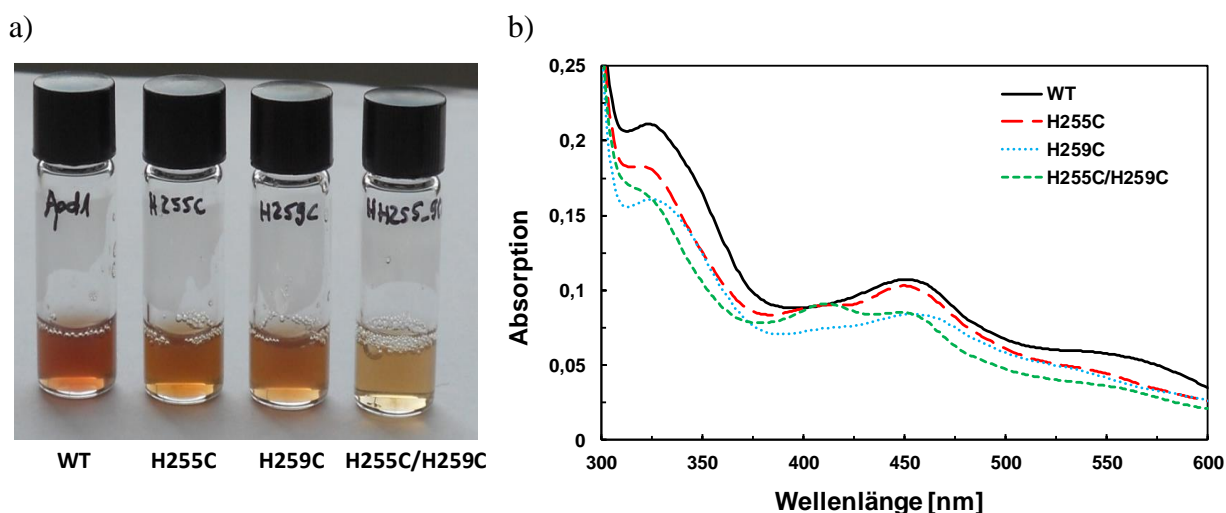


Abbildung 2.16: Vergleich der Histidinmutanten mit dem Wildtyp-Protein. a) Proteinlösungen der Apd1-Varianten (Bild übernommen aus (Jakob, 2015)); b) UV/Vis-Spektren von Apd1 und den entsprechenden Histidinmutanten. Abgebildet sind die Spektren der Proteine zwischen 300 und 600 nm. Schwarz: Wildtyp-Apd1, rot: H255C, blau: H259C, grün: H255C/H259C. Die Spektren wurden normiert auf 280 nm.

Apd1 besitzt im UV/Vis-Spektrum Maxima bei 330 nm, 450 nm, sowie eine Schulter bei 550 nm, was dem typischen Spektrum eines [2Fe-2S]-Clusters ähnelt. Durch die Mutation der Histidine zu Cysteinen werden die Cluster in ihrer Koordination verändert, was sich in den Spektren klar

erkennen lässt. H255C hat einen sehr ähnlichen Verlauf zum Wildtyp-Apd1, zeigt aber im Gegensatz dazu noch eine kleine Schulter bei ca. 410 nm und einen flacheren Verlauf bei 560 nm. Im H259C-Spektrum verschiebt sich der Peak bei 450 nm leicht zu höheren Wellenlängen und es wird eine Schulter bei 410 nm sowie ein flacherer Verlauf im Bereich von 560 nm beobachtet. Die Doppelmutante dagegen zeigt einen neuen Peak bei 410 nm und kaum eine Schulter bei 550 nm.

2.3.2 Fe/S-Cluster-Gehalt der Mutanten

Die Ausbeuten der Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp-Protein etwas geringer, aber immer noch in einem sehr zufriedenstellenden Bereich von ca. 30 mg aus 2l Bakterienkultur. Auch diese Proteine wurden bis auf eine Präparation nur mit dem zusätzlichen Plasmid pRKISC exprimiert. Nach der erfolgreichen Isolation wurden auch diese Präparate auf ihren Fe/S-Cluster-Gehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 zusammengestellt.

Tabelle 2.3: Charakterisierung der Fe/S-Cluster in den Mutanten

gereinigtes Protein	mg Protein aus 2l Kultur	Eisen pro Protein	S ²⁻ pro Protein
Apd1 WT (n=12)	30-50	1,64±0,45	1,76±0,44
H255C (n=4)	27-45	1,08±0,04	1,17±0,11
H259C (n=4)	27-34	0,83±0,22	1,03±0,42
H255C/H259C (n=4)	28-43	0,86±0,10	0,93±0,20

Wie auch im Wildtyp-Apd1 ist deutlich zu erkennen, dass in allen Mutanten Eisen und Schwefel in stöchiometrischen Ratios vorlagen. Allerdings sind in allen Varianten nur etwa 50 % der Proteinmoleküle mit einem Cluster besetzt. Dies deutet darauf hin, dass in den Mutanten die Cluster im Vergleich zum Wildtyp-Protein durch die vorgenommenen Veränderungen instabiler sind und daher das Protein teilweise in Apoform vorliegt. Für alle verwendeten spektroskopischen Untersuchungen sind allerdings nur Proteine in Holoform entscheidend, sodass die geringere Besetzung in den Mutanten für die ESR- oder Mössbauerspektroskopie kein gravierendes Problem darstellt.

2.4 ESR-Spektroskopie

2.4.1 Spektren der verschiedenen Apd1-Varianten

Die Proben wurden für die ESR-Spektroskopie gemäß Kapitel 5.4.5 vorbereitet. Die Proteinlösungen, welche im Entsalzungspuffer bei pH 9 vorlagen, wurden durch Zugabe von 2 mM (Endkonzentration) Natriumdithionit (NaDT) unter anaeroben Bedingungen fünf Minuten reduziert und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren. Die in Abbildung 2.17 dargestellten Spektren wurden bei 77 K mit einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Modulationsamplitude

von 1,5 mT aufgenommen. Die Mikrowellenleistung lag bei 6,4 mW und die Mikrowellenfrequenz bei 9,42 GHz. Um in den Spektren ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurden bei den verschiedenen Mutanten unterschiedlich viele Scans (je 84 Sekunden) gemessen.

Wie schon in den UV/Vis-Spektren sind auch in den ESR-Spektren deutliche Unterschiede zwischen Apd1 und den Mutanten zu erkennen (Abb. 2.17). Apd1 zeigt bei 77 K ein rhombisches Signal, was für [2Fe-2S]-Cluster typisch ist. Die g -Werte sind 2,009, 1,907 und 1,862. H255C hat wie das Wildtyp-Spektrum ein klar rhombisches Signal einer einzigen Spezies, g_x ist aber zu höherem, g_y und g_z sind zu niedrigerem Feld verschoben (2,000, 1,935 und 1,879). Bei H259C und der Doppelmutante liegen vermutlich zwei ähnliche rhombische Signale übereinander gelagert vor. Die ermittelten g -Werte der deutlichsten ESR-Signale sind 2,003, 1,928 und 1,904 für H259C und 2,006, 1,955 und 1,922 für H255C/H259C. Da die beiden übereinanderliegenden Signale bei H259C und der Doppelmutante vermutlich leicht unterschiedliche g_y -Werte besitzen, wurde dabei die Null-Durchquerung für die Bestimmung verwendet.

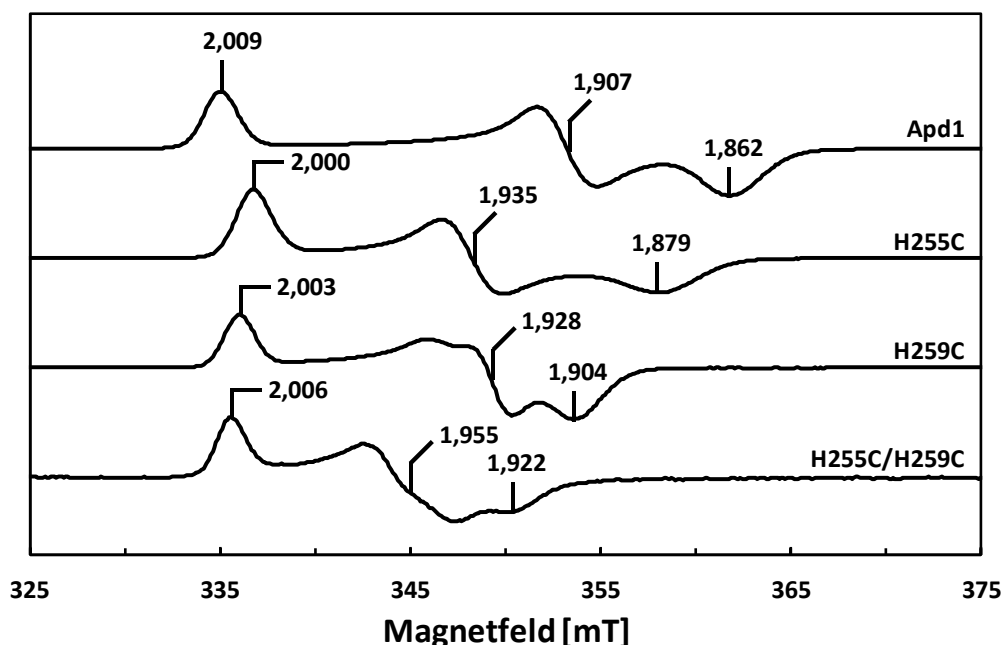


Abbildung 2.17: ESR-Spektren von Apd1. ESR-Spektren von Apd1 und den Mutanten bei 77 K mit den ermittelten g -Werten. Für die dargestellten Spektren waren bei Apd1 und H259C nur ein Scan, bei H255C und H255C/H259C zwei Scans nötig, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die Mikrowellenleistung lag bei 6,4 mW und die Frequenz bei 9,42 GHz.

Die g -Werte der in Abbildung 2.17 gezeigten ESR-Spektren, sind in Tabelle 2.4 im Vergleich mit bekannten [2Fe-2S]¹⁺-Cluster enthaltenden Proteinen aus der Literatur aufgeführt. Aufgrund der vermuteten gebundenen Liganden wurde hier Apd1 mit einem Rieske-Protein verglichen, die Einzelmutanten H255C und H259C mit mitoNEET und die Doppelmutante H255C/H259C entsprechend mit dem TLF aus *A. aeolicus*.

Tabelle 2.4: Vergleich der g -Werte der Apd1-Varianten mit Referenzproteinen

Protein	Organismus	g_x	g_y	g_z
Apd1 Rieske-Protein (Fee <i>et al.</i> , 1984)	<i>S. cerevisiae</i>	2,009	1,907	1,862
	<i>T. thermophilus</i>	2,02	1,90	1,80
Apd1 H255C Apd1 H259C mitoNEET (Dicus <i>et al.</i> , 2010)	<i>S. cerevisiae</i>	2,000	1,935	1,879
	<i>S. cerevisiae</i>	2,003	1,928	1,904
	<i>H. sapiens</i>	2,007	1,937	1,897
Apd1 H255C/H259C TLF (Chatelet <i>et al.</i> , 1999)	<i>S. cerevisiae</i>	2,006	1,955	1,922
	<i>A. aeolicus</i>	2,006	1,950	1,918

Die g -Werte des natürlichen Apd1-Proteins können beispielsweise mit dem Rieske-Protein aus *T. thermophilus* verglichen werden. Dennoch zeigen sich kleine Abweichungen, v. a. beim g_z -Wert, was wiederum auf Unterschiede zwischen Apd1 und dem hier gewählten Rieske-Protein hindeutet. Im Vergleich dazu liegen die g -Werte der Einzelmutanten nahe an den gemessenen Werten für das Protein mitoNEET. Das lässt vermuten, dass in den Mutanten H255C und H259C ebenfalls eine Cys₃-His₁-Koordination des Clusters vorliegt. Die Doppelmutante zeigt ähnliche Werte zum TLF aus *A. aeolicus*, in welchem vier Cysteine als Liganden binden.

2.4.2 Stabilität des reduzierten [2Fe-2S]-Clusters

Um die Stabilität des Clusters im reduzierten Zustand überprüfen zu können, wurde Apd1 (ca. 67 μ M) mit Natriumdithionit (Endkonzentration 2 mM) versetzt und unterschiedlich lange (zwischen 0 und 240 Minuten) bei pH 9 und 25 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert, bevor die Proben in Flüssigstickstoff eingefroren wurden. Anschließend wurden sie mittels ESR-Spektroskopie gemessen und die Amplitude des g_y -Signals ermittelt.

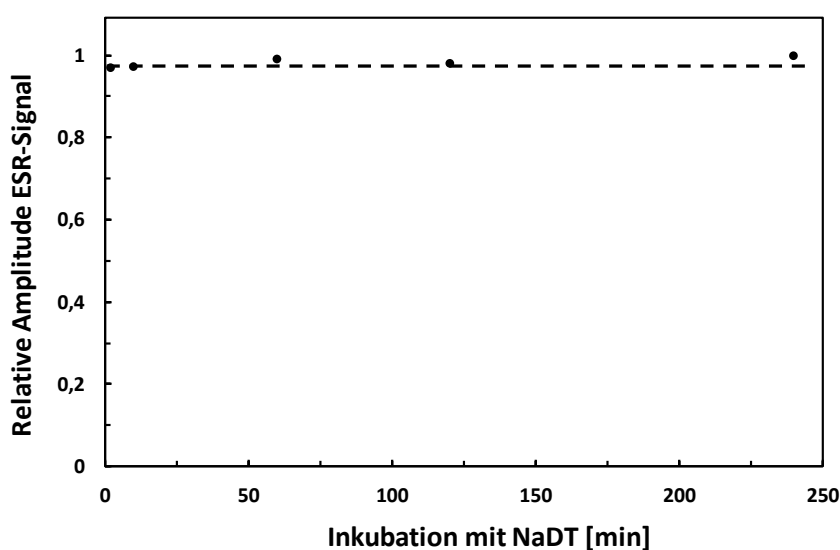


Abbildung 2.18: Stabilität des reduzierten [2Fe-2S]-Clusters von Apd1. Dargestellt sind jeweils die normierten Amplituden der gemessenen ESR-Signale gegen die Länge der Inkubation mit NaDT bei 25 °C und pH 9.

Es ist eindeutig zu erkennen (Abb. 2.18), dass eine Inkubation mit Natriumdithionit bereits nach zwei Minuten eine nahezu vollständige Reduktion des Clusters im Protein bewirkt. Außerdem ist das Signal des g_y -Peaks auch nach 240 Minuten Inkubation immer noch sehr stabil. Somit können bei diesem pH-Wert und dieser Temperatur auch längere Versuche wie Redox titrationen (Kap. 2.7) ohne Bedenken durchgeführt werden, ohne dass ein Verlust oder eine Beschädigung des Clusters auftreten könnten.

2.4.3 ESR-Spektren von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten

Vom Rieske-Protein aus *T. thermophilus* wurden ESR-Spektren bei pH 7 und pH 14 beschrieben (Tiago de Oliveira *et al.*, 2004). Dabei ließ sich eine pH-abhängige Verschiebung der g -Werte feststellen. Daher wurde auch das Apd1-Protein in Good's Puffern (200 mM) mit dem gewünschten pH-Wert (pH 5,5–11,0) verdünnt, mit NaDT (Endkonzentration 2 mM) fünf Minuten inkubiert und anschließend in einem ESR-Röhrchen mit Flüssigstickstoff schockgefroren. In Abbildung 2.19 sind die erhaltenen Spektren (77 K) dargestellt.

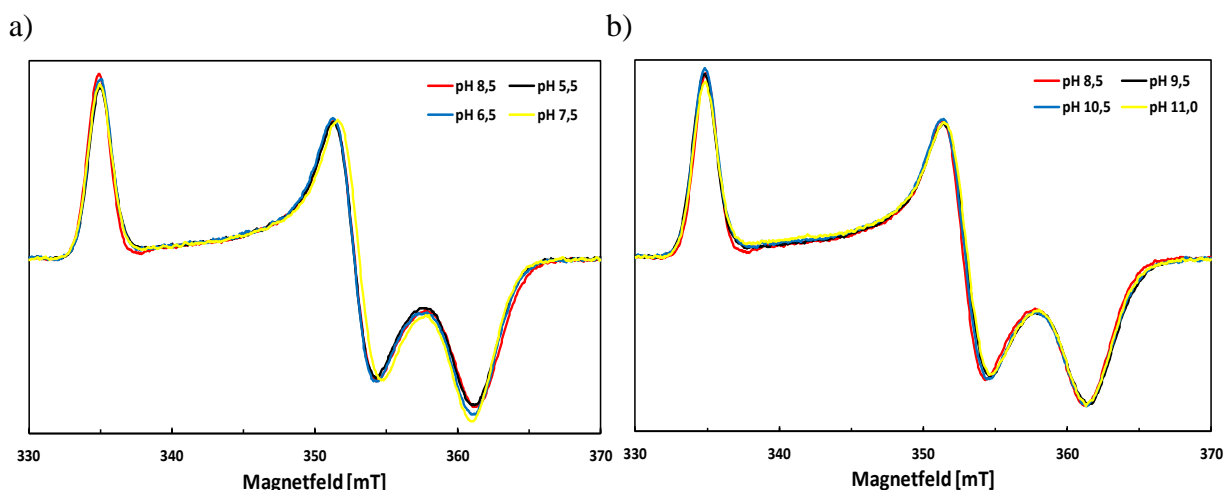


Abbildung 2.19: ESR-Spektren von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt sind auf g_y normierte Spektren. Gemessen wurde bei 77 K. a) ESR-Spektren bei pH 5,5, pH 6,5 und pH 7,5 im Vergleich mit pH 8,5; b) ESR-Spektren bei pH 9,5, pH 10,5 und pH 11,0 im Vergleich mit pH 8,5.

Für den reduzierten Cluster des Apd1-Proteins ist bei verschiedenen pH-Werten nur eine geringe Änderung im ESR-Spektrum zu erkennen. Es lassen sich jedoch keine generellen Tendenzen festlegen. Sowohl das Spektrum von Apd1 bei pH 7,5 (Abb. 2.19 a)) als auch das Spektrum von Apd1 bei pH 11,0 (Abb. 2.19 b)) zeigen im Vergleich zu Apd1 bei pH 8,5 (jeweils rot) eine kleine Verschiebung zu einem niedrigeren g_y -Wert. Eine Verbreiterung ist nicht zu erkennen. Das reduzierte Apd1 ist somit über den gesamten gemessenen pH-Bereich zwischen pH 5,5 und pH 11,0 bis auf kleine Schwankungen pH-unabhängig. Der pK-Wert des reduzierten Clusters liegt daher weit über elf.

2.4.4 Vergleich mit einer ^{57}Fe -angereicherten Apd1-Probe

Da es durch die magnetische Wechselwirkung zwischen dem Elektronenspin und dem Kernspin zu einer Hyperfeinstruktur des ESR-Signals kommen kann, wurde eine Probe des Apd1, welche für die Mössbauerspektroskopie mit ^{57}Fe angereichert wurde, mit Apd1 aus einer Kultur ohne Anreicherung verglichen (Abb. 2.20). Beide Spektren wurden bei 77 K mit den in Kapitel 2.4.1 genannten Parametern gemessen.

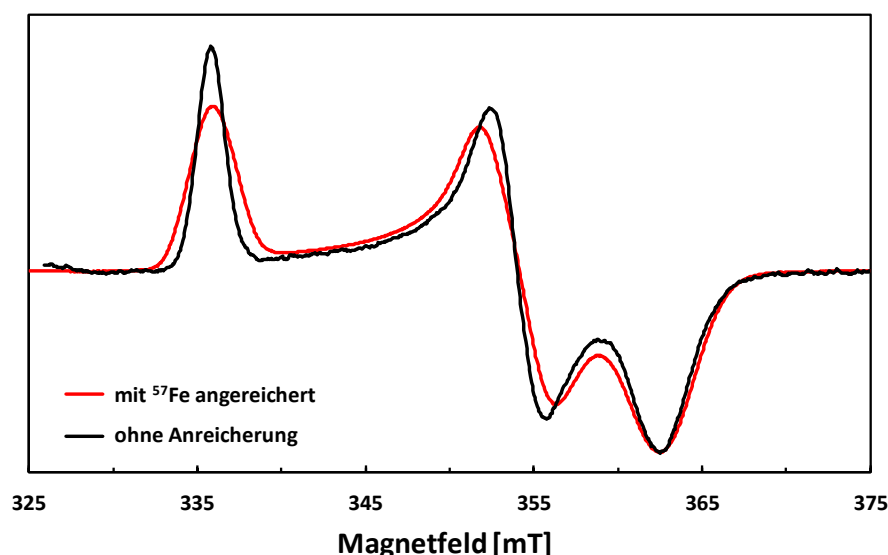


Abbildung 2.20: Verbreiterung des ESR-Signals von Apd1 durch ^{57}Fe -Hyperfeinkopplung. Die Intensität des Spektrums der Probe ohne Anreicherung (schwarz) wurde um den Faktor 5,5 vergrößert, sodass die Peakhöhe des dritten g -Wertes (g_z) vergleichbar war.

In der generellen Form des Spektrums sind erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen den beiden Proben zu erkennen. Auch die g -Werte sind identisch. Die mit ^{57}Fe angereicherte Probe zeigt allerdings eine Verbreiterung im Spektrum bei den g_x - und g_y -Peaks. Dieses Phänomen wurde bereits bei Putidamonooxin und Putidaredoxin beobachtet (Twilfer *et al.*, 1981; Tsibris *et al.*, 1968) und ist auf die Hyperfeinkopplung des ungepaarten Elektrons mit den beiden ^{57}Fe -Kernen mit dem Nuklearspin $I = 1/2$ zurückzuführen. Diese ist allerdings bei diesen Bedingungen nicht ausreichend aufgelöst und bewirkt statt einer Aufspaltung in ein Triplet eine Verbreiterung des Spektrums.

2.5 pK_s-Wert-Bestimmung

Da Histidine auch nach Bindung an ein Metallion durch eines der beiden Stickstoffatome am anderen Stickstoffatom unterschiedliche Protonierungsgrade annehmen können, ist es für diese Liganden möglich pK_s-Werte zu bestimmen. Sie wurden im oxidierten Protein nach der Anleierung in Kapitel 5.4.6 bestimmt. Es wurde entweder mit einem UV/Vis-Spektrometer in der eigenen Arbeitsgruppe oder mit einem UV/Vis-Diodenarrayphotometer im Fachbereich Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel gearbeitet. Beide Messungen

fürten zu übereinstimmenden Ergebnissen. Um sicher zu stellen, dass die Messmethode korrekte Ergebnisse liefert, wurden zum Vergleich anschließend auch die Ergebnisse des *T. thermophilus* Rieske-Proteins reproduziert (Kap. 2.5.2), die in der Literatur als Referenz für Rieske-Zentren dienen (Konkle *et al.*, 2009).

2.5.1 Apd1 und die Mutanten

Wurde das Apd1-Protein verschiedenen pH-Werten ausgesetzt, so kam es zu einer Veränderung des UV/Vis-Spektrums. Es war eine Verschiebung des Peaks bei ca. 450 nm zu beobachten (Abb. 2.21 a)). Nach Betrachtung der Differenzspektren zwischen zwei pH-Werten wurden die beiden Wellenlängen 445 nm und 465 nm zur Auswertung ausgewählt, da hier sowohl zwischen pH 10,5 und pH 8,5 als auch zwischen pH 8,5 und pH 7,0 eine kleine, aber signifikante Änderung (ca. 5 % der Absorption) zu verzeichnen ist (Abb. 2.21 b)).

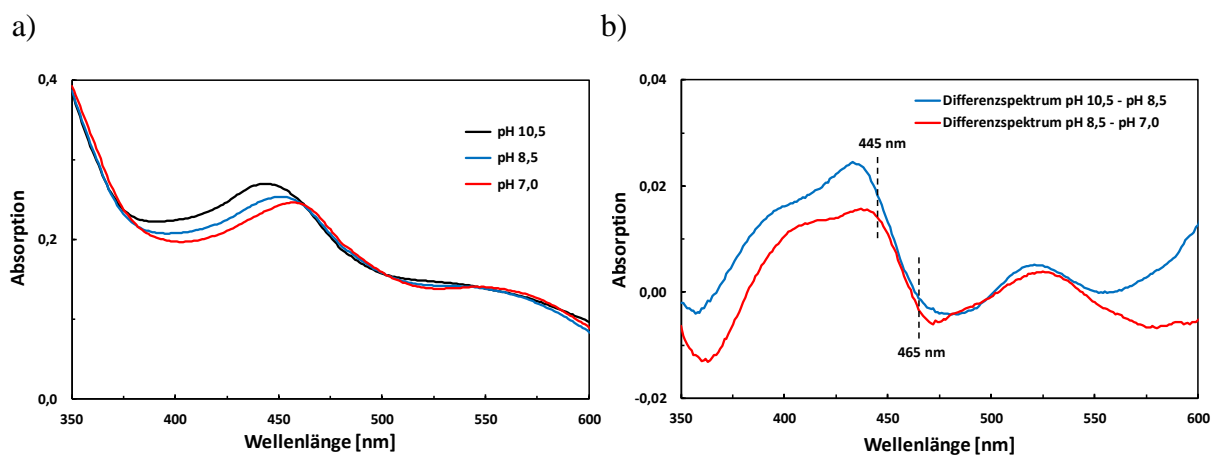


Abbildung 2.21: UV/Vis-Spektren von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten und Differenzspektren. a) Spektren des oxidierten Apd1 bei pH 10,5 (schwarz), pH 8,5 (blau) und pH 7,0 (rot); b) Differenzspektren zwischen pH 10,5 und pH 8,5 (blau) bzw. zwischen pH 8,5 und pH 7,0 (rot). Markiert sind die zur Auswertung verwendeten Wellenlängen.

Auch für die beiden Einzelmutanten H255C und H259C wurde eine pH-Abhängigkeit des Spektrums festgestellt. In den Differenzspektren (Abb. 2.22 a) und b)) ist wie beim Wildtyp eine Absorptionsabnahme im Bereich um 450 nm festzustellen. Bei der Doppelmutante H255C/H259C (Abb. 2.22 c)) dagegen sind die Absorptionsunterschiede zwischen pH 8 und pH 10,5 über die gesamte Breite des Spektrums sehr gering (< 1 %). Es waren bis auf kleine Abweichungen in der Konzentration keine Änderungen zu beobachten. In allen Fällen wurden die Absorptionen bei 445 nm und 465 nm ausgewertet.

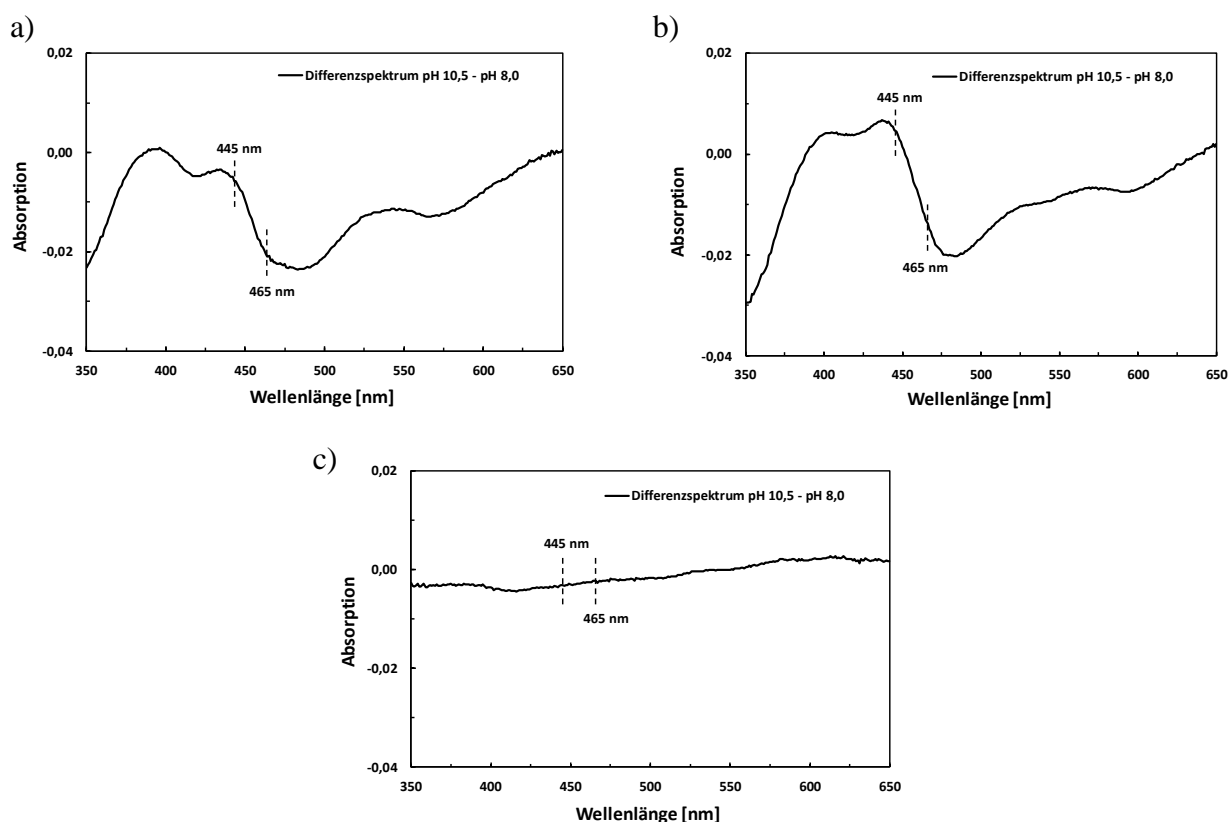


Abbildung 2.22: UV/Vis-Differenzspektren der Mutanten. Dargestellt sind jeweils die Differenzspektren zwischen pH 10,5 und pH 8,0. a) H255C; b) H259C; c) H255C/H259C.

Die Absorptionsänderungen von Apd1 und seinen Mutanten sind in Abbildung 2.23 als Funktion des pH-Wertes dargestellt. Die Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt und die Ergebnisse zweier Messungen für kleine Konzentrationsunterschiede korrigiert. Die pH-Werte wurden nach Verdünnen des Proteins in Good's Puffern (200 mM) mit einer Mikroelektrode überprüft und hatten eine Abweichung von $< 0,25$ pH-Einheiten.

Anhand des Kurvenverlaufs von Apd1 und der großen Spanne der Absorptionsänderungen ist deutlich zu erkennen, dass hier zwei Protonierungen und somit zwei pK_s -Werte zugrunde liegen müssen. Im Protein können die beiden Histidine jeweils protoniert oder deprotoniert vorliegen, dadurch gibt es drei Zustände, die miteinander im Gleichgewicht stehen.

Die Konzentrationen der drei Zustände werden durch die folgenden Gleichungen (Nguyen & Rabenstein, 2011) beschrieben:

$$f_{H_2A} = [H^+]^2 / X \quad (\text{diprotoniert})$$

$$f_{HA} = K_{ox_1} [H^+] / X \quad (\text{monoprotoniert})$$

$$f_A = K_{ox_1} K_{ox_2} / X \quad (\text{deprotoniert})$$

$$\text{wobei:} \quad X = [H^+]^2 + K_{ox_1} [H^+] + K_{ox_1} K_{ox_2}$$

mit: f = Fraktion der Spezies

$K_{ox_{1,2}}$ = Säurekonstanten des oxidierten Clusters

$[H^+]$ = Protonenkonzentration

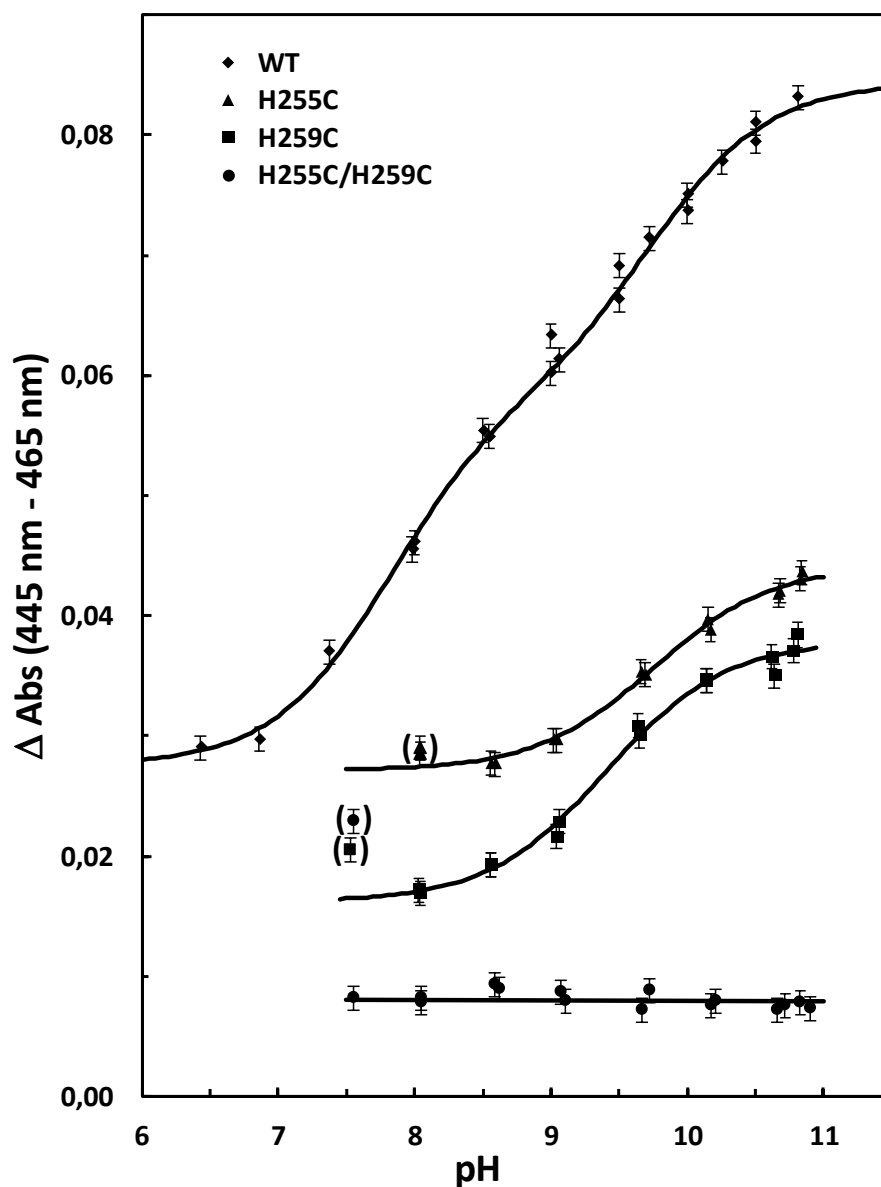


Abbildung 2.23: pK_S-Wert-Bestimmung von Apd1 und seinen Mutanten. Vergleich der Absorptionsdifferenzen von Apd1 und seinen Mutanten. Die Kurven sind zur besseren Übersicht auf der y-Achse leicht verschoben dargestellt. Die eingeklammerten Symbole wurden im Fit nicht berücksichtigt.

Durch Addition der Absorption der drei Spezies kann nun die Fitkurve ermittelt werden. Dabei ergaben sich die folgenden Werte für den Wildtyp: $pK_{ox1} = 7,81 \pm 0,04$ und $pK_{ox2} = 9,74 \pm 0,07$. Bei beiden Einzelmutanten waren die Änderungen geringer und konnten mit einer einzelnen Henderson-Hasselbalch-Gleichung simuliert werden, was nur noch einer Protonierung im Cluster entspricht. Im Fall von H255C/H259C war keine pH-Abhängigkeit vorhanden. In Tabelle 2.5 ist eine Übersicht aller pK_S-Werte dargestellt.

Tabelle 2.5: pK_S-Werte von Apd1 und seinen Mutanten

	WT Apd1		H255C	H259C	H255C/H259C
pK_{ox1}	$7,81 \pm 0,04$	pK_{ox}	$9,75 \pm 0,05$	$9,41 \pm 0,03$	Keine pH-Abhängigkeit
pK_{ox2}	$9,74 \pm 0,07$				

Es fällt auf, dass beide Einzelmutanten sehr ähnliche pK_S -Werte besitzen, welche im Bereich des zweiten pK_S -Wertes von Apd1 liegen. Somit ist es nicht möglich die beiden pK_S -Werte im Wildtyp-Protein jeweils einem spezifischen Histidin zuzuordnen. Dieses Phänomen wurde auch in der Literatur bereits am Rieske-Protein beobachtet (Ullmann *et al.*, 2002).

2.5.2 Rieske-Protein

Konkle *et al.* (2009) haben ausführliche pK_S -Wert-Bestimmungen am Rieske-Protein (aus *Thermus thermophilus*) durchgeführt. Sie erhielten für das Protein mit den AS 38-210 $pK_{ox1} = 7,48 \pm 0,12$ und $pK_{ox2} = 10,07 \pm 0,17$ und für die verkürzte Variante mit den AS 46-201 $pK_{ox1} = 7,87 \pm 0,17$ und $pK_{ox2} = 9,84 \pm 0,42$. In der vorliegenden Arbeit dienten dieses Protein und die ermittelten pK_S -Werte als Referenz. Dementsprechend wurde die gleiche, nicht vollständig korrekte Art der Berechnung über eine einfache Summe aus zwei Henderson-Hasselbalch-Gleichungen gewählt, um die pK_S -Werte zu bestimmen. Bei der Bestimmung wurden in jedem Fall mindestens zwei Messreihen durchgeführt und die Ergebnisse für kleine Konzentrationsunterschiede korrigiert. Die pH-Werte wurden ebenfalls nach Verdünnen überprüft und die Abweichungen lagen bei $< 0,25$ pH-Einheiten. Die Absorptionsdifferenz als Funktion des pH-Wertes ist in Abbildung 2.24 exemplarisch am TTRieske_short dargestellt.

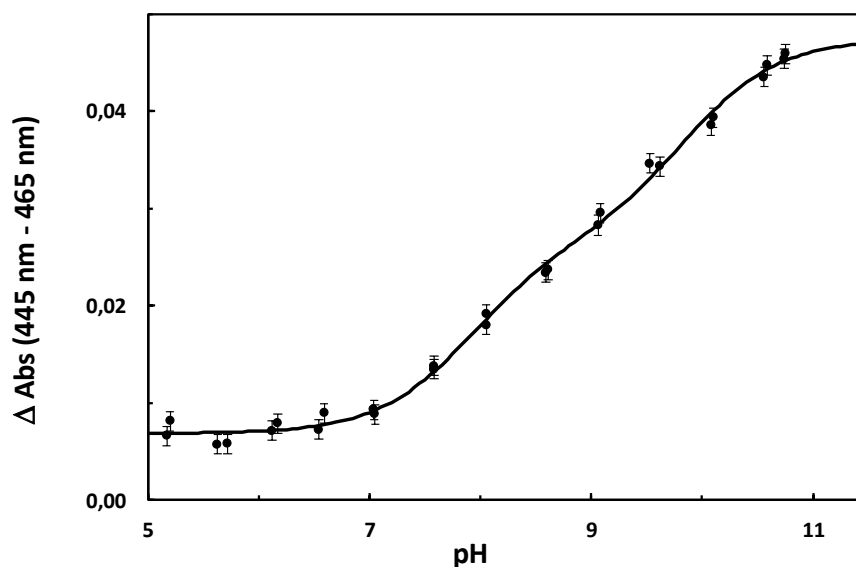


Abbildung 2.24: pK_S -Wert-Bestimmung des verkürzten Rieske-Proteins. Es wurde das Protein TTRieske_short verwendet. Es ergeben sich die Werte $pK_{ox1} = 7,88 \pm 0,05$ und $pK_{ox2} = 9,82 \pm 0,02$.

In Tabelle 2.6 sind alle ermittelten pK_S -Werte der untersuchten thermophilen Rieske-Proteine zusammengefasst.

Tabelle 2.6: pK_S-Werte der verschiedenen Varianten des Rieske-Proteins. Die Literaturwerte sind Ergebnisse von Konkle *et al.* (2009).

	TTRieske_short (AS 46-201)	TTRieske (AS 38-210)	His₆-TEV-TTRieske (AS 38-210, His-Tag)
pK_{ox1}	7,88 ± 0,05 (Lit. 7,87 ± 0,17)	7,77 ± 0,06 (Lit. 7,48 ± 0,12)	7,51 ± 0,30
pK_{ox2}	9,82 ± 0,02 (Lit. 9,84 ± 0,42)	9,52 ± 0,02 (Lit. 10,07 ± 0,17)	9,50 ± 0,04

Die pK_S-Werte der längeren Versionen weichen von den Literaturwerten leicht ab. Da aufgrund des unstrukturierten Vorkommens einiger Aminosäuren in der Kristallstruktur in den Publikationen von Konkle *et al.* (2009; 2010) mit dem kürzeren Protein gearbeitet wurde, könnten diese Abweichungen eventuell aus einem möglichen undefinierten Abbau des Proteins resultieren. Im Fall des Proteins mit His-Tag könnte der Tag auch für die Unterschiede verantwortlich sein, da besonders bei einem so kleinen Protein ein angehängter Tag große Änderungen zur Folge haben könnte. Als pK_S-Werte für TTRieske_short konnten jedoch in der vorliegenden Arbeit Werte von pK_{ox1} = 7,88 ± 0,05 und pK_{ox2} = 9,82 ± 0,02 erhalten werden, welche sehr nahe an den Literaturwerten liegen. Somit kann die Methode als zuverlässig angesehen werden.

2.6 Mössbauerspektroskopie

Die bisherigen Ergebnisse deuten eine Koordination des Apd1-Clusters durch zwei Histidinreste an. Dennoch kann noch nicht auf die tatsächliche Verteilung der gebundenen Liganden geschlossen werden. Um herauszufinden, ob beide Histidine an einem Eisenion gebunden sind und die Eisenkerne somit unterschiedliche Koordinationen haben oder ob sie beide durch je ein Cystein und ein Histidin gebunden sind, wurden Proben für die Mössbauerspektroskopie angefertigt und gemessen.

Die Proben wurden gemäß Kapitel 5.4.7 vorbereitet. Dabei wurde während der Kultivierung der Zellen 100 μM ⁵⁷Fe ins Medium gegeben, um eine Anreicherung dieses Isotops im Cluster des exprimierten Proteins zu bewirken. Nach der Aufreinigung wurden die Proteine stark aufkonzentriert, um bessere Messergebnisse erzielen zu können. Die Messungen erfolgten an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Physik (Biophysik) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Schönemann durch Dipl. Biophys. Hendrik Auerbach und Dipl. Biophys. Christina Müller.

2.6.1 Oxidiertes Apd1

Für das aerob gereinigte Wildtyp-Protein wurden Messungen bei 77 K ohne äußeres Magnetfeld durchgeführt. Das Protein lag in Entsalzungspuffer mit pH 9 vor. Das Spektrum ist in Abbildung 2.25 zu sehen.

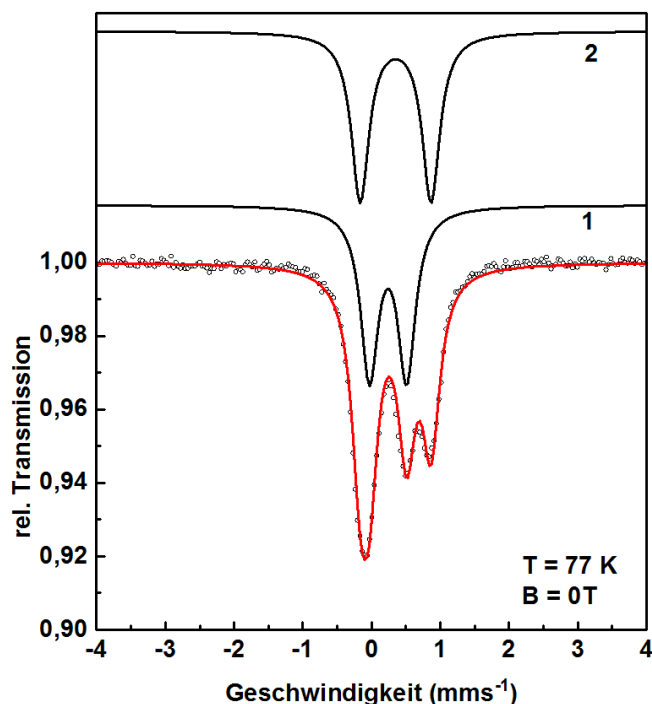


Abbildung 2.25: Mössbauerspektrum des oxidierten Apd1. Die rote Linie ist der resultierende Fit aus den beiden schwarzen Subspektren der beiden Eisenionen. Dargestellt ist das Spektrum bei $T = 77 \text{ K}$ und $B = 0 \text{ T}$.

Die Subspektren 1 und 2 sind die Spektren der entsprechenden Eisenkerne im Molekül. Die rote Linie ist der resultierende Fit aus diesen Subspektren. Dieser Fit wurde von Dipl. Biophys. Hendrik Auerbach durchgeführt. Das experimentelle Spektrum konnte durch zwei stöchiometrisch vorliegende Dubletts simuliert werden (Abb. 2.25). Komponente 1 ist ein Dublett mit einer Isomerieverschiebung von $\delta = 0,24 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$ und einer Quadrupolaufspaltung von $\Delta E_Q = 0,54 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$. Komponente 2 dagegen zeigt eine höhere Isomerieverschiebung ($\delta = 0,35 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$) und eine größere Quadrupolaufspaltung ($\Delta E_Q = 1,03 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$). Die Linienbreiten betragen für die Komponente 1 $0,31 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$ und für die Komponente 2 $0,32 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$. Beide wurden mit einer Fläche von 50 % gefittet. Im Hochfeldspektrum (5 K und 5 T) zeigt Apd1 ein typisches Spektrum für einen diamagnetischen Cluster, was einen Gesamtspin von $S = 0$ für das oxidierte Protein bedeutet (Auerbach, persönliche Mitteilung).

Durch die verschiedenen Parameter lassen sich die beiden Eisenkerne eindeutig voneinander unterscheiden und identifizieren. Da Stickstoff im Vergleich zu Schwefel ein stärker elektronenziehendes Element ist, kommt es bei gebundenen Histidinen zu einer geringeren Elektronendichte am Eisenkern als bei Cysteinen. Durch die geringere Elektronendichte steigt der Wert der Isomerieverschiebung an. Auch der höhere Wert bei der Quadrupolaufspaltung lässt auf eine

Asymmetrie in der Elektronendichteverteilung um das Eisenion schließen. Da bei einer Verteilung der Histidine auf beide Eisenionen nur ein geringer Unterschied in den Parametern zu beobachten wäre, folgt somit, dass Komponente 1 ($\delta=0,24\text{ mms}^{-1}$) ein Eisenkern ist, welcher von vier Schwefelatomen koordiniert ist. Komponente 2 ($\delta=0,35\text{ mms}^{-1}$) wird im Gegensatz dazu von zwei Schwefel- und zwei Stickstoffatomen gebunden.

Die Mössbauerdaten des oxidierten Apd1 deuten somit darauf hin, dass es sich bei den beiden Cysteinen (C207 und C216) und den Histidinen (H255 und H259) um die Liganden des Clusters handelt. Durch die unterschiedlichen Parameter kann darüber hinaus davon ausgegangen werden, dass im Apd1-Cluster die beiden Histidine am selben Eisenion gebunden sind. Ein möglicher daraus resultierender Clusteraufbau für Apd1 ist in Abbildung 2.26 dargestellt. Ungeklärt ist allerdings, ob die Histidine tatsächlich wie hier abgebildet über die N_{δ} -Atome gebunden sind oder ob diese Bindung möglicherweise auch über die N_{ϵ} -Atome stattfindet.

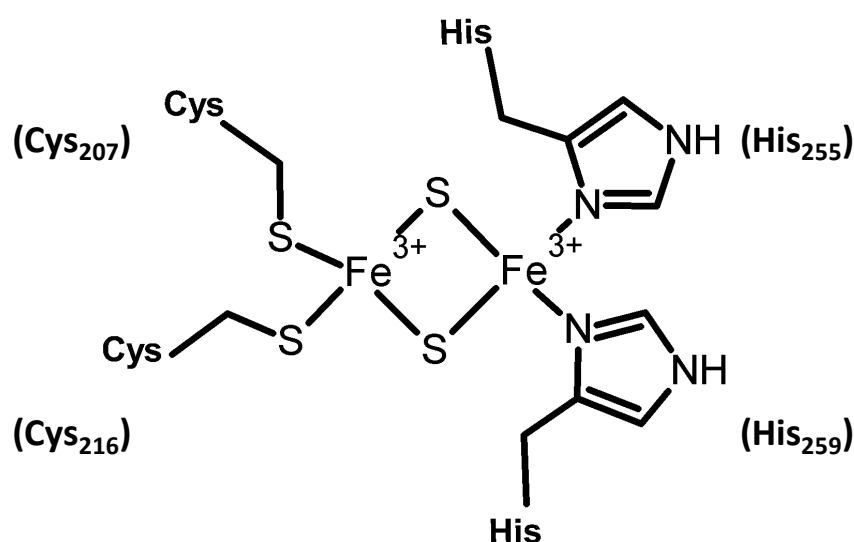


Abbildung 2.26: Möglicher Clusteraufbau des Apd1. Ein Eisenkern ist von den Cysteinen (207 & 216) koordiniert, während am zweiten Eisenkern die Histidine (255 & 259) als Liganden fungieren. Dargestellt ist die Bindung der Histidine über das N_{δ} -Atom ähnlich wie im Rieske-Protein. Denkbar wäre ebenso eine Bindung über das N_{ϵ} -Atom.

2.6.2 Reduziertes Apd1

Die vermessene Probe des oxidierten Proteins wurde in anaerober Umgebung mit NaDT reduziert. Dafür musste aufgrund der deutlich höheren Proteinkonzentration im Vergleich zu den Proben für die ESR-Spektroskopie die NaDT-Konzentration auf eine Endkonzentration von 5 mM erhöht werden. Die Mössbauerspektren zeigen einen einfach reduzierten, paramagnetischen $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Cluster mit einem Grundzustand von $S=1/2$ (Auerbach, persönliche Mitteilung).

2.6.3 Apd1-Spektren bei verschiedenen pH-Werten

Die beiden gebundenen Histidine können entweder protoniert oder deprotoniert vorliegen. Ihre pK_s -Werte im Protein Apd1 wurden in Kapitel 2.5.1 bereits bestimmt. Daher wurden gemäß Abbildung 2.27 drei verschiedene pH-Werte für weitere Mössbauermessungen ausgewählt. Dadurch sollte untersucht werden, ob der Protonierungsgrad der Liganden Auswirkungen auf den Cluster und somit das gemessene Spektrum hat.

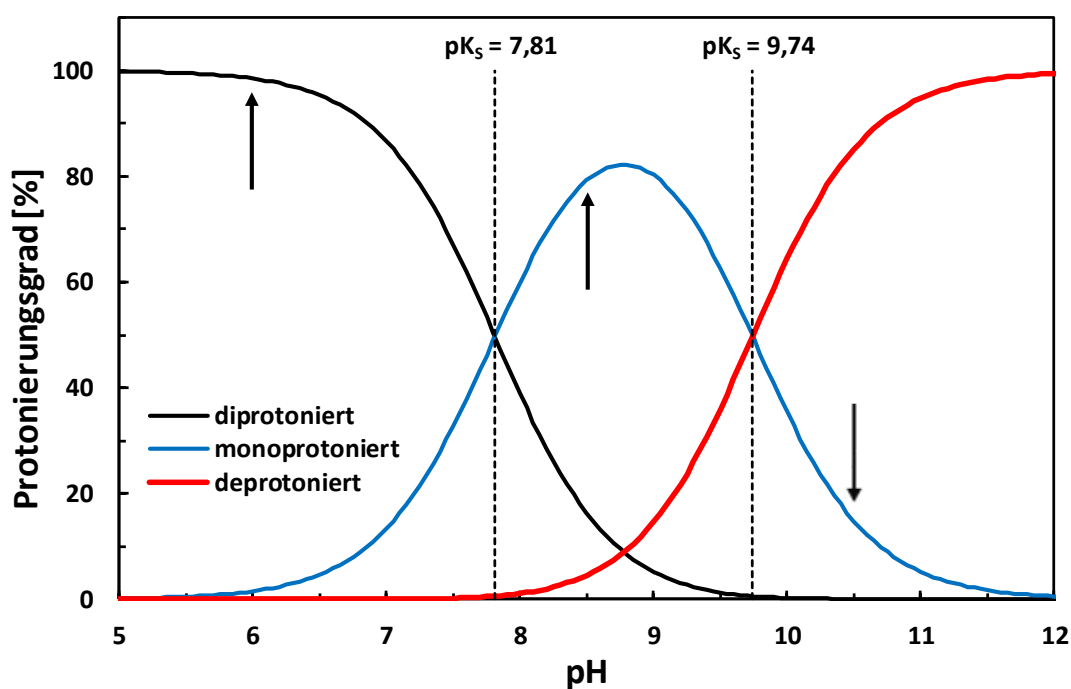


Abbildung 2.27: Protonierungszustände der Histidinreste von Apd1. Dargestellt sind die theoretischen Protonierungszustände bei verschiedenen pH-Werten. Schwarz: diprotonierte Form, blau: monoprotone Form, rot: deprotonierte Form. Markiert sind die für die weiteren Messungen ausgewählten pH-Werte. Die eingezeichneten pK_s -Werte wurden in Kapitel 2.5.1 bestimmt.

Es wurden die pH-Werte 6,0, 8,5 und 10,5 ausgewählt. Beim pH-Wert 6,0 liegt zu 98,5 % die diprotonierte Form vor. Bei pH 8,5 gibt es eine Mischung aus 16,3 % diprotonierter, 79 % monoprotone und 4,5 % der deprotonierten Form. Bei pH 10,5 liegen 85,1 % des deprotonierten und 14,8 % des monoprotone Clusters vor. Für alle pH-Werte wurden Nullfeldmessungen bei 77 K durchgeführt. In Abbildung 2.28 sind die experimentellen Mössbauerspektren dargestellt und die ermittelten Parameter sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst.

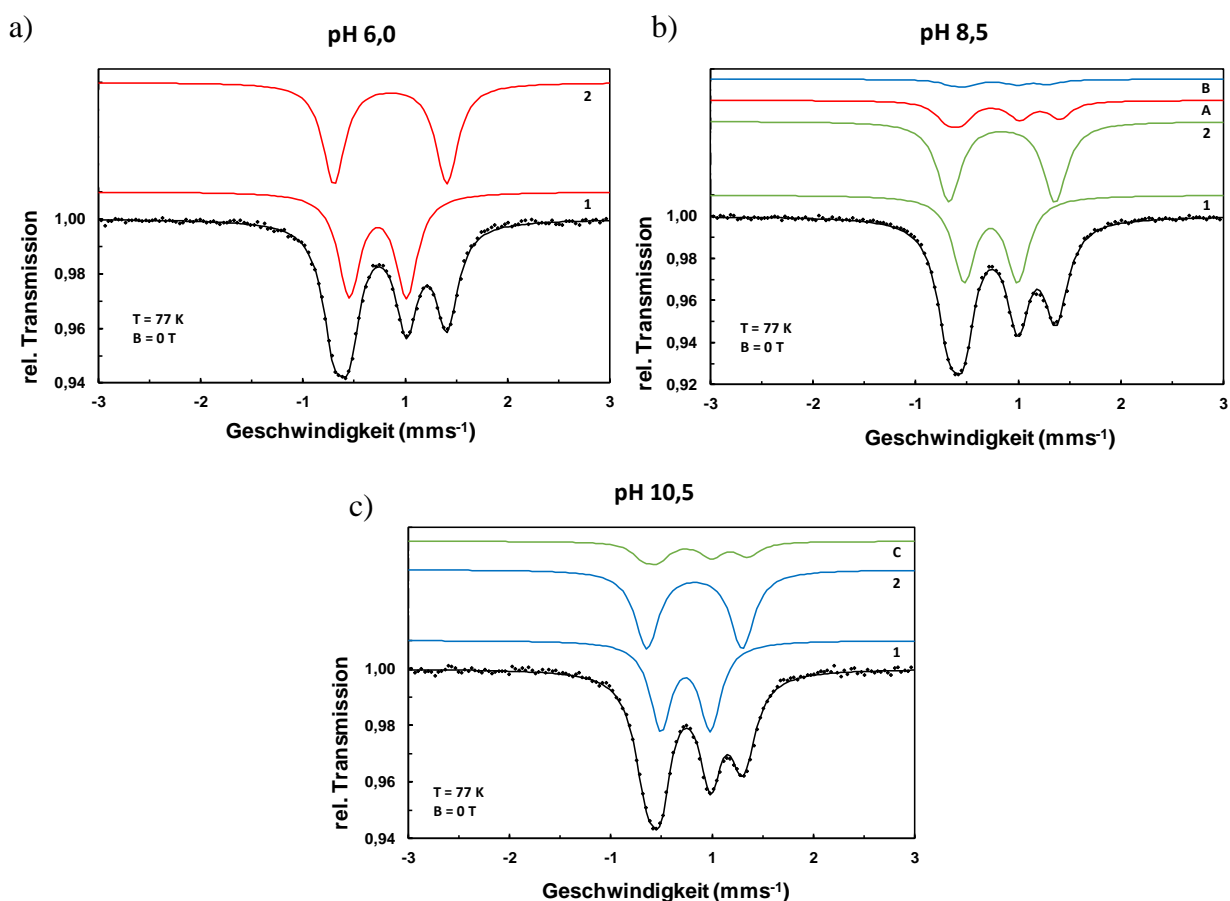


Abbildung 2.28: Mössbauerspektren der Proben von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten. Die schwarzen Linien sind die Simulationen mit den in Tab. 2.7 genannten Parametern. 1 und 2 sind jeweils die beiden Subspektren der Eisenkerne. Rot: Anteil von diprotoniertem Protein, grün: Anteil von monoprotiniertem Protein, blau: Anteil von deprotoniertem Protein. a) pH 6,0; b) pH 8,5 mit 16,3 % diprotoniertem Protein (A) und 4,5 % deprotoniertem Protein (B); c) pH 10,5 mit 14,8 % monoprotiniertem Protein (C).

Bei der Bestimmung der Parameter wurde ein iteratives Verfahren angewandt. Zunächst wurde das Spektrum für pH 6,0 gefittet. Anschließend wurde der Anteil der diprotonierten Form vom Spektrum bei pH 8,5 abgezogen und gefittet. Danach wurde das Spektrum von pH 10,5 analog durch Abzug der Anteile der monoprotinierten Form gefittet. Die so erhaltenen Parameter für die deprotonierte Form wurde anschließend wieder für den Fit des pH 8,5 Spektrums verwendet. Die Prozedur wurde einmal wiederholt und zeigte danach keine Änderung der Parameter mehr. Diese Fits wurden von Prof. Dr. A. J. Pierik durchgeführt.

Tabelle 2.7: Parameter der Mössbauerspektren der Proben von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten.

Komponente	pH 6,0		pH 8,5		pH 10,5	
	1	2	1	2	1	2
δ (mms ⁻¹)	0,23	0,35	0,23	0,34	0,24	0,33
ΔE_Q (mms ⁻¹)	0,56	1,11	0,52	1,04	0,49	0,94
Γ (mms ⁻¹)	0,26	0,26	0,26	0,27	0,26	0,28
Fläche (%)	50	50	50	50	50	50

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Isomerieverschiebung der Komponente 1 bei allen drei pH-Werten sehr konstant im Bereich von $0,23 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$ bleibt. Bei der zweiten Komponente dagegen wird sie niedriger mit steigendem pH-Wert ($0,36 \text{ mms}^{-1}$ bei pH 6,0 und $0,32 \text{ mms}^{-1}$ bei pH 10,5). Dies ist auf die Wechselwirkung der gebundenen Histidine mit dem entsprechenden Eisenion zurückzuführen. Bei der Quadrupolaufspaltung wurde in beiden Fällen eine Abnahme bei höherem pH festgestellt. Allerdings ist auch hier bei Komponente 2 ein stärkerer Effekt des pH-Wertes zu beobachten. Dies resultiert ebenso aus dem Deprotonieren der Histidine. Dass in diesem Fall auch Komponente 1 Änderungen aufzeigt, könnte damit zusammenhängen, dass eine Protonierung der Histidine eine leichte Umstrukturierung des Clusters zur Folge haben könnte, wodurch sich auch die Parameter der cysteingebundenen Komponente verschieben. Es ist jedoch festzuhalten, dass es mittels Mössbauerspektroskopie möglich ist, die verschiedenen Protonierungsgrade des Proteins zu unterscheiden.

Durch das Berücksichtigen der drei Zustände konnten in diesen Spektren Linienbreiten von $0,26\text{--}0,28 \text{ mms}^{-1}$ beobachtet werden, wohingegen in Abbildung 2.25 (Spektrum des oxidierten Proteins bei pH 9) Linienbreiten zwischen $0,31\text{--}0,32 \text{ mms}^{-1}$ gefunden wurden.

Für NIS- (*Nuclear Inelastic Scattering*) und NFS- (*Nuclear Forward Scattering*) Experimente der Proben am ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) in Grenoble durch Dipl. Biophys. Hendrik Auerbach (Arbeitskreis Prof. Dr. Schünemann, Fachbereich Physik, Fachrichtung Biophysik, TU Kaiserslautern) wurden die vorhandenen drei Proben (pH 6,0, pH 8,5 und pH 10,5) auf ein Volumen von $70 \mu\text{l}$ eingengt, in ein entsprechendes Probengefäß überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.6.4 Untersuchung der Mutanten

Da die Mutanten in ausreichender Menge isoliert werden konnten, wurden auch davon hochkonzentrierte oxidierte Mössbauerproben mit pH 9 angefertigt. Dabei sollte überprüft werden, welche Änderungen eine Mutation der Histidine im gemessenen Spektrum bewirkt. Die Proben wurden bei 77 K ohne Feld gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.8 und Abbildung 2.29 zusammengestellt. Die Fits wurden von Dipl. Biophys. Hendrik Auerbach durchgeführt.

Tabelle 2.8: Parameter der Mössbauerspektren der Apd1-Mutanten

Komponente	H255C		H259C		H255C/H259C	
	1	2	1	2	1	2
$\delta \text{ (mms}^{-1}\text{)}$	0,24	0,30	0,24	0,31	0,26	0,28
$\Delta E_Q \text{ (mms}^{-1}\text{)}$	0,43	0,77	0,45	0,95	0,39	0,58
$\Gamma \text{ (mms}^{-1}\text{)}$	0,25	0,25	0,26	0,28	0,25	0,31
Fläche (%)	50	50	50	50	50	50

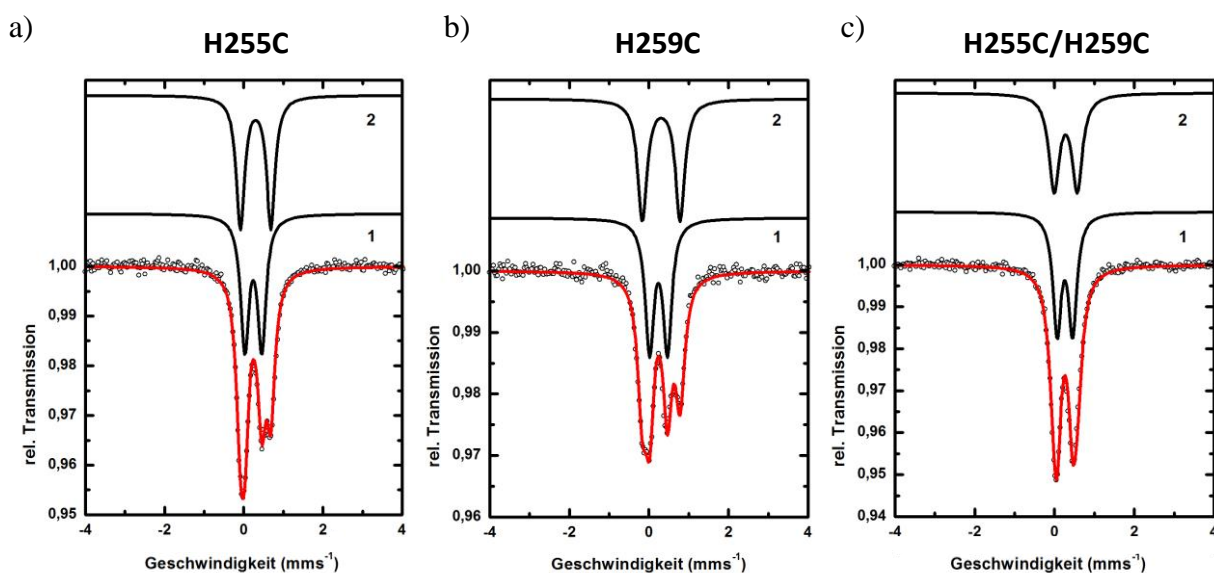


Abbildung 2.29: Mössbauerspektren der Apd1-Mutanten. Abgebildet sind die Spektren der Nullfeldmessungen bei 77 K. Die roten Linien sind die Simulationen mit den in Tab. 2.8 genannten Parametern. a) H255C; b) H259C; c) H255C/H259C.

Sowohl bei der Betrachtung der Spektren, als auch beim Vergleich der Parameter ist eindeutig zu sehen, dass es zu Veränderungen gegenüber dem Wildtyp-Apd1 (vgl. Abb. 2.25) kommt. Alle Spektren können mit zwei Dubletts simuliert werden. Bei den beiden Einzelmutanten H255C und H259C ergeben sich relativ ähnliche Parameter. Das erste Eisenion zeigt jeweils eine Isomerieverschiebung von $0,24 \text{ mms}^{-1}$ und die Quadrupolaufspaltungen betragen $0,43 \text{ mms}^{-1}$ bzw. $0,45 \text{ mms}^{-1}$. Die zweite Eisenkomponente zeigt in den Einzelmutanten eine Isomerieverschiebung von $0,30$ - $0,31 \text{ mms}^{-1}$. Die Quadrupolaufspaltung hingegen ist in der H259C Mutante mit $0,95 \text{ mms}^{-1}$ ein wenig höher als bei der H255C Mutante mit $0,77 \text{ mms}^{-1}$. Im Vergleich zum Wildtyp-Apd1 sind die Parameter des zweiten Eisenions ähnlicher zum ersten, nur mit Schwefel koordinierten Eisenion, da auf den Eisenkern eine geringere elektronenziehende Wirkung der Liganden ausgeübt wird. Bei der Doppelmutante H255C/H259C kann das Spektrum durch zwei Dubletts mit sehr ähnlichen Isomerieverschiebungen simuliert werden. Dies ist auf die identische Koordination beider Eisenatome mit jeweils vier Schwefelatomen zurückzuführen.

2.6.5 Spektren des Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten

Am oxidierten Rieske-Protein wurden, wie in Kapitel 1.4.1 ausgeführt, in der Literatur (Kuila & Fee, 1986) bereits Mössbauerstudien durchgeführt. Gemessen wurden Spektren bei pH 7,8 und pH 10. In beiden Fällen lagen jedoch Gemische zweier Spezies vor. Daher wurden für das oxidierte Rieske-Protein, wie für Apd1, Proben mit für die drei Zustände passenden pH-Werten (6,0; 8,5 und 10,5) hergestellt, um das Vorkommen gemischter Spezies im Spektrum zu minimieren. Es wurden Nullfeldmessungen bei 77 K (Abb. 2.30) durchgeführt. Die aus den Simulationen erhaltenen Parameter nach der Korrektur für die zusätzlich enthaltenen Anteile der anderen Protonierungsformen sind in Tabelle 2.9 aufgeführt. Dabei wurden allerdings die 3,7% der deprotonierten Form im Spektrum bei pH 8,5 vernachlässigt. Die Fits wurden durchgeführt von Dipl. Biophys. Christina Müller.

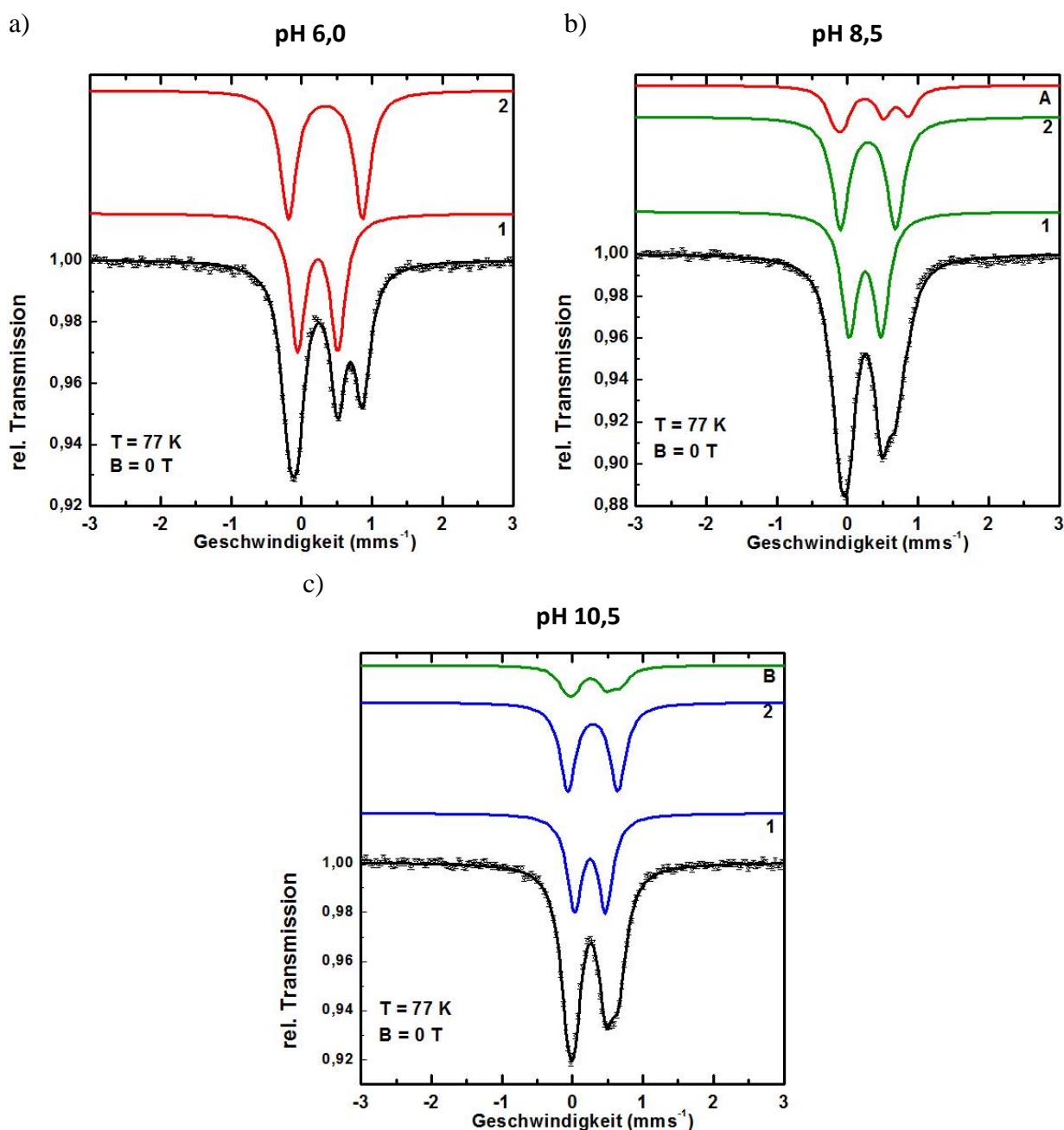


Abbildung 2.30: Mössbauerspektren der Proben des Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten. Die schwarzen Linien sind die Simulationen mit den in Tab. 2.9 genannten Parametern. 1 und 2 sind jeweils die beiden Subspektra der Eisenkerne. Rot: Anteil von diprotoniertem Protein, grün: Anteil von monoprotiniertem Protein, blau: Anteil von deprotoniertem Protein. a) pH 6,0; b) pH 8,5 mit 19 % diprotoniertem Protein (A); c) pH 10,5 mit 17 % monoprotiniertem Protein (B).

Der $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster des Rieske-Proteins verhält sich sehr ähnlich wie der Cluster des Apd1-Proteins. Die Isomerieverschiebung bleibt am cysteingebundenen Eisenion über den ganzen Bereich innerhalb der Fehlergenauigkeit konstant, während sie am Eisenion, welches von Histidinen koordiniert ist, mit steigendem pH-Wert abnimmt. Die Quadrupolaufspaltung zeigt ebenso gleiches Verhalten wie im Apd1. Allerdings ist hier eine größere Abnahme der Quadrupolaufspaltungen von $0,34 \text{ mms}^{-1}$ zu sehen als bei Apd1 ($0,17 \text{ mms}^{-1}$). Beides resultiert aus dem (De-)Protonieren der gebundenen Histidine.

Tabelle 2.9: Parameter der Mössbauerspektren der Proben des Rieske-Proteins bei verschiedenen pH-Werten. Die Abweichungen lagen bei allen Werten bei $\pm 0,01$.

Komponente	pH 6,0		pH 8,5		pH 10,5	
	1	2	1	2	1	2
δ (mms ⁻¹)	0,23	0,34	0,25	0,29	0,25	0,29
ΔE_Q (mms ⁻¹)	0,57	1,05	0,46	0,78	0,44	0,71
Γ (mms ⁻¹)	0,26	0,27	0,26	0,28	0,25	0,27
Fläche (%)	50	50	50	50	50	50

2.7 Elektrochemie

Die Bestimmung der elektrochemischen Potentiale wurde im Rahmen dieser Arbeit mit zwei Methoden durchgeführt. Eine Methode war eine Redoxtitration in Anwesenheit von Redoxmediatoren und anschließender Messung der eingefrorenen Proben mittels ESR-Spektroskopie, eine zweite war die Cyclovoltammetrie, welche in Zusammenarbeit mit Nicholas Yates im Labor von Dr. Alison Parkin an der University of York durchgeführt wurde. Im Fall der cyclovoltammetrischen Messungen war trotz vieler Variationen die Detektion der Redoxpotentiale nicht möglich. Daher sind im Folgenden nur die Ergebnisse der Redoxtitrationen dargestellt. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 5.4.8 erläutert.

2.7.1 Apd1

Da das Protein im pH-Bereich zwischen 8 und 9 (vgl. Kap. 2.2.6) die höchste Stabilität aufwies, wurde zunächst bei pH=8,5 eine reduktive Redoxtitration in anaerober Umgebung durchgeführt. Durch definierte Zugaben von Natriumdithionit und anschließender Äquilibration wurden verschiedene Potentiale des Gemisches eingestellt, Proben entnommen und mit Flüssigstickstoff eingefroren. Anschließend wurden diese Proben im ESR-Spektrometer bei 77 K gemessen. Die Redoxtitration für Apd1 bei pH 8,5 ist in Abbildung 2.31 gezeigt.

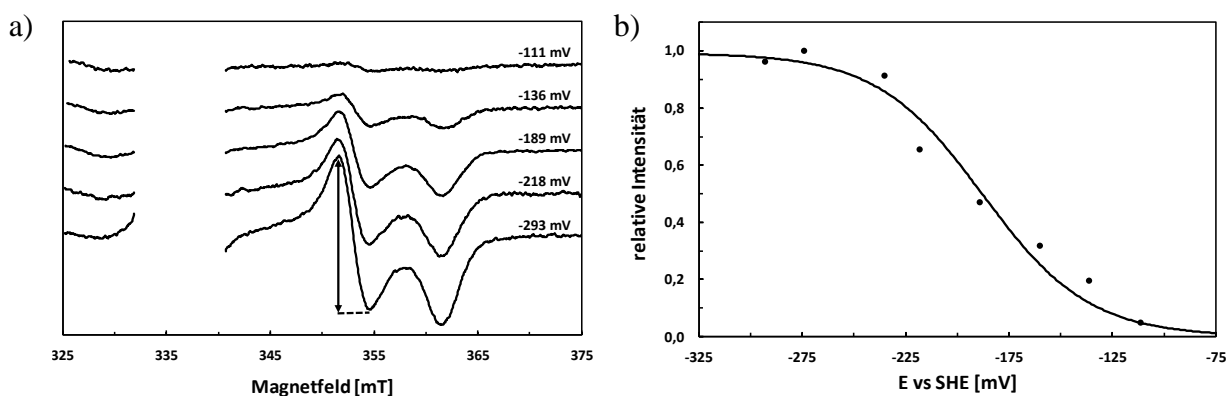


Abbildung 2.31: Redoxtitration von Apd1 bei pH=8,5. a) Auszug der gemessenen ESR-Spektren. Mit abnehmendem Potential der Lösung (rechts) nimmt die Amplitude des g_y -Peaks zu. Der Bereich um 335 mT wurde zur besseren Übersicht nicht dargestellt; b) Dargestellt sind die normierten Amplituden des gemessenen g_y -Peaks gegen die entsprechend gemessenen Potentiale.

Es ist gut zu erkennen, dass mit abnehmendem Potential der Protein-Mediatoren-Mischung die Amplitude des g_y -Peaks zunimmt, da der $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster reduziert wird. Im Bereich von 335 mT war in allen Fällen ein starkes Radikalsignal zu sehen, welches von Methylviologen, Benzylviologen und Semicuinon-Radikalen aus dem Mediatormix stammte. Zur besseren Übersicht wurde dieses Signal nicht abgebildet. Die Amplituden von g_y wurden auf die Probe mit der größten Amplitude normiert und in Abbildung 2.31 b) als Funktion der gemessenen Potentiale der Lösung aufgetragen.

Durch Umformung der Nernst-Gleichung ergibt sich für die Intensität der reduzierten Form:

$$Red = \frac{k}{1 + e^{(E - E_m) * \frac{nF}{RT}}}$$

mit: k = Umrechnungsfaktor für gemessene Amplitude F = Faraday-Konstante
 E = Potential der Lösung bei Probennahme R = universelle Gaskonstante
 E_m = Redoxpotential des Proteins T = Temperatur (298 K)
 n = Anzahl der übertragenen Elektronen ($n = 1$)

Mit der EXCEL-Solver-Funktion wurden in diesem Fit die Werte für den Umrechnungsfaktor der Amplitude (k) und das Redoxpotential E_m angepasst. Bei pH 8,5 (Abb. 2.31 b)) ergab sich für den $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster des Apd1 ein Potential von $E_m = -188$ mV. Anschließend wurden Redox titrationen bei neun weiteren pH-Werten (zwischen pH 7 und 10) durchgeführt und die Redoxpotentiale jeweils über die Intensitäten der ESR-Signale als Funktion der Potentiale bestimmt. In Abbildung 2.32 a) sind die erhaltenen Redoxpotentiale gezeigt.

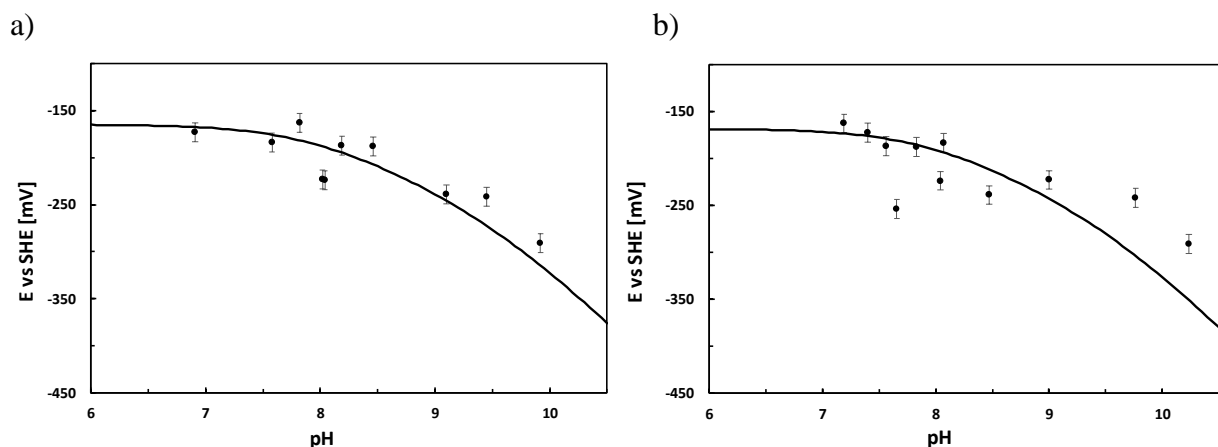


Abbildung 2.32: pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials von Apd1. a) gemessene Redoxpotentiale von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten; b) Redoxpotentiale von Apd1 mit den korrigierten pH-Werten für die Verschiebung während des Einfrierens der Proben. Es wurde angenommen, dass die Proben bei ca. -10°C einfrieren.

In Abbildung 2.32 a) ist zu beobachten, dass das Redoxpotential des $[2\text{Fe-2S}]^{2+/1+}$ -Übergangs im Apd1 pH-abhängig ist. Um diese pH-Abhängigkeit zu simulieren, wurde die folgende Formel verwendet:

$$E_{obs} = E_{alk} - \frac{RT}{nF} \ln \left[\left(1 + \frac{a_{H^+}}{K_{ox_2}} + \frac{a_{H^+}^2}{K_{ox_1}K_{ox_2}} \right) / \left(1 + \frac{a_{H^+}}{K_{red_2}} + \frac{a_{H^+}^2}{K_{red_1}K_{red_2}} \right) \right]$$

mit: E_{obs} = Potential der Lösung

R = universelle Gaskonstante

E_{alk} = Potential der Lösung am alkalischen Limit

T = Temperatur (298 K)

$K_{ox_{1,2}}$ = Säurekonstanten des oxidierten Clusters

F = Faraday-Konstante

$K_{red_{1,2}}$ = Säurekonstanten des reduzierten Clusters

a_{H^+} = Wasserstoffionen-Aktivität

n = Anzahl der übertragenen Elektronen ($n=1$)

Es wurde mit den in Kapitel 2.5.1 erhaltenen pK_{ox} -Werten und der Annahme, dass beide $pK_{red} = 12,5$ sind (nach Zu *et al.*, 2003), gearbeitet und das Potential der Lösung am alkalischen Limit mit der EXCEL-Solver-Funktion gefittet. Die ESR-Spektren des Wildtyp-Proteins bei verschiedenen pH-Werten bestätigen auch für Apd1, dass die pK_{red} -Werte über pH 11 liegen müssen (vgl. Kap. 2.4.3), sodass die Annahme gerechtfertigt ist. Da bei Puffern während des Einfrierprozesses oft eine Verschiebung im pH-Wert auftritt, wurde dieses Phänomen als mögliche Erklärung für die abweichenden Potentiale im Vergleich zum angelegten Fit in Betracht gezogen. Diese Verschiebung ist durch den Wert $d(pK_S)/dT$ gegeben. Durch die Verwendung der pH-Werte, die sich beim Einfrieren (ca. bei -10°C) unter Berücksichtigung des genannten Wertes ergeben würden, konnte allerdings keine besonders große Verbesserung der Qualität der Simulation erzielt werden (Abb. 2.32 b)).

2.7.2 Mutanten

Auch für die Mutanten wurde versucht die Redoxpotentiale zu bestimmen. Es wurde bei pH 8,5 gearbeitet. Beide Einzelmutanten zeigten ein sehr ähnliches Titrationsverhalten (Abb. 2.33).

Die durchgeführten Redox titrationen ergaben die Werte $E_m = -415\text{ mV}$ für H255C und $E_m = -397\text{ mV}$ für H259C. Dies ist eine Differenz von etwa 200 mV im Vergleich zu Apd1 (-188 mV bei pH 8,5). Ein Absinken des Redoxpotentials um einen ähnlichen Wert nach Austausch eines Histidins durch Cystein wurde auch in der Literatur beim Rieske-Ferredoxin aus *Sulfolobus solfataricus* und in mitoNEET bereits beobachtet (Kounosu *et al.*, 2004; Bak *et al.*, 2009). Die H259C-Mutante zeigte in der Redox titration wie schon in den normalen ESR-Spektren eine Überlagerung zweier Signale (Abb. 2.33 b) Inset). Die blaue Kurve resultiert aus der Reduktion einer zweiten Spezies, für welche ein g -Wert von 1,942 sowie ein Redoxpotential von ca. -245 mV ermittelt werden konnten. Der g_x -Wert, welcher im Bereich des Radikalsignals liegt, konnte nicht bestimmt werden.

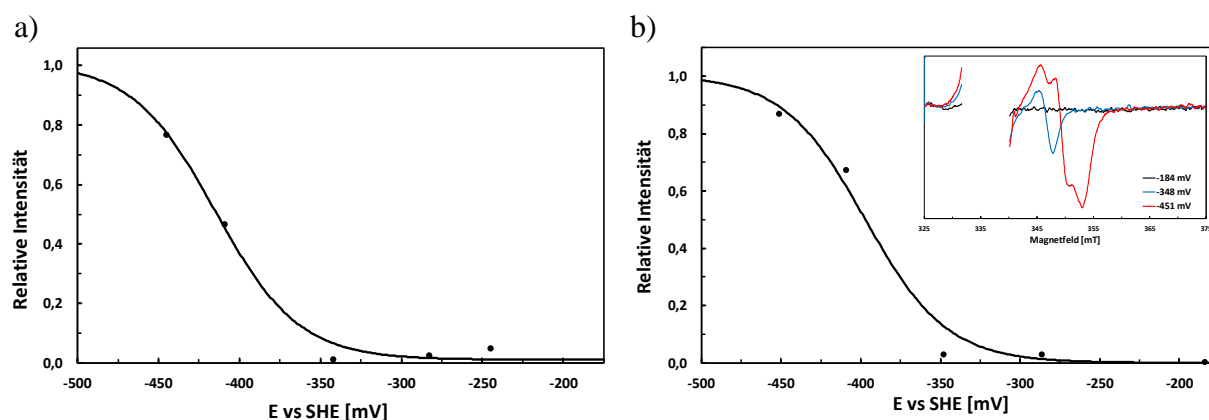


Abbildung 2.33: Redox titrations der Apd1-Einzelmutanten bei pH 8,5. Dargestellt sind die reduktiven Redox titrations der Apd1-Einzelmutanten. a) H255C mit einem Potential von -415 mV; b) H259C mit einem Potential von -397 mV. Inset: Auszug der gemessenen ESR-Spektren. Die dargestellten Spektren wurden durch einen gleitenden Mittelwert über neun Datenpunkte geglättet. Auch hier wurde der Bereich um 335 mT zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Schwarz: -184 mV, blau: -348 mV und rot: -451 mV (jeweils vs. SHE).

Für die Doppelmutante wurden bei gleicher Proteinkonzentration selbst beim niedrigsten Potential der Lösung (-450 mV vs. SHE) bei pH 8,5 keine Signale detektiert. Der Grund hierfür könnte ein weiter abgesunkenes Redoxpotential durch den zweiten Histidinaustausch sein. Mit der Annahme, dass in der Probe bei -450 mV vs. SHE maximal 5% Signal anwesend ist, kann das Redoxpotential von H255C/H259C auf niedriger als -500 mV abgeschätzt werden.

2.8 Modifikation der Histidinliganden mit DEPC

Ein oft verwendetes Reagenz zur Untersuchung von Histidinen stellt das DEPC (Diethylpyrocarbonat) dar. Es reagiert mit deprotonierten Histidinen und führt zu einer Carboxyethylierung am Ring-Stickstoff. Es können allerdings auch Lysine und Tyrosine von DEPC modifiziert werden (Konkle *et al.*, 2010). Durch eine Modifikation von gebundenen Histidinliganden verändert sich die Elektronendichte im Imidazolring und damit die Eigenschaften des Fe/S-Clusters. Aufgrund dessen konnten beim Rieske-Protein aus dem Cytochrom bc_1 -Komplex aus Rinderherzen nach einer Behandlung mit DEPC Verschiebungen der g -Werte in den ESR-Spektren nachgewiesen werden (Ohnishi *et al.*, 1994).

2.8.1 DEPC-Behandlung von Apd1

UV/Vis-Versuche zur Modifikation von Apd1-Protein (50 μ M) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 ergaben, dass neben einer Zunahme der Absorption bei ca. 240 nm, welche charakteristisch ist für die Carboxyethylierung der Histidine, eine Abnahme des Peaks bei etwa 450 nm zu beobachten war. Diese Effekte im UV/Vis-Spektrum konnten bereits bei einer Konzentration von 1 mM DEPC (Zugabe mittels einer frischen 100 mM Stammlösung in kaltem absolutem Ethanol) und einer Inkubationszeit von 10 Minuten festgestellt werden.

Das isolierte Apd1-Protein lag in der Regel in Entsalzungspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris) vor. Zur Bestimmung des Effekts der Histidinmodifikation auf das ESR-Spektrum des

[2Fe-2S]¹⁺-Clusters wurde das Protein daher in einem Good's Puffer mit dem gewünschten pH-Wert verdünnt, um Reaktionen des DEPC mit Tris, die ebenfalls stattfinden können, weitgehend zu vermeiden. Da DEPC bei niedrigen pH-Werten längere Halbwertszeiten besitzt (Berger, 1975) und somit stabiler ist, wurde zunächst bei pH 6,5 (MES) gearbeitet. In der Literatur (Karagas *et al.*, 2014; Konkle *et al.*, 2010) wurde durch die Behandlung mit DEPC eine Reduktion des Fe/S-Clusters erzeugt. In dieser Arbeit wurde eine Reduktion des Clusters von Apd1 aufgrund der Behandlung mit DEPC jedoch nicht beobachtet. Daher musste der Cluster zusätzlich mit NaDT reduziert werden. Es wurden zunächst Versuche zur Reihenfolge der Zugaben durchgeführt (Abb. 2.34 a)). Das Protein wurde immer mit 1 mM DEPC (Endkonzentration) für 10 min inkubiert.

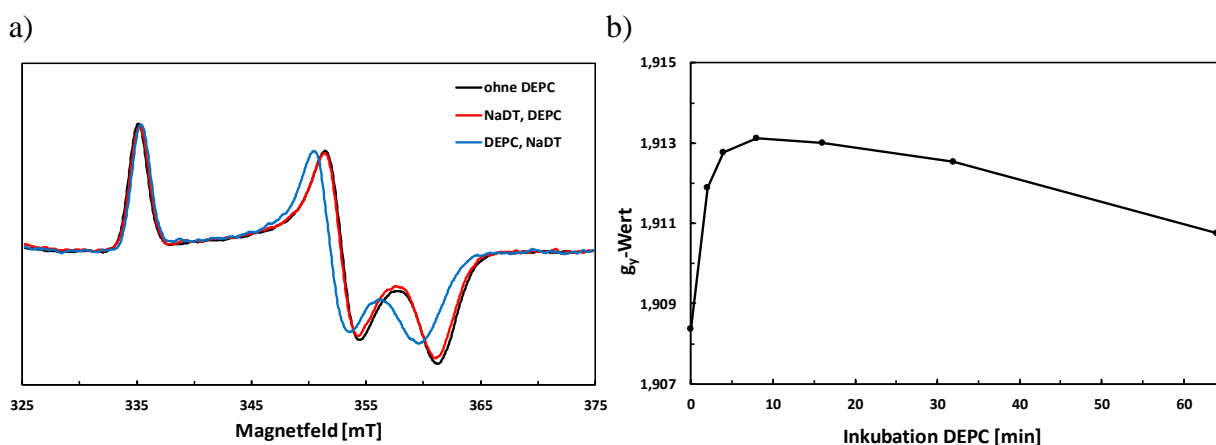


Abbildung 2.34: Vorversuche zur Modifikation mit DEPC. Um die Auswertung der mit Flüssigstickstoff gemessenen Spektren zu vereinfachen, wurde ein gleitender Mittelwert über neun Datenpunkte genutzt. a) Versuche zur Reihenfolge von DEPC und NaDT bei pH 6,5. Dargestellt sind auf g_x normierte Spektren. Schwarz: ohne DEPC, rot: Reduktion mit NaDT (2 mM, 5 min) vor DEPC-Behandlung (1 mM, 10 min), blau: DEPC-Behandlung (1 mM, 10 min) vor Reduktion mit NaDT (2 mM, 5 min); b) Auftragung der g_y -Werte für verschiedene Inkubationszeiten des Proteins (in MES, pH 6,5) mit DEPC (1 mM), diese Proben wurden anschließend mit NaDT reduziert (2 mM, 5 min).

Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Reihenfolge der Zugaben wichtig ist. Wird zuerst reduziert und anschließend mit DEPC versucht, die Histidine zu modifizieren, so zeigt sich im ESR-Spektrum kaum eine Verschiebung der g -Werte. Das Spektrum ist fast identisch mit dem des reduzierten Proteins ohne DEPC-Behandlung. Wird vor der Reduktion die DEPC-Modifikation durchgeführt, verschieben sich die g -Werte von Apd1. Dabei verschiebt sich der g_x -Wert von 2,009 zu 2,017, wohingegen g_y von 1,907 nach 1,914 und g_z von 1,862 nach 1,873 verschoben sind.

Anschließend wurde die Geschwindigkeit der DEPC-Modifikation als Funktion der Zeit untersucht. Dabei wurde ebenfalls bei pH 6,5 (MES) unterschiedlich lange mit DEPC inkubiert, bevor eine Reduktion des Clusters vorgenommen und ein ESR-Spektrum aufgenommen wurde. Das Resultat ist in Abbildung 2.34 b) zu sehen. Nach acht Minuten Inkubation mit DEPC ist der g_y -Wert von 1,907 nach 1,913 verschoben. Wird die Inkubation länger fortgesetzt, so kann eine Abnahme des g -Wertes festgestellt werden. Nach 64 Minuten Inkubation wurde ein g_y -Wert von

1,911 beobachtet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass hier eine Inkubationslänge von ca. 10 Minuten optimal ist.

Da deprotonierte Histidine bessere Nucleophile sind und schneller mit DEPC reagieren, wurden Apd1-Proben bei verschiedenen pH-Werten mit DEPC behandelt und die ESR-Spektren gemessen. Dazu wurde das Protein zunächst jeweils mit den Puffern MES (pH 6,5), TAPS (pH 8,5) oder CAPS (pH 10,5) der Konzentration 200 mM verdünnt und die Modifikation (1 mM DEPC), wie zuvor beschrieben, durchgeführt (Abb. 2.35 a)).

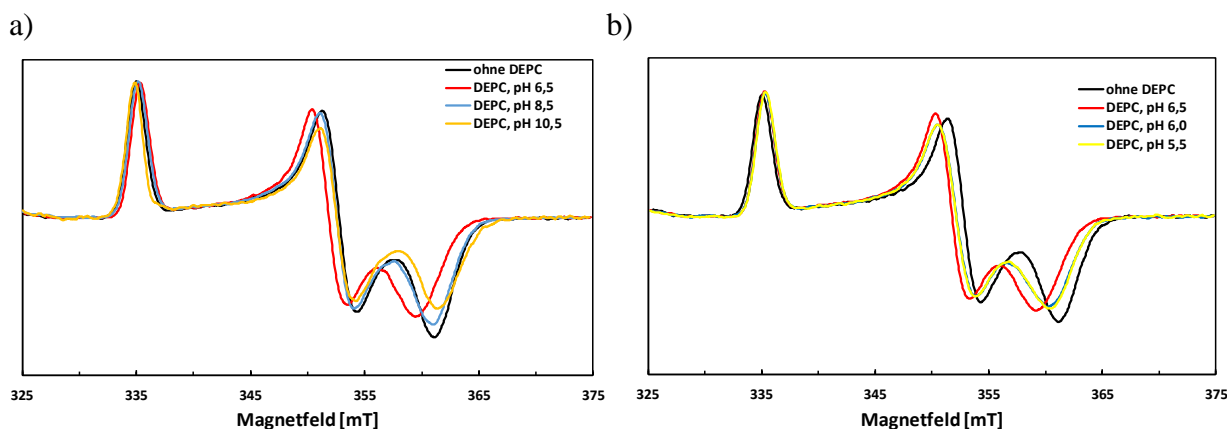


Abbildung 2.35: Modifikation von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten. Es wurde immer 10 Minuten mit DEPC (1 mM) inkubiert und anschließend 5 Minuten mit NaDT (2 mM) reduziert. Dargestellt sind jeweils die auf g_x -Amplituden normierten Spektren. Um die Auswertung der mit Flüssigstickstoff gemessenen Spektren zu vereinfachen, wurde ein gleitender Mittelwert über neun Datenpunkte genutzt. a) DEPC-behandelte Proben bei pH 6,5, 8,5 und 10,5. Schwarz: ohne DEPC, rot: DEPC, pH 6,5, blau: DEPC, pH 8,5, gelb: DEPC, pH 10,5; b) DEPC-behandelte Proben im sauren Bereich. Schwarz: ohne DEPC, rot: DEPC, pH 6,5, blau: DEPC, pH 6,0 und gelb: DEPC, pH 5,5.

Dabei fällt auf, dass DEPC bei pH 6,5 die stärkste Verschiebung der g -Werte bewirkt. Bei pH 8,5 und pH 10,5 sind die Spektren sehr ähnlich zum Spektrum ohne DEPC-Behandlung. Nach dieser Beobachtung wurden weitere pH-Werte im sauren Bereich ausgewählt und getestet. Ein Vergleich der Spektren (Abb. 2.35 b)) zeigt, dass bei pH 5,5 und pH 6,0 zwar Verschiebungen der g -Werte auftreten, bei pH 6,5 allerdings der größte Effekt beobachtet werden kann.

Ein Überblick über die ermittelten g_y -Werte ist in Abbildung 2.36 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die g_y -Werte im unbehandelten Protein in allen pH-Bereichen bis auf kleine Schwankungen sehr konstant sind. Wird das Protein mit DEPC behandelt, kommt es zu Verschiebungen des g_y -Wertes, die unterschiedlich stark sind. Allgemein tritt eine stärkere Verschiebung im sauren pH-Bereich auf, bei pH 6,5 verändert sich der g_y -Wert von 1,909 zu 1,913 und weist damit die größte Veränderung auf.

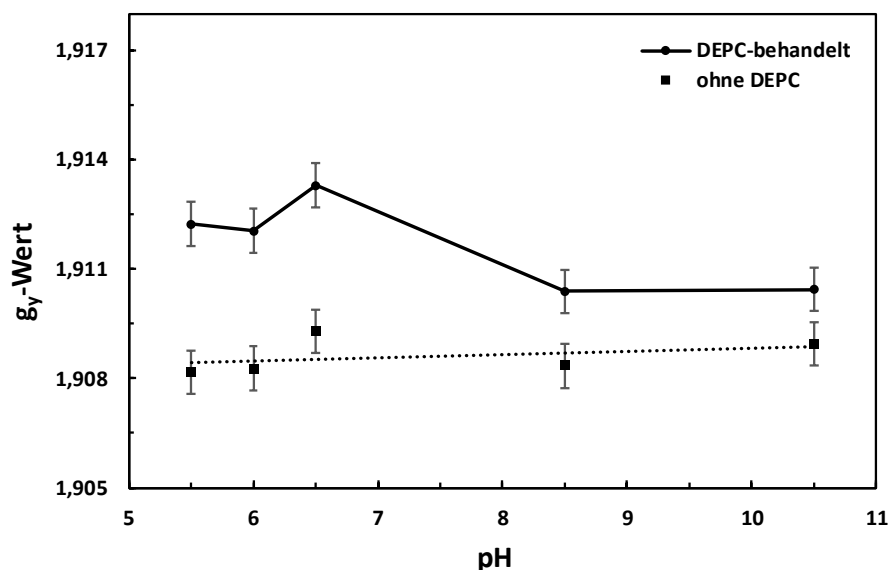


Abbildung 2.36: g_y -Werte des $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Clusters von Apd1 nach DEPC-Behandlung. Es sind die g_y -Werte bei verschiedenen pH-Werten zusammengefasst. Kreise: DEPC-behandelte Proben, Quadrate: unbehandelte Proben. Bei pH 6,5 tritt die stärkste Verschiebung des g_y -Wertes, hervorgerufen durch die Behandlung mit DEPC, auf.

2.8.2 DEPC-Behandlung der Mutanten

Um nun zu untersuchen, ob beide Histidine am Cluster modifiziert werden können, wurden auch die Einzelmutanten einer Behandlung mit DEPC unterzogen und die ESR-Spektren gemessen. Die Experimente wurden analog zum Wildtyp-Protein in MES-Puffer pH 6,5 durchgeführt. Bei der H259C-Mutante wurden für die mit DEPC behandelten Proben Signale erhalten, welche im Vergleich zu einer unbehandelten Probe nicht verschoben waren. Für die Einzelmutante H255C und die Doppelmutante konnten bisher keine Signale erhalten werden. Mögliche Gründe für diese Beobachtungen werden in der Diskussion näher erläutert.

2.9 Kristallisation

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Charakterisierung eines neuartigen Proteins ist die Identifizierung seiner Kristallstruktur. Diese gibt neben dem Clustertypen und seinen Liganden auch Aufschluss über die allgemeine Proteinfaltung und es kann eventuell schon auf mögliche Funktionen des Proteins rückgeschlossen werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht von Apd1 und His₆-TEV-Apd1 Kristalle zu erhalten. Diese Kristallisationsexperimente wurden an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Holger Dobbek (Strukturelle Biologie / Biochemie) unter der Anleitung von Dr. Berta Martins durchgeführt. Es wurden bisher die in Abbildung 2.37 gezeigten Kristalle erhalten.

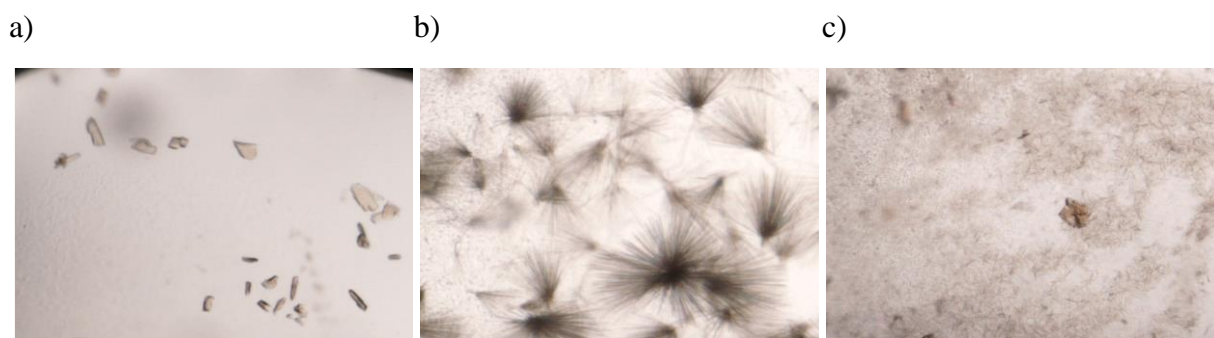


Abbildung 2.37: Erhaltene Kristalle des Apd1-Proteins. a) 0,1 M Bis-Tris, pH 5,5, 25 % w/v PEG 3350 (JCSG screen); b) 0,1 M MIB, pH 4,0, 25 % w/v PEG 1500 (PACT screen); c) 0,1 M MMT, 25 % PEG 1500 (PACT screen).

Die verwendeten Proteine lagen in Entsalzungspuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 9,0) vor und wurden mit verschiedenen Screens (Molecular Dimensions & Hampton Research) zu kristallisieren versucht. Die Screens bestanden aus vorgefüllten 96-well-Platten mit je 100 μ l Reservoirlösung. Auf der Plattform oberhalb der Reservoirlösung wurden dann für die sitting-drop-Methode je 0,6 μ l der Proteine und 0,6 μ l der Reservoirlösung mit einem Pipettierroboter gemischt. Anschließend wurden die Platten versiegelt. Die ersten Kristalle waren die in Abbildung 2.37 a) gezeigten, welche bereits am nächsten Tag entstanden waren. Sie wurden unter den Bedingungen 0,1 M Bis-Tris (Bis-(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan), pH 5,5, 25 % w/v PEG 3350 im JCSG-Screen erhalten. Da die Kristalle jedoch eine zu geringe Größe und Stabilität aufwiesen, konnten sie nicht weiter analysiert werden. Sie zeigten aber eine deutliche braune Farbe. Weitere Kristalle wurden unter den Bedingungen 0,1 M MIB (Malonic acid, Imidazole, Boric acid), pH 4,0, 25 % PEG 1500 (Abb. 2.37 b)) und 0,1 M MMT (Malic acid, MES, Tris), 25 % PEG 1500 (Abb. 2.37 c)) im PACT-Screen erhalten. Auch nach verschiedenen Optimierungsversuchen konnten bisher unter keiner der genannten Bedingungen geeignete Kristalle für eine Röntgenkristallographie erhalten werden.

2.10 Bioinformatik

Abschließend wurden bioinformatische Studien durchgeführt, um die Proteine Apd1 und Aim32 noch genauer kennen zu lernen und eventuelle ähnliche Proteine zu Gruppen zusammenfassen zu können. Dafür wurde die Aminosäuresequenz von Apd1 auf das Motiv des clusterbindenden Teils inklusive sechs Aminosäuren vor dem ersten Cystein (C207) und sechs Aminosäuren nach dem zweiten Histidin (H259) beschränkt. Mit dieser Sequenz wurde in anderen Organismen nach ähnlichen Proteinen gesucht. Dabei wurde in eukaryotischen Genomen (JGI=Joint Genome Institute) sowie in Genomen verschiedener Pilze (JGI MycoCosm und *National Center of Biotechnology Information*) gesucht. Um eine Vielfältigkeit zu erreichen, wurden auf der Seite MycoCosm aus den verschiedenen dargestellten Ästen jeweils mehrere Organismen ausgesucht. Aus den gefundenen Sequenzen wurden anschließend diejenigen ausgesucht, deren Ähnlichkeit zu Apd1 signifikant (Expect-Wert $< 10^{-3}$) war (n=167). Diese Sequenzen wurden in einem Alignment (Clustal Omega mit den Standardeinstellungen) mit Hefe-Apd1 zusammengestellt

und mittels iTOL zu einem phylogenetischen Stammbaum zusammengefasst. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.38 zu sehen.

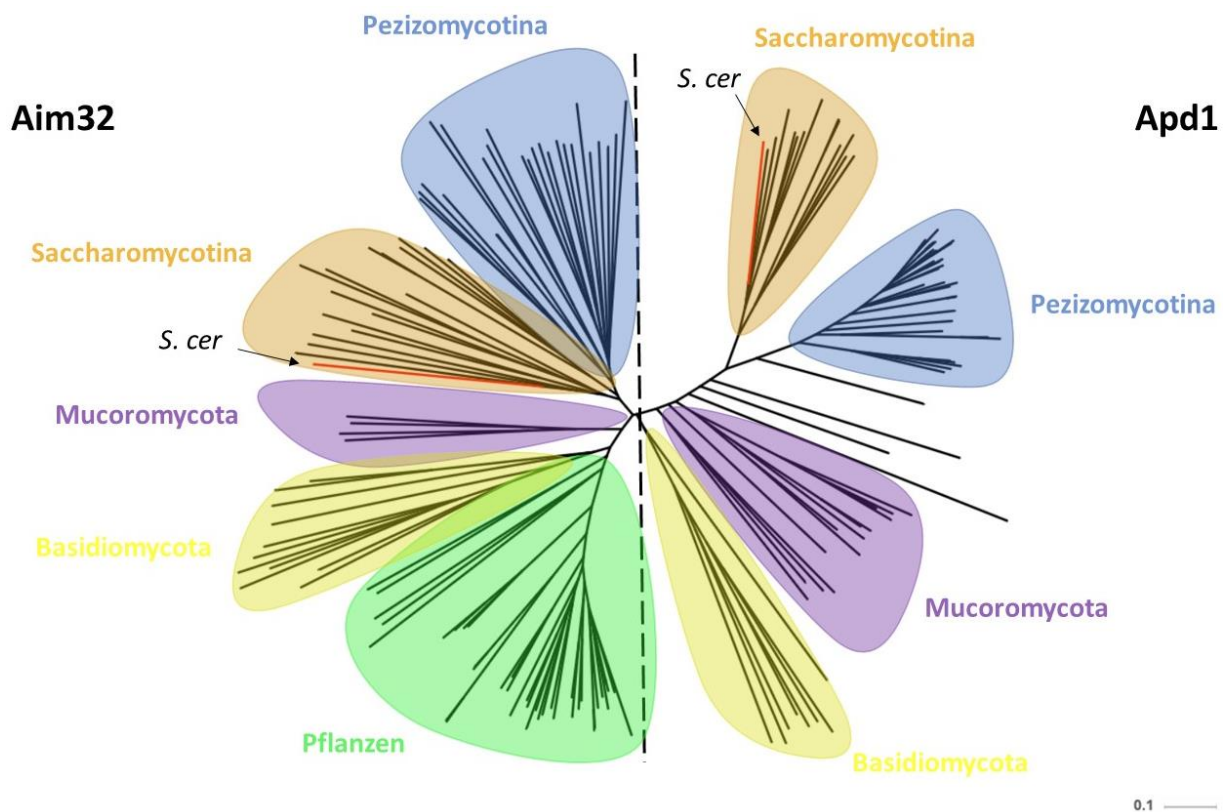


Abbildung 2.38: Phylogenetischer Baum von Aim32- und Apd1-ähnlichen Proteinsequenzen. Dargestellt ist der phylogenetische Baum basierend auf der verkürzten Sequenz um den clusterbindenden Teil. In rot markiert sind die in dieser Arbeit verwendeten Proteine aus *S. cerevisiae*. Die farbige Einordnung der Proteine beruht auf der phylogenetischen Zuordnung der Organismen.

Auf den ersten Blick ist deutlich zu erkennen, dass eine klare Trennung zwischen Apd1-Proteinen und Aim32-Proteinen vorgenommen werden kann, welche aufgrund des C-terminalen Tryptophans in den meisten Fällen vorausgesagt werden konnte. Außerdem auffällig ist, dass alle Proteine, die aus Pflanzen stammen, dem Aim32 ähnlicher sind. Diese beinhalten alle eine C-terminale Verlängerung aus ca. 100-150 Aminosäuren, in welchen häufig ein oder mehrere Doppel-Cystein-Motive zu finden sind. Weitere Gruppen innerhalb der beiden großen Äste des Stammbaums lassen sich hauptsächlich auf die phylogenetische Zuordnung der Organismen zurückführen.

In allen untersuchten Sequenzen dieses Stammbaums ist im Bereich der Histidine eine hochkonservierte Sequenz zu finden. Diese kann beschrieben werden durch **HXGGH**, bis auf wenige Ausnahmen von pflanzlichen Sequenzen, in denen nicht beide Glycine konserviert vorliegen. Auch dies ist ein weiterer Hinweis auf die Histidine als Bindungspartner im Cluster. Als Konsensussequenz wurde für Aim32 und Apd1 **C-X₈-C-X₂₄₋₇₅-H-X₃-H** festgestellt. Dabei ist bei Apd1 die häufigste Anzahl der Aminosäuren zwischen Cystein und Histidin 38 und bei Aim32

sind meistens 30 Aminosäuren zu finden, vor allem in den pflanzlichen Vertretern. In Abbildung 2.39 a) ist die genaue Verteilung der Länge des zwischen den Liganden liegenden Teils dargestellt.

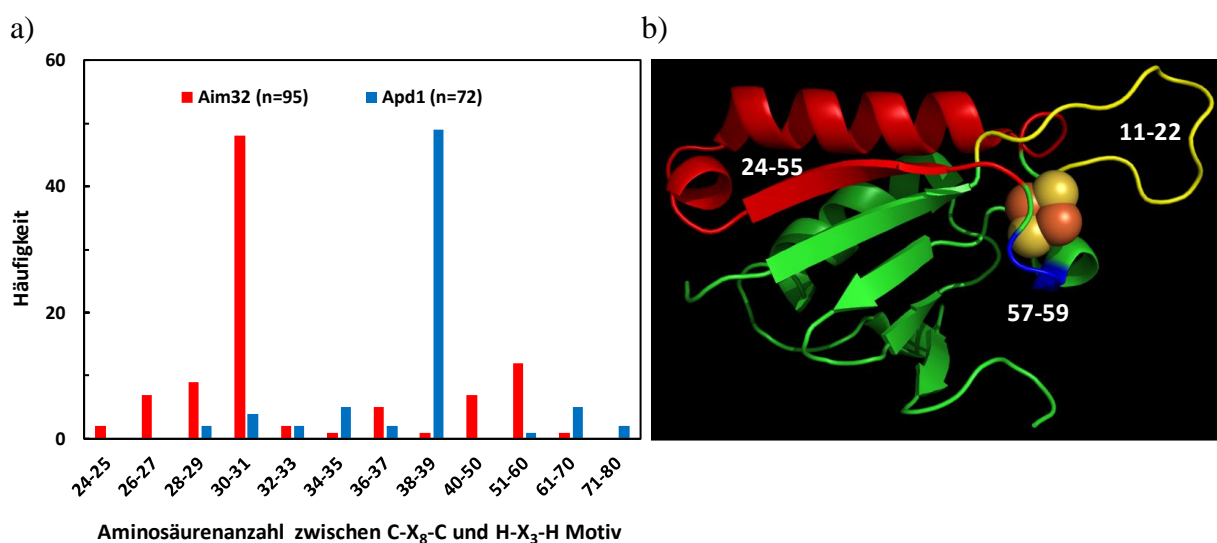


Abbildung 2.39: Strukturuntersuchungen in Apd1 und Aim32. a) Anzahl der Aminosäuren zwischen dem C-X₈-C und dem H-X₃-H Motiv in der Aminosäuresequenz. Rot: Aim32 (95 Sequenzen) und blau: Apd1 (72 Sequenzen); b) A-Kette des TLF aus *A. aeolicus* inklusive des Eisen-Schwefel-Clusters (gelbe und braune Kugeln). Gelb: C-X₁₂-C, rot: C-X₃₂-H und blau: C-X₃-C (Programm: PyMOL; PDB 1F37).

Somit scheint in Apd1-Proteinen ein größerer Loop zwischen den beiden clusterbindenden Motiven zu liegen als in Aim32. In Abbildung 2.39 b) ist eine 3D-Grafik der A-Kette des TLF aus *A. aeolicus* dargestellt. Darin sind die unterschiedlichen Loops farblich markiert. Die Aminosäuren 11 bis 22 (gelb) sind die Aminosäuren des C-X₁₂-C-Motivs, welches in Apd1 und Aim32 immer nur acht variable Aminosäuren enthält. Im Bild deutlich zu erkennen ist auch, dass dieser Loop auch in verkürzter Version, wie in Apd1 und Aim32 mit acht Aminosäuren, gut den Fe/S-Cluster binden kann. In rot sind die Aminosäuren 24 bis 55 (32 Aminosäuren) hervorgehoben, welche der variablen Anzahl zwischen dem Cystein- und dem Histidin-Motiv entsprechen. In Apd1 und Aim32 kann die Verbindung zwischen der α -Helix und dem β -Faltblatt am linken Bildrand vermutlich in der Länge variiert werden, wodurch hier eine deutlich größere Varianz (24-75) zu finden ist. Als letztes ist das blaue C-X₃-C-Motiv (AS 57-59) hervorgehoben, welches in Apd1 und Aim32 immer dem oben beschriebenen **HXGGH** und somit ebenso drei Aminosäuren entspricht. In der abgebildeten Struktur ist gut zu erkennen, dass die beiden Loops, welche die clusterbindenden Liganden (gelb und blau) enthalten, nah am Eisen-Schwefel-Cluster liegen, welcher durch gelbe und braune Kugeln dargestellt ist.

3. Diskussion und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die spektroskopische und elektrochemische Untersuchung von TLF-artigen Proteinen aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Aufgrund vorangegangener bioinformatischer Studien konnten zwei bisher weitgehend unerforschte Proteine, Apd1 und Aim32, als mögliche Eisen-Schwefel-Proteine identifiziert werden. Diese beiden Proteine weisen in ihrem C-Terminus eine geringe Sequenz-Identität zu den TLF's auf, welche einen Fe/S-Cluster binden können. Daher konnte vermutet werden, dass auch die beiden unerforschten Hefeproteine solche Cluster binden könnten. Bei Apd1 wurde ein zusätzlicher Hinweis gefunden, dass es mit einer C-terminalen Erkennungssequenz, einem endständigen Tryptophan, ausgestattet ist, welche beim Clustertransfer in der CIA-(*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*) Maschinerie von großer Bedeutung ist (Greth, persönliche Mitteilung).

Daher wurden die in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine sowie ein Referenzprotein, das Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus*, zunächst kloniert und, nach heterologer Genexpression in *E. coli*, isoliert und aufgereinigt. Bei allen untersuchten Proteinen konnten mittels der UV/Vis-Spektren Hinweise auf einen enthaltenen $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster gefunden werden. Die Charakterisierung der Proteine auf den Eisen- bzw. säurelabilen Schwefelgehalt wies anschließend ebenfalls auf den Clustertyp hin. Allerdings waren deutliche Unterschiede in der Menge des erhaltenen Proteins zu verzeichnen. Bei Apd1 konnte bis zu dreifach mehr Protein pro Gramm *E. coli*-Zellen isoliert werden als bei Aim32. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Fokus auf Apd1 gelegt. Beide Proteine wurden einer nativen Molekülmassenbestimmung unterzogen und als Monomere von ca. 37 kDa bestimmt. Zusätzliche Banden in der SDS-PAGE konnten im MALDI posttranslationalen Modifikationen zugeordnet werden. Diese konnten auf den enthaltenen His-Tag zurückgeführt werden, welcher phosphogluconoyliert und anschließend teilweise dephosphoryliert wurde. Um homogeneres Protein zu erhalten, könnte in Zukunft eine modifizierte Aufreinigung nach der Behandlung von His₆-TEV-Apd1 mit der TEV-Protease helfen. Durch die unterschiedlichen pI-Werte von Apd1 (6,86), dem angehängten Tag (6,56) und der TEV-Protease (9,6) könnte zunächst mit einem Anionentauscher die TEV-Protease entfernt werden. Dabei würde der Tag zusammen mit Apd1 eluiert werden. Anschließend könnte durch Gel-Permeationschromatographie Apd1 (37 kDa) vom abgeschnittenen Tag (2,4 kDa) getrennt werden.

Der Vergleich von Apd1 bzw. Aim32 mit dem TLF aus *Aquifex aeolicus* (vgl. Abb. 2.15) resultierte in der Feststellung, dass vier hochkonservierte Aminosäuren des Apd1 bzw. Aim32 (zwei Cysteine und zwei Histidine) ähnliche Positionen innehatten, wie die vier clusterbindenden Cysteine im TLF. Daher wurden für Apd1 die Histidine in dieser Arbeit jeweils einzeln (H255C und H259C) oder beide gleichzeitig (H255C/H259C) zu Cysteinen mutiert. Somit konnte der Effekt dieses Austausches überprüft werden und gleichzeitig mögliche Probleme einer Ersetzung durch Alanin, einer Aminosäure, die nicht fähig ist, einen Cluster zu binden, umgangen werden.

Alle drei Mutanten konnten erfolgreich in großen Mengen isoliert werden. Die Farben der Proteinlösungen zeigten allerdings große Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Apd1 und untereinander. Der Wildtyp ist rot gefärbt, die Doppelmutante H255C/H259C ist braun und die Einzelmutanten H255C und H259C nehmen eine Farbe zwischen diesen beiden Extremen an. Nach Aufnahme der UV/Vis-Spektren (pH 9,0) zeigten sich diese Unterschiede auch deutlich in veränderten Spektren (vgl. Abb. 2.16), wobei alle mehrere Maxima enthielten, die für $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster typisch sind. Somit können bereits an diesem Punkt die zwei Histidine als potentielle Bindungspartner des Fe/S-Clusters vermutet werden. Zwischen den beiden Einzelmutanten sind ebenfalls Unterschiede im Verlauf der Spektren zu erkennen und diese sind auch bei anderen pH-Werten, z. B. bei pH 8,0 oder pH 10,5 deutlich (Abb. 3.1). Somit sind diese Änderungen nicht damit zu erklären, dass die Mutanten durch die unterschiedlichen pK_S -Werte ihrer Histidinliganden bei pH 9,0 in einer anderen Protonierung vorliegen, sondern weisen möglicherweise auf einen leicht zugänglichen und einen etwas verdeckteren Histidinrest hin. Eine andere Erklärung wäre, dass ein Histidin über N_δ und das andere über N_ϵ gebunden sein könnte. Eine solche Bindung über N_ϵ ist beispielsweise in Hämoproteinen oder Hydrogenasen zu finden (Rotsaert *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 1998). Auch im N5-Cluster ($[4\text{Fe-4S}]$) aus einer Untereinheit des Komplex I aus *T. thermophilus* wurde eine N_ϵ -Bindung nachgewiesen (Sazanov & Hinchliffe, 2006). Die Gehälter der Mutanten an Eisen bzw. säurelabilem Schwefel sind niedriger als im Wildtyp-Protein. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass durch eine veränderte Clusterkoordination der eingebaute Fe/S-Cluster einer Mutante in der Regel instabiler ist als im Wildtyp des entsprechenden Proteins. Dadurch liegen in den Mutanten im Vergleich zu Apd1 mehr Proteinmoleküle in Apoform, also ohne eingebauten Fe/S-Cluster vor.

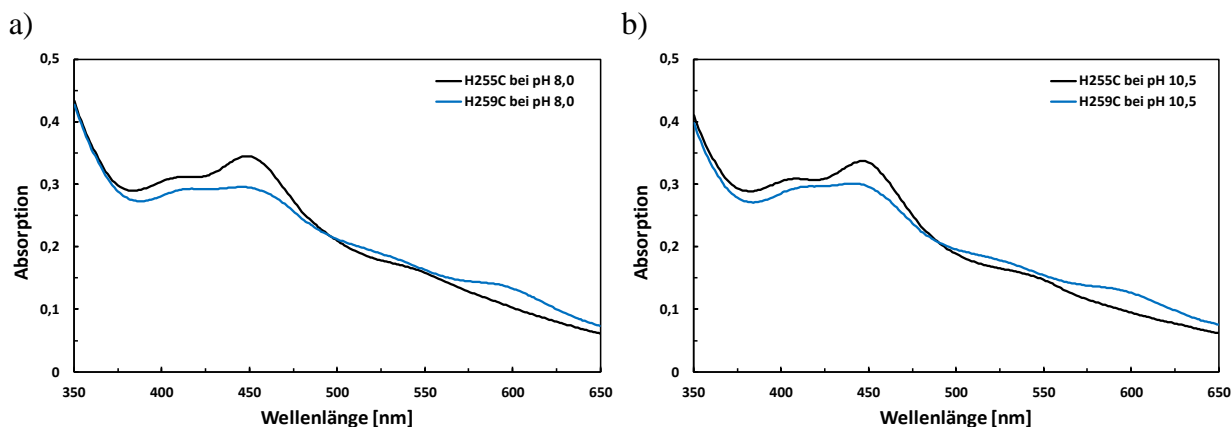


Abbildung 3.1: UV/Vis-Spektren der Einzelmutanten bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt sind jeweils die Spektren der Mutante H255C (schwarz) und der Mutante H259C (blau). a) pH 8,0; b) pH 10,5.

In der ESR-Spektroskopie wurden mit Natriumdithionit reduzierte Proteinproben des Wildtyps und aller Mutanten bei 77 K gemessen. Grundsätzlich zeigten alle Mutanten unterschiedliche Spektren bezüglich ihrer g -Werte und Linienbreiten (vgl. Abb 2.17). Sie sind für die verschiedenen Proteine mit unterschiedlichen Referenzproteinen vergleichbar. Dabei sind vor allem H255C und H259C sehr ähnlich zu mitoNEET und H255C/H259C weist vergleichbare g -Werte

zu denen des *A. aeolicus*-TLFs auf. Apd1 hingegen zeigt trotz der beiden Histidine als potentiellen Liganden zwar Ähnlichkeiten zu Rieske-Zentren, hat allerdings v. a. einen höheren g_z -Wert als alle bekannten Rieske-Zentren. Die g -Werte von Apd1 sind: 2,009, 1,907 und 1,862, die des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus* beispielsweise sind: 2,02, 1,90, 1,80 (Fee *et al.*, 1984). Dies könnte möglicherweise an den verschiedenen Proteinsequenzen und den unterschiedlichen Proteinstrukturen liegen. Rieske-Zentren haben eine charakteristische Konsensussequenz von **C-X-H-X₁₅₋₄₇-C-X₂-H**, Apd1 und Aim32 können dagegen mit einer Sequenz von **C-X₈-C-X₂₄₋₇₅-H-X₃-H** beschrieben werden. In letzteren sind in der Aminosäuresequenz also zuerst die beiden Cysteine und danach die beiden Histidine zu finden, wohingegen in Rieske-Zentren die Liganden der einzelnen Fe-Ionen abwechselnd in der Sequenz vorkommen.

Ein weiterer aussagekräftiger Vergleichswert in der ESR-Spektroskopie ist der gemittelte g_{av} -Wert eines Spektrums. Tabelle 3.1 zeigt einen Überblick über die gemittelten g -Werte (g_{av}) der Proteine dieser Arbeit mit denen von Referenzproteinen. Hierbei zeigt sich, dass Apd1 mit einem Mittelwert von 1,926 noch im Bereich der Rieske-Proteine- und Rieske-Zentren (Link, 1999) liegt, wenn auch am oberen Rand. Die beiden Einzelmutanten besitzen g_{av} -Werte von 1,938 (H255C) bzw. 1,945 (H259C), welche eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem Wert 1,947 von mitoNEET (Dicus *et al.*, 2010) haben. Dadurch kann hier eine Koordination des [2Fe-2S]-Clusters mit drei Cysteinen und einem Histidin, ähnlich der in mitoNEET, vermutet werden. Die Doppelmutante (H255C/H259C) mit einem g_{av} -Wert von 1,961 zeigt eine hervorragende Übereinstimmung mit [2Fe-2S]-Ferredoxinen, die im Bereich von 1,96 (Link *et al.*, 1996) liegen bzw. dem TLF in HydC mit einem g_{av} von 1,958 (Birrell *et al.*, 2016). In der Doppelmutante binden also wahrscheinlich vier Cysteine den [2Fe-2S]-Cluster.

Tabelle 3.1: Vergleich der g_{av} -Werte. Es werden die Werte des Wildtyp-Proteins und der Mutanten mit denen der [2Fe-2S]-Referenzproteine aus der Literatur verglichen.

Protein	g_{av}	g_{av} der Referenzproteine
Apd1	1,926	Rieske-Proteine (Link, 1999) 1,88 - 1,92
H255C	1,938	mitoNEET (Dicus <i>et al.</i> , 2010) 1,947
H259C	1,945	
H255C/H259C	1,961	[2Fe-2S]-Ferredoxine (Link <i>et al.</i> , 1996) 1,96 TLF in HydC (Birrell <i>et al.</i> , 2016) 1,958

In Abbildung 3.2 ist ein Gibson Plot dargestellt. Darin sind die Mittelwerte der g -Werte von Proteinen bekannter [2Fe-2S]¹⁺-Clusterkoordination gegen die Rhombizität entlang der z-Achse $[300(g_y - g_z)/(2g_x - g_y - g_z)]$ aufgetragen. Die grauen Symbole sind Cluster mit einer Koordination durch vier Cysteine, rot sind solche mit drei Cysteinen und einem Histidin und blau sind Rieske-

artige Koordinationen mit zwei Cysteinen und zwei Histidinen. Als offene Symbole sind die Werte von Apd1 und seinen Mutanten eingezeichnet. Es ist gut zu erkennen, dass Apd1 mit seinen Werten eher einem Rieske-Protein ähnelt als beispielsweise einem [2Fe-2S]-Ferredoxin, bei denen die g_{av} -Werte deutlich höher sind als in Rieske-Proteinen. Obwohl der Wert für WT-Apd1 auf der extrapolierten Geraden der bekannten g_{av} -Werte für Rieske-Koordination liegt, ist zu erkennen, dass Apd1 andere Eigenschaften zu haben scheint wie ein Rieske-Zentrum, da seine Rhombizität viel niedriger ist als alle Literaturwerte. Für die Mutanten hingegen ist eine deutlich größere Ähnlichkeit mit [2Fe-2S]-Clustern bekannter Koordination festzustellen. So liegt die Doppelmutante H255C/H259C sehr gut inmitten der Literaturwerte verschiedener [2Fe-2S]-Ferredoxine. Auch die Einzelmutante H255C ist in ihrem g_{av} -Wert vergleichbar mit Proteinen mit einer Clusterkoordination aus drei Cysteinen und einem Histidin. Für die zweite Einzelmutante H259C ist wie beim WT-Apd1 zu beobachten, dass sie zwar auf der extrapolierten Linie liegt, die Rhombizität aber viel geringer ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Histidin an Position 255 dem Cluster andere Eigenschaften verleiht. Womöglich ist dies ein Hinweis auf eine unterschiedliche Bindung der Histidine. So könnte zum Beispiel H259 wie in Rieske-Zentren über N_{δ} und H255 im Gegensatz dazu über N_{ϵ} gebunden sein.

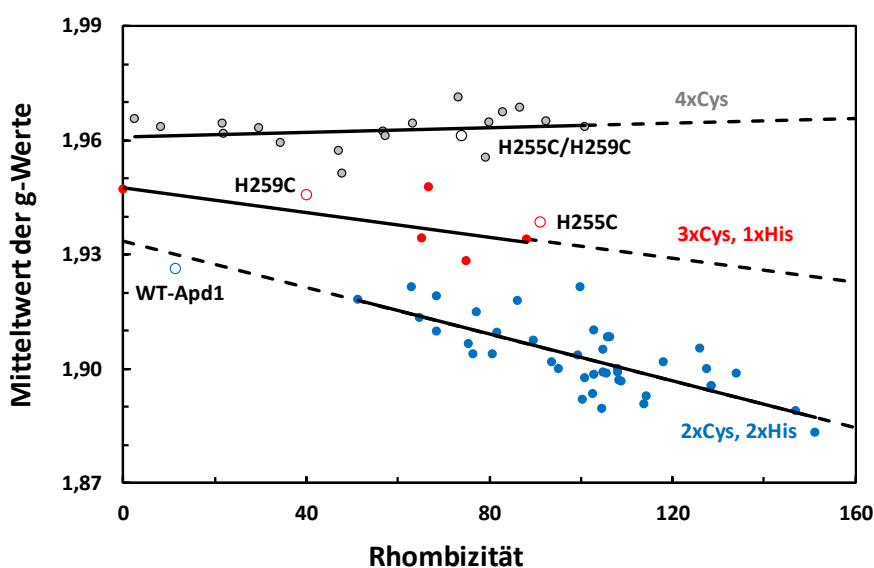


Abbildung 3.2: Gibson Plot. Aufgetragen sind die Mittelwerte der g -Werte gegen die Rhombizität entlang der z-Achse $[300(g_y - g_z)/(2g_x - g_y - g_z)]$ für [2Fe-2S]¹⁺ Cluster bekannter Koordination (geschlossene Symbole) bzw. WT-Apd1 und seinen Mutanten (offene Symbole). Die gestrichelten Bereiche der Linien sind Extrapolationen. Diagramm zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. J. Pierik.

Ein weiterer auffälliger Punkt in den Ergebnissen der ESR-Spektroskopie ist der Unterschied der beiden Einzelmutanten, wobei bemerkt werden muss, dass bei H259C zwei verschiedene ESR-Signale gefunden wurden. Auch dies könnte aus einer unterschiedlichen Oberflächenexposition der Histidine oder unterschiedlicher Bindungsvarianten resultieren.

Da koordinierte Histidine am anderen Stickstoffatom protoniert bzw. deprotoniert werden können, wurde für alle Apd1- und *T. thermophilus* Rieske-Proteine in dieser Arbeit eine pK_S -Wert-Bestimmung der Histidinliganden im oxidierten Zustand durchgeführt. Dazu wurden die

UV/Vis-Spektren der Proteine in Puffern mit verschiedenen pH-Werten aufgenommen und die Änderungen im sichtbaren Bereich ausgewertet. Zunächst wurden die pK_S -Werte der Histidine in Apd1 und seinen Mutanten bestimmt. Für den Wildtyp, welcher im pH-Bereich zwischen 6,5 und 11,0 zuverlässige Spektren lieferte, konnten zwei pK_S -Werte bestimmt werden: $pK_{ox1} = 7,81 \pm 0,04$ und $pK_{ox2} = 9,74 \pm 0,07$. Diese Werte sind vergleichbar mit den beiden Werten der kurzen Variante des Rieske-Proteins (Konkle *et al.*, 2009), welche bei $7,87 \pm 0,17$ und $9,84 \pm 0,42$ liegen. Für die Einzelmutanten wurde aufgrund der Mutation eines der gebundenen Histidine im Cluster nur noch ein pK_S -Wert in den Messungen ermittelt. Für die H255C-Mutante wurde der pK_S -Wert $9,75 \pm 0,05$ erhalten und für H259C lag der pK_S -Wert bei $9,41 \pm 0,03$. Es ist somit nicht möglich die beiden gemessenen pK_S -Werte des Wildtyp-Apd1 jeweils einem bestimmten Histidin zuzuordnen, was bereits für das Rieske-Protein in der Literatur postuliert wurde (Ullmann *et al.*, 2002). Die Doppelmutante zeigte im überprüften pH-Bereich keinerlei pH-Abhängigkeit des UV/Vis-Spektrums. Dies ist zurückzuführen auf die vier gebundenen Cysteine, die nicht (de-)protonierbar und somit unabhängig vom pH-Wert sind. Alle Mutanten konnten nur im pH-Bereich zwischen 7,5 und 11 untersucht werden, da unter pH 7,5 Präzipitation auftrat und eine Auswertung unmöglich machte. Im Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus* konnte durch NMR-spektroskopische Untersuchungen herausgefunden werden, dass das Histidin an Position 154 zuerst deprotoniert wird (Hsueh *et al.*, 2010). Ähnliche Experimente könnten in Zusammenarbeit mit Prof. Mario Piccioli (CERM, Florenz, Italien) für Apd1 durchgeführt werden, wobei durch die höhere Molekülmasse und die sieben weiteren Histidine eine Zuordnung der Signale schwierig sein könnte.

Da der Cluster im Wildtyp-Protein im ESR-Spektrum bei verschiedenen pH-Werten im Bereich zwischen 5,5 und 11 nur leichte Änderungen bezüglich der g -Werte zeigte (vgl. Abb. 2.19), kann davon ausgegangen werden, dass die pK_{red} -Werte deutlich über 11 liegen müssen. Nachdem die pH-Stabilität zwischen pH 11 und pH 14 überprüft worden ist, könnte versucht werden die $pK_{red1,2}$ -Werte zu bestimmen.

Anschließend wurden die aus der Literatur bekannten Werte des Rieske-Proteins aus *T. thermophilus* gemessen, um die Genauigkeit der hier verwendeten Methode zu untersuchen. Im Fall der beiden längeren Proteine (TTRieske und His₆-TEV-TTRieske) wurden pK_S -Werte ermittelt, die geringfügig von den bekannten Literaturwerten des Rieske-Proteins abweichen. Im Fall des His₆-TEV-TTRieske kann der angehängte Tag für die unterschiedlichen Werte verantwortlich sein. Für TTRieske_short (ohne Tag) dagegen konnten nahezu identische Werte zu Konkle *et al.* (2009) erhalten werden (vgl. Kap. 2.5.2), die Methode wird deswegen als zuverlässig erachtet.

Mit Hilfe der Mössbauerspektroskopie sollte die Art des im Apd1 enthaltenen Clusters zweifelsfrei bestimmt werden, da zwei Arten der Koordination der Liganden möglich waren. Die Eisenionen könnten sich unterscheiden, indem ein Fe^{3+} von zwei Cysteinen und das andere Fe^{3+} von den beiden Histidinen gebunden ist. Die zweite Möglichkeit wäre eine identische Koordination beider Eisenkerne durch je einen Cystein- und einen Histidinliganden. Die Probe des oxidierten Apd1 zeigte eindeutig unterschiedliche Parameter ($\delta_1 = 0,24 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$,

$\Delta E_{Q1} = 0,54 \pm 0,02 \text{ mms}^{-1}$, $\delta_2 = 0,35 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$, $\Delta E_{Q2} = 1,03 \pm 0,01 \text{ mms}^{-1}$) für die beiden Fe^{3+} -Ionen. Somit hat der Apd1-[2Fe-2S]-Cluster ein Fe^{3+} , welches neben den verbrückenden Schwefelliganden zwei Cysteine bindet und ein Fe^{3+} , das stattdessen zwei Histidine und die verbrückenden Schwefelliganden koordiniert (vgl. Abb. 2.26). Im Mössbauerspektrum der reduzierten Proteinprobe konnte festgestellt werden, dass Apd1 einen paramagnetischen $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Cluster mit einem Grundzustand von $S = 1/2$ enthält (Auerbach, persönliche Mitteilung). Dies ist in guter Übereinstimmung zu den beobachteten ESR-spektroskopischen Ergebnissen.

Wegen der enthaltenen Histidinliganden und deren Fähigkeit entweder protoniert oder deprotoniert vorzuliegen, wurde versucht, der Effekt der unterschiedlichen Protonierungszustände auch mittels Mössbauerspektroskopie sichtbar zu machen. Tabelle 2.7 und Abbildung 2.28 zeigen deutlich, dass diese Unterschiede nachweisbar sind. Die Änderungen der Protonierungszustände bewirken eine leichte Verschiebung der Parameter, welche sich vor allem am bis-Histidin-koordinierten Eisen beobachten lassen. Mit steigendem pH wurde hier eine Verringerung sowohl der Isomerieverschiebung als auch der Quadrupolaufspaltung verzeichnet. Diese Proben wurden bereits stark aufkonzentriert für NIS- und NFS-Experimente am ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) in Grenoble durch Dipl. Biophys. Hendrik Auerbach (Arbeitskreis Prof. Dr. Schünemann, Fachbereich Physik, Fachrichtung Biophysik, TU Kaiserslautern) mit denen das Schwingungsverhalten der Eisenionen untersucht werden kann.

Ähnliche pH-abhängige Experimente wurden bereits für das Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus* durchgeführt (Kuila & Fee, 1986). Dabei wurden damals Proben bei pH-Werten von 7,8 und 10 gemessen. In beiden Fällen liegen allerdings Gemische zweier Spezies vor. Bei pH 7,8 ist dieses Gemisch fast äquimolar aus der diprotonierten (54 %) und der monoprotinierten (46 %) Version des Clusters, bei pH 10 liegt eine Verteilung von ca. 41 % des monoprotinierten und 59 % des deprotonierten Clusters vor. Daher wurde in dieser Arbeit versucht die einzelnen Zustände separat zu erzielen. Dafür wurden Proteinproben mit den pH-Werten 6,0, 8,5 und 10,5 hergestellt und gemessen. Bei pH 6,0 liegt mit 98 % hauptsächlich diprotonierter Cluster vor, bei pH 8,5 sind 75 % monoprotiniert und bei pH 10,5 sind 73 % der Cluster deprotoniert. Dadurch können zum ersten Mal die Mössbauerspektren der drei verschiedenen Zustände des Rieske-Proteins genauer ermittelt werden. Die Parameter ändern sich ähnlich wie bei Apd1. Bei steigendem pH-Wert werden die Werte für die Isomerieverschiebung und die Quadrupolaufspaltung für die Eisenkomponente mit den gebundenen Histidinen niedriger. Beim Eisenzentrum mit den Cysteinen ändern sich die Parameter kaum.

Alle drei Apd1-Mutanten konnten in ausreichender Menge isoliert und aufkonzentriert werden um Mössbauerspektroskopie durchzuführen. In Abbildung 3.3 ist zunächst der Vergleich des Mössbauerspektrums von mitoNEET mit denen der Einzelmutanten (H255C und H259C) von Apd1 dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Spektren sehr ähnlich sind. Sie können ebenso wie Wildtyp-Apd1 (vgl. Abb. 2.25) durch zwei Dubletts simuliert werden, die sich aber in ihren Parametern unterscheiden. Diese nehmen ähnliche Werte zu denen des mitoNEET-Clusters an,

besonders in der H259C-Mutante von Apd1 (vgl. Tab. 3.2). Wieder könnten mögliche Abschirmungseffekte durch das umgebende Proteingerüst oder eine unterschiedliche Bindungsart der Histidine die Unterschiede zwischen den beiden Einzelmutanten erklären.

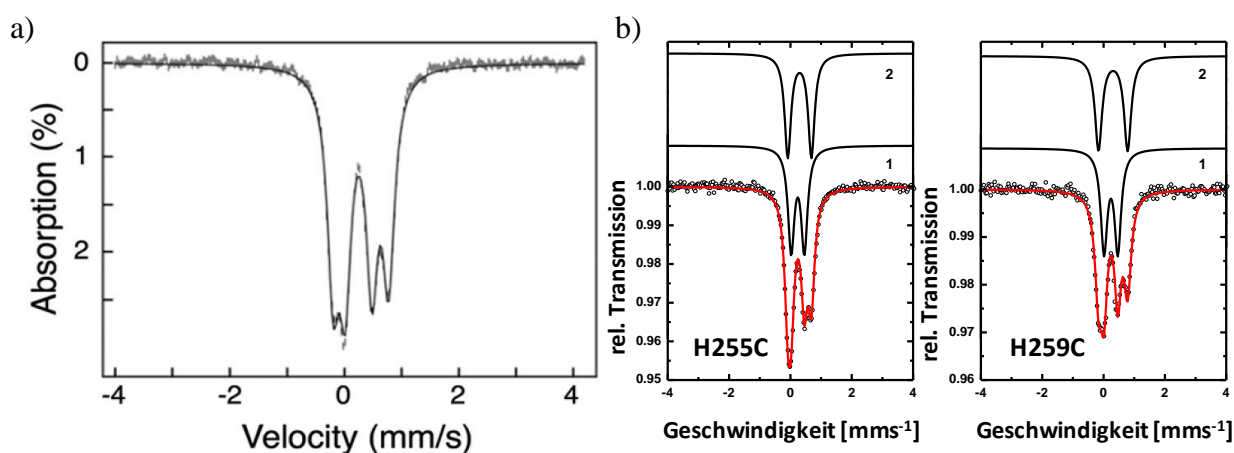


Abbildung 3.3: Vergleich der Mössbauerspektren von mitoNEET und den Einzelmutanten. a) Spektrum von mitoNEET bei 4,2 K und 60 mT (Ferecatu *et al.*, 2014); b) Spektren der H255C- und H259C-Mutante von Apd1 bei 77 K ohne Feld.

Tabelle 3.2: Vergleich der Parameter von mitoNEET mit denen der Histidinmutanten von Apd1. Referiert sind die Werte für mitoNEET aus (Ferecatu *et al.*, 2014).

Komponente	H255C (77 K)		H259C (77 K)		mitoNEET (4,2 K)	
	1	2	1	2	1	2
δ (mms ⁻¹)	0,24	0,30	0,24	0,31	0,26	0,30
ΔE_Q (mms ⁻¹)	0,43	0,77	0,45	0,95	0,47	0,96

Die Mössbauerparameter der Doppelmutante H255C/H259C werden in Tabelle 3.3 sowohl mit dem pflanzenartigen Ferredoxin Fd1 aus *A. aeolicus* als auch mit dem TLF aus HydC verglichen.

Tabelle 3.3: Vergleich der Parameter zweier Ferredoxine mit denen der Doppelmutante. Referiert sind die Werte des pflanzenartigen Ferredoxins Fd1 aus *A. aeolicus* (Meyer *et al.*, 2002) und des TLF aus HydC (Birrell *et al.*, 2016).

Komponente	H255C/H259C (77 K)		Ferredoxin (4,2 K)		TLF in HydC (80 K)	
	1	2	1	2	1	2
δ (mms ⁻¹)	0,26	0,28	0,26	0,28	0,29	0,31
ΔE_Q (mms ⁻¹)	0,39	0,58	0,62	0,76	0,54	0,86

Der Vergleich der Parameter zeigt, dass in der Doppelmutante von Apd1 Ähnlichkeiten zu Ferredoxinen bestehen. Die Isomerieverschiebungen und Quadrupolaufspaltungen sind zwar etwas niedriger als in den gezeigten Beispielen des pflanzenartigen Ferredoxins oder des TLF's, liegen aber im typischen Bereich von [2Fe-2S]²⁺-Clustern, die von vier Cysteinen koordiniert sind

(Pandelia *et al.*, 2015). In Abbildung 3.4 sind die experimentellen Mössbauerspektren zusammengefasst dargestellt.

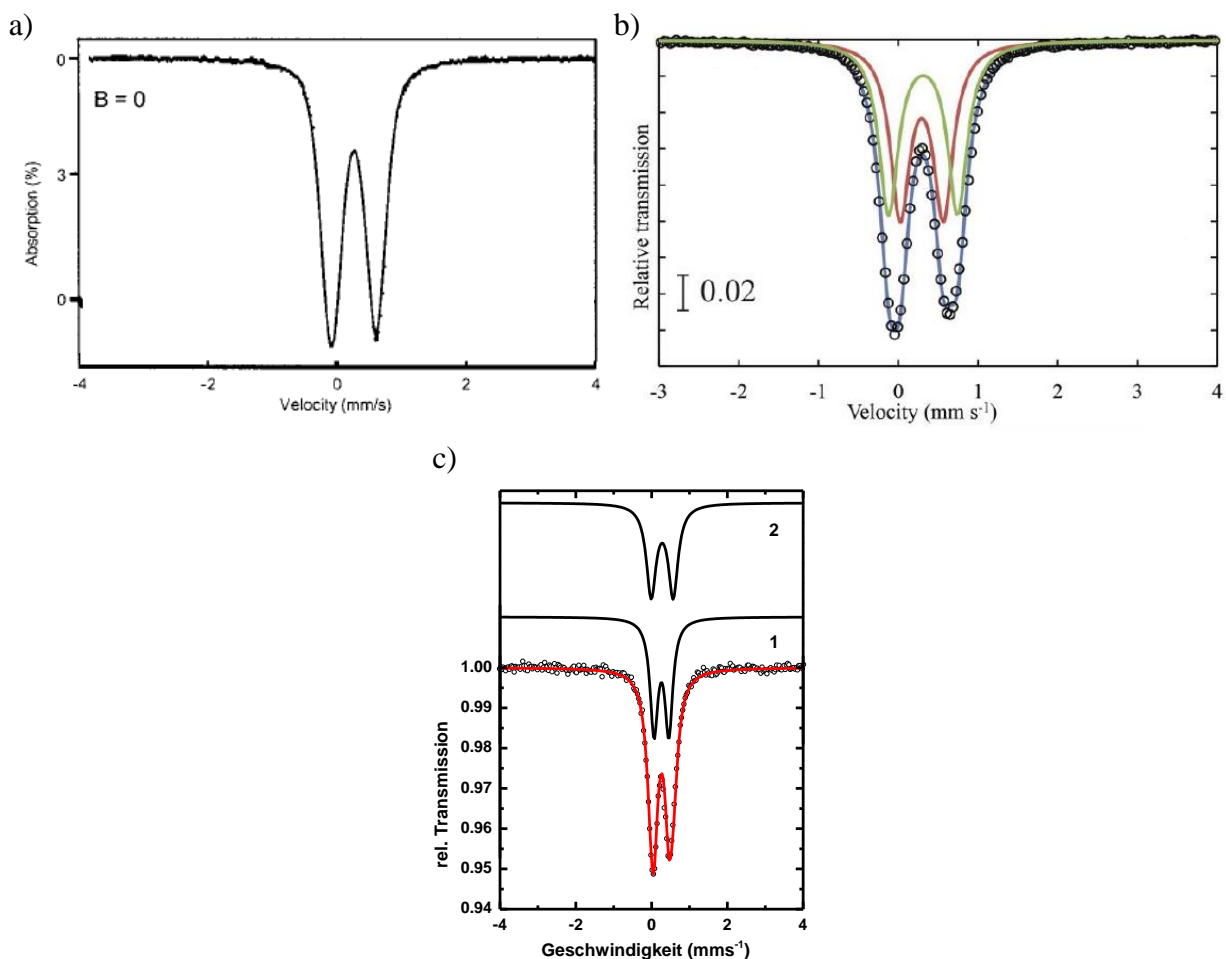


Abbildung 3.4: Vergleich der Mössbauerspektren zweier Ferredoxine und dem der Doppelmutante. a) Spektrum des oxidierten pflanzenartigen Ferredoxins Fd1 aus *A. aeolicus* bei 4,2 K ohne Feld. Abbildung modifiziert nach (Meyer *et al.*, 2002); b) Spektrum des oxidierten TLF's aus Hyd C bei 80 K ohne Feld (Birrell *et al.*, 2016); c) Spektrum der H255C/H259C-Mutante von Apd1 bei 77 K ohne Feld.

In der Literatur werden Redoxpotentiale normalerweise bei einem pH-Wert von 7,0 angegeben. Da Apd1 allerdings im pH-Bereich zwischen 8 und 9 seine höchste Stabilität aufweist (vgl. Kap. 2.2.6), wurde sein Redoxpotential zunächst bei pH 8,5 gemessen. Die Bestimmung erfolgte durch eine Titration mit Natriumdithionit in Anwesenheit von Redoxmediatoren in einer anaeroben Kammer und einer anschließenden Messung der genommenen Proben im ESR-Spektrometer bei 77 K. Dabei wurde ein Potential von -188 mV erhalten. Rieske-Proteine aus *bc*₁- und *bc*₆-Komplexen besitzen meist deutlich höhere Redoxpotentiale mit Werten zwischen +265 und +320 mV (Zu *et al.*, 2003; Link, 1999). Da bereits über UV/Vis-Spektroskopie eine pH-Abhängigkeit festgestellt worden war, wurde auch das Redoxpotential von Apd1 bei verschiedenen pH-Werten (zwischen pH 7 und 10) überprüft (vgl. Abb. 2.32). Dabei konnte ebenfalls eine pH-Abhängigkeit beobachtet werden. Bei pH 7 besitzt Apd1 ein Potential von -173 mV. Es liegt also im Bereich von Rieske-Zentren der Rieske-Dioxygenasen (ca. -150 mV), welche sich allerdings von Apd1 durch viel höhere pK_s-Werte (9,8 und 11,5)

unterscheiden (Zu *et al.*, 2003). In Abbildung 3.5 sind Bereiche von Redoxpotentialen verschiedener Clustertypen, Proteine und Koordinationen zusammengefasst. Apd1 hat im Vergleich zu TLF-Zentren ein höheres Potential.

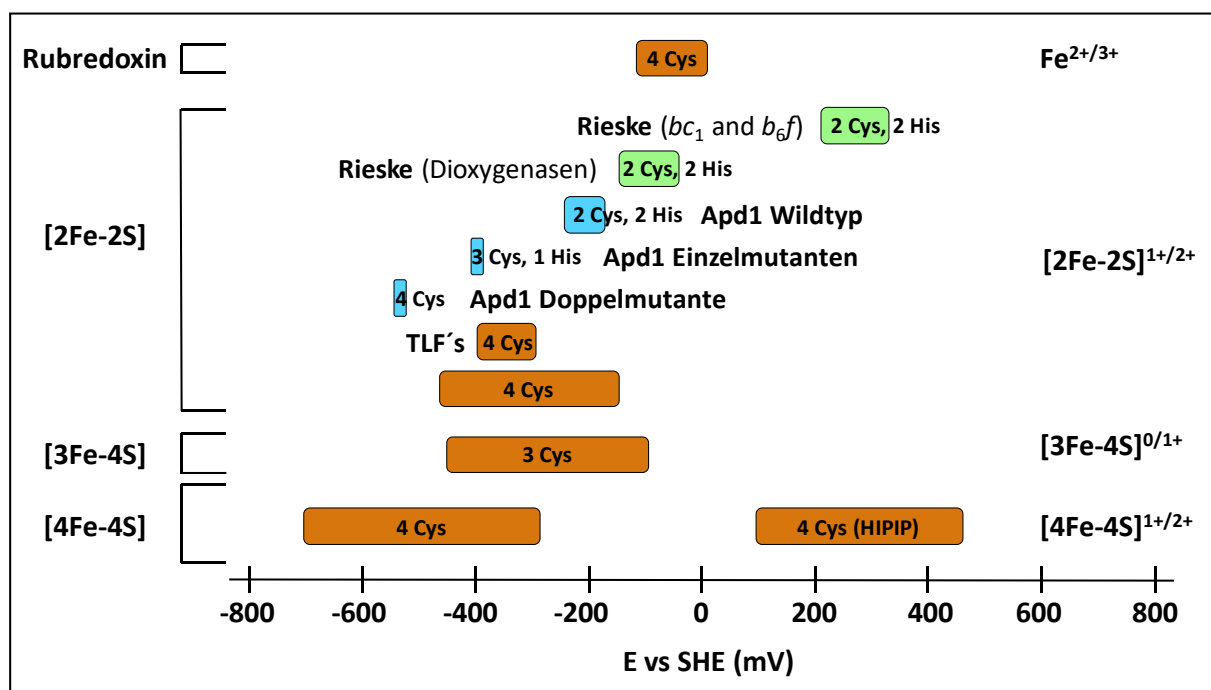


Abbildung 3.5: Übersicht der Redoxpotentiale von Fe/S-Zentren. Dargestellt sind die Bereiche der Redoxpotentiale verschiedener Clustertypen, Proteine und Koordinationen. In blau ist das Redoxpotential von Apd1 und seinen Mutanten dargestellt. Abbildung modifiziert nach (Bak & Elliott, 2014).

Bei der Bestimmung der Redoxpotentiale der Mutanten wurde ebenfalls bei pH 8,5 gearbeitet. Es ergaben sich für die beiden Einzelmutanten deutlich niedrigere Potentiale als beim Wildtyp (H255C: -415 mV; H259C: -397 mV). Dieses Absinken des Potentials um bis zu 300 mV beim Austausch von einem Histidin durch ein Cystein wurde auch in der Literatur im Rieske-Ferredoxin aus *Sulfolobus solfataricus* und im mitoNEET berichtet (Kounosu *et al.*, 2004; Bak *et al.*, 2009). Da in der Doppelmutante selbst bei -450 mV vs. SHE keine Signale messbar waren, liegt ein Redoxpotential unter -500 mV vor. Dies ist in Übereinstimmung mit der Abnahme des Redoxpotentials von Wildtyp-Apd1 zu den Einzelmutanten von ca. 200 mV. In der Zwischenzeit wurden in der Arbeitsgruppe Pierik weitere Messungen an der Doppelmutante durchgeführt und es konnte ein Redoxpotential von -530 mV bei pH 8,6 ermittelt werden (Bechtel, persönliche Mitteilung).

Eine weitere Möglichkeit die Eigenschaft und Funktion von Histidinen in Proteinen zu untersuchen, ist die Reaktion mit DEPC (Diethylpyrocarbonat). Dieses Reagenz reagiert bevorzugt mit deprotonierten Histidinen und führt dort eine Carboxyethylierung am Ring-Stickstoff durch. Diese kann sich anschließend, wie beispielsweise beim Rieske-Protein, in ESR-Spektren durch die Verschiebung der *g*-Werte bemerkbar machen (Ohnishi *et al.*, 1994). In Veröffentlichungen, in denen das Rieske-Protein mit DEPC behandelt wurde, kam es zu einer Reduktion des Clusters ohne zusätzliches Reduktionsmittel (Karagas *et al.*, 2014; Konkle *et al.*, 2010). Da sich in dieser

Arbeit der Cluster von Apd1 nicht allein durch Behandlung mit DEPC reduzieren ließ, mussten die Proben zur Untersuchung im ESR-Spektrometer zusätzlich mit Natriumdithionit reduziert werden. Daher wurde zunächst überprüft, in welcher Reihenfolge die beiden Reagenzien zugegeben werden müssen und, im Fall von DEPC, wie lange die Inkubation stattfinden muss, um einen möglichst starken Effekt beobachten zu können. In Abbildung 2.34 a) ist deutlich zu erkennen, dass eine DEPC-Behandlung nur dann zu einer Verschiebung führt, wenn erst mit DEPC behandelt und danach reduziert wird. Wird die Reduktion zuerst durchgeführt, liegen die Histidine im Protein aufgrund der hohen pK_{red} -Werte ($pK_{\text{red}} > 11$, Kap. 2.4.3) nahezu nur diprotoniert vor und können somit nicht mehr oder nur sehr langsam mit DEPC reagieren. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Behandlung mit DEPC nicht dauerhaft ist. Wird längere Zeit mit DEPC inkubiert, kommt es zunächst zu einer immer stärkeren Verschiebung des g_y -Wertes. Bei länger andauernder Inkubation ist zu erkennen, dass die g -Werte wieder Werte annehmen, die sich eher der unbehandelten Probe annähern. Die Modifikation mit DEPC ist nicht stabil und es kann eine ungefähre Halbwertszeit von 60 Minuten abgeschätzt werden. Für die weiteren Versuche wurde also eine Inkubation mit DEPC für zehn Minuten und eine anschließende Reduktion des Proteins als optimal angesehen. Alle diese Vorversuche wurden aufgrund der Instabilität des Reagenzes in hohen pH-Werten (Berger, 1975) bei einem pH von 6,5 (MES) durchgeführt. Da DEPC allerdings bevorzugt deprotonierte Histidine angreift, wurden daraufhin auch Proteinproben mit höheren pH-Werten getestet. Im Vergleich zu pH 6,5 sind die g -Werte der Proben bei pH 8,5 (TAPS) und bei pH 10,5 (CAPS) nach Behandlung mit DEPC jedoch weniger weit verschoben (vgl. Abb. 2.35 a)). Dies könnte verschiedene Gründe haben. Einerseits ist DEPC, wie erwähnt, bei höheren pH-Werten instabiler und könnte deshalb möglicherweise das Protein nicht mehr modifizieren. Ein anderer denkbarer Grund könnte auch die Instabilität des entstehenden Produktes sein (Miles, 1977; Karagas *et al.*, 2014). Möglich wäre auch, dass nicht in allen Fällen, wie angenommen beide Histidine, sondern nur ein Histidin modifiziert wird und somit unterschiedlich große Differenzen auftreten. Diese Möglichkeit könnte mittels Massenspektrometrie unter Variation der DEPC-Konzentration und der Inkubationszeit näher untersucht werden.

Daraufhin wurden weitere pH-Werte im sauren Bereich ausgewählt, um die Auswirkung der DEPC-Modifikation auf die ESR-Spektren von Apd1 zu untersuchen. Dabei fällt auf, dass es bei pH 6,5 zur stärksten Verschiebung der g -Werte kam (vgl. Abb. 2.35 b)). Obwohl der optimale Arbeitsbereich im neutralen bis leicht sauren Bereich liegt (Berger, 1975; Loosemore & Pratt, 1976), gibt es in der Literatur auch Untersuchungen, bei denen die Modifikationen bei pH 4 untersucht worden sind (Melchior & Fahrney, 1970). Die Reaktion mit Diethylpyrocarbonat verläuft dabei deutlich langsamer als in höheren pH-Werten. Es wurde allerdings hervorgehoben, dass bei diesem pH-Wert keine oder nur wenige Histidine, sondern nur die Aminogruppen der Proteine, modifiziert werden (Melchior & Fahrney, 1970). Dies könnte also ein Grund sein, wieso bei den durchgeführten Versuchen pH 6,5 als der effektivste pH-Wert zur DEPC-Modifikation von clustergebundenen Histidinen wie bei Apd1 nachgewiesen werden konnte. In Abbildung 2.36 sind die gemessenen g_y -Werte bei verschiedenen pH-Werten für den Apd1-Cluster mit bzw. ohne DEPC-Behandlung dargestellt. Da die Bestimmung der g -Werte

bei niedrigeren Proteinkonzentrationen durch Spektren mit einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis erschwert ist, könnte eine erneute Bestimmung mit höherer Proteinkonzentration genauere Ergebnisse bezüglich der Verschiebungen liefern. Da bei den Studien mit DEPC mit Hilfe der ESR-Spektroskopie mit reduziertem Protein gearbeitet werden muss, sind auch hier Fehlerquellen nicht auszuschließen. So könnte es möglicherweise zu einer Reaktion des Natriumdithionits mit DEPC kommen oder das Produkt ist nicht stabil genug, um verlässliche Werte zu ermitteln. Daher scheint eine Untersuchung mittels UV/Vis-Spektroskopie, bei der mit dem oxidierten Cluster gearbeitet sowie die Zeitspanne deutlich verkürzt werden kann, eine gute Alternative zu sein, um die DEPC-Modifikationen an den clusterbindenden Histidinen nachzuvollziehen.

Im Fall der mit DEPC-behandelten Mutanten wurden bis jetzt bei pH 6,5 nur Spektren für die H259C-Mutante aufgenommen. Diese zeigte allerdings keine Unterschiede zwischen der unbehandelten und der modifizierten Probe. Für die zweite Einzelmutante (H255C) sowie die Doppelmutante (H255C/H259C) konnten bei pH 6,5 bisher keine Signale erhalten werden. Ein Grund für die fehlende Reaktivität der H259C-Mutante mit DEPC könnte der pK_{ox} -Wert sein. Dieser liegt bei 9,41 (H259C). Dadurch liegt das Histidin im Cluster beim gewählten pH-Wert von 6,5 zu mehr als 99 % protoniert vor und die DEPC-Modifikation wird sehr langsam sein. Beim Wildtyp-Apd1 mit den pK_{ox} -Werten von 7,81 und 9,74 liegen bei pH 6,5 schon ca. 5 % der Histidine deprotoniert vor und reagieren somit schneller mit DEPC. Eine Alternative wäre also die Mutanten bei einem höheren pH-Wert mit DEPC zu behandeln und die Auswirkung auf das ESR-Spektrum zu überprüfen.

Eine Kristallstruktur ist bei jedem unbekanntem Protein ein wichtiger Schritt um die Besonderheiten und Funktionen verstehen zu können. Innerhalb dieser Arbeit war es nicht möglich, Kristalle zu erhalten, mit denen eine Röntgenkristallstrukturanalyse möglich gewesen wäre. Die bisher erhaltenen Kristalle konnten aufgrund ihrer geringen Größe und Stabilität nicht zur weiteren Analyse genutzt werden. Ihre deutliche braune Färbung deutet aber darauf hin, dass es sich bei den erhaltenen Kristallen tatsächlich um Apd1-Kristalle mit Cluster und keine Salzkristalle handelte. Interessant ist, dass sie alle im sauren Bereich (pH 4-5,5) erhalten wurden, aber keinerlei Kristalle bei pH 8-9 zu sehen waren, wo das Protein stabiler ist. Nach der Analyse mittels MALDI-TOF könnte ein neuer Ansatz zur Kristallisation eine gekürzte Variante von Apd1 darstellen. Dazu würde zunächst wie beim Rieske-Protein eine partielle Proteolyse des Proteins durchgeführt. In einer anschließenden MALDI-TOF-Analyse könnten die stabilsten gekürzten Proteine bestimmt werden. Diese Proteine würden danach gezielt kloniert, isoliert und kristallisiert werden.

Die Koordination durch zwei Histidinreste wurde in dieser Arbeit durch vielerlei unterschiedliche Methoden untersucht. Nach Entdeckung des hochkonservierten **HXGGH**-Motivs, welches an ähnlicher Stelle zu den Cysteinen drei und vier in den TLF's liegt, wurden Mutationen dieser Histidine durchgeführt. Die Untersuchungen dieser Mutanten führten zu Änderungen in den UV/Vis-, ESR- und Mössbauerspektren des [2Fe-2S]-Clusters. Es wurde festgestellt, dass nach

jeder Mutation der vorhandenen Histidine zu Cysteinen, jeweils ein pK_s -Wert weniger und ein niedrigeres Redoxpotential detektiert werden konnten. All diese Aspekte, sowie die leichte Verschiebung der ESR-Signale nach Behandlung mit DEPC, welche auf eine Modifikation von clusterbindenden Histidinen hinweist, legen den Clustertyp in Apd1 mit zwei Histidinen und zwei Cysteinen nahe. In laufenden unveröffentlichten Studien (Blinn, persönliche Mitteilung) konnten C207, C216, H255 & H259 als Clusterliganden in *in-vivo*-Experimenten, unabhängig von dieser Arbeit, definiert werden. Zudem werden Studien durchgeführt, in denen die Bindungspartner sowie die Funktionen der beiden Proteine bestimmt werden sollen.

Alle beobachteten Unterschiede, die dennoch zwischen Apd1 und dem Rieske-Protein bestehen, könnten mehrere Ursachen haben. Zum einen besitzt Apd1, wie bereits erwähnt, eine andere Aminosäureabfolge als das Rieske-Protein. Zudem bestehen die Unterschiede in der Faltung, die beim C-Terminus von Apd1 und Aim32 den TLF-Proteinen ähnelt. Sobald für Apd1 eine Kristallstruktur erhalten wird, können genaue Aussagen über die Art der Bindung der Histidine getroffen werden. In Anlehnung an das Rieske-Protein (Link, 2006) könnte vermutet werden, dass bei Apd1 die Histidine ebenfalls über eine N_δ -Bindung an das Eisenatom koordinieren (vgl. Abb. 2.26). Möglicherweise könnten eines oder beide Histidine aber auch über das N_ϵ -Atom an den $[2Fe-2S]$ -Cluster binden. Außerdem könnten sie in der Ebene verdreht vorliegen, wodurch ebenfalls leichte Unterschiede in den spektroskopischen Eigenschaften auftreten würden. Um die Bindungsart der Histidine bereits genauer zu untersuchen, können NMR-, ENDOR- und Q-Band-HYSCORE-Messungen durchgeführt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Erforschung von Apd1 und Aim32 ist die Untersuchung ihrer Funktionen. In Anlehnung an Rieske-Zentren, deren Aufgabe Elektronentransport (Link, 1999) darstellt, könnte auch hier die Reduktion und Oxidation des $[2Fe-2S]$ -Clusters und die daraus resultierende Elektronenübertragung eine mögliche Funktion sein. Das sehr niedrige Potential von Apd1 lässt vermuten, dass allerdings andere Substrate mit einem niedrigen Potential an der Reaktion beteiligt sind. Möglicherweise ist auch ein weiteres konserviertes Histidin in der TLF-Domäne (H209) von Apd1 in den entsprechenden Reaktionsmechanismus involviert, wie dies z. B. in Dioxygenasen mit der Asparaginsäure ebenso der Fall ist.

$\Delta sod2$ -Zellen zeigen eine Anfälligkeit gegenüber dem Antimalariamedikament Primaquin. Die Überexpression von zwei Proteinen, Aim32 und Mcr1, konnte diese Sensibilität verringern und die Zellen schützen (Lalève *et al.*, 2016). In einer Studie von Lin *et al.* (2016) wurde Cbr1 als Reduktase für Dph3, einen Elektronenträger für ein SAM-Enzym, identifiziert. Als alternative Reduktasen wurden dabei Ncp1 und Mcr1 gefunden. Durch die ähnliche Wirkungsweise von Mcr1 und Aim32 in den Studien von Lalève *et al.* (2016), könnten Aim32 und Apd1 somit am gleichen Stoffwechselweg beteiligt sein wie Mcr1 und von der Reduktase reduziert werden.

Zu beachten ist auch, dass der untersuchte Fe/S-Cluster im C-terminalen Teil des Proteins lokalisiert ist. In der PDB (*Protein Data Bank*) ist bisher keine homologe Struktur zu den N-terminalen Aminosäuren 1–196 von Apd1 gespeichert. Möglicherweise ist der N-Terminus nicht nur

wichtig für die Ausbildung und Stabilität der Proteinstruktur, sondern beinhaltet einen weiteren Aspekt, der wichtig ist für die Funktion von Apd1. So ist beispielsweise auffällig, dass auch dort Cysteine und Histidine zu finden sind, die weitere Metallionen binden könnten. Insbesondere wäre die Bindung eines mononuklearen Eisens, wie es z. B. in Dioxygenasen zu finden ist, eine Möglichkeit (Dawson *et al.*, 2016; Wackett, 2002).

Um dies zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe bereits Versuche durchgeführt, in denen nur Teile des Proteins exprimiert und charakterisiert werden sollten (Jakob, 2015). Proteine, die nur aus dem N- bzw. nur dem C-Terminus von Apd1 bestanden, konnten nur in geringen Mengen exprimiert werden und enthielten keinen Fe/S-Cluster. Würde Apd1 ein mononukleares Zentrum enthalten, könnte dies eventuell durch die Verwendung von Imidazol während der Reinigung aus dem Protein entfernt worden sein. Um dies zu überprüfen, wäre eine Isolierung ohne Tag oder mit einem andersartigen Tag (z. B. Twin-Strep-Tag) mit anschließender Eisenquantifizierung notwendig.

Eine andere Möglichkeit ein mononukleares Eisen im Protein nachzuweisen, ist die Untersuchung mittels ESR-Spektroskopie nach Bildung eines NO (Stickstoffmonoxid)-Protein-Komplexes (Twilfer *et al.*, 1985; Wolfe *et al.*, 2001; Wackett, 2002). Dieser Komplex kann im Gegensatz zum mononuklearen Eisen (Fe^{2+}), welches in Proteinen keine ESR-Signale erzeugt, detektiert werden. Nach Bindung von NO an eine offene Bindungsstelle des Eisens wird in Mono- bzw. Dioxygenasen ein $S=3/2$ Zustand erhalten, welcher im Spektrum sehr starke Signale im Bereich von $g \approx 4$ zeigt, wobei die normalen Signale des [2Fe-2S]-Clusters bei $g \approx 2$ nicht beeinflusst werden. Da auch mononukleare Fe^{3+} -Ionen im ESR-Spektrum leicht zu identifizieren sind, könnte alternativ auch ein Oxidationsmittel eingesetzt werden, um eventuelle mononukleare Fe^{2+} im Protein zu Fe^{3+} zu oxidieren.

Eine weitere interessante Frage ist, ob auch mittels Mössbauerspektroskopie ein mögliches zusätzliches Eisenzentrum nachzuweisen wäre. Dazu müsste Apd1, wie in dieser Arbeit beschrieben, rekombinant exprimiert, isoliert und anschließend mit ^{57}Fe Eisen rekonstituiert werden (Bill *et al.*, 1981). Durch den Verlust des gebundenen Eisens während der Elution durch Imidazol könnte so möglicherweise das ^{57}Fe in dem mononuklearen Zentrum selektiv eingebaut werden.

Zusammengefasst handelt es sich bei Apd1 und Aim32 um eine neuartige Klasse von Proteinen mit einer C-terminalen Domäne, deren Faltung ähnlich zu TLF's ist, die aber gleichzeitig ein Rieske-artiges Zentrum beinhaltet. Daher wurden weitere bioinformatische Studien durchgeführt, um mehr Informationen über die Gruppe von Apd1- und Aim32-Proteinen zu erhalten. Als Basis diente nur der erweiterte Bereich um die clusterbindenden Liganden im C-Terminus. Die Proteine sind im Stammbaum in den meisten Fällen dadurch zu unterscheiden, dass Apd1-ähnliche Proteine meist ein C-terminales Tryptophan besitzen, Aim32-ähnliche Proteine dagegen nicht. Alle in Pflanzen enthaltenen Proteine dieses Typs sind eher Aim32-ähnliche Proteine. Es konnte folgende Konsensussequenz festgestellt werden: **C-X₈-C-X₂₄₋₇₅-H-X₃-H**, wobei unterschiedliche Präferenzen in der Zahl der Aminosäuren zwischen dem Cystein- und dem Histidinmotiv auftreten. Bei Apd1 sind am häufigsten 38 Aminosäuren zu finden, während Aim32

seinen Loop oft nur mit 30 Aminosäuren ausbildet. Apd1 und Aim32 sind zwar nicht im menschlichen Genom zu finden, sie kommen aber neben der Hefe und nahezu allen anderen Pilzen auch in vielen anderen Organismen, u. a. auch in pathogenen einzelligen Eukaryoten vor (vgl. Abb. 2.38). In Zusammenarbeit mit Prof. RNDr. Julius Lukes (Südböhmische Universität Budweis, Tschechische Republik) wird deshalb bereits ein Aim32/Apd1-Homolog in *Trypanosoma brucei* studiert. Außerdem wird in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus (TU Kaiserslautern) versucht die Funktion und Lokalisierung der vier Homologe von Apd1/Aim32-Proteinen in *Arabidopsis thaliana* zu bestimmen.

4. Materialien

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
Anaerobes Zelt (Glove Box)	Laboratory Products Type B (Coy), Airlock (Coy), Catalyst Box S/N (Coy), Monitor CAM-12 (Coy), Pumpe Pro Silent a50 (JBL GmbH & Co. KG)
Autoklav	V-65 Autoklav (Systec)
Brutschrank	Heratherm IMC 18 (Thermo Scientific)
Destille	Destamat Bi 18E (Wisag)
Drigalski-Spatel	Drigalski-Spatel (Assistent)
Durchflussphotometer	Single Path Monitor UV-1 Control Unit + Optical Unit (Pharmacia Biotech)
Elektrophoresezubehör (Agarose / SDS-PAGE)	Power Source 300V (VWR), Fusion SL Vilber Lourmat (Peqlab), HU10 (Biostep®), Mini Protean II™ (Bio Rad), Digitalkamera IXUS 132 (Canon), Stativ, Lichtbank
ESR + Zubehör	Elexsys E580 Electron Paramagnetic Resonance Console (Bruker), Pulsed Microwave Bridge E580-1010 (Bruker), Netzteil ER 082 (155/45) (Bruker), 4122SHQE-W1/1017 Cavity (Bruker), ER 167FDS-Q Fingerdewar (Bruker), Quarzglasröhrchen Ilmasil PN Ø 3,7 mm x 0,5 mm Wandstärke (QSIL), Acrylglas / Plexiglas Rundstab 1 m x 5 mm, Gummischlauch Ø 3 mm x 2 mm Wandstärke (Kobe)
Falcons	Schraubröhre 50 ml PP (Sarstedt), 15 ml Cellstar® Polypropylen Röhrchen (Greiner Bio-One)
Filter	Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt), Filter Upper Cup 0,2 µm PES membrane (VWR)
Fraktionssammler	Fraction Collector FRAC-100 (Pharmacia Biotech)
French Press	SLM Aminco FA-078, FA-073 (SLM Instruments)
Gummiwischer	Wischer Spatenform 2260002 (Deutsch & Neumann)
Impfösen	Einwegimpfösen (Greiner Bio-One), Impfschlingen (Sarstedt)
Kanülen	100 Sterican Gr. 1 Ø 0,90 x 40 mm (Braun)
Konzentratoren	Vivaspin 6, 20 & Vivacon 500 10.000 MWCO PES (Sartorius Stedim Biotech)
Küvetten	Einweg-Küvetten Polystyrol (Sarstedt), UV-Küvetten halbmikro (Brand), 50 µl (Eppendorf)
Laborboy	Swiss Boy 110 (Rudolf Grauer AG)

Magnetrührer	IKA-Werk KMO2 electronic (Janke und Kunkel), IKA-COMBIMAG RET (Janke und Kunkel), Cimarec i Telemodul (Thermo Scientific)
Mikroplatten-Spektralphotometer	Epoch (BioTek)
Mikrowelle	M401 (Privileg)
Petrischalen	Petrischalen 92 x 16 mm (Sarstedt)
pH-Meter + Elektroden	WTW pH 522 (Wissenschaftlich technische Werkstätten), Education Line EL20 (Mettler Toledo), InLab [®] Easy-Elektrode (Mettler Toledo), InLab [®] Micro-Elektrode (Mettler Toledo), InLab [®] Redox Micro-Elektrode (Mettler Toledo)
Pipetten	Research plus 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl (Eppendorf), accujet [®] pro (Brand), Pipet Assistant (labsolute), Pipetboy comfort (IBS Integra Biosciences), Pipette mit Spitze 5 ml / 10 ml (Greiner Bio-One)
Pipettenspitzen	Sapphire 10 µl (Greiner Bio-One), 200 µl; 1000 µl (Sarstedt)
Pumpen	Peristaltikpumpe P-1 (Pharmacia Biotech), Pump P-500 (Pharmacia Biotech)
Reaktionsgefäße	1,5 ml (Sarstedt), 2 ml; Sapphire PCR tubes (Greiner Bio-One)
Rotoren	Type Ti70 (Beckman), JA-10 (Beckman), JLA-8.1 (Beckman Coulter), A-4-62 (Eppendorf)
Schreiber	Schreiber (Pharmacia Biotech)
Schüttler/Inkubatoren	Multitron Pro (Infors HT), Luftschüttler MaxQ 4000 (Thermo Scientific), innova 4000 incubator Shaker (New Brunswick Scientific), PMR-30 (Grant-bio), Rocking Platform (VWR), Diffusions-Entfärb-Apparatur (Desaga)
Spritzen	Omnifix [®] 60 ml (Braun), Injekt 6 ml (Braun), 2 ml (Becton Dickinson)
Spülmaschine	Mielabor Automatic G7733 (Miele)
Sterilbank	LaminAir HB 2448 (Heraeus Instruments)
Thermomixer	Thermomixer comfort (Eppendorf), Thermomixer pro (CellMedia)
Thermocycler	PCR Sprint Thermal Cycler (Hybaid Limited)
Trockenschrank	T 5050 (Heraeus), KTG 800 (Heraeus)
UV/Vis-Spektrometer	Genesys 10s uv-vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), Bio-Photometer plus (Eppendorf), Diodenarray Spektrometer Agilent 8453 (Agilent Technologies)
Verschlussfolie	Parafilm M (Brand)

Vortexer	IKA-Labortechnik VF2 (Janke & Kunkel), RS-VA10 (Phoenix Instrument)
Waagen	Typ L 610 D (Sartorius), Typ 1204 MP (Sartorius), XS 205 Dual Range Feinwaage (Mettler Toledo)
Zentrifugen	Optima™ LE-80K Ultracentrifuge (Beckman), Avanti J-26S XP Centrifuge (Beckman Coulter), Model J2-21 Centrifuge (Beckman), Centrifuge 5810R (Eppendorf), 1-16 (Sigma), MicroStar 17 (VWR)
Zentrifugenbehälter	1 l; 50 ml; 26,3 ml (Beckman Coulter), 500 ml (Nalgene)

4.2 Chemikalien

Substanz	Firma
2,6-Dichlorphenolindophenol	Sigma Aldrich
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	Sigma Aldrich
Ammoniumacetat	Riedel de Haën
Ammoniumeisen(II)-Sulfat (Mohrsches Salz)	Riedel de Haën
Ammoniumeisen(III)-Citrat	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	AppliChem
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
Benzylviologen	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Sial
CAPS	Roth
Chloramphenicol	Roth
DEPC	Sigma Aldrich
DMSO (zur Analyse)	AppliChem
DOC	Serva
DTT	AppliChem
DMPD Dihydrochlorid	Fluka
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem
Ethanol (absolut 99,8 %)	Roth
⁵⁷ Eisenpulver	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Schünemann
Eisen(III)-Chlorid	Sigma Aldrich

Essigsäure	Roth
Feren (3-(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-Tri- azine-5',5''-disulfoxylsäure (Dinatriumsalz))	Sigma Aldrich
Formiergas (Arcal F5, 5 % H ₂ /95 % N ₂)	Air Liquide
Glycerin	Roth
Glycin	MP Biomedicals
HEPES	AppliChem
Hexaammincobalt(III)-Chlorid	Fluka
Indigokarmin	Sigma Aldrich
Imidazol	AppliChem
IPTG	AppliChem
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	J. T. Baker
Kanamycinsulfat	AppliChem
Kupfersulfat-Pentahydrat	AppliChem
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	Sigma Aldrich
Lithiumdisulfid	Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Mangan(II)-Chlorid	Fluka
MES	Serva
Methylenblau	Merck
Methylviologen	Sigma Aldrich
Natriumanthrachinon-2-sulfonat	Sigma Aldrich
Dinatriumcarbonat	Merck
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	J. T. Baker
Neutralrot	Sigma Aldrich
Phenazinethosulfat	Sigma Aldrich
Phenosafranin	Sigma Aldrich
PMSF	Sigma Aldrich

Resorufin	Sigma Aldrich
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich
Safranin T	Sigma Aldrich
Salzsäure (rauchend, $\geq 37\%$)	Sigma Aldrich
SDS	Roth
Stickstoff (technisch)	Air Liquide
TAPS	Roth
TCA	Sigma Aldrich
TEMED	AppliChem
Tetracyclin	AppliChem
Tris	AppliChem
Zinkacetat-Dihydrat	Sigma Aldrich

4.3 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien

Folgende kommerziell erhältliche Reagenzien wurden für die entsprechenden Laborroutinen verwendet:

<u>Lösung / Reagenz</u>	<u>Laborroutine</u>	<u>Firma</u>
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	SDS-PAGE	Roth
Agar Agar Kobe I	LB-Agarplatten	Roth
Agarose (LE für DNA- Elektrophorese)	Agarosegele	Biozym
GelRed	Fluoreszenzfarbstoff (Agarosegel)	New England Biolabs
Gel Loading Dye Purple (6X)	Farbstoff (Agarosegel)	New England Biolabs
Instant Blue	Färbung SDS-PAGE	Expedeon
LB-Fertigmedium	Kulturen	Roth
pH-Eichlösungen	Eichung pH-Meter	AppliChem
Roti Blue	SDS-Färbung	Roth

4.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ angesetzt und der benötigte pH entsprechend mit NaOH oder HCl eingestellt.

4.5 Zellstämme und Plasmide

<i>E.-coli</i> -Stamm	Verwendung	Bemerkungen
BL21	Proteinexpression	verwendet für heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> , T7 Expressionsstamm, Mangel an Proteasen
DH5 α / NEB5	Klonierung / Plasmid-vervielfältigung	hohe Plasmidstabilität, gut transformierbar für kleinere bis mittlere Plasmide
NEB10	Klonierung / Plasmid-vervielfältigung	Derivat von NEB5, höhere Resistenz gegenüber Kanamycin und besser für größere Plasmide
<i>S.-cerevisiae</i> -Stamm	Verwendung	Bemerkungen
W303-1A	Isolation der chromosomalen DNA	Laborstamm der <i>S. cerevisiae</i> mit Genotyp <i>MATa {leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11, 15}</i> ; Wildtyp (WT) in dieser Arbeit

Die Sequenzen aller in dieser Arbeit erzeugten Plasmide wurden vor Verwendung mittels Sanger Sequenzierung überprüft (Fa. SeqIT in Kaiserslautern).

Tabelle 4.1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Größe / Antibiotikum	Quelle
<i>Ausgangsplasmide</i>			
pETDuet-1	T7-Promotor	5420 bp / Amp	Novagen
pET-28a_TS	T7-Promotor und Spaltstelle für die TEV-Protease	5378 bp / Kan	B. Martins (Humboldt-Universität zu Berlin)
14ACS74P_ ThetheRieske_ pMA-T	Expression eines codonoptimierten synthetischen Rieske-Proteins von <i>T. thermophilus</i>	2908 bp / Amp	GeneArt AG (life technologies)

<i>Plasmide zur Expression in E. coli</i>			
pETDuet-1_Apd1	Gen Apd1	6346bp / Amp	Diese Arbeit
pETDuet-1_ Apd1_H255C	Gen Apd1 mit Mutation der AS 255 (His durch Cys ausgetauscht)	6346bp / Amp	Diese Arbeit
pETDuet-1_ Apd1_H259C	Gen Apd1 mit Mutation der AS 259 (His durch Cys ausgetauscht)	6346bp / Amp	Diese Arbeit
pETDuet-1_ Apd1_HH255_9CC	Gen Apd1 mit Mutationen der AS 255 und 259 (His durch Cys ausgetauscht)	6346bp / Amp	Diese Arbeit
pETDuet-1_Aim32	Gen Aim32	6331bp / Amp	Diese Arbeit
pETDuet-1_ TTRieske	Gen Rieske-Protein von <i>T. thermophilus</i>	5913bp / Amp	Diese Arbeit
pETDuet-1_ TTRieske_short	Gen einer verkürzten Version des Rieske-Proteins von <i>T. thermophilus</i>	5862bp / Amp	Diese Arbeit
pET-28a_TS_Apd1	Gen Apd1	6274bp / Kan	Diese Arbeit
pET-28a_TS_ Aim32	Gen Aim32	6259bp / Kan	Diese Arbeit
pET-28a_TS_ TTRieske	Gen Rieske-Protein von <i>T. thermophilus</i>	5867bp / Kan	Diese Arbeit
<i>zusätzliche Plasmide</i>			
pRKISC	pRK415 basiert; enthält Sequenzen, die für Komponenten der <i>E. coli</i> -ISC- Maschinerie codieren	18,3 kbp / Tc	(Nakamura <i>et al.</i> , 1999)
GroEL/ES	codiert den Chaperonin-Komplex GroEL/ES aus <i>E. coli</i> zur Unterstüt- zung der korrekten Faltung von Protei- nen	Cam	(Castanié <i>et al.</i> , 1997)

4.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion bestellt. Sie lagen entsalzt und lyophilisiert vor und wurden entsprechend der Herstellerangaben in autoklaviertem H₂O_{dd} gelöst, um Stammlösungen von 100 µM zu erhalten. Diese wurden zur Verwendung 1:10 verdünnt. Alle Primerlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4.2: Verwendete Oligonukleotide: Sortiert nach ihren Anwendungsgebieten

<i>Primer für Klonierungen</i>			
Name	Sequenz (5' → 3')	Gen / Zielvektor bzw. Verwendung	Restriktions-schnittstelle
Ap_NT ^{Bam} HI	ATG GTA GGA TCC CAT GGC TTT TTT GAA TAT TTT CAA GC	Apd1 / pETDuet-1 (forward)	BamHI
Ap_SalI	ATG GTA GTC GAC TAC CAG CTT TGA TAT TTC TTA ATA C	Apd1 / pETDuet-1 (reverse)	SalI
Apd1_Scer_NdeI	ATG GTA CAT ATG GCT TTT TTG AAT ATT TTC AAG C	Apd1 / pET-28a (forward)	NdeI
Apd1_Scer_SalI	ATG GTA GTC GAC TTA CCA GCT TTG ATA TTT CTT AAT AC	Apd1 / pET-28a (reverse)	SalI
TTRieske_for_NdeI	GAG CTC CAT ATG AGC CTG CGT C	Rieske-Protein aus <i>T. thermophilus</i> amp- lizieren (forward)	NdeI
TTRieske_rev_BamHI	GGT ACC GGA TCC TTA AAC ACG C	Rieske-Protein aus <i>T. thermophilus</i> amp- lizieren (reverse) und Rieske-Protein (<i>T. thermophilus</i>) / pETDuet-1 (reverse)	BamHI
pET28a_for_BamHI	GGT CGC GGA TCC GAA TTC	Vektor pET-28a amp- lizieren (forward)	BamHI

pET28a_rev_NdeI	GCT AGC CAT ATG GCC CTG	Vektor pET-28a amp- lifizieren (reverse)	NdeI
TTR_NcoI_for	ATG GTA CCA TGG CAA GCC TGC GTC CGC GTG AAG	Rieske-Protein (<i>T. thermophilus</i>) / pETDuet-1 (forward)	NcoI
TTR_NcoI_short_for	ATG GTA CCA TGG CAA CAC CGG AAA AAG AAC CGC	kürzere Version des Rieske-Proteins (<i>T. thermophilus</i>) / pETDuet-1 (forward)	NcoI
TTR_BamHI_short_rev	ATG GTA GGA TCC TTA TGC CTG AAC ACC AAC CGG	kürzere Version des Rieske-Proteins (<i>T. thermophilus</i>) / pETDuet-1 (reverse)	BamHI
Aim32_NT BamHI	ATG GTA GGA TCC CAT GCT ACG TAT AAC TGT CAA AAC	Aim32 / pETDuet-1 (forward)	BamHI
Aim32_SalI	ATG GTA GTC GAC TAA TTC ATC GAT ATG CCA CCT CTG	Aim32 / pETDuet-1 (reverse)	SalI
<i>Mutageneseprimer</i>			
Name	Sequenz (5' → 3')		
H255C_for	TGT TAA TTG TGT TGG TGG TCA CAA ATT TGC TGC		
H255C_rev	CAC CAA CAC AAT TAA CAA ATG CAA TTT TGA CAC		
H259C_for	ATG TTG GTG GTT GCA AAT TTG CTG CAA ATG TTC		
H259C_rev	AAA TTT GCA ACC AAC ATG ATT AAC AAA TGC		
HH255_9CC_for	AAT TGT GTT GGT GGT TGC AAA TTT GCT GCA AAT GTT C		
HH255_9CC_rev	GCA ACC ACC AAC ACA ATT AAC AAA TGC AAT TTT GAC AC		
<i>Sequenzierungsprimer</i>			
Name	Sequenz (5' → 3')	sequenzierter Vektor	
pET_up1	ATG CGT CCG GCG TAG	pETDuet-1 (forward)	
pET_down1	GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA	pETDuet-1 (reverse)	
T7_forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G	pET-28a	
T7_reverse	TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG	pET-28a	

4.7 Säulen und Säulenmaterialien

Säule	Firma
HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade	Pharmacia Biotech
Ni-NTA-Agarose	Cube Biotech
PD10-Säulen	GE Healthcare
Q Sepharose Fast Flow	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Trommer

4.8 Größenstandards

Marker	Firma
2-log DNA Ladder (0,1 - 10,0 kb)	New England Biolabs Inc
Protein Marker III (6,5 - 212 kDa)	AppliChem
Roti [®] -Mark Standard (14 - 212 kDa)	Roth

4.9 Proteine und Enzyme

Substanz	Firma
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	Sigma Aldrich
Cytochrom <i>c</i> (Rinderherz)	Sigma Aldrich
DNase I (Rinderpankreas)	AppliChem
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	Sigma Aldrich
Phusion [®] -Polymerase (High Fidelity) und HF-Puffer	New England Biolabs Inc
Restriktionsenzyme und deren Puffer	New England Biolabs Inc
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
T4-DNA-Ligase und Puffer	New England Biolabs Inc

4.10 Software

Software	Anwendung	Firma
Chromas	DNA-Sequenz-Analysen	Technelysium (online)
Gen5 2.01	Plattenreader	BioTek
PyMOL	3D-Grafik Proteinstruktur	Schrödinger LLC
UV visible Chem Station	UV/Vis-Diodenarrayphotometer	Agilent
VisionCapt	Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Vision Lite	UV/Vis Spektrometer	Thermo Fischer Scientific
Xepr	ESR-Spektrometer	Bruker

4.11 Sonstige Materialien

Kit	Firma
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Aufreinigung von DNA aus Restriktionsverdau- und PCR-Reaktionsansätzen sowie Extraktion von DNA aus Agarosegelen	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid (No Lid) Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	Macherey-Nagel
Kristallisationsscreens (Humboldt-Universität zu Berlin, AG Prof. Dobbek)	
Screen	Firma
JCSG- <i>plus</i> TM HT-96	Molecular Dimensions
<i>ProPlex</i> HT-96	Molecular Dimensions
PACT <i>premier</i> TM HT 96	Molecular Dimensions
The Stura Footprint Screen TM + MacroSol TM HT-96	Molecular Dimensions
PEG/Ion HT TM -HR2-139	Hampton Research
SaltRx HT TM HR2-136	Hampton Research

5. Methoden

Die Experimente dieser Arbeit wurden, wenn nötig, gemäß den Verordnungen des Gentechnikgesetzes durchgeführt und unterlagen teilweise der Sicherheitsstufe S1.

5.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

5.1.1 Steriles Arbeiten

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden mikrobiologische Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle dafür benötigten Materialien wurden daher vor Gebrauch autoklaviert. Nicht autoklavierbare Utensilien wie z. B. die Sterilbank oder Arbeitsflächen wurden mit einer 70 %-igen (v/v) Ethanol-Lösung desinfiziert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (0,22 µm). Kontaminierte Gefäße und Lösungen mussten nach dem Arbeiten erneut autoklaviert werden. Die hier durchgeführten Methoden sind den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) zu entnehmen.

5.1.2 Kultivierung von *E. coli*

LB-Agar-Platten

25 g/l LB-Medium

15 g/l Agar

autoklavieren

LB-Medium

25 g/l LB-Medium

autoklavieren

Nachdem die Mischung für die Platten auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden Lösungen der entsprechenden Antibiotika hinzugefügt, gemischt, die Petrischalen gefüllt und abkühlen gelassen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Kultivierung in Flüssigmedium

Die Kultivierung der verwendeten *E.-coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm. Je nach eingesetzten Plasmiden wurden verschiedene Antibiotika zur Selektion eingesetzt.

Antibiotika

Alle wässrigen Lösungen der Antibiotika wurden vor Verwendung sterilfiltriert (0,22 µm) und in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5.1: Verwendete Antibiotika und ihre Konzentrationen

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration Stamm-lösung	Endkonzentration Festmedium	Endkonzentration Flüssigmedium
Ampicillin	H ₂ O _{dd}	100 mg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O _{dd}	30 mg/ml	30 µg/ml	30 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol (70 %)	20 mg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
Tetracyclin	Ethanol (70 %)	10 mg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml

5.1.3 Messung der optischen Dichte

Das Bakterienwachstum im Medium kann durch die optische Dichte bei 600 nm bestimmt werden, da bei dieser Wellenlänge die Lichtstreuung von der Anzahl der vorhandenen Zellen abhängt. Somit kann das Zellwachstum durch regelmäßiges Messen der OD₆₀₀ mithilfe eines UV/Vis-Spektrometers kontrolliert werden. Bei Werten über OD₆₀₀=0,5 wurde die Bakterienkultur verdünnt gemessen, um ein Unterschätzen der optischen Dichte zu vermeiden. Als Blindwert wurde LB-Medium verwendet.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) handelt es sich um ein *in-vitro*-Verfahren, mit dem sich bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigen lassen. Dabei wird eine thermostabile DNA-Polymerase eingesetzt, welche nach Anlagerung von passenden Oligonukleotiden (Primern) an eine DNA-Sequenz (Template) in der Lage ist, zugegebene Mononukleotidtriphosphate (dNTPs) an diese anzulagern und somit zu replizieren. Dabei fungieren die beiden eingesetzten Primer jeweils als Startpunkt, an dem die DNA-Polymerase den neuen Strang in der 5' → 3' Richtung generiert. Da es sich bei der PCR um eine Kettenreaktion handelt, werden Produkte aus früheren Zyklen als Template für die weiteren Zyklen verwendet, wodurch sich im Idealfall eine exponentielle Vermehrung der ursprünglichen DNA ergibt. Daher wird als Ausgangsstoff nur eine geringe Menge DNA benötigt.

Eine solche PCR ist typischerweise aus 35 Zyklen aufgebaut, bei denen sich die drei folgenden Schritte wiederholen:

- 1. Denaturierung:** Bei einer Temperatur von 98 °C werden die beiden Einzelstränge des Doppelstranges der zu vervielfältigenden DNA voneinander getrennt.
- 2. Primerhybridisierung (Annealing):** Im Hybridisierungsschritt werden die zugesetzten Primer an die komplementären Abschnitte der Einzelstränge angelagert. Dabei muss die Temperatur so gewählt werden, dass sie etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt.

- 3. Elongation:** In diesem Schritt verlängert die DNA-Polymerase vom 3`-Ende der Primer ausgehend die angelagerten Oligonukleotide und komplementiert den DNA-Strang entsprechend der Vorlage mit den passenden dNTPs, sodass ein Doppelstrang entsteht.

Die Klonierungen in dieser Arbeit wurden mit Phusion[®] High Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs Inc (NEB) und den entsprechenden Puffern durchgeführt. Im Folgenden sind sowohl ein Pipettierschema als auch ein PCR-Programm, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt.

Pipettierschema eines typischen PCR-Ansatzes

10 µl	Phusion HF-Puffer (5X)
1 µl	dNTPs (10 mM)
2,5 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
x µl	Template-DNA (30 ng Plasmid bzw. 1 µl 1:10 verdünnte chromosomale DNA)
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase
<hr/>	
ad 50 µl	H ₂ O _{dd}

PCR-Programm zur Amplifikation

1x	98 °C	30 Sekunden (Plasmid) bzw. 5 Minuten (chromosomale DNA)	
	98 °C	10 Sekunden	Denaturierung
35x	56 °C	30 Sekunden	Hybridisierung
	72 °C	30 Sekunden / kb	Elongation
<hr/>			
1x	72 °C	10 Minuten	

Die Dauer der Elongation wurde entsprechend der Länge der zu amplifizierenden Fragmente angepasst. Um den Vektor pET-28a zu vervielfältigen, wurde die Annealingtemperatur auf 51 °C verringert.

5.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren, welches DNA-Fragmente nach ihrer Größe auf-trennen kann. Sie kann sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt werden. Dabei wird DNA zusammen mit einem Ladepuffer und Gel Red, welches nach Bindung an die DNA unter UV-Licht fluoresziert, in ein Agarosegel gegeben. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung des Pluspoles durch das Gel. Dabei bewegen sich kleinere Fragmente schneller als große. Mittels eines Standards kann anschließend die Größe der aufgetrennten DNA-Banden anhand ihrer Lage abgeschätzt werden. Außerdem kann durch Vergleich der Intensitäten der Proben mit den Banden des Standards auch ihre ungefähre Menge eingeschätzt werden, was z. B. bei Ligationen (Kap. 5.2.5) von Vorteil ist.

TAE-Puffer (50x Stammlösung)

2 M	Tris
0,1 M	Na ₂ EDTA
0,95 M	Eisessig

mit Essigsäure auf pH=8 einstellen

Die Agarosegelelektrophorese wurde je nach Größe des zu untersuchenden Fragments in Agarosegelen von 1 - 1,5 % (w/v) durchgeführt. Hierfür wurde Agarose in TAE-Puffer (1x) in einer Mikrowelle für 3 Minuten erhitzt und danach zu einem Gel gegossen und erkalten gelassen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer (1x) verwendet. Die Elektrophorese wurde entsprechend der Anwendung zwischen 20 und 40 Minuten bei 100 V durchgeführt. Analytische Proben hatten ein Gesamtvolumen von 10 µl, wobei 1 - 5 µl DNA, 1/6 Ladepuffer (Loading Dye Purple 6X) und 1/10 Gel Red (10x) enthalten waren. Verbleibendes Volumen wurde mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Bei präparativen Gelen wurden die Volumina aller Komponenten entsprechend der Menge an DNA angepasst. Als Größenstandard wurde 2-log DNA Ladder verwendet.

5.2.3 Reinigung von DNA

Zur Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen, Agarosegelen oder einem Restriktionsverdau wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel) verwendet. Dies diente einer Entfernung von Kontaminationen, wie z. B. Agarose, Enzymen, Primer oder Nukleotiden. Dabei wurden die Arbeitsschritte gemäß den Herstellerangaben durchgeführt inklusive des zusätzlichen Waschvorgangs. Die Elution wurde je nach Anwendung mit 15 - 30 µl des Elutionspuffers durchgeführt.

5.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme werden bei der gezielten Spaltung von DNA eingesetzt. Dabei wird die Phosphodiesterbindung des Doppelstrangs hydrolytisch gespalten. Sie schneiden spezifische Regionen, die in den meisten Fällen palindromisch aus vier bis acht Basenpaaren aufgebaut sind, und als Erkennungssequenzen für die jeweiligen spezifischen Enzyme fungieren. Bei einem Restriktionsverdau werden in der Regel Fragmente mit 5`-Phosphat- und 3`-OH-Ende generiert, wobei entweder glatte (*blunt ends*) oder überhängende (*sticky ends*) Enden erzeugt werden können. Auf diese Weise können gezielt DNA-Sequenzen überprüft oder Klonierungen durchgeführt werden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs Inc bezogen. Es wurden pro Reaktionsansatz zwischen 0,5 und 1 µg DNA gespalten. Dafür wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl 1 µl Restriktionsenzym eingesetzt, im Falle von sogenannten Doppelverdau wurde die Menge pro Enzym auf 1,5 µl erhöht. Wurde nur ein Probeverdau zur Überprüfung von Klonierungen durchgeführt, wurden nur 25 µl Reaktionsvolumen und 1 µl pro Enzym verwendet. Außerdem wurde Cut Smart Puffer zugegeben und die verbleibenden Volumina mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C

inkubiert und anschließend je nach Größe der abgetrennten Enden entweder direkt mittels „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ oder Agarosegelelektrophorese (Kap. 5.2.2) und nachfolgender Extraktion mit demselben Kit aufgereinigt.

5.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden durch Restriktionsenzyme geschnittene DNA-Fragmente durch die T4-DNA-Ligase neu miteinander verknüpft, wobei neue Phosphodiesterbindungen ausgebildet werden. Somit ist es in Klonierungen möglich, bestimmte Genabschnitte beispielsweise in Expressionsvektoren einzubringen.

Alle Ligationen dieser Arbeit wurden mit der T4-DNA-Ligase sowie dem entsprechenden T4-DNA-Ligase-Puffer von New England Biolabs Inc durchgeführt. Ligiert wurden die Reaktionsansätze zwischen 30 und 60 min bei entweder 16 °C oder 22 °C. Dabei enthielten die Ansätze 100 ng Vektor und Insert, dessen Menge sich mit folgender Formel berechnen ließ.

$$\text{ng Insert} = \frac{100 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Größe des Inserts in kb}}{\text{Größe des Vektors in kb}} \cdot 3$$

Die Konzentrationen der zu ligierenden Vektoren und Inserts wurden mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 5.2.2) abgeschätzt. Die Volumina wurden so gewählt, dass zu einer entsprechenden Menge H₂O_{dd} zunächst der Ligase Puffer (1/10 des Gesamtvolumens) und die DNA pipettiert wurden. Es wurde entweder in 10 µl mit 0,5 µl Ligase oder in 20 µl mit 1 µl Ligase ligiert. Zur Überprüfung, ob Selbstligation des Vektors stattgefunden hat oder unverdaulicher Vektor vorhanden war, wurde jeweils ein Ansatz ohne Insert als Kontrolle mitgeführt.

5.2.6 Transformation von *E.-coli*-Zellen

Zu 100 µl langsam aufgetauten kompetenten *E.-coli*-Zellen wurden ca. 5 ng Plasmid, ein kompletter Ligations- oder Mutageneseansatz zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Inkubation für zehn Minuten auf Eis wurden die Zellen 90 Sekunden im vorgeheizten Thermomixer bei 42 °C einem Hitzeschock (ohne Schütteln) ausgesetzt. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und das ganze Gemisch bei 37 °C und 850 rpm für 40 Minuten im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünf Minuten bei 5000 rpm (Sigma 1-16) abzentrifugiert, 950 µl abgenommen und die Zellen im verbleibenden Medium vorsichtig resuspendiert. Mit einem Drigalski-Spatel wurde die Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit den für die verwendeten Plasmide benötigten Antibiotika ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte zwischen 12 und 16 Stunden bei 37 °C.

5.2.7 Herstellung kompetenter *E.-coli*-Zellen

Damit *E.-coli*-Zellen in der Lage sind, Plasmid-DNA aufzunehmen, müssen sie kompetent sein. Um dies zu erreichen, wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Rubidiumchloridmethode verwendet. Diese Methode ist eine Variante der Calciumchloridmethode, die eine etwas höhere Kompetenz liefert.

SOB-Medium

20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

pH=7

Nach dem Autoklavieren wurden noch 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat und 10 mM Natriumchlorid hinzugefügt. All diese Zusätze wurden mit autoklavierten H₂O_{dd} angesetzt und sterilfiltriert.

1 M MES-Lösung, wurde mit KOH auf einen pH von 6,2 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert

TFB (Endkonzentrationen in 50 ml)

10 mM MES-Lösung

100 mM Rubidiumchlorid

45 mM Mangan(II)-chlorid

10 mM Calciumchlorid

3 mM Hexaammincobalt(III)-chlorid

sterilfiltrieren

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden zunächst 25 ml SOB-Medium mit dem entsprechenden Zellstamm (und den benötigten Antibiotika) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 ml frisches, auf 30 °C vorgewärmtes, SOB-Medium mit 2 % (10 ml) der Übernachtskultur inokuliert. Nach Zugabe von 36 ml sterilem Natriumchlorid (5 M) wurde die Kultur bei 30 °C und 200 rpm (Thermo Scientific Luftschtütler MaxQ 4000) inkubiert, bis OD₆₀₀=0,5 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 15 min, Beckman Model J2-21 Centrifuge, Rotor Beckman JA-10) und das überschüssige Medium vorsichtig und vollständig abgenommen. Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in 50 ml eisgekühltem TFB resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Unter Schwenken wurden 1,75 ml DMSO zur Zellsuspension hinzugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zu 100–200 µl in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

5.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels des Kits „NucleoSpin® Plasmid“ von Macherey-Nagel isoliert. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen einschließlich des zusätzlichen Waschschrittes und die DNA mit 30 µl Elutionspuffer aus der Säule eluiert.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde anschließend entweder photometrisch mit dem Eppendorf BioPhotometer plus bestimmt oder durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 5.2.2) ab-

geschätzt. Im Falle von Klonierungen wurde der Elektrophorese ein Kontrollverdau vorge stellt und positive Klone abschließend durch Sequenzierung überprüft. Dafür wurden nach Vor gaben der Firma SeqIT in Kaiserslautern ca. 500 ng DNA (in 5 μ l = 100 ng/ μ l) mit 1 μ l des ent sprechenden Sequenzierungsprimers (10 μ M) gemischt und eingeschickt.

5.2.9 Gezielte Mutagenese

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der gezielten Mutagenese (oder auch ortsspezifischen Mutagenese) die Histidinliganden des Fe/S-Clusters des Proteins Apd1 nach der Methode von Zheng *et al.* (2004) zu Cysteinen mutiert. Als Template wurde dabei jeweils pETDuet-1_Apd1 verwendet.

Tabelle 5.2: Pipettierschema für einen Mutageneseansatz

	A	B	C (Kontrolle)
H ₂ O _{dd} (autoklaviert)	35 μ l	35 μ l	37,5 μ l
5X-HF-Puffer	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Vorwärtsprimer (10 μ M)	2,5 μ l	–	–
Rückwärtsprimer (10 μ M)	–	2,5 μ l	–
Plasmid (1:10, ca. 30 ng)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
dNTPs	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Phusion-Polymerase	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Gesamtmenge	50 μl	50 μl	50 μl

Die Mutagenese wurde in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei wurden Primer verwendet, bei denen die Mutation am 5`-Ende in einem komplementären Bereich von ca. 18-20 Basen lag. Am 3`-Ende hatten sie einen Überhang von ca. 13-15 Basen (vgl. Zheng *et al.*, 2004). In der ersten PCR-Reaktion wurden zuerst mittels der einzelnen Primer, die die gewünschte Mutation enthielten, DNA-Einzelstränge mit folgendem Programm amplifiziert:

PCR 1:

1x	98 °C	30 Sekunden
	98 °C	15 Sekunden
8x	55 °C	30 Sekunden
	72 °C	3 Minuten 30 Sekunden
	4 °C	Lagerung bis zur PCR 2

Im Anschluss wurden je 25 μ l aus den Ansätzen A und B miteinander vermischt, 0,5 μ l frische Phusion-Polymerase hinzugefügt und die zweite PCR-Reaktion durchgeführt. In dieser wurden

nun die amplifizierten Einzelstränge zu einem Doppelstrang hybridisiert. Zum Kontrollansatz wurden ebenfalls 0,5 µl frische Phusion-Polymerase pipettiert.

PCR 2:

1x	98 °C	30 Sekunden
	98 °C	15 Sekunden
18x	55 °C	30 Sekunden
	72 °C	3 Minuten 30 Sekunden
1x	72 °C	10 Minuten

Nach der zweiten PCR wurden der Mutageneseansatz sowie die Kontrolle jeweils mit 1 µl des Restriktionsenzym DpnI versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. DpnI schneidet ausschließlich methylierte DNA und greift daher spezifisch nur die in *E. coli* methylierten Plasmide (Template) an, nicht aber die unmethylierten PCR-Produkte. Anschließend wurde die DNA gereinigt (Kap. 5.2.3) und in *E. coli* transformiert (Kap. 5.2.6). Nach erfolgreicher Transformation wurden 5 ml LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) mit einer Kolonie inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die mutierte Plasmid-DNA konnte schließlich wie in Kapitel 5.2.8 beschrieben isoliert werden. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde ein Kontrollverdau (Kap. 5.2.4) durchgeführt, um erfolgreich mutierte Plasmide zur Sequenzierung auszuwählen. Hierbei kann bei manchen Mutagenesen bereits in den Primern über eine sogenannte stille Mutation eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingefügt werden, um die Überprüfung zu erleichtern. Durch Sequenzierung der DNA wurde dann die Mutation in der Sequenz analysiert und sichergestellt.

5.3 Expression und Reinigung von Proteinen aus *E. coli*

5.3.1 Heterologe Genexpression

Heterologe Genexpression ist die Expression eines Proteins in einem fremden Organismus. In dieser Arbeit wurden Gene aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* in *E. coli* überexprimiert und die entsprechenden Proteine daraus isoliert. Dazu wurden die entsprechenden Gene in Expressionsvektoren (pETDuet-1, pET-28a) kloniert und anschließend mittels Transformation (Kap. 5.2.6) die Plasmid-DNA in *E.-coli*-Zellen (BL21 mit pRKISC) eingebracht. Am nächsten Tag wurden Übernachtkulturen (80-100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika) mit drei Kolonien der Transformationsplatte angeimpft. Die anschließende Inkubation dieser Übernachtkulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Die Überexpression fand am nächsten Tag in einem 2-l-Maßstab statt. Dazu wurden in einem 5-l-Kolben 2 l LB-Medium mit Antibiotika mit der Übernachtkultur (2 % des Volumens der Großkultur) inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zusätzlich wurden noch Ammoniumeisen(III)-Citrat (0,38 mM) und Cysteinhydrochlorid (1 mM) ins Medium gegeben, um den Einbau von Eisen und säurelabilem Schwefel in das Protein zu unterstützen. Durch regelmäßige Messungen wurde das Wachstum der Kultur überprüft und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurde die Genexpression mittels IPTG (0,5 mM) induziert.

Nach erfolgter Induktion wurde die Überexpression bis zum nächsten Tag bei reduzierter Temperatur von 18 °C fortgesetzt.

5.3.2 Ernte und Aufschluss

Lysepuffer

20 mM Tris

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH=9

sterilfiltrieren

Nach der Überexpression über Nacht wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation geerntet (12 °C, 6000 rpm, 15 min, Avanti J-26S XP Centrifuge, Rotor Beckman Coulter JLA-8.1). Der erhaltene Überstand wurde verworfen und die Zellen in ca. 50 ml Lysepuffer vorsichtig mit einem Gummiwischer resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (12 °C, 4000 rpm, 15 min, Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-62) konnte das Nassgewicht der Zellen bestimmt werden und das Pellet, falls benötigt, zur Lagerung bei -20 °C eingefroren werden. Aus 2 l Bakterienkultur konnten zwischen 6,5 und 13 g Zellen geerntet werden.

Der Zellaufschluss wurde mit der French Press durchgeführt. Vorher musste das gewonnene Zellpellet erneut in Lysepuffer (max. 40 ml) aufgenommen werden. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNaseI und PMSF-Lösung (200 mM in Ethanol; 5 µl pro ml Zellsuspension) wurde die Zellsuspension durch eine Kanüle (0,9 mm) gedrückt, um verbliebene Zellklumpen zu entfernen und die Suspension zu homogenisieren. Anschließend wurden die Zellen in der vorgekühlten 50-ml-Zelle der French Press bei einem Druck von 1000 psi aufgeschlossen. Danach wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Bestandteilen in der Ultrazentrifuge (4 °C, 30000 rpm, 70 min, Beckman Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Rotor Beckman Type Ti70) abgetrennt. Das erhaltene Lysat konnte nun in weiteren Schritten aufgereinigt werden.

5.3.3 Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Lysepuffer (wie in Kap. 5.3.2)

Waschpuffer

20 mM Tris

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

pH=9

sterilfiltrieren

Elutionspuffer

20 mM Tris

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH=9

sterilfiltrieren

Die Proteine, die in dieser Arbeit mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden, verfügten alle über einen His₆-Tag, welcher an das Säulenmaterial Ni-NTA-Agarose (Nickel-Nitrilotriacetat-Agarose) binden kann. Es wurden 3 ml der Ni-NTA-Agarose (50 %-ige Suspension) in eine leere PD10-Säule eingefüllt und vor Benutzung mit 50 ml gekühltem Lysepuffer äquilibriert. Dann wurde das Ni-NTA-Material mit einem Teil des in Kapitel 5.3.2 erhaltenen Lysats resuspendiert und vorsichtig in das 50-ml-Falcon mit dem Lysat überführt. Diese Mischung wurde zur besseren Bindung des Proteins an das Säulenmaterial 1 h bei 4 °C vorsichtig homogenisiert (rotiert) und anschließend wieder in die PD10-Säule gefüllt. Nach Packen der Säule folgte ein Waschschriff mit 50 ml des Waschpuffers. Um das Protein von der Säule zu eluieren, wurden 10 ml Elutionspuffer verwendet und dabei das farbige Protein in Eppendorfgefäßen gesammelt. Nach der Elution wurde die Säule mit weiteren 50 ml Waschpuffer gewaschen und zur Lagerung (bei 4 °C) in 20 %-igem Ethanol aufgenommen.

5.3.4 Entsalzen von Proteinen

Entsalzungspuffer

20 mM Tris
150 mM NaCl
pH=9
sterilfiltrieren

8M HET-Puffer

8 M Harnstoff
5,95 mM EDTA
60 mM Tris
pH=9

Der pH wird durch Zugabe von 100 mM Tris/HCl auf pH=9 eingestellt. Die Molarität von Tris ergibt sich ebenso aus dieser Zugabe.

Da das im Elutionspuffer in hohen Konzentrationen vorliegende Imidazol auf Dauer zu einer Präzipitation der Proteine führen könnte, mussten die in Kapitel 5.3.3 erhaltenen Proteine direkt im Anschluss entsalzt werden. Dabei wurden bis zu 2,5 ml der gesammelten Proteinlösung auf eine mit 30 ml Entsalzungspuffer äquilibrierte PD10-Säule aufgetragen und in das Säulenmaterial einziehen gelassen. Anschließend wurde solange mit Puffer eluiert, bis die Proteinfraction erneut in Eppendorfgefäßen gesammelt werden konnte. Anschließend wurde die Säule mit weiteren 50 ml des Puffers gespült, um das später eluierende Imidazol vollständig aus der Säule zu entfernen. Zur Lagerung (bei RT) wurden 15 ml 8M HET-Puffer in die Säule gegeben. Dies diente dazu denaturierte Proteine zu entfernen und als Schutz für die Säule, um einer Verschmutzung vorzubeugen. Das Protein konnte nun aufkonzentriert (Kap. 5.3.8), aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

5.3.5 Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie können Proteine anhand ihrer Ladung aufgetrennt werden. Proteine binden je nach ihrer Zusammensetzung durch die Aminosäuren unterschiedlich stark an das geladene Säulenmaterial. Durch Erhöhung der Ionenstärke können dann nach und nach die Proteine von der Säule eluiert und somit aufgetrennt werden.

Puffer A		Puffer B	
50 mM	Tris	50 mM	Tris
pH=8		1 M	NaCl
sterilfiltrieren		pH=8	
		sterilfiltrieren	

In der vorliegenden Arbeit wurde für das Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus* eine Anionenaustauschchromatographie mit dem Säulenmaterial „Q Sepharose Fast Flow“ durchgeführt. Dieses enthält positiv geladene quartäre Amine und gilt als starker Anionenaustauscher. Die Isolierung wurde bei RT mit einer FPLC-Anlage (Pump P-500) durchgeführt, mittels eines Durchflussphotometers bei 280 nm verfolgt und das Protein mit einem Fraktionssammler (5 ml pro Fraktion) aufgefangen.

Eine leere Säule wurde mit ca. 30 ml Q Sepharose Fast Flow befüllt. Zum Äquilibrieren der Säule wurden vom Puffer A 10 ml mit 1 ml/min, 10 ml mit 2 ml/min und zuletzt 80 ml mit 4 ml/min durch die Säule laufen gelassen. Dabei wurde eine Basislinie aufgenommen. Das in Kapitel 5.3.2 erhaltene Lysat wurde vor Auftragen auf die Säule filtriert (0,22 µm), um ein Verstopfen der Säule zu vermeiden. Das filtrierte Lysat wurde mit 1 ml/min auf die Säule aufgetragen (Peristaltikpumpe P-1) und anschließend wurde die Säule solange mit Puffer A gespült (4 ml/min, Pump P-500), bis die UV-Absorption wieder ähnlich zum Puffer war. Dann wurde ein Gradient (0–100 % in 400 ml) von Puffer B (4 ml/min) angelegt, sodass mit steigendem NaCl-Gehalt die gebundenen Proteine nach und nach vom Säulenmaterial eluiert wurden. Die Fraktionen mit dem erhaltenen braunen Protein wurden mittels Ammoniumsulfatfällung (Kap. 5.3.6) für einen weiteren Reinigungsschritt vorbereitet. Die Säule wurde abschließend zuerst für 30 min mit Puffer B (4 ml/min) gespült, 30 min mit Puffer A (4 ml/min) und dann bei 4 °C gelagert.

5.3.6 Ammoniumsulfatfällung

Mit der Ammoniumsulfatfällung konnte einerseits bereits ein weiterer Aufreinigungsschritt ausgeführt und andererseits das Volumen des Proteins verringert werden. Zunächst wurde zur Proteinlösung im Eisbad langsam portionsweise unter Rühren die entsprechende Menge an Ammoniumsulfat zugegeben, bis 55 % Ammoniumsulfat (Referenz-Tabelle: AG Pierik, TU Kaiserslautern) in der Lösung enthalten waren. Dabei kam es zur Präzipitation von Proteinen. Nachdem das gesamte Ammoniumsulfat in Lösung war, wurde die Mischung 15 Minuten unter Rühren im Eisbad inkubiert und im Anschluss bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet bestand aus Verunreinigungen, die noch in der Proteinlösung vorhanden waren, und war farblos, während der Überstand eine rot-braune Lösung des Rieske-Proteins war. Im nächsten Schritt wurde die Menge an Ammoniumsulfat unter gleichen Bedingungen auf 80 % erhöht. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wurde erneut zentrifugiert. Das dabei erhaltene Pellet hatte nun eine braun-rötliche Farbe und der Überstand war fast farblos. Das Pellet wurde

in 1,9 ml Puffer A (Kap. 5.3.5) aufgenommen und mittels Gel-Permeationschromatographie (Kap. 5.3.7) weiter aufgereinigt.

5.3.7 Gel-Permeationschromatographie

Bei der Gel-Permeationschromatographie oder auch Größenausschluss-Chromatographie handelt es sich um eine Flüssigchromatographie, bei der Moleküle bezüglich ihrer Größe aufgetrennt werden können. Das Säulenmaterial besteht dabei aus porösen Polymeren, in deren Poren kleinere Moleküle eindringen können, wohingegen große Moleküle nur in die äußeren Zwischenräume gelangen. Deshalb wandern große Moleküle schneller durch die Säule als kleine.

Aufreinigung des Rieske-Proteins

Diese Chromatographiemethode wurde für das Rieske-Protein aus *Thermus thermophilus* durchgeführt. Die Isolierung wurde bei RT mit einer FPLC-Anlage (Pump P-500) durchgeführt, mittels eines Durchflussphotometers bei 280 nm verfolgt und das Protein mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Es wurde durchgehend mit einer Puffermischung aus 90 % Puffer A und 10 % Puffer B (Kap. 5.3.5) gearbeitet. Äquiliert wurde die Säule „HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade“ mit mindestens zwei Säulenvolumen des Puffers. Mittels eines 2-ml-Loops wurde die Proteinlösung (Kap. 5.3.6) auf die Säule aufgetragen und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min die Chromatographie durchgeführt. Nach 100 Minuten wurde der Fraktionssammler aktiviert und das Eluat in 3-ml-Fraktionen aufgefangen. Alle braunen Fraktionen wurden anschließend durch Absorptionsmessungen bei 280 nm (1:10 verdünnt) und 456 nm auf ihren Protein- und Clustergehalt untersucht und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Gereinigtes Rieske-Protein hat ein Verhältnis von A_{460}/A_{280} zwischen 0,23 und 0,27 (Hunsicker-Wang *et al.*, 2003; Fee *et al.*, 1984). Abschließend wurde das isolierte Protein mit einer Membran der Ausschlussgröße von 10 kDa aufkonzentriert (Kap. 5.3.8) und aliquotiert schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Säule wurde erneut mit mindestens zwei Säulenvolumen Puffer gespült, anschließend mit zwei Säulenvolumen H_2O_{dd} , und bei 4 °C gelagert.

Molekülmassenbestimmung

Um die Molekülmasse der Proteine Apd1 und Aim32 zu bestimmen, wurde ebenfalls die Gel-Permeationschromatographie angewendet. Dabei wurde analog zum vorigen Abschnitt vorgegangen, jedoch mit dem Entsalzungspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 9,0) gearbeitet. Apd1 und Aim32 hatten beim Auftragen etwa eine Konzentration von 1,5 mg/ml und die Fraktionen wurden auf 2 ml eingestellt. Nach Elution der Proteine wurde die Säule mit mindestens zwei Säulenvolumen Puffer und zwei Säulenvolumen H_2O_{dd} gespült und bei 4 °C gelagert.

Die in Tabelle 5.3 aufgeführten Proteine wurden zur Eichung verwendet, wobei hier auf eine Fraktionierung verzichtet wurde. Die Konzentrationen dieser Proteine variierten zwischen 1 und 4 mg/ml.

Tabelle 5.3: Proteine zur Eichung der Gel-Permeationssäule

Protein	Molekülmasse [kDa]
Rinderserumalbumin (BSA)	66
Ovalbumin	44,2
Carboanhydrase	29
Cytochrom <i>c</i>	12,3

5.3.8 Proteinaufkonzentrierung durch Zentrifugation

Um die Proteinkonzentrationen in den Probenlösungen zu erhöhen, werden Membrankonzentratoren verwendet, die Poren kleiner als die Proteingröße enthalten. Durch geeignete Porengrößenwahl können die Lösungen sowohl in ihrer Konzentration als auch in ihrer Reinheit gesteigert werden, da nur Proteine, die einen kleineren Durchmesser haben als die Pore (Ausschlussgröße), passieren können. In dieser Arbeit wurden die Vivaspin Konzentratoren bei 3800 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf A-4-62) und 12 °C so lange zentrifugiert, bis sich die gewünschten Volumina einstellten. Vor Gebrauch wurden sie mit H₂O_{dd} von Konservierungsstoffen befreit und sämtliche Zentrifugationsschritte wurden mit austarierten Probengefäßen durchgeführt.

5.4 Quantitative und qualitative Analysemethoden

5.4.1 UV/Vis-Spektroskopie

Eine wichtige Methode Fe/S-Proteine zu analysieren, stellt die UV/Vis-Spektroskopie dar, da Absorptionsspektren von Eisen-Schwefel-Clustern sehr charakteristische Merkmale besitzen. [4Fe-4S]-Cluster zeigen im sichtbaren Bereich nur eine Schulter bei ca. 420 nm. Im Gegensatz dazu besitzen [2Fe-2S]-Cluster mehrere deutlich sichtbare Maxima zwischen 300 und 600 nm. Deshalb lässt sich durch die Aufnahme eines Spektrums zwischen 250 nm und 600 nm schnell Anwesenheit und Art des enthaltenen Clustertyps bestimmen. Die gereinigten Proteine wurden 1:10 verdünnt in eine UV-Küvette pipettiert und das Absorptionsspektrum gemessen. Dies diente meist einer ersten Abschätzung der Proteinkonzentration sowie des Clustergehalts.

5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-Biuret-Methode

Um Proteinkonzentrationen zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist die Micro-Biuret-Methode, welche 1953 publiziert wurde (Goa, 1953). Sie beruht darauf, dass Proteine im alkalischen Milieu mit Cu²⁺-Ionen blauviolette Komplexe bilden können. Dabei kommt es zu einer Koordination des Cu²⁺ mit vier Stickstoffatomen der Peptidbindungen und dieser Komplex kann bei 545 nm photometrisch gemessen werden. Da damit allerdings keine absoluten Werte bestimmt werden können, muss immer eine Kalibriergerade erstellt werden. Als Standardprotein wird dafür BSA verwendet.

BSA-Standard

2 mg/ml BSA

DOC-Lösung

0,15 % (w/v) Natriumdesoxycholat (DOC)

TCA-Lösung

70 % (w/v) Trichloressigsäure

NaOH-Lösung

3 % (w/v) Natriumhydroxid

Micro-Biuret-Reagenz

590 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat

940 mM Natriumcarbonat

70 mM Kupfersulfat

Tabelle 5.4: Pipettierschema der Probenansätze der Micro-Biuret-Methode

	BSA-Standard (2 mg/ml)						Proteinprobe		
Protein (μl)	0	50	100	150	200	300	10	20	30
H ₂ O _{dd} (μl)	1000	950	900	850	800	700	990	980	970

Zur Erstellung der Kalibriergeraden und zur Probenvorbereitung wurden die in Tabelle 5.4 beschriebenen Volumina pipettiert. Je nach Konzentration der Proben, abgeschätzt durch ein UV/Vis-Spektrum, variierten die Mengen der Proteinzugaben in den Ansätzen und das Protein wurde zum Teil auch 1:10 verdünnt eingesetzt. Im zweiten Schritt wurde jeder Probe 100 μl der DOC-Lösung (0,15 %) zugegeben, invertiert und fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 100 μl TCA (70 %) wurde erneut gemischt und zentrifugiert (RT, 13000 x g, 10 min). Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig und gründlich entfernt und die Pellets in je 950 μl NaOH (3 %) durch Vortexen gelöst. Als nächstes wurden 50 μl des Micro-Biuret-Reagenzes hinzugefügt und nach Invertieren für 15 Minuten in der Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurden die Proben bei 545 nm in Einmalküvetten gegen H₂O_{dd} gemessen und zur Bestimmung der Proteinkonzentration das arithmetische Mittel aller vermessenen Reaktionsansätze verwendet.

5.4.3 Bestimmung des Eisen- und säurelabilen Schwefelgehaltes

Ein wichtiger Punkt der Analyse von Fe/S-Proteinen ist die Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehaltes im gereinigten Protein. Dadurch können Rückschlüsse auf die enthaltenen Fe/S-Cluster gezogen werden. Um die Stöchiometrien berechnen zu können, werden die im folgenden beschriebenen Methoden durchgeführt.

Bestimmung des Eisengehaltes

In der Bestimmung von Lovenberg *et al.* (1963) wird ausschließlich der Gehalt von Nicht-Häm-Eisen detektiert. Sie basiert auf der Freisetzung des Eisens aus dem Protein, der Umwandlung zu Fe²⁺ und einer anschließenden Komplexbildung mit dem Chelator Feren. Dieser blaue Komplex kann dann bei 593 nm photometrisch vermessen werden. Dabei werden wie bei der Micro-

Biuret-Methode keine absoluten Werte ermittelt. Für die Kalibriergerade wurde in dieser Arbeit Mohrsches Salz (0,2 mM) verwendet.

Eisenstandard (frisch ansetzen)

0,2 mM Mohrsches Salz

HCl-Lösung

1 % (w/v) HCl

Ammoniumacetatlösung

7,5 % (w/v) Ammoniumacetat

Ascorbinsäurelösung (frisch ansetzen)

4 % (w/v) Ascorbinsäure

SDS-Lösung

2,5 % (w/v) SDS

Ferenlösung

1,5 % (w/v) Feren

Tabelle 5.5: Pipettierschema der Probenansätze zur Bestimmung des Eisengehaltes

	Eisenstandard (0,2 mM)							Proteinprobe		
Reagenz (μl)	0	10	20	40	60	80	100	10	20	30
H ₂ O _{dd} (μl)	100	90	80	60	40	20	0	90	80	70

Zur Erstellung der Kalibriergeraden und der Probenvorbereitung wurden die in Tabelle 5.5 beschriebenen Volumina pipettiert. Auch hier wurden die Proteine entweder pur oder 1:10 vermessen und entsprechend die Volumina angepasst. Zuerst wurden zu den Reaktionsansätzen je 100 μl HCl (1 %) gegeben und zehn Minuten bei 80 °C im vorgeheizten Thermomixer inkubiert. In die abgekühlten Proben wurden dann nacheinander je 500 μl Ammoniumacetat (7,5 %), 100 μl Ascorbinsäure (4 %) und 100 μl SDS (2,5 %) pipettiert. Nach jeder Zugabe wurde durch Vortexen gemischt. Nach einer Zugabe von 100 μl Feren (1,5 %) wurde invertiert und die Mischungen zentrifugiert (RT, 13000 $\times g$, 7 min), um mögliche Präzipitate zu entfernen. Nach vorsichtiger Überführung der Überstände in Einmalküvetten konnten jetzt alle Ansätze bei 593 nm gegen H₂O_{dd} gemessen werden. Auch hier wurden zur Bildung des arithmetischen Mittels die drei unterschiedlich stark konzentrierten Proteinproben verwendet und unter Zuhilfenahme der Kalibriergeraden der Eisengehalt ermittelt.

Bestimmung des säurelabilen Schwefelgehaltes

Die Methode nach Fogo & Popowsky (1949) ermöglicht spezifisch die Bestimmung von säurelabilem Schwefel. Der aus den Aminosäuren Methionin oder Cystein stammende Schwefel wird dabei nicht detektiert, sondern nur der im Fe/S-Cluster enthaltene. Dafür muss er mittels einer Behandlung mit Zinkacetat und Natriumhydroxid als Zinksulfid aus dem Protein freigesetzt und anschließend zu Schwefelwasserstoff umgesetzt werden. Dieser kann mit zwei Molekülen DMPD (*N,N*-Dimethyl-1,4-phenylendiamin) unter sauren und oxidativen Bedingungen den Farbstoff Methylenblau bilden, der photometrisch bei 670 nm gemessen wird. Mehr noch als bei der Eisenbestimmung ist es durch die variable Ausbeute von Methylenblau nicht möglich, Extinktionskoeffizienten zu benutzen, daher wurde in dieser Arbeit als Standard Lithiumsulfid verwendet.

Sulfidstandard (frisch ansetzen)

20 mM Lithiumsulfid
in 10 mM NaOH
wird 1:10 verdünnt eingesetzt

Zinkacetatlösung

1 % (w/v) Zinkacetat
aus einer 10 % Zinkacetatlösung frisch verdünnt

NaOH-Lösung

7 % (w/v) NaOH

DMPD-Lösung

0,1 % (w/v) DMPD
in 5 M HCl

Eisen(III)-chloridlösung

10 mM Eisen(III)-chlorid
in 1 M HCl

Tabelle 5.6: Pipettierschema der Probenansätze zur Bestimmung des säurelabilen Schwefelgehaltes

	Sulfidstandard (2 mM)						Proteinprobe		
Reagenz (μ l)	0	5	10	15	20	25	10	20	30
H ₂ O _{dd} (μ l)	200	195	190	185	180	175	190	180	170

Zuerst wurden die in Tabelle 5.6 beschriebenen Probenansätze pipettiert. Wie auch im Micro-Biuret-Test und bei der Eisenbestimmung wurden die Proteine entweder unverdünnt oder 1:10 verdünnt gemessen und entsprechend die Volumina angepasst. Nach Zugabe von je 600 μ l Zinkacetat (1 %) sowie 50 μ l NaOH (7 %) wurden die Ansätze durch Invertieren gemischt und bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (RT, 13000 rpm, 15 s, Sigma 1-16). Die nächsten Schritte wurden jeweils für ein Reaktionsgefäß direkt hintereinander durchgeführt. Durch langsames Hinzufügen von 150 μ l DMPD (0,1 %) bei gleichzeitigem vorsichtigem Vermischen wurde das Pellet aufgelöst und 150 μ l Eisen(III)-Chlorid zugegeben. Nach sofortigem Verschließen des Reaktionsgefäßes wurde die Mischung 30 Sekunden lang gevortext. Nach einer Inkubation der Proben für 20 Minuten bei RT, wurde erneut zentrifugiert (RT, 13000 rpm, 7 min, Sigma 1-16), um mögliche Proteinpräzipitate zu entfernen. Die Überstände wurden dann in Einmalküvetten überführt und bei 670 nm gegen H₂O_{dd} gemessen. Die drei unterschiedlich konzentrierten Proben wurden auch in diesem Fall genutzt, um mittels des arithmetischen Mittels den säurelabilen Schwefelgehalt der Proteinlösung zu bestimmen.

5.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE, welche von Laemmli (1970) eingeführt wurde, stellt eine Methode zur Abschätzung der molekularen Masse von Proteinen dar. Außerdem kann damit die Reinheit von Proteinen überprüft werden. Die Gelmatrix besteht aus zwei Teilen, dem Sammelgel und dem Trenngel, wobei sich die beiden in pH-Wert und Porengröße unterscheiden. Die unteren zwei Drittel der Elektrophoresekammer werden mit dem engerporigen Trenngel befüllt, das obere Drittel mit dem weitporigen Sammelgel. Zur Vorbereitung der Proben werden sie im

Probenpuffer auf 95 °C erhitzt, um sie zu denaturieren und das im Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) ist hierbei für die Spaltung der Disulfidbrücken verantwortlich. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit hauptsächlich von der molekularen Größe der Proteine abhängig. Im Sammelgel werden die durch SDS (Natriumdodecylsulfat) negativ geladenen, denaturierten Proteine zunächst aufkonzentriert, sodass sie eine extrem schmale Bande bilden. Die Trennung des Proteingemischs erfolgt im Trenngel. Dessen Trennwirkung resultiert aus den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen. Größere Proteine wandern langsamer im elektrischen Feld zur Anode als kleine Proteine (Siebwirkung des Trenngels). Aus diesen unterschiedlichen Laufstrecken kann dann im Vergleich zu einem Standard (Protein Marker III bzw. Roti[®]-Mark Standard) die molekulare Masse der Proteine abgeschätzt werden.

Trenngelpuffer

1,5 M Tris
0,4 % (w/v) SDS
pH = 8,8

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris
0,4 % (w/v) SDS
pH = 6,8

APS-Lösung

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Acrylamid-/Polyacrylamidlösung

Rotiphorese Gel 30 % w/w (Verhältnis 37,5:1)

Probenpuffer (2x)

125 mM Tris
4 % (w/v) SDS
20 % Glycerin
200 mM DTT
pH = 6,8
0,02 % Bromphenolblau*

Elektrophoresepuffer (10x)

1,9 M Glycin
0,25 mM Tris
1 % (w/v) SDS
ad 2 l H₂O_{dd}
pH ≈ 8,3 (nur zur Kontrolle, wird nicht angepasst)

*Hinweis: Zuerst wird eine Tris-Lösung mit pH 6,8 hergestellt. Anschließend wird von dieser Lösung so viel zu dem Gemisch aus SDS, Glycerin und DTT gegeben, bis die gewünschte Menge erreicht ist. Bromphenolblau wird zuletzt zugegeben.

Tabelle 5.7: Pipettierschema für gängige Trenn- und Sammelgele: Mengenangaben für 2 Gele

	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4,5 %)
H ₂ O _{dd}	5,25 ml	3,75 ml	3 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	1,25 ml
Acrylamidlösung	6 ml	7,5 ml	0,75 ml
TEMED	30 µl	30 µl	10 µl
APS-Lösung	75 µl	75 µl	30 µl

Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben auf das Gel wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 75 V gestartet. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

Gelfärbung und -dokumentation

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit H₂O_{dd} gewaschen und entweder mit Instant Blue (Expedeon) oder mit Roti Blue (Roth) nach Herstelleranleitung gefärbt. Diese Färbemittel enthalten den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue, welcher sich an positiv geladene Proteinreste anlagert und so die im Gel enthaltenen Proteinbanden einfärbt. Nach Entfärben der Gele mit H₂O_{dd} konnte durch Vergleich der jetzt sichtbaren Banden mit den Markerbanden die Molekülmasse der Proteine abgeschätzt werden. Zur Dokumentation wurden die Gele mit dem Geldokumentationsgerät Fusion SL Vilber Lourmat (Peqlab) fotografiert.

5.4.5 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

In der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) wird eine Probe mit Mikrowellen im X-Band-Bereich bestrahlt, während sie sich in einem äußeren Magnetfeld befindet. Bei gleichbleibender Mikrowellenleistung und -frequenz wird das Magnetfeld variiert. Änderungen der reflektierten Mikrowellen gehen auf Absorptionen durch die eingebrachte Probe zurück. Für diese Methode muss die Probe ungepaarte Elektronen enthalten, also paramagnetisch sein. Fe/S-Cluster zeigen im ESR je nach Typ und Redoxzustand charakteristische Spektren. Daher können aufgrund von ESR-Spektren Rückschlüsse auf die im Protein enthaltenen Cluster gezogen werden.

Um die in den gereinigten Proteinen enthaltenen [2Fe-2S]²⁺-Cluster in einen einheitlichen elektronischen Zustand zu versetzen, wurden sie vor der Messung in der anaeroben Glove Box mit Natriumdithionit (Endkonzentration 2 mM) versetzt und so zu [2Fe-2S]¹⁺ reduziert. Anschließend wurden 300 µl der Proteinlösung in ein ESR-Röhrchen gefüllt, das Röhrchen verschlossen und nach einer Inkubation von fünf Minuten wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messung erfolgte in dieser Arbeit bei einer Temperatur von 77 K, mit einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Modulationsamplitude von 1,5 mT. Die Mikrowellenleistung lag bei 6,4 mW und die Mikrowellenfrequenz bei 9,42 GHz. Ein Scan dauerte jeweils 84 Sekunden.

Die Proben der Redox titrationen (Kap. 5.4.8) wurden ebenfalls mittels ESR-Spektroskopie gemessen.

5.4.6 pK_s-Wert-Bestimmung von Histidin-Liganden in [2Fe-2S]-Proteinen

Zur Bestimmung der pK_s-Werte von Histidin-Liganden in [2Fe-2S]-Proteinen wurde in dieser Arbeit die UV/Vis-Spektroskopie (Kap. 5.4.1) verwendet. Dabei wurden die entsprechenden Proteine in verschiedenen Puffern (Tab. 5.8) einer Konzentration von 200 mM verdünnt. Je nach Konzentration des verwendeten Präparates musste die Verdünnung angepasst werden. Es wurde

darauf geachtet, dass die Absorption bei 450 nm der zu messenden Proteinlösung bei ca. 0,2-0,4 lag. Innerhalb einer Messreihe wurde allerdings immer die gleiche Verdünnung verwendet. Nach der Messung der UV/Vis-Spektren wurden die exakten pH-Werte der Lösungen gemessen. Zur Auswertung der Spektren wurde die Differenz von 445 nm und 465 nm gegen den gemessenen pH aufgetragen. Um die pK_S -Werte zu ermitteln, wurden entweder eine Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Apd1 Mutanten) oder eine Summe aus zwei Henderson-Hasselbalch-Gleichungen (Konkle *et al.*, 2009) verwendet. Im Fall von Apd1 wurden jeweils die Anteile der diprotonierten, monoprotinierten und deprotonierten Proteinanteile (Nguyen & Rabenstein, 2011) einbezogen, um die makroskopischen pK_S -Werte zu berechnen. Es wurde mit der EXCEL-Solver-Funktion über die Methode der kleinsten Quadrate (GRG-Nichtlinear) gefittet und die vier Variablen ΔAbs_{pK_1} , ΔAbs_{pK_2} , pK_{ox_1} und pK_{ox_2} angepasst.

Tabelle 5.8: Verwendete Puffer für die pK_S -Wert-Bestimmung. pH wurde mit 1 M NaOH eingestellt.

pH	Puffer (200 mM)	pH	Puffer (200 mM)
5,0	MES	8,5 9,0	TAPS
5,5			
6,0			
6,5			
7,0	HEPES	9,5 10,0 10,5 11,0	CAPS
7,5			
8,0			

5.4.7 Probenvorbereitung für die Mössbauerspektroskopie

Um Mössbauerspektren von Protein-gebundenen Fe/S-Clustern messen zu können, muss eine Anreicherung des ^{57}Fe -Isotops im Protein erreicht werden. Im Medium, welches normalerweise zur Aufzucht der Bakterien verwendet wird, ist nur $6,3\ \mu\text{M}$ Eisen enthalten. In der natürlichen Isotopenverteilung hat das Isotop ^{57}Fe nur eine relative Häufigkeit von 2,2 %. Um eine Erhöhung auf mindestens 80 % zu erreichen, wurde eine ^{57}Fe -Lösung hergestellt, die bei der Aufzucht der Bakterien als Zusatz anstelle von nicht markiertem Ammoniumeisen(III)-Citrat ins Medium gegeben wurde. Anschließend wurde das Protein gereinigt (Kap. 5.3), aufkonzentriert und in ein entsprechendes Mössbauer-Probengefäß eingefüllt. Die Proben hatten ein Volumen von ca. $400\ \mu\text{l}$ und sollten eine möglichst hohe Konzentration an Protein bzw. Eisen im Cluster beinhalten. Die Proben wurden von Dipl. Biophys. Hendrik Auerbach und Dipl. Biophys. Christina Müller aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V. Schünemann im Fachbereich Physik (Biophysik) an der TU Kaiserslautern vermessen.

Herstellung einer ^{57}Fe -Lösung

Zuerst wurden 33,5 mg ^{57}Fe zusammen mit 1 ml HCl (8 M) in einem Glasgefäß solange gerührt, bis das Pulver gelöst war. Üblicherweise wurde diese Mischung über das Wochenende angesetzt. Um Verluste zu vermeiden, wurde die Öffnung locker mit Parafilm verschlossen, sodass aber immer noch kleinere Mengen an entstehendem Wasserstoffgas entweichen könnten. Sobald das komplette ^{57}Fe in Lösung war, wurden 4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und 200 mg Trinatriumcitrat-Dihydrat zugegeben. Anschließend wurde diese Lösung vorsichtig mit Ammoniak (25 %) auf einen pH-Wert zwischen fünf und sechs titriert.

Um eine definierte Menge an ^{57}Fe ins Medium (100 μM) zugeben zu können, wurde von dieser Lösung anschließend eine Eisenbestimmung durchgeführt gemäß Kapitel 5.4.3 mit der Änderung, dass die Zugabe von SDS nicht durchgeführt wurde und das Probenvolumen (Wasser und Standard oder Probe) auf 300 μl erhöht war. Dazu wurden 10, 20 und 30 μl einer 1:100 Verdünnung gemessen.

5.4.8 Redoxtitration

Um die elektrochemischen Potentiale der isolierten Proteine zu bestimmen, wurde eine Redox-titration in der anaeroben Glove Box durchgeführt. Hierfür wurde ein Ansatz aus einem Milliliter Mediatormix (Tab. 5.9), zwei Milliliter 200 mM Puffer (Tab. 5.10) und einem Milliliter des Apd1-Proteins (ca. 2 mg/ml) verwendet. Das Protein wurde vorher mit dem entsprechend verwendeten, geringer konzentrierten Puffer (50 mM) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die im Mediatormix enthaltenen Chemikalien wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ unter Sauerstoffausschluss gelöst und pufferten das elektrochemische Potential in der Lösung. Die Konzentration der Mediatoren lag in allen Fällen bei 160 μM in der Stammlösung und 40 μM während der Bestimmung.

In der Regel wurde mit definierten Zugaben einer frischen Natriumdithionitlösung (2 mM, 20 mM oder 50 mM) das Potential des Gemisches langsam schrittweise verringert (reduktiv). Alternativ konnte auch mit einer Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung das Potential schrittweise erhöht werden (oxidativ). Dabei wurden mit einer Redoxelektrode (Silber / Silberchlorid; +207 mV vs. SHE) die Zugaben überwacht. An acht verschiedenen Punkten wurde eine Probe (300 μl) entnommen, in ein ESR-Röhrchen transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von diesen Proben wurden anschließend ESR-Spektren gemessen und die normierten Amplituden der g_y -Werte der Spektren gegen das gemessene Potential aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der Nernst-Gleichung ($n = 1$; $T = 298 \text{ K}$). Auch hier wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewendet und diese mit der EXCEL-Solver-Funktion (GRG-Nichtlinear) gefittet. Um die Abhängigkeit des Potentials vom pH zu untersuchen, wurden die Messungen in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte hier analog zu Zu *et al.* (2003).

Tabelle 5.9: Chemikalien im Mediatormix und ihre Redoxpotentiale

Chemikalie	Redoxpotential (vs. SHE) bei pH 7
<i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	+276 mV
2,6-Dichlorphenolindophenol	+217 mV
Phenazinethosulfat	+55 mV
Methylenblau	+11 mV
Resorufin	-51 mV
Indigokarmin	-125 mV
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	-152 mV
Natriumanthrachinon-2-sulfonat	-225 mV
Phenosafranin	-252 mV
Safranin T	-289 mV
Neutralrot	-329 mV
Benzylviologen	-358 mV
Methylviologen	-449 mV

Tabelle 5.10: In Redox titrationen verwendete Puffer

pH	Puffer
7,0	HEPES
7,3	MOPS
7,5	HEPES
7,8	TAPS
8,0	HEPES bzw. Tris
8,2	TAPS
8,5	
9,0	
9,5	CAPS
10,0	

5.4.9 Bioinformatik

Um einen phylogenetischen Stammbaum der Proteine Apd1 und Aim32 zu erstellen, wurden die Internetseiten Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) mit den Standardeinstellungen und iTOL (<http://itol.embl.de/>) verwendet.

Es wurde die Sequenz im Bereich der clusterbindenden Liganden von Apd1 verwendet. Dabei wurden alle Aminosäuren des Clusterbindemotivs inklusive sechs vor dem ersten Cystein und sechs nach dem zweiten Histidin zum Vergleich herangezogen. Diese verkürzte Sequenz wurde zur Suche in anderen Organismen eingesetzt. Dazu wurden die Seiten des Joint Genome Institute (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi> (Eukaryoten)) und des National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) verwendet. Die Seite von NCBI wurde nach Auswahl einiger Organismen aus jedem Ast auf der Seite MycoCosm des Joint Genome Institute (JGI MycoCosm: <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) zur Suche genutzt. Anschließend wurde der phylogenetische Stammbaum mit den oben genannten Programmen dargestellt.

6. Anhang

6.1 Vektorkarten

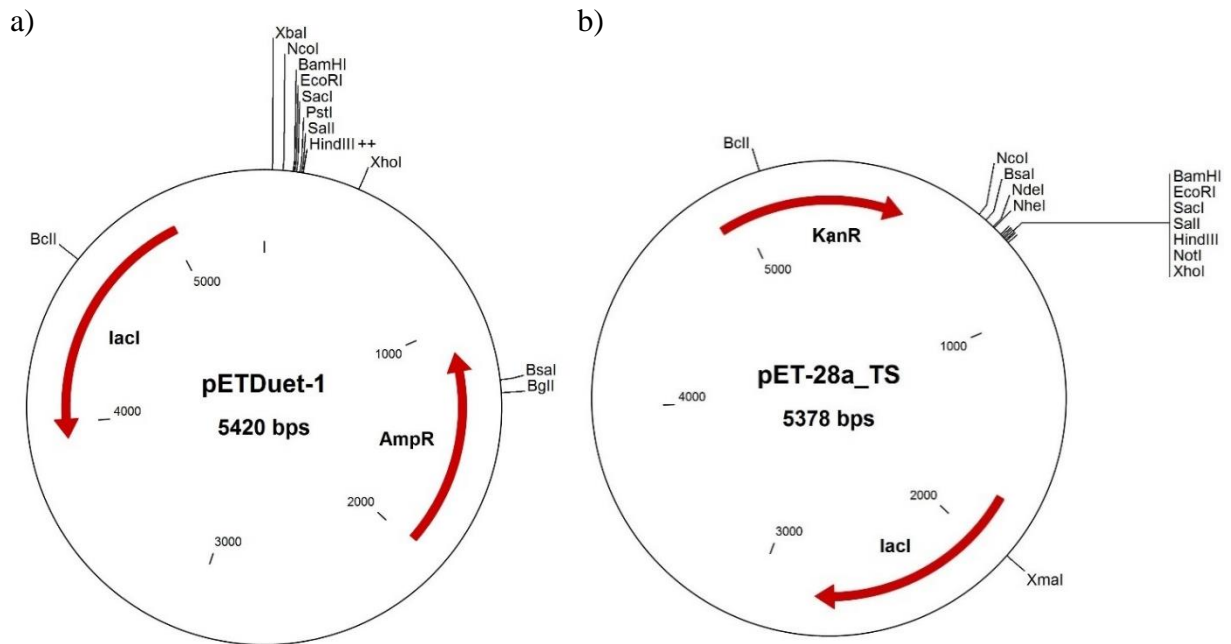


Abbildung 6.1: Karten der Leervektoren. a) pETDuet-1; b) pET-28a_TS.

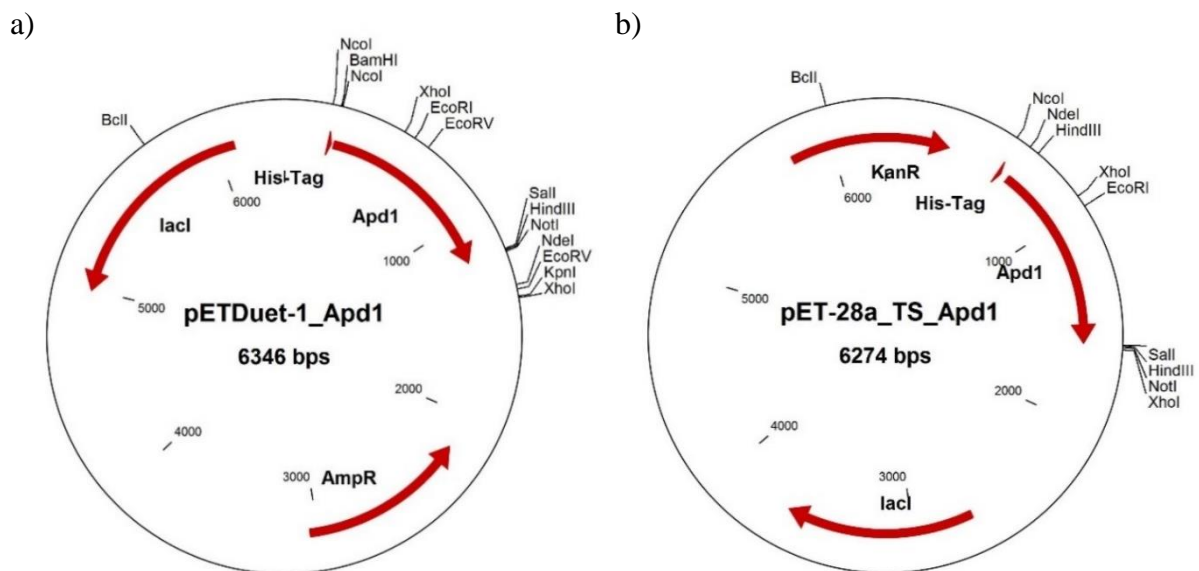


Abbildung 6.2: Karten der Vektoren, die für das Protein Apd1 kodieren. a) pETDuet-1_Apd1; b) pET-28a_TS_Apd1.

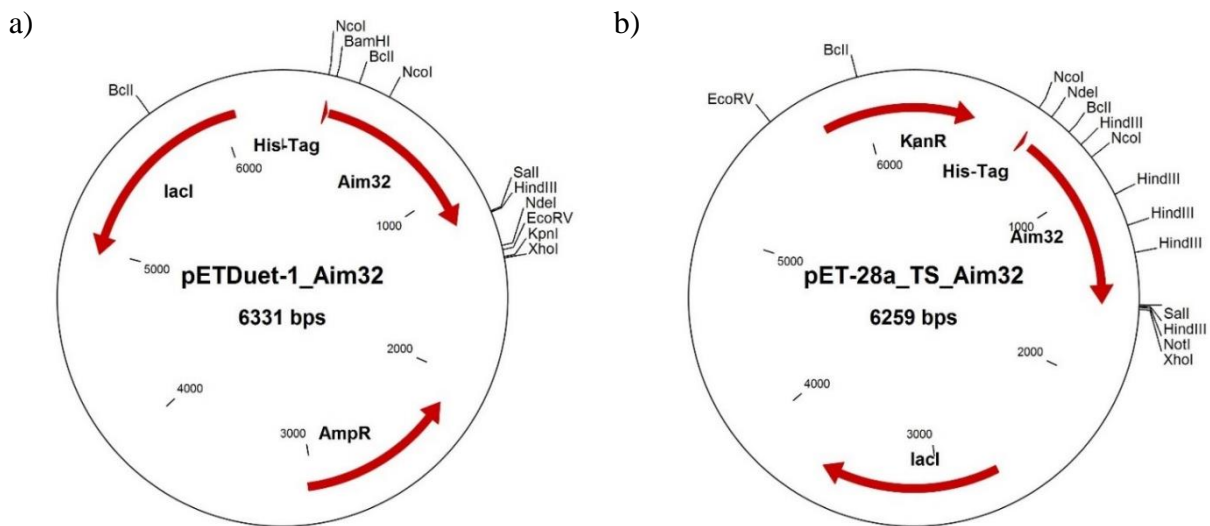


Abbildung 6.3: Karten der Vektoren, die für das Protein Aim32 kodieren. a) pETDuet-1_Aim32; b) pET-28a_TS_Aim32.

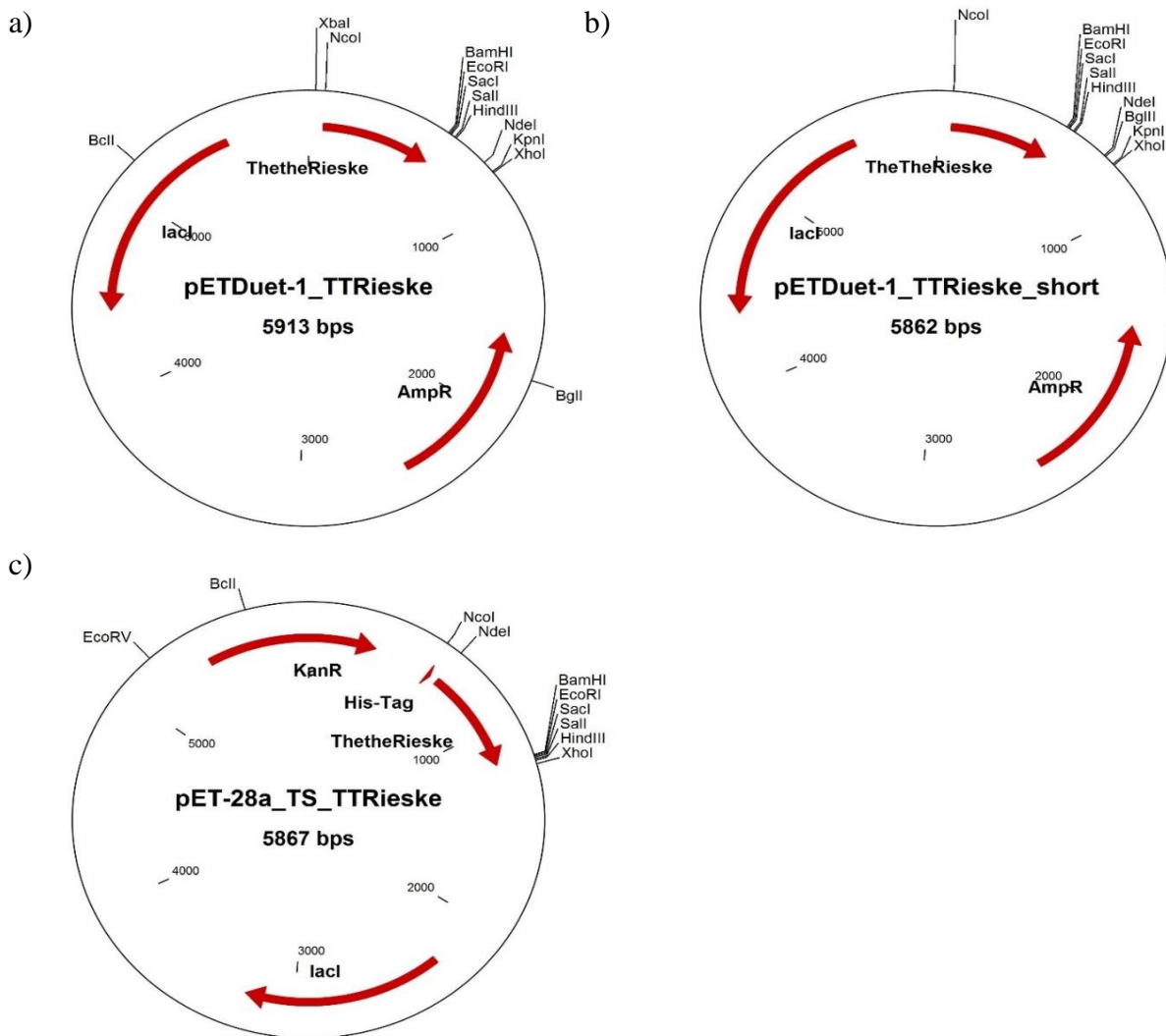


Abbildung 6.4: Karten der Vektoren, die für das Rieske-Protein aus *T.thermophilus* kodieren. a) pET-Duet-1_TTRieske; b) pETDuet-1_TTRieske_short; c) pET-28a_TS_TTRieske.

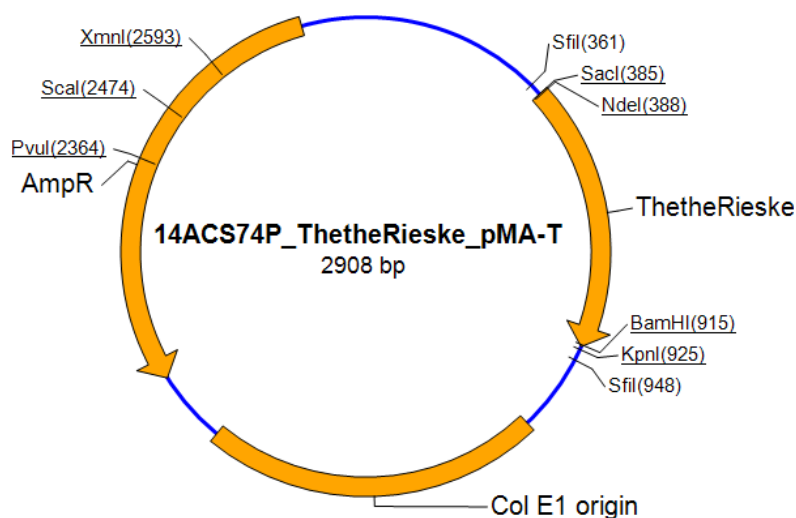


Abbildung 6.5: Karte des Vektors mit dem synthetischen Gen von GeneArt AG. Codonoptimiertes Rieske-Protein im Vektor pMA-T.

6.2 DNA- und Aminosäuresequenzen der Proteine

pETDuet-1_Apd1

```

1  ATGGGCAGCA GGCATCACCA TCATCACCAC AGCCAGGATC CCATGGCTTT TTTGAATATT
   M G S S H H H H H H S Q D P M A F L N I
61  TTCAAGCAAA AACGTGGTGA TGAAGCTTCA CAACTGAGCG CAAAGGGACG GGAGGAAATT
   F K Q K R G D E A S Q L S A K G R E E I
121 TCTCAATCGA TTAAGATATG CAAAAGTGAC GATGCTGCTA ACGAACATAG CTGCTCTGGT
   S Q S I K I C K S D D A A N E H S C S G
181 GATTGCAAAA CAGAAATTGA AGAAGGAGAG CAGGCCTTTG CGAAACTAAA GATCGAACAT
   D C K T E I E E G E Q A F A K L K I E H
241 GAAACTCCTT TGTTGAACTC TTCTAAAACG CCAAAAATTC ACTTCGTTGT CCCCACCTCT
   E T P L L N S S K T P K I H F V V P T S
301 CAAATCGATT GGCAGCATGA TGCCTGCCTC GAGGACCCAA AGTCAGTACA GTATAAAATT
   Q I D W Q H D A C L E D P K S V Q Y K I
361 TCCCAGTGGT GTGATAAGAA TTCAGCTAAA TTTTCCAACG TGGGCACAGG CAAGACACTA
   S Q W C D K N S A K F S N V G T G K T L
421 AACTGTGCAG TTTCATCTTT ACCTAAAGAT ATCATGGATA TTGATGTTAT GCGGGGAACC
   N C A V S S L P K D I M D I D V M R G T
481 AAGAATAATG TACTTATTTT GCCTTACTTC ATTTGGCTGA ACGACCTTAG ATCAGATGAC
   K N N V L I L P Y F I W L N D L R S D D
541 GTCGAAGCAA CGCTGGATGG TTTAGTTCCT GACTTATTAG ACGAGAATAT TTCAAGAGAG
   V E A T L D G L V P D L L D E N I S R E
601 AAATTGCTAG AAACACGACC AAATGTTGCC GTTGCACGTG AACGTGCATT TGTATTTATA
   K L L E T R P N V A V A R E R A F V F I
661 TGTTACATA CTACGAGGGA TAAACGATGC GGGATTACGG CACCCTATTT AAAGAAAGTT
   C S H T T R D K R C G I T A P Y L K K V
721 TTTGACAGTA AATTACAGGA ACATGGGCTG TATAGGGACA ATTCGGATTA CAGGKCAGAG
   F D S K L Q E H G L Y R D N S D Y R A E
781 GGTGTCAAAA TTGCATTTGT TAATCATGTT GGTGGTCACA AATTTGCTGC AAATGTTCAA
   G V K I A F V N H V G G H K F A A N V Q
841 APTTATTTAC GAAATCCAAA TACCTTAATT TGTTGGGAA GAGTAACTCC AACCATAGTT
   I Y L R N P N T L I W L G R V T P T I V
901 CCTTCTATTG TCGAACATCT GATTGTTTCT GAAGAACCAA CGTTGCCGTT TCCCGAAAAA
   P S I V E H L I V P E E P T L P F P E K
961 GTTCGCTGTA TTAAGAAATA TCAAAGCTGGTAG
   V R C I K K Y Q S W -

```

pET-28a_TS_Apd1

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC GGGTCTCCAA CGACCGAAAA CTTGTATTTT
   M G S S S H H H H H H H G S P T T E N L Y F
61  CAGGGCCATA TGGCTTTTTT GAATATTTTC AAGCAAAAAC GTGGTGATGA AGCTTCACAA
   Q G H M A F L N I F K Q K R G D E A S Q
121 CTGAGCGCAA AGGGACGGGA GGAAATTTCT CAATCGATTA AGATATGCAA AAGTGACGAT
   L S A K G R E E I S Q S I K I C K S D D
181 GCTGCTAACG AACATAGCTG CTCTGGTGAT TGCAAAACAG AAATTGAAGA AGGAGAGCAG
   A A N E H S C S G D C K T E I E E G E Q
241 GCCTTTGCGA AACTAAAGAT CGAACATGAA ACTCCTTTGT TGAACTCTTC TAAAACGCCA
   A F A K L K I E H E T P L L N S S K T P
301 AAAATTCACT TCGTTGTCCC CACCTCTCAA ATCGATTGGC AGCATGATGC CTGCCTCGAG
   K I H F V V P T S Q I D W Q H D A C L E
361 GACCCAAAGT CAGTACAGTA TAAAATTTCC CAGTGGTGTG ATAAGAATTC AGCTAAATTT
   D P K S V Q Y K I S Q W C D K N S A K F
421 TCCAACGTGG GCACAGGCAA GACACTAAAC TGTGCAGTTT CATCTTTACC TAAAGATATC
   S N V G T G K T L N C A V S S L P K D I
481 ATGGATATTG ATGTTATGCG GGAACCAAG AATAATGTAC TTATTTTGCC TTTACTTCATT
   M D I D V M R G T K N N V L I L P Y F I
541 TGGCTGAACG ACCTTAGATC AGATGACGTC GAAGCAACGC TGGATGGTTT AGTTCCTGAC
   W L N D L R S D D V E A T L D G L V P D
601 TTATTAGACG AGAATATTTT AAGAGAGAAA TTGCTAGAAA CACGACCAAA TGTTGCCGTT
   L L D E N I S R E K L L E T R P N V A V
661 GCACGTGAAG GTGCATTTGT ATTTATATGT TCACATACTA CGAGGGATAA ACGATGCGGG
   A R E R A F V F I C S H T T R D K R C G
721 ATTACGGCAC CCTATTTAAA GAAAGTTTTT GACAGTAAAT TACAGGAACA TGGGCTGTAT
   I T A P Y L K K V F D S K L Q E H G L Y
781 AGGGACAATT CGGATTACAG GGCAGAGGGT GTCAAAATTG CATTTGTTAA TCATGTTGGT
   R D N S D Y R A E G V K I A F V N H V G
841 GGTCACAAAT TTGCTGCAAA TGTTCAAATT TATTTACGAA ATCCAAATAC CTTAATTTGG
   G H K F A A N V Q I Y L R N P N T L I W
901 TTGGGAAGAG TAACTCCAAC CATAGTTCCT TCTATTGTCT AACATCTGAT TGTTCCCTGAA
   L G R V T P T I V P S I V E H L I V P E
961 GAACCAACGT TGCCGTTTCC CGAAAAAGTT CGCTGTATTA AGAAATATCA AAGCTGGTAA
   E P T L P F P E K V R C I K K Y Q S W -

```

pETDuet-1_Aim32

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCACCA TCATCACCAC AGCCAGGATC CCATGCTACG TATAACTGTC
   M G S S S H H H H H H S Q D P M L R I T V
61  AAAACTTTGC AGCAGCGGGC ATCCTTCCAT CATAGCTTCA AACATATTAG CGTTCCTGAT
   K T L Q Q R A S F H H S F K H I S V P D
121 CTCATACC GTGCTCAAAA TGATCAAACA AACTGTTATT GCCAAGAAAT AAACGCAAGG
   L H T R A Q N D Q T N C Y C Q E I N A R
181 CTGCCTTCAA AAAGTATGCC ATTAGATCCT CATATCAAGC TTCCTCATAG AACGCCCAAT
   L P S K T D P L D P H I K L P H R T P N
241 TACAATAAGC ATGTTTTGCT GTTATCACCG GGTGATAGGT TTGCTCAACC ATGGAAGGTA
   Y N K H V L L L S P G D R F A Q P W K V
301 GCATGGAATC ATAATTTGGA TACTAATAA AATCGGCCAT ATAATGCCAT TAGTAAATTG
   A W N H N L D T N T N R P Y N A I S K L
361 CGCTCCCATT TAGGTGGTTC TCCAGGAATA CTAATAAATG CCGTGCATTT GCAAAATGAA
   R S H L G G S P G I L I N A V H L Q N E
421 TTTATTCCAA GGCCAAAACA ACACGATGAA TGGCTTTATT TTTTGTAT TCCTGACATG
   F I P R P K Q H D E W L Y F F V I P D M
481 AAGCTTTATG TAATTAAGGA AACGGATC GAGGAATTTG CATCTTTTTT AGATGAAGGA
   K L Y V I K E T D I E E F A S F L D E G
541 GCTATTCAAG CACCAAAGCT ATCCTTCCAG GATTATTTAA GCGGTAAGGC CAAGGCTTCC
   A I Q A P K L S F Q D Y L S G K A K A S
601 CAACAGGTTT ATGAAGTGCA TCATAGAAAG CTTACAAGGT TTCAGGGTGA AACTTTTCTA
   Q Q V H E V H H R K L T R F Q G E T F L
661 AGAGATTGGA ACTTAGTCTG TGGGCATTAT AAGAGAGATG CTAAGTGTGG AGAAATGGGA
   R D W N L V C G H Y K R D A K C G E M G
721 CCCGACATAA TTGCAGCATT TCAAGATGAA AAGCTTTTTT CTGAGAATAA TCTAGCCTTA
   P D I I A A F Q D E K L F P E N N L A L
781 ATTTCTCATA TTGGGGGTCA TATTTTTGCT GGTAATGTCA TTTTCTATAA ACTATTCGGC
   I S H I G G H I F A G N V I F Y K L F G
841 AGAGAAAAGA TGCAAAACAA GCTGGATTCA TTATGGTTTG GTAAAGTTTA CCCACACAAC
   R E K M Q N K L D S L W F G K V Y P H N

```

901 TTGAAGCTGT TATGTGAAAA CTTGAAAAAC GGTA AAAATCA TCGACGAAAT GTACAGAGGT
 L K L L C E N L E N G K I I D E M Y R G
 961 GGCATATCG ATGAATTAG
 G I S M N -

pET-28a_TS_Aim32

1 ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC GGGTCTCCAA CGACCGAAAA CTTGTATTTT
 M G S S H H H H H H G S P T T E N L Y F
 61 CAGGGCCATA TGCTACGTAT AACTGTCAAA ACTTTGCAGC AGCGGGCATC CTTCCATCAT
 Q G H M L R I T V K T L Q Q R A S F H H
 121 AGCTTCAAAC ATATTAGCGT TCCTGATCTT CATAACCGTG CTCAAAATGA TCAAACAAAC
 S F K H I S V P D L H T R A Q N D Q T N
 181 TGTTATTGCC AAGAAATAAA CGCAAGGCTG CCTTCAAAAA CTGATCCATT AGATCCTCAT
 C Y C Q E I N A R L P S K T D P L D P H
 241 ATCAAGCTTC CTCATAGAAC GCCCAATTAC AATAAGCATG TTTTGCTGTT ATCACCGGGT
 I K L P H R T P N Y N K H V L L L S P G
 301 GATAGGTTTG TCAACCATG GAAGGTAGCA TGGAATCATA ATTTGGATAC TAATACAAAT
 D R F A Q P W K V A W N H N L D T N T N
 361 CGGCCATATA ATGCCATTAG TAAATTGCGC TCCCATTTAG GTGGTTCTCC AGGAATACTA
 R P Y N A I S K L R S H L G G S P G I L
 421 ATAAATGCGG TGCAATTTGCA AAATGAATTT ATTCCAAGGC CAAAACAACA CGATGAATGG
 I N A V H L Q N E F I P R P K Q H D E W
 481 CTTTATTTTT TTGTTATTCC TGACATGAAG CTTTATGTAA TTAAGGAAAC GGACATCGAG
 L Y F F V I P D M K L Y V I K E T D I E
 541 GAATTTGCAT CTTTTTTAGA TGAAGGAGCT ATTCAAGCAC CAAAGCTATC CTTCCAGGAT
 E F A S F L D E G A I Q A P K L S F Q D
 601 TATTTAAGCG GTAAGGCCAA GGCTTCCCAA CAGGTTTCATG AAGTGCATCA TAGAAAGCTT
 Y L S G K A K A S Q Q V H E V H H R K L
 661 ACAAGGTTTC AGGGTGAAC TTTTCTAAGA GATTGGAAC TAGTCTGTGG GCATTATAAG
 T R F Q G E T F L R D W N L V C G H Y K
 721 AGAGATGCTA AGTGTGGAGA AATGGGACCC GACATAATTG CAGCATTTCA AGATGAAAAG
 R D A K C G E M G P D I I A A F Q D E K
 781 CTTTTCTCTG AGAATAATCT AGCCTTAATT TCTCATATTG GGGGTCATAT TTTTGCTGGT
 L F P E N N L A L I S H I G G H I F A G
 841 AATGTCATTT TCTATAAACT ATTCGGCAGA GAAAAGATGC AAAACAAGCT GGATTCATTA
 N V I F Y K L F G R E K M Q N K L D S L
 901 TGGTTTGTA AAGTTTACCC ACACAACCTG AAGCTGTTAT GTGAAAACCT GGAAAACGGT
 W F G K V Y P H N L K L L C E N L E N G
 961 AAAATCATCG ACGAAATGTA CAGAGGTGGC ATATCGATGA ATTA
 K I I D E M Y R G G I S M N -

pETDuet-1_TTRieske

1 ATGGCAAGCC TGCGTCCGCG TGAAGAAGTT ACACCGGAAA AAGAACCGCT GAAACCGGGT
 M A S L R P R E E V T P E K E P L K P G
 61 GATATTCTGG TTTATGCACA GGGTGGTGGT GAACCGAAAC CGATTTCGTCT GGAAGAAGCTG
 D I L V Y A Q G G G E P K P I R L E E L
 121 AAACCTGGCG ATCCGTTTGT TCTGGCATAT CCGATGGACC CGAAAACCAA AGTTGTAAAA
 K P G D P F V L A Y P M D P K T K V V K
 181 AGCGGTGAAG CAAAAAATAC CCTGCTGGTT GCACGTTTTG ATCCTGAAGA ACTGGCACCG
 S G E A K N T L L V A R F D P E E L A P
 241 GAAGTTGCAC AGCATGCAGC AGAAGGTGTT GTTGCATATA GCGCAGTTTG TACCCATCTG
 E V A Q H A A E G V V A Y S A V C T H L
 301 GGTTGTATTG TTAGCCAGTG GGTTGCAGAT GAAGAGGCAG CACTGTGTCC GTGTCATGGT
 G C I V S Q W V A D E E A A L C P C H G
 361 GGTGTTTATG ATCTGCGTCA TGGTGCACAG GTTATTGCAG GTCCGCCTCC GCGTCCGGTT
 G V Y D L R H G A Q V I A G P P P R P V
 421 CCGCAGCTGC CGGTTCTGTG TGAAGATGGT GTTCTGGTTG CAGCCGGTGA ATTTCTGGGT
 P Q L P V R V E D G V L V A A G E F L G
 481 CCGGTTGGTG TTCAGGCAAG TGCCGGTGCA TATACCTGGC GTGTTTAA
 P V G V Q A S A G A Y T W R V -

pETDuet-1_TTRieske_short

```

1  ATGGCAACAC CGGAAAAAGA ACCGCTGAAA CCGGGTGATA TTCTGGTTTA TGCACAGGGT
   M A T P E K E P L K P G D I L V Y A Q G
61  GGTGGTGAAC CGAAACCGAT TCGTCTGGAA GAAGTGAAC CTGGCGATCC GTTTGTCTG
   G G E P K P I R L E E L K P G D P F V L
121 GCATATCCGA TGGACCCGAA AACCAAAGTT GTTAAAAGCG GTGAAGCAAA AAATACCCTG
   A Y P M D P K T K V V K S G E A K N T L
181 CTGTTGTCAC GTTTTGATCC TGAAGAAGT GCACCGGAAG TTGCACAGCA TGCAGCAGAA
   L V A R F D P E E L A P E V A Q H A A E
241 GGTGTTGTTG CATATAGCGC AGTTTGTACC CATCTGGGTT GTATTGTTAG CCAGTGGGTT
   G V V A Y S A V C T H L G C I V S Q W V
301 GCAGATGAAG AGGCAGCACT GTGTCCGTGT CATGGTGGTG TTTATGATCT GCGTCATGGT
   A D E E A A L C P C H G G V Y D L R H G
361 GCACAGGTTA TTGAGGTCC GCCTCCGCGT CCGGTTCCGC AGCTGCCGGT TCGTGTGAA
   A Q V I A G P P P R P V P Q L P V R V E
421 GATGGTGTTT TGGTTGCAGC CCGTGAATTT CTGGGTCCGG TTGGTGTTCA GGCATAA
   D G V L V A A G E F L G P V G V Q A -

```

pET-28a_TTRieske

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC GGGTCTCCAA CGACCGAAAA CTTGTATTTT
   M G S S H H H H H H G S P T T E N L Y F
61  CAGGGCCATA TGAGCCTGCG TCCGCGTGAA GAAGTTACAC CGGAAAAAGA ACCGCTGAAA
   Q G H M S L R P R E E V T P E K E P L K
121 CCGGGTGATA TTCTGGTTTA TGCACAGGGT GGTGGTGAAC CGAAACCGAT TCGTCTGGAA
   P G D I L V Y A Q G G G E P K P I R L E
181 GAAGTGAAC CTGGCGATCC GTTTGTCTG GCATATCCGA TGGACCCGAA AACCAAAGTT
   E L K P G D P F V L A Y P M D P K T K V
241 GTTAAAAGCG GTGAAGCAAA AAATACCCTG CTGGTTGCAC GTTTTGATCC TGAAGAAGT
   V K S G E A K N T L L V A R F D P E E L
301 GCACCGGAAG TTGCACAGCA TGCAGCAGAA GGTGTTGTTG CATATAGCGC AGTTTGTACC
   A P E V A Q H A A E G V V A Y S A V C T
361 CATCTGGGTT GTATTGTTAG CCAGTGGGTT GCAGATGAAG AGGCAGCACT GTGTCCGTGT
   H L G C I V S Q W V A D E E A A L C P C
421 CATGGTGGTG TTTATGATCT GCGTCATGGT GCACAGGTTA TTGAGGTCC GCCTCCGCGT
   H G G V Y D L R H G A Q V I A G P P P R
481 CCGGTTCCGC AGCTGCCGGT TCGTGTGAA GATGGTGTTT TGGTTGCAGC CCGTGAATTT
   P V P Q L P V R V E D G V L V A A G E F
541 CTGGGTCCGG TTGGTGTTCA GGCAAGTGCC GGTGCATATA CCTGGCGTGT TTAA
   L G P V G V Q A S A G A Y T W R V -

```

Mutanten von Apd1

Alle Mutanten wurden aus dem Plasmid pETDuet-1_Apd1 generiert.

H255C: Codon für AS 255 wurde von CAT (Histidin) nach TGT (Cystein) geändert

H259C: Codon für AS 259 wurde von CAC (Histidin) nach TGC (Cystein) geändert

H255C/H259C: Codon für AS 255 wurde von CAT (Histidin) nach TGT (Cystein) und das Codon für AS 259 wurde von CAC (Histidin) nach TGC (Cystein) geändert

6.3 Größenstandards

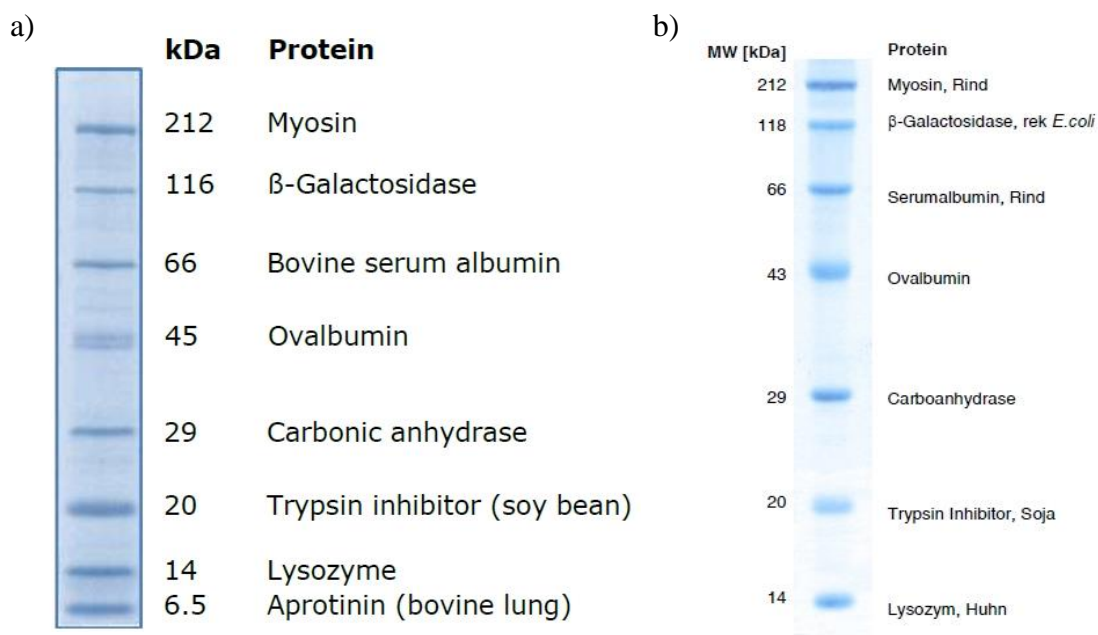


Abbildung 6.6: SDS-PAGE Größenstandards. a) Protein Marker III (Appli Chem; 6,5 - 212 kDa); b) Roti[®]-Mark Standard (Roth; 14 - 212 kDa).

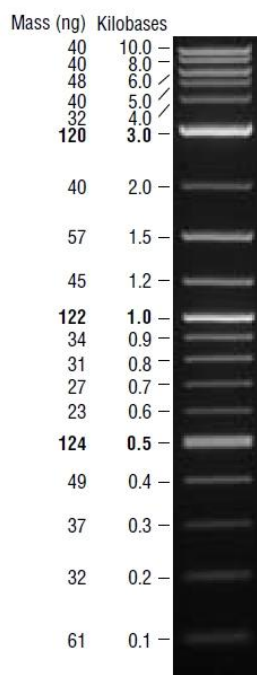


Abbildung 6.7: Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese. 2-log DNA Ladder (0,1 - 10,0kb).

7. Literaturverzeichnis

- Achim, C., Bominaar, E.L., Meyer, J., Peterson, J., Münck, E. (1999) Observation and Interpretation of Temperature-Dependent Valence Delocalization in the $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$ Cluster of a Ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3704–3714.
- AG Pierik, TU Kaiserslautern. Ammoniumsulfate saturation table (08.09.2015). AG Pierik, Methodensammlung. URL: <https://www.chemie.uni-kl.de/pierik/methoden/#c4433> (Aufruf am 09.09.2015).
- Auerbach, H. (*pers. Mitteilung*).
- Bak, D.W., Elliott, S.J. (2013) Conserved hydrogen bonding networks of MitoNEET tune Fe-S cluster binding and structural stability. *Biochemistry* **52**, 4687–4696.
- Bak, D.W., Elliott, S.J. (2014) Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 50–58.
- Bak, D.W., Zuris, J.A., Paddock, M.L., Jennings, P.A., Elliott, S.J. (2009) Redox characterization of the FeS protein MitoNEET and impact of thiazolidinedione drug binding. *Biochemistry* **48**, 10193–10195.
- Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S.-V., Londei, P., Ermler, U., Tampé, R. (2011) Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 3228–3233.
- Bechtel, D. (*persönliche Mitteilung*).
- Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C.J., Anger, A.M., Armache, J.-P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., Karcher, A., Thomm, M., Hopfner, K.-P., Green, R., Beckmann, R. (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**, 501–506.
- Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins. Ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 2–15.
- Beinert, H., Holm, R.H., Münck, E. (1997) Iron-sulfur clusters. Nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653–659.
- Beinert, H., Kennedy, M.C., Stout, C.D. (1996) Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* **96**, 2335–2374.
- Beinert, H., Sands, R.H. (1960) Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 41–46.
- Berger, S.L. (1975) Diethyl pyrocarbonate: an examination of its properties in buffered solutions with a new assay technique. *Anal. Biochem.* **67**, 428–437.

- Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J.T., Jarrett, J.T., Drennan, C.L. (2004) Crystal structure of biotin synthase, an *S*-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **303**, 76–79.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 1005–1075.
- Bevers, L.E., Bol, E., Hagedoorn, P.-L., Hagen, W.R. (2005) WOR5, a novel tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a broad substrate specificity. *J. Bacteriol.* **187**, 7056–7061.
- Bill, E., Bernhardt, F.-H., Trautwein, A.X. (1981) Mössbauer Studies on the Active Fe ...[2Fe-2S] Site of Putidamonooxin, Its Electron Transport and Dioxygen Activation Mechanism. *Eur. J. Biochem.* **121**, 39–46.
- Birrell, J.A., Laurich, C., Reijerse, E.J., Ogata, H., Lubitz, W. (2016) Importance of Hydrogen Bonding in Fine Tuning the [2Fe-2S] Cluster Redox Potential of HydC from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **55**, 4344–4355.
- Blinn, C. (*persönliche Mitteilung*).
- Blinn, C. (2014) *Die Thioredoxin-artigen Ferredoxine Aim32 und Apd1 der Bäckerhefe*. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Boxhammer, S., Glaser, S., Köhl, A., Wagner, A.K., Schmidt, C.L. (2008) Characterization of the recombinant Rieske [2Fe-2S] proteins HcaC and YeaW from *E. coli*. *Biometals* **21**, 459–467.
- Cabrita, L.D., Gilis, D., Robertson, A.L., Dehouck, Y., Rooman, M., Bottomley, S.P. (2007) Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Science* **16**, 2360–2367.
- Cammack, R., Rao, K.K., Hall, D.O. (1981) Metalloproteins in the evolution of photosynthesis. *Bio Systems* **14**, 57–80.
- Camponeschi, F., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L. (2017) Anamorsin/Ndor1 Complex Reduces [2Fe-2S]-MitoNEET via a Transient Protein-Protein Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 9479–9482.
- Castanié, M.P., Bergès, H., Oreglia, J., Prère, M.F., Fayet, O. (1997) A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **254**, 150–152.
- Chatelet, C., Gaillard, J., Pétillet, Y., Louwagie, M., Meyer, J. (1999) A [2Fe-2S] protein from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 885–889.

- Cline, J.F., Hoffman, B.M., Mims, W.B., LaHaie, E., Ballou, D.P., Fee, J.A. (1985) Evidence for N Coordination to Fe in the [2Fe-2S] Clusters of *Thermus* Rieske Protein and Phthalate Dioxygenase from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **260**, 3251–3254.
- Clustal Omega. URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Aufruf am 05.04.2017).
- Colbert, C.L., Couture, M.M., Eltis, L.D., Bolin, J.T. (2000) A cluster exposed: Structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and the redox properties of Rieske Fe-S proteins. *Structure* **8**, 1267–1278.
- Colca, J.R., McDonald, W.G., Waldon, D.J., Leone, J.W., Lull, J.M., Bannow, C.A., Lund, E.T., Mathews, W.R. (2004) Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am. J. Physiol.* **286**, E252-60.
- Cutsail, G.E., Doan, P.E., Hoffman, B.M., Meyer, J., Telser, J. (2012) EPR and ⁵⁷Fe ENDOR investigation of 2Fe ferredoxins from *Aquifex aeolicus*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 1137–1150.
- Dawson, W.K., Jono, R., Terada, T., Shimizu, K. (2016) Electron Transport in a Dioxygenase-Ferredoxin Complex: Long Range Charge Coupling between the Rieske and Non-Heme Iron Center. *PloS one* **11**, e0162031.
- Dicus, M.M., Conlan, A., Nechushtai, R., Jennings, P.A., Paddock, M.L., Britt, R.D., Stoll, S. (2010) Binding of histidine in the (Cys)₃(His)₁-coordinated [2Fe-2S] cluster of human mitoNEET. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2037–2049.
- Einsle, O., Andrade, S.L.A., Dobbek, H., Meyer, J., Rees, D.C. (2007) Assignment of individual metal redox states in a metalloprotein by crystallographic refinement at multiple X-ray wavelengths. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2210–2211.
- Elsen, N.L., Moe, L.A., McMartin, L.A., Fox, B.G. (2007) Redox and functional analysis of the Rieske ferredoxin component of the toluene 4-monooxygenase. *Biochemistry* **46**, 976–986.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Götz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Röhmer, A., Römer, A., Hinnen, A. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**, 683–702.
- Fee, J.A., Findling, K.L., Yoshida, T., Hille, R., Tarr, G.E., Hearshen, D.O., Dunham, W.R., Day, E.P., Kent, T.A., Münck, E. (1984) Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus*. Evidence for a [2Fe-2S] cluster having non-cysteine ligands. *J. Biol. Chem.* **259**, 124–133.

- Ferecatu, I., Goncalves, S., Golinelli-Cohen, M.-P., Clémancey, M., Martelli, A., Riquier, S., Guittet, E., Latour, J.-M., Puccio, H., Drapier, J.-C., Lescop, E., Bouton, C. (2014) The diabetes drug target MitoNEET governs a novel trafficking pathway to rebuild an Fe-S cluster into cytosolic aconitase/iron regulatory protein 1. *J. Biol. Chem.* **289**, 28070–28086.
- Ferraro, D.J., Gakhar, L., Ramaswamy, S. (2005) Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 175–190.
- Fleischhacker, A.S., Stubna, A., Hsueh, K.-L., Guo, Y., Teter, S.J., Rose, J.C., Brunold, T.C., Markley, J.L., Münck, E., Kiley, P.J. (2012) Characterization of the [2Fe-2S] cluster of *Escherichia coli* transcription factor IscR. *Biochemistry* **51**, 4453–4462.
- Flint, D.H., Allen, R.M. (1996) Iron–Sulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem. Rev.* **96**, 2315–2334.
- Fogo, J.K., Popowsky, M. (1949) Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide. *Anal. Chem.* **21**, 732–734.
- Fontecave, M. (2006) Iron-sulfur clusters. Ever-expanding roles. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 171–174.
- Fontecave, M., Ollagnier-de-Choudens, S., Mulliez, E. (2003) Biological radical sulfur insertion reactions. *Chem. Rev.* **103**, 2149–2166.
- Gatti, D.L., Tarr, G., Fee, J.A., Ackerman, S.H. (1998) Cloning and sequence analysis of the structural gene for the *bc₁*-type Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 223–233.
- Gatto, G.J., Berg, J.M. (2003) Nonrandom tripeptide sequence distributions at protein carboxyl termini. *Genome Res.* **13**, 617–623.
- Geoghegan, K.F., Dixon, H.B., Rosner, P.J., Hoth, L.R., Lanzetti, A.J., Borzilleri, K.A., Marr, E.S., Pezzullo, L.H., Martin, L.B., LeMotte, P.K., McColl, A.S., Kamath, A.V., Stroh, J.G. (1999) Spontaneous α -N-6-phosphogluconoylation of a "His tag" in *Escherichia coli*: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins. *Anal. Biochem.* **267**, 169–184.
- Goa, J. (1953) A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5**, 218–222.
- Golinelli-Cohen, M.-P., Lescop, E., Mons, C., Gonçaves, S., Clémancey, M., Santolini, J., Guittet, E., Blondin, G., Latour, J.-M., Bouton, C. (2016) Redox Control of the Human Iron-Sulfur Repair Protein MitoNEET Activity via Its Iron-Sulfur Cluster. *J. Biol. Chem.* **291**, 7583–7593.
- Greth, C. (*persönliche Mitteilung*).
- Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R. (2000) Adrenodoxin. Structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* **40**, 590–612.

- Gruner, I., Frädriich, C., Böttger, L.H., Trautwein, A.X., Jahn, D., Härtig, E. (2011) Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing [4Fe-4S]²⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. *J. Biol. Chem.* **286**, 2017–2021.
- Gurbiel, R.J., Batie, C.J., Sivaraja, M., True, A.E., Fee, J.A., Hoffman, B.M., Ballou, D.P. (1989) Electron-nuclear double resonance spectroscopy of ¹⁵N-enriched phthalate dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* proves that two histidines are coordinated to the [2Fe-2S] Rieske-type clusters. *Biochemistry* **28**, 4861–4871.
- Harmer, J.E., Hiscox, M.J., Dinis, P.C., Fox, S.J., Iliopoulos, A., Hussey, J.E., Sandy, J., van Beek, F.T., Essex, J.W., Roach, P.L. (2014) Structures of lipoyl synthase reveal a compact active site for controlling sequential sulfur insertion reactions. *Biochem. J.* **464**, 123–133.
- Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Hibbs, M.A., Hayes, A.P., Paw, J., Clore, J.J., Mendoza, R.M., Luis, B.S., Nislow, C., Giaever, G., Costanzo, M., Troyanskaya, O.G., Caudy, A.A. (2009) Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS genetics* **5**, e1000407.
- Heuer, A., Gerovac, M., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Preis, A., Kötter, P., Berninghausen, O., Becker, T., Beckmann, R., Tampé, R. (2017) Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 453–460.
- Hinchliffe, P., Sazanov, L.A. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771–774.
- Hsueh, K.-L., Westler, W.M., Markley, J.L. (2010) NMR investigations of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* support a coupled proton and electron transfer mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7908–7918.
- Hu, Y., Ribbe, M.W. (2013) Nitrogenase assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1112–1122.
- Hunsicker-Wang, L.M., Heine, A., Chen, Y., Luna, E.P., Todaro, T., Zhang, Y.M., Williams, P.A., McRee, D.E., Hirst, J., Stout, C.D., Fee, J.A. (2003) High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* **42**, 7303–7317.
- Institut für Humangenetik München *MITOPROT: Prediction of mitochondrial targeting sequences*. URL: <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html> (Aufruf am 27.02.17).
- Interactive Tree of Life (iTOL). URL: <http://itol.embl.de/> (Aufruf am 05.04.2017).
- Iwata, S., Saynovits, M., Link, T.A., Michel, H. (1996) Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure* **4**, 567–579.
- Jakob, V. (2015) *Charakterisierung der Liganden der thio-redoxinartigen Ferredoxin-Domäne des Apd1-Proteins*. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.

- Jarrett, J.T. (2005) The novel structure and chemistry of iron-sulfur clusters in the adenosylmethionine-dependent radical enzyme biotin synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 312–321.
- JGI MycoCosm. URL: <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf> (Aufruf am 05.04.2017).
- Jin, Y.H., Dunlap, P.E., McBride, S.J., Al-Refai, H., Bushel, P.R., Freedman, J.H. (2008) Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.* **4**, e1000053, 10.1371/journal.pgen.1000053.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., Johnson, M.K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247–281.
- Joint Genome Institute. URL: <https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi> (Aufruf am 05.04.2017).
- Karagas, N.E., Jones, C.N., Osborn, D.J., Dzierlenga, A.L., Oyala, P., Konkle, M.E., Whitney, E.M., Britt, R.D., Hunsicker-Wang, L.M. (2014) The reduction rates of DEPC-modified mutant *Thermus thermophilus* Rieske proteins differ when there is a negative charge proximal to the cluster. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 1121–1135.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., Kiley, P.J. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂. [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6087–6092.
- Kiley, P.J., Beinert, H. (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 181–185.
- Knauer, S.H., Buckel, W., Dobbek, H. (2011) Structural basis for reductive radical formation and electron recycling in (*R*)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4342–4347.
- Konkle, M.E., Elsenheimer, K.N., Hakala, K., Robicheaux, J.C., Weintraub, S.T., Hunsicker-Wang, L.M. (2010) Chemical modification of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* using diethyl pyrocarbonate modifies ligating histidine 154 and reduces the [2Fe2S] cluster. *Biochemistry* **49**, 7272–7281.
- Konkle, M.E., Muellner, S.K., Schwander, A.L., Dicus, M.M., Pokhrel, R., Britt, R.D., Taylor, A.B., Hunsicker-Wang, L.M. (2009) Effects of pH on the Rieske protein from *Thermus thermophilus*: a spectroscopic and structural analysis. *Biochemistry* **48**, 9848–9857.
- Kounosu, A., Li, Z., Coper, N.J., Shokes, J.E., Scott, R.A., Imai, T., Urushiyama, A., Iwasaki, T. (2004) Engineering a three-cysteine, one-histidine ligand environment into a new hyperthermophilic archaeal Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 12519–12528.

- Kuila, D., Fee, J.A. (1986) Evidence for a redox-linked ionizable group associated with the [2Fe-2S] cluster of *Thermus* Rieske protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 2768–2771.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lalève, A., Vallières, C., Golinelli-Cohen, M.-P., Bouton, C., Song, Z., Pawlik, G., Tindall, S.M., Avery, S.V., Clain, J., Meunier, B. (2016) The antimalarial drug primaquine targets Fe-S cluster proteins and yeast respiratory growth. *Redox Biol.* **7**, 21–29.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., Lill, R. (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1050–1055.
- Lee, M., Gräwert, T., Quitterer, F., Rohdich, F., Eppinger, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Groll, M. (2010) Biosynthesis of isoprenoids. Crystal structure of the [4Fe-4S] cluster protein IspG. *J. Mol. Biol.* **404**, 600–610.
- Leggate, E.J., Bill, E., Essigke, T., Ullmann, G.M., Hirst, J. (2004) Formation and characterization of an all-ferrous Rieske cluster and stabilization of the [2Fe-2S]⁰ core by protonation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10913–10918.
- Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P.J., Winge, D.R., Johnson, M.K., Outten, C.E. (2011) Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for *in vivo* iron signaling in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**, 867–876.
- Lill, R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsässer, H.-P., Hausmann, A., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., Mühlenhoff, U. (2006) Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 652–667.
- Lill, R., Mühlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes. Mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 669–700.
- Lin, Z., Dong, M., Zhang, Y., Lee, E.A., Lin, H. (2016) Cbr1 is a Dph3 reductase required for the tRNA wobble uridine modification. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 995–997.
- Link, T.A. (1999) *The Structures of Rieske and Rieske-Type Proteins. Advances in Inorganic Chemistry* 47. Auflage, S. 83–157, Elsevier.
- Link, T.A. (2006) *Fe-S Rieske Center. Handbook of Metalloproteins* 1. Auflage, S. 1–14, John Wiley & Sons, Ltd.
- Link, T.A., Hagen, W.R., Pierik, A.J., Assmann, C., von Jagow, G. (1992) Determination of the redox properties of the Rieske [2Fe-2S] cluster of bovine heart *bc₁* complex by direct electrochemistry of a water-soluble fragment. *Eur. J. Biochem.* **208**, 685–691.

- Link, T.A., Hatzfeld, O.M., Unalkat, P., Shergill, J.K., Cammack, R., Mason, J.R. (1996) Comparison of the "Rieske" [2Fe-2S] center in the *bc₁* complex and in bacterial dioxygenases by circular dichroism spectroscopy and cyclic voltammetry. *Biochemistry* **35**, 7546–7552.
- Liu, H., Rudolf, J., Johnson, K.A., McMahon, S.A., Oke, M., Carter, L., McRobbie, A.-M., Brown, S.E., Naismith, J.H., White, M.F. (2008) Structure of the DNA repair helicase XPD. *Cell* **133**, 801–812.
- Liu, L., Nogi, T., Kobayashi, M., Nozawa, T., Miki, K. (2002) Ultrahigh-resolution structure of high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*. *Acta Cryst. Section D* **58**, 1085–1091.
- Loosemore, M.J., Pratt, R.F. (1976) The irreversible cleavage of histidine residues by diethylpyrocarbonate (ethoxyformic anhydride). *FEBS Lett.* **72**, 155–158.
- Lovenberg, W., Buchanan, B.B., Rabinowitz, J.C. (1963) Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. *J. Biol. Chem.* **238**, 3899–3913.
- Machray, G.C., Burch, L., Hedley, P.E., Davies, H.V., Waugh, R. (1994) Characterisation of a complementary DNA encoding a novel plant enzyme with sucrolytic activity. *FEBS Lett.* **354**, 123–127.
- Melchior, W.B., Fahrney, D. (1970) Ethoxyformylation of proteins. Reaction of ethoxyformic anhydride with α -chymotrypsin, pepsin, and pancreatic ribonuclease at pH 4. *Biochemistry* **9**, 251–258.
- Meyer, J. (2001) Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett.* **509**, 1–5.
- Meyer, J. (2008) Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 157–170.
- Meyer, J., Bruschi, M.H., Bonicel, J.J., Bovier-Lapierre, G.E. (1986) Amino acid sequence of [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **25**, 6054–6061.
- Meyer, J., Clay, M.D., Johnson, M.K., Stubna, A., Münck, E., Higgins, C., Wittung-Stafshede, P. (2002) A hyperthermophilic plant-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus* is stabilized by a disulfide bond. *Biochemistry* **41**, 3096–3108.
- Meyer, J., La Andrade, S., Einsle, O. (2008) *Thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin*. *Handbook of metalloproteins*.
- Meynet, P., Head, I.M., Werner, D., Davenport, R.J. (2015) Re-evaluation of dioxygenase gene phylogeny for the development and validation of a quantitative assay for environmental aromatic hydrocarbon degraders. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91** (6), 10.1093/femsec/fiv049.
- Miles, E.W. (1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**, 431–442.

- Miller, W.L. (2005) Minireview. Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* **146**, 2544–2550.
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C., Carnahan, J.E. (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 448–452.
- Nakamaru-Ogiso, E., Matsuno-Yagi, A., Yoshikawa, S., Yagi, T., Ohnishi, T. (2008) Iron-sulfur cluster N5 is coordinated by an HXXXCXXCXXXXXC motif in the NuoG subunit of *Escherichia coli* NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* **283**, 25979–25987.
- Nakamura, M., Saeki, K., Takahashi, Y. (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster. *J. Biochem.* **126**, 10–18.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (Aufruf am 05.04.2017).
- Netz, D.J.A., Stith, C.M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M.J., Pierik, A.J. (2011) Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 125–132.
- Nguyen, K., Rabenstein, D.L. (2011) Determination of the primary structure and carboxyl pK_{AS} of heparin-derived oligosaccharides by band-selective homonuclear-decoupled two-dimensional ¹H NMR. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 663–671.
- Ohnishi, T., Meinhardt, S.W., von Jagow, G., Yagi, T., Hatefi, Y. (1994) Effect of ethoxyformic anhydride on the Rieske iron-sulfur protein of bovine heart ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase. *FEBS Lett.* **353**, 103–107.
- Owens, C.P., Katz, F.E.H., Carter, C.H., Oswald, V.F., Tezcan, F.A. (2016) Tyrosine-Coordinated P-Cluster in *G. diazotrophicus* Nitrogenase. Evidence for the Importance of O-Based Ligands in Conformationally Gated Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 10124–10127.
- Paddock, M.L., Wiley, S.E., Axelrod, H.L., Cohen, A.E., Roy, M., Abresch, E.C., Capraro, D., Murphy, A.N., Nechushtai, R., Dixon, J.E., Jennings, P.A. (2007) MitoNEET is a uniquely folded 2Fe-2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 14342–14347.
- Pandelia, M.-E., Lanz, N.D., Booker, S.J., Krebs, C. (2015) Mössbauer spectroscopy of Fe/S proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1395–1405.
- Pandey, A., Pain, J., Ghosh, A.K., Dancis, A., Pain, D. (2015) Fe-S cluster biogenesis in isolated mammalian mitochondria. Coordinated use of persulfide sulfur and iron and requirements for GTP, NADH, and ATP. *J. Biol. Chem.* **290**, 640–657.
- Parales, R.E., Parales, J.V., Gibson, D.T. (1999) Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity. *J. Bacteriol.* **181**, 1831–1837.

- Paul, V.D., Lill, R. (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1528–1539.
- Paul, V.D., Mühlenhoff, U., Stümpfig, M., Seebacher, J., Kugler, K.G., Renicke, C., Taxis, C., Gavin, A.-C., Pierik, A.J., Lill, R. (2015) The deca-GX₃ proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. *eLife* **4**, e08231.
- Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., Seefeldt, L.C. (1998) X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution. *Science* **282**, 1853–1858.
- Peters, J.W., Stowell, M.H., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., Rees, D.C. (1997) Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**, 1181–1187.
- Pierrel, F., Hamelin, O., Douki, T., Kieffer-Jaquinod, S., Mühlenhoff, U., Ozeir, M., Lill, R., Fontecave, M. (2010) Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chem. Biol.* **17**, 449–459.
- Pikus, J.D., Studts, J.M., Achim, C., Kauffmann, K.E., Münck, E., Steffan, R.J., McClay, K., Fox, B.G. (1996) Recombinant toluene-4-monooxygenase: Catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four-protein complex. *Biochemistry* **35**, 9106–9119.
- Rees, D.C. (2002) Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 221–246.
- Rieske, J.S., MacLennan, D.H., Coleman, R. (1964) Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome *c* reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 338–344.
- Rosche, B., Fetzner, S., Lingens, F., Nitschke, W., Riedel, A. (1995) The 2Fe2S centres of the 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase from *Pseudomonas putida* 86 studied by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 177–179.
- Rotsaert, F.A.J., Hallberg, B.M., Vries, S. de, Moenne-Loccoz, P., Divne, C., Renganathan, V., Gold, M.H. (2003) Biophysical and structural analysis of a novel heme *b* iron ligation in the flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**, 33224–33231.
- Rouault, T.A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 406–414.
- Rouault, T.A. (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells. New insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–164.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W.J., Stark, M.J.R., White, M.F. (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol. Cell* **23**, 801–808.

- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual: Vol. 2*, Cold Spring Harbor.
- Sazanov, L.A., Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430–1436.
- Schlesier, J., Rohde, M., Gerhardt, S., Einsle, O. (2016) A Conformational Switch Triggers Nitrogenase Protection from Oxygen Damage by Shethna Protein II (FeSII). *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 239–247.
- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.-P., Mühlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., Lill, R. (2010) Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 11775–11780.
- Shethna, Y.I., DerVartanian, D.V., Beinert, H. (1968) Non heme (iron-sulfur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 862–868.
- Shethna, Y.I., Wilson, P.W., Hansen, R.E., Beinert, H. (1964) Identification by isotopic substitution of the EPR signal at $g = 1.94$ in a non-heme iron protein from *Azotobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1263–1271.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**, 1043–1057.
- Tamir, S., Paddock, M.L., Darash-Yahana-Baram, M., Holt, S.H., Sohn, Y.S., Agranat, L., Michaeli, D., Stofleth, J.T., Lipper, C.H., Morcos, F., Cabantchik, I.Z., Onuchic, J.N., Jennings, P.A., Mittler, R., Nechushtai, R. (2015) Structure-function analysis of NEET proteins uncovers their role as key regulators of iron and ROS homeostasis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1294–1315.
- Tang, H.-M.V., Pan, K., Kong, K.-Y.E., Hu, L., Chan, L.-C., Siu, K.-L., Sun, H., Wong, C.-M., Jin, D.-Y. (2015) Loss of *APDI* in yeast confers hydroxyurea sensitivity suppressed by Yap1p transcription factor. *Sci. Rep.* **5**, 7897.
- Tiago de Oliveira, F., Bominaar, E.L., Hirst, J., Fee, J.A., Münck, E. (2004) Antisymmetric exchange in $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ clusters. EPR of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* at pH 14. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5338–5339.
- Tinberg, C.E., Tonzetich, Z.J., Wang, H., Do, L.H., Yoda, Y., Cramer, S.P., Lippard, S.J. (2010) Characterization of iron dinitrosyl species formed in the reaction of nitric oxide with a biological Rieske center. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18168–18176.
- Tsibris, J.C., Tsai, R.L., Gunsalus, I.C., Orme-Johnson, W.H., Hansen, R.E., Beinert, H. (1968) The number of iron atoms in the paramagnetic center ($g = 1.94$) of reduced putidaredoxin, a nonheme iron protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 959–965.

- Twilfer, H., Bernhardt, F.H., Gersonde, K. (1981) An electron-spin-resonance study on the redox-active centers of the 4-methoxybenzoate monooxygenase from *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.* **119**, 595–602.
- Twilfer, H., Bernhardt, F.H., Gersonde, K. (1985) Dioxygen-activating iron center in putidamonooxin. Electron spin resonance investigation of the nitrosylated putidamonooxin. *Eur. J. Biochem.* **147**, 171–176.
- Ullmann, G.M., Noodleman, L., Case, D.A. (2002) Density functional calculation of pK_a values and redox potentials in the bovine Rieske iron-sulfur protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 632–639.
- Upadhyay, A.S., Vonderstein, K., Pichlmair, A., Stehling, O., Bennett, K.L., Dobler, G., Guo, J.-T., Superti-Furga, G., Lill, R., Överby, A.K., Weber, F. (2014) Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cell. Microbiol.* **16**, 834–848.
- Valentine, R.C. (1964) Bacterial Ferredoxin. *Bacteriol. Rev.* **28**, 497–517.
- Vernay, A., Marchetti, A., Sabra, A., Jauslin, T.N., Rosselin, M., Scherer, P.E., Demaurex, N., Orci, L., Cosson, P. (2017) MitoNEET-dependent formation of intermitochondrial junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 8277–8282.
- Wackett, L.P. (2002) Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 577–587.
- Webert, H., Freibert, S.-A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlhoff, U., Banci, L., Lill, R. (2014) Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* **5**, 5013.
- Werth, M.T., Sices, H., Cecchini, G., Schröder, I., Lasage, S., Gunsalus, R.P., Johnson, M.K. (1992) Evidence for non-cysteinyll coordination of the [2Fe-2S] cluster in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **299**, 1–4.
- White, M.F., Dillingham, M.S. (2012) Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 94–100.
- Wiley, S.E., Murphy, A.N., Ross, S.A., van der Geer, P., Dixon, J.E. (2007a) MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5318–5323.
- Wiley, S.E., Paddock, M.L., Abresch, E.C., Gross, L., van der Geer, P., Nechushtai, R., Murphy, A.N., Jennings, P.A., Dixon, J.E. (2007b) The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. *J. Biol. Chem.* **282**, 23745–23749.

- Wolfe, M.D., Parales, J.V., Gibson, D.T., Lipscomb, J.D. (2001) Single turnover chemistry and regulation of O₂ activation by the oxygenase component of naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **276**, 1945–1953.
- Yeh, A.P., Ambroggio, X.I., Andrade, S.L.A., Einsle, O., Chatelet, C., Meyer, J., Rees, D.C. (2002) High resolution crystal structures of the wild type and Cys-55->Ser and Cys-59->Ser variants of the thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34499–34507.
- Yeh, A.P., Chatelet, C., Soltis, S.M., Kuhn, P., Meyer, J., Rees, D.C. (2000) Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *J. Mol. Biol.* **300**, 587–595.
- Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J.-L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115.
- Zu, Y., Couture, M.M.-J., Kolling, D.R.J., Crofts, A.R., Eltis, L.D., Fee, J.A., Hirst, J. (2003) Reduction potentials of Rieske clusters: importance of the coupling between oxidation state and histidine protonation state. *Biochemistry* **42**, 12400–12408.
- Zuris, J.A., Halim, D.A., Conlan, A.R., Abresch, E.C., Nechushtai, R., Paddock, M.L., Jennings, P.A. (2010) Engineering the redox potential over a wide range within a new class of FeS proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 13120–13122.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

- Mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Antonio J. Pierik für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung dieses interessanten Themas und für seine stete Hilfsbereitschaft während meiner Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit, sowie die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen meines Projektes.
- Herrn Prof. Dr. Ing. Stefan Ernst für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann, im Besonderen Hendrik Auerbach und Christina Müller, die für mich die Messungen und anschließenden Simulationen der Mössbauerspektroskopie durchgeführt haben und darüber hinaus immer offen für Diskussionen waren.
- Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor während meiner Zeit in Berlin, im Besonderen Frau Dr. Berta Martins für ihre Hilfe bei allen Kristallisationsexperimenten.
- Frau Dr. Alison Parkin und Nicholas Yates, sowie den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe an der University of York für die freundliche Atmosphäre im Labor und die Hilfe bei den Cyclovoltammetrieexperimenten während meines Aufenthaltes.
- Frau Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel für die Möglichkeit der Nutzung des UV/Vis-Diodenarrayphotometers in ihrer Arbeitsgruppe.
- Herr Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung des „Q Sepharose Fast Flow“-Säulenmaterials.
- Catharina Blinn und Valentin Jakob, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten an diesem Projekt mitgearbeitet haben.
- Meinen fleißigen Korrekturlesern: Dr. Reinhard Philipp, Catharina Blinn, Carina Greth und Dominique Bechtel
- Für jegliche Hilfe in allen Verwaltungsfragen oder bei Bestellungen: Frau Carolin Fluck, Doreen Knochenhauer und Elke Litmianski
- Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Pierik und Trommer für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit bei allen Gelegenheiten, sei es im Kaffeezimmer, im Labor oder bei sonstigen Veranstaltungen.
- Besonders erwähnen möchte ich dabei vor allem Catharina Blinn, Carina Greth, Monika Schneider und Dominique Bechtel. Danke für die tolle, lustige, kameradschaftliche Zeit im Labor, die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit und für die Freundschaft, die auch außerhalb des Labors viel Spaß macht.
- Der größte Dank geht allerdings an meine Familie, die mich immer bei allem unterstützt, mir den Rücken frei hält und immer für mich da ist. Das weiß ich sehr zu schätzen. Ich hab euch sehr lieb. Danke!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Kathrin Stegmaier

Ausbildung

- 11/2017 **Promotion**
Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften (Note: Sehr gut)
- 10/2013 – 11/2017 **Promotion in der Fachrichtung Biochemie**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. J. Pierik, *TU Kaiserslautern*
Titel: Spektroskopische und elektrochemische Studien der neuartigen Clusterkoordination in Proteinen mit C-terminaler Thioredoxin-Ferredoxin-Domäne
- 06/2013 **Diplomhauptprüfung in Chemie**
Abschluss: Diplom-Chemikerin (Note: 1,4)
- 10/2012 – 06/2013 **Diplomarbeit in der Fachrichtung Biochemie**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. E. Trommer, *TU Kaiserslautern*
Titel: Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers
- 02/2012 – 04/2012 **Forschungsarbeit in der Fachrichtung Biochemie**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. E. Trommer, *TU Kaiserslautern*
Titel: Untersuchung des molten globule-Zustandes von MBP mittels ESR-Spektroskopie
- 10/2006 – 06/2013 **Studium der Chemie**
Vertiefungsrichtung Biochemie, *TU Kaiserslautern*

Schulbildung

- 06/2006 **Allgemeine Hochschulreife**
Warndtgymnasium, Völklingen-Geislautern (Note: 1,7)
- 09/1997 – 06/2006 **Warndtgymnasium, Völklingen-Geislautern**
- 08/1993 – 07/1997 **Grundschule Schlossparkschule, Völklingen-Geislautern**

Publikationen

Stegmaier, K., Blinn, C. M., Bechtel, D. F., Auerbach, H., Müller, C. S., Jakob, V., Netz, D. J. A., Schünemann, V., Pierik, A. J., The yeast proteins Aim32 and Apd1 are prototypes of a new class of redox-active iron-sulfur proteins. Manuskript in Vorbereitung.

Müller, C. S., Auerbach, H., Stegmaier, K., Wolny J. A., Schünemann, V., Pierik, A. J., Mössbauer spectroscopy and DFT calculations on all protonation states of the 2Fe-2S cluster of the Rieske protein. Hyperfine Interact. eingereicht.

Posterbeiträge

Blinn, C. M., Stegmaier, K., Pierik, A. J. (2017) Identification of the ligands of a novel class of [2Fe-2S] proteins via chemogenomics. 68. Mosbacher Kolloquium der GBM, Mosbach.

Bechtel, D. F., Stegmaier, K., Pierik, A. J. (2017) Characterisation of Iron-Sulfur Cluster coordination by Spectroscopy. 68. Mosbacher Kolloquium der GBM, Mosbach.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Spektroskopische und elektrochemische Studien der neuartigen Clusterkoordination in Proteinen mit C-terminaler Thioredoxin-Ferredoxin-Domäne“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe und diese Arbeit in gleicher oder abgewandelter Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Kaiserslautern, den 09.10.2017

Kathrin Stegmaier