

Faltung, Assemblierung und Stabilisierung des Transmembranproteins Cytochrom b_6



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Biologie

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von Lydia Tome

August, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

1. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.2014

Diese Arbeit wurde erstellt am
Institut für Pharmazie und Biochemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Tome L., Schätzel C., Dreher C. and Schneider D. (2014). Fe- but not Mg-protoporphyrin IX binds to a transmembrane b-type cytochrome. *Molecular Membrane Biology*. 31, 37-45.

Ahijado-Guzmán R., Prasad J., Rosman C., Henkel A., **Tome L.**, Schneider D., Rivas G., Sönnichsen C. (2014). Plasmonic Nanosensors for Simultaneous Quantification of Multiple Protein-Protein Binding Affinities. *Nano Letters* (eingereicht).

Tome L., Steindorf D. and Schneider D. (2013). Genetic systems for monitoring interactions of transmembrane domains in bacterial membranes. *Methods Mol. Biol.* 1063, 57-91.

Weber M., **Tome L.**, Otzen D.E. and Schneider, D. (2012). A Ser residue influences the structure and stability of a Pro-kinked transmembrane helix dimer. *Biochim. Biophys. Acta. (Biomembranes)*, 1818, 2103-2107.

Anbazhagan V., Munz C., **Tome L.** and Schneider D. (2010). Fluidizing the membrane by a local anesthetic: Phenylethanol affects membrane protein oligomerization. *J. Mol. Biol.* 404, 773-777.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Membranen und Membranproteine	1
1.1.1 Aufbau und Bedeutung biologischer Membranen.....	1
1.1.2 Struktureller Aufbau von Membranproteinen	2
1.1.3 Membranprotein-Faltung.....	4
1.1.3.1 Wechselwirkungen membranständiger α -Helices.....	5
1.1.4 Einfluss interhelikaler <i>Loops</i> auf die Faltung von Membranproteinen.....	8
1.2 Cytochrome	11
1.2.1 Das transmembrane Cytochrom b_6	13
1.2.1.1 Struktur und Funktion von Cytochrom b_6	13
1.2.1.2 Assemblierung von Cytochrom b_6	17
1.2.2 Struktur und Biosynthese zyklischer Tetrapyrrole	19
1.2.2.1 Absorptionsspektroskopie an zyklischen Tetrapyrrolen.....	21
1.3 Ziele der Arbeit	23
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte und Zubehör	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Enzyme.....	27
2.1.3.1 Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.....	27
2.1.4 <i>E. coli</i> -Bakterienstämme	28
2.1.5 Kulturmedien für <i>E. coli</i>	29
2.1.6 Plasmide.....	29
2.1.7 Oligonukleotide	29
2.1.8 Längen- und Größenstandards	30
2.1.9 Antikörper	30
2.1.10 Computerprogramme.....	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid DNA	32
2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32

2.2.1.3	Restriktionsverdau von DNA	32
2.2.1.4	Agarosegelelektrophorese.....	32
2.2.1.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	33
2.2.1.6	Ligation von DNA	33
2.2.1.7	Zielgerichtete Mutagenese durch <i>Overlap Extension</i> PCR	33
2.2.1.8	Sequenzierung von DNA	36
2.2.1.9	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.2.2	Biochemische Methoden	37
2.2.2.1	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	37
2.2.2.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Ultraschall.....	37
2.2.2.3	Solubilisierung von Membranproteinen aus Einschlusskörperchen	37
2.2.2.4	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie und <i>in vitro</i> Rückfaltung	38
2.2.2.5	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie nach Häm- bzw. Chlorophyll-Zugabe.....	39
2.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.2.2.7	Proteinfällung mittels Trichloressigsäure	39
2.2.2.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.2.9	Coomassie-Färbung.....	40
2.2.2.10	Semi-dry Western-Blot	40
2.2.2.11	Western-Blot mit dem Tank-Blot-System.....	41
2.2.2.12	Immunodetektion von Proteinen	41
2.2.2.13	Rekonstitution der Cytochrome	41
2.2.2.14	Titration von Porphyrinen mit Cytochromen.....	42
2.2.2.15	SDS-Titration.....	42
2.2.2.16	Proteolytischer Verdau von Cytochrom b ₆	43
2.2.2.17	Präparative Gelfiltration.....	43
2.2.2.18	Herstellung einer Peptidlösung.....	43
2.2.2.19	Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie.....	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Das Modellprotein Cytochrom b₆ zur Untersuchung kofaktor-tragender Membranproteine.....	46
3.1.1	Expression, Reinigung und Rekonstitution von Cytochrom b ₆	46
3.2	Untersuchungen zum Einfluss interhelikaler Loops auf die Faltung, Assemblierung und Stabilität von Cytochrom b₆	50
3.2.1	Expression, Reinigung und Rekonstitution der Cytochrom b ₆ Gly _n -Varianten.....	50
3.2.2	Bestimmung der Protein-zu-Häm Verhältnisse der Cytochrom b ₆ Gly _n -Varianten.....	54
3.2.3	Untersuchungen zur Stabilität der Cytochrom b ₆ Gly _n -Varianten	55

3.2.4	Untersuchungen zur Assemblierung getrennter Cytochrom b_6 -Hälften....	57
3.2.5	Untersuchungen zur Assemblierung transmembraner Fragmente des Cytochrom b_6	63
3.2.6	Untersuchung der Häm-Bindung an synthetisierten transmembranen Cytochrom b_6 Peptiden	67
3.3	Untersuchungen zur Spezifität der Häm-Bindung	70
3.3.1	Bindungsverhalten von Chlorophyll a an Apo-Cytochrom b_6	70
3.3.2	Einfluss des zentralen Eisen-Ions auf die Bindung des Häms an Apo-Cytochrom b_6	73
3.3.3	Einfluss der Ethylen- und Propionylseitenketten auf die Bindung des Häms an Apo-Cytochrom b_6	74
4	Diskussion	79
4.1	Cytochrom b_6 als transmembranes Modellprotein	79
4.2	Einfluss der interhelikalen <i>Loops</i> auf die Faltung und Assemblierung von Cytochrom b_6.....	80
4.2.1	Einfluss der Länge des BC- <i>Loops</i> auf die Assemblierung und Stabilität von Cytochrom b_6	80
4.2.1.1	Die Verlängerung des BC- <i>Loops</i> beeinträchtigt nicht die Assemblierung von Cytochrom b_6	80
4.2.1.2	Ein verlängerter BC- <i>Loops</i> stabilisiert ab einer kritischen Länge Cytochrom b_6	82
4.2.2	Eine kovalente Verknüpfung der Cytochrom b_6 -Hälften ist für die Häm-Bindung nicht essentiell	85
4.2.3	Cytochrom b_6 bleibt nach proteolytischer Spaltung der <i>Loops</i> assembliert	87
4.2.4	Welches Strukturelement ist die kleinste Häm-bindende Einheit?	88
4.2.5	Der Assemblierungsweg von Cytochrom b_6	90
4.3	Die Spezifität der Häm-Bindung an Apo-Cytochrom b_6 wird durch das zentrale Eisen-Ion vermittelt.....	91
4.3.1	Das zentrale Eisen-Ion des Häms ist essentiell für die Bindung der Kofaktoren an Apo-Cytochrom b_6	92
4.3.2	Die Ethylen- und Propionylseitenketten stabilisieren die Häm-Bindung an Apo-Cytochrom b_6	94
4.3.3	Die Eisenchelatase ist das Schlüsselenzym der Häm-Biosynthese.....	97
5	Zusammenfassung	99
6	Anhang	101
6.1	Ergänzende Ergebnisse.....	101
6.2	Abkürzungsverzeichnis	106
6.3	Abbildungsverzeichnis	108
6.4	Tabellenverzeichnis	110

6.5	Literatur	112
6.6	Lebenslauf.....	125
6.7	Danksagung	127

1. Einleitung

1.1 Membranen und Membranproteine

1.1.1 Aufbau und Bedeutung biologischer Membranen

Biologische Membranen begrenzen pro- und eukaryotische Zellen und erfüllen vielfältige lebensnotwendige physiologische Funktionen. Sie stellen hochselektive Permeabilitäts-schranken dar, die durch eingelagerte Pumpen und Kanäle die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums kontrollieren. In die Membran eingelagerte Rezeptoren steuern die interzelluläre Kommunikation, in dem sie spezifisch äußere Signale erkennen und diese ins Zellinnere weiterleiten. Die Elektronentransportketten der beiden wichtigsten biologischen Energieumwandlungsprozesse, der Photosynthese und Atmungskette, befinden sich ebenfalls in Membranen. Eukaryotische Zellen besitzen ein inneres Membransystem, das die einzelnen Organellen, wie z. B. Chloroplasten, Mitochondrien und Lysosomen, begrenzt. Dadurch gewährleisten Membranen die Aufrechterhaltung bestimmter physikochemischer Bedingungen in den abgegrenzten Reaktionsräumen und ermöglichen den gleichzeitigen Ablauf verschiedener Prozesse innerhalb einer Zelle. Trotz der verschiedenen Funktionen besitzen biologische Membranen einen universalen Aufbau. Das Grundgerüst wird von Membranlipiden gebildet. Membranlipide werden in drei Hauptgruppen eingeteilt: Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin. Die meisten Lipide bestehen aus einem polaren und einem unpolaren Teil. Der unpolare Teil der Phospho- und Glykolipide wird von Acylketten, die eine Kettenlänge von 14 bis 24 C-Atomen besitzen können, gebildet. Der hydrophile Kopf der Phospholipide wird von einem phosphorylierten Alkohol gebildet. Im Fall der Phosphoglyceride handelt es sich bei dem Alkohol um Glycerin, welches bei Sphingomyelin durch Sphingosin ersetzt wird. Bei Glykolipiden stellen Zuckerreste hydrophile Einheiten dar. Cholesterin hingegen ist, bis auf eine Hydroxylgruppe, hydrophob. Aufgrund ihres amphipathischen Charakters und der Tatsache, dass Lipide zwei Acylketten besitzen, ordnen sich Lipide in wässriger Umgebung spontan zu geschlossenen Doppelschichten an. Dabei sind der hydrophobe Teil ins Innere der Doppelschicht und der hydrophile Teil dem Wasser zugewandt. Die Vorstellung, dass Membranen aus einer Lipiddoppelschicht bestehen wurde erstmals 1935 von Danielli und Davson beschrieben (Danielli, 1935). Darauf aufbauend, entwickelten Singer und Nicholson 1972 das „Fluid-Mosaik-Modell“ (Singer, 1972). Sie beschreiben dass sich, neben den peripher gebundenen Proteinen auch integrale Membranproteine (MP) in der

Lipiddoppelschicht befinden. Proteine und Lipide sind in der Doppelschicht permanent in Bewegung, weshalb Membranen als zweidimensionale viskose Flüssigkeiten betrachtet werden (Goni, 2014). Die Dicke einer biologischen Membran beträgt etwa 60 Å. Der hydrophobe Kern hat einen Durchmesser von etwa 30 Å und die hydrophilen Grenzregionen mit den hydratisierten Lipidkopfgruppen etwa 15 Å (White und Wimley, 1999, Wiener und White, 1992). Diese Abmessungen sind jedoch nicht als starre Größen zu betrachten. Die Dicke der Membran variiert aufgrund der Molekülbewegung und unterschiedlicher Lipidzusammensetzungen. Innerhalb der Membran entsteht ein Polaritätsgefälle zwischen den hydrophilen Grenzregionen und dem hydrophoben Inneren. Mit Hilfe der Dielektrizitätskonstanten ϵ kann die Polarität eines Milieus beschrieben werden. Im Bereich der Lipidkopfgruppen entspricht ϵ einem Wert von etwa 18 (White und Wimley, 1999) und im Kern der Membran ist ϵ etwa zwei (Dilger, 1982). Wasser besitzt zum Vergleich einen Wert von 80 (Stryer, 1996). Aufgrund der hohen Hydrophobizität stellt die Membran eine natürliche Barriere für hydrophile Moleküle dar. Die Zusammensetzung der MP so wie das Protein-zu-Lipid-Verhältnis können, je nach Art der Membran, unterschiedlich sein (van Meer *et al.*, 2008). Mitochondrienmembranen enthalten viele Enzymkomplexe und besitzen dadurch einen sehr hohen Proteinanteil (Goldhor, 1968). Myelin hingegen, dient der elektrischen Isolierung der Axone von Nervenzellen und ist eine lipidreiche Membran (Yurlova *et al.*, 2011).

1.1.2 Struktureller Aufbau von Membranproteinen

Die Einteilung der MP erfolgt nach peripheren und integralen Proteinen (Abbildung 1). Periphere MP sind über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Acylketten oder elektrostatische Interaktionen mit den Lipidkopfgruppen mit der Membran assoziiert. Eine Verankerung über eine kovalente Bindung an eine Fettsäure oder ein Lipid tritt ebenfalls auf. Proteine, die mit integralen MP in Kontakt stehen, die Membran aber nicht durchspannen, gehören ebenfalls zu den peripheren MP. Integrale MP durchspannen beide Schichten der Membran und ihr in die Membran eingebetteter Teil besitzt in der Regel eine α -helikale oder eine β -Faltblatt Struktur. Ein komplett ungefaltetes Polypeptid könnte aufgrund des polaren Charakters seines Rückgrats nicht stabil in den hydrophoben Kern der Membran integriert werden. Dies würde einen sehr hohen energetischen Aufwand bedeuten, der etwa 80 bis 100 kcal/mol erfordern würde (White und Wimley, 1999). Kürzere ungefaltete Proteinbereiche kommen, z. B. bei geknickten Helices, vor. Sie sind für die Funktion von Kanälen und Transportern wichtig, indem sie ihnen Polarität und Flexibilität verleihen (Kauko *et al.*, 2008). In einer β -Faltblatt-Struktur verlaufen benachbarte β -Stränge entweder parallel oder antiparallel zueinander und interagieren über Wasserstoff-

brückenbindungen miteinander. Um das Wasserstoffbrückenpotential des Proteinerückgrats optimal abzudecken, ordnen sie sich innerhalb einer Membran in einer zylindrischen β -Fass-Struktur an. In dieser Struktur weisen hydrophile Aminosäuren ins Innere des Proteins und hydrophobe Aminosäuren nach außen zu den Lipiden (Ulmschneider und Sansom, 2001). Daraus ergibt sich in der Primärsequenz der Proteine eine alternierende Abfolge hydrophober und hydrophiler Aminosäuren. Proteine mit einer β -Fass-Struktur bil-

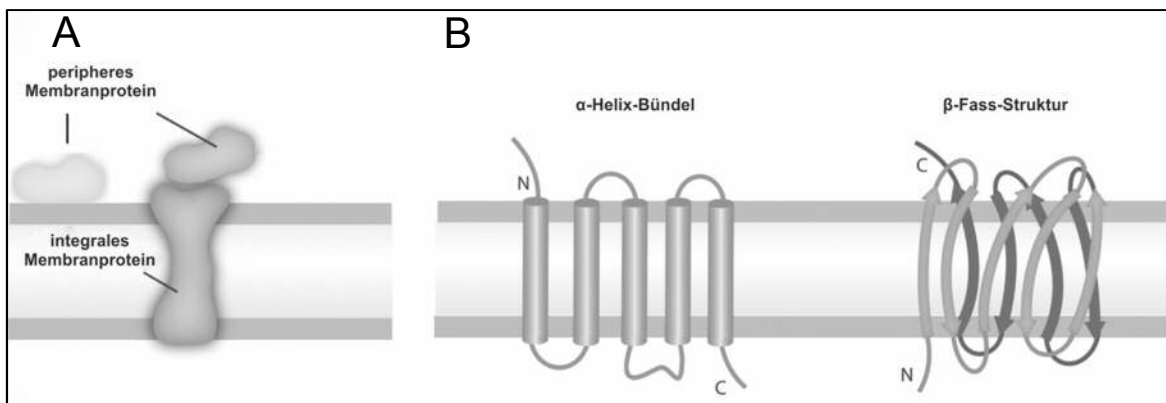


Abbildung 1: Klassifizierung von Membranproteinen.

Periphere MP (A) sind an die Membranoberfläche assoziiert. Die Bindung erfolgt über elektrostatische oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Lipidkopfguppen, Acylketten oder integralen MP. Einige MP sind kovalent mit einem Lipidanker verbunden. Integrale MP (B) besitzen entweder eine α -helikale Struktur und bilden Helix-Bündel aus oder sie durchspannen die Membran mit β -Faltblättern, die eine fassartige Struktur ausbilden. Modifiziert nach (Hedin *et al.*, 2011).

den wassergefüllte Kanäle, die ausschließlich in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten zu finden sind (Imai *et al.*, 2008). Die Polypeptidkette einer idealen α -Helix nimmt eine rechtsgängige, schraubenförmige Anordnung ein, in der jede Aminosäure zur vorhergehenden um ca. 100° versetzt ist. Eine vollständige Windung umfasst demnach 3,6 Reste und die axiale Verschiebung zwischen zwei Aminosäuren misst $1,5 \text{ \AA}$ (Bowie, 1997, Arkin und Brunger, 1998). Die durchschnittliche Länge einer α -Helix beträgt 20 bis 30 Aminosäuren, die überwiegend hydrophob sind (Popot und Engelman, 2000). Intrahelikale Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoff der i -ten Aminosäure und dem Amidproton der $(i-4)$ -ten Aminosäure stabilisieren die α -Helix. Dadurch wird gewährleistet, dass das Wasserstoffbrückenpotential des Proteinerückgrats maximal gesättigt ist (Popot und Engelman, 2000). Im Vergleich zu α -Helices in wässriger Umgebung, sind TM α -Helices in der Lipiddoppelschicht besonders stabil. Grund dafür ist die geringe Anzahl an Wassermolekülen in der Membran, die um die stabilisierenden Wasserstoffbrücken konkurrieren. Folglich ist eine Struktur, deren Wasserstoffbrücken intramolekular maximal gesättigt sind, in einer Umgebung mit einer niedrigen Dielektrizitätskonstanten bevorzugt (Haltia und Freire, 1995). Integrale MP mit

einer einzelnen α -helikalen TM-Helix werden als bitopisch bezeichnet. Besitzen sie mehrere TM-Helices gelten sie als polytopisch (Blobel, 1980). MP mit α -helikalen TM-Domänen sind zahlreicher als β -Fässer und kommen in allen zellulären Membranen vor. Auch das Spektrum ihrer Funktionen und Faltungen ist größer. Die zunehmende Anzahl an aufgelösten Kristallstrukturen von Membranproteinen hat gezeigt, dass viele α -Helices nicht, wie lange angenommen, einfache Helix-Bündel darstellen. Membranintegrierte Helices weisen oft Knicke auf, die ihre geradlinige Struktur durchbrechen. Oft, jedoch nicht immer, sind diese Knicke durch die sterischen Eigenschaften des Prolins induziert. Vermutlich wechseln die Wasserstoffbrücken des Proteinerückgrats ihre Interaktionspartner, um das Wasserstoffbrückenpotential zu sättigen und die Wechselwirkungen innerhalb des Proteins zu maximieren (Yohannan *et al.*, 2004, Cao und Bowie, 2012, Barrett *et al.*, 2012). Obwohl die Entfaltung einer Helix in der Membran energetisch ungünstig ist, weisen Helices eine unerwartete Dynamik auf. Es wurden Helices beschrieben, die während des Faltungsprozesses in die Membran eintauchen und diese wieder auf derselben Seite verlassen („reentrant loops“). Der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang nicht verstanden. Es wird angenommen, dass ein Bruch in der helikalen Struktur eingeführt wird und dass zur Sättigung des Wasserstoffbrückenpotentials Wasser in die Membran eindringt (Bowie, 2013).

1.1.3 Membranprotein-Faltung

Voraussetzung für die Funktion von Proteinen ist ihre korrekte Faltung, d. h. die Ausbildung ihrer intakten Tertiär- bzw. Quartärstruktur. Darunter versteht man die Assoziation der Sekundärelemente zu einer Tertiärstruktur und bei multimeren Komplexen die Zusammenlagerung der Untereinheiten zur Quartärstruktur. Dies ist auch bei MP der Fall. Wechselwirkungen zwischen den TM-Helices sind daher oft essentiell für die Assemblierung des gesamten Proteins und haben unmittelbaren Einfluss auf dessen Funktionalität. Die Membranprotein-Faltung ist im Vergleich zur Faltung wasserlöslicher Proteine wenig untersucht. Das liegt unter anderem daran, dass die bislang eingesetzten Methoden für hydrophobe Proteine ungeeignet sind. Dementsprechend ist es erforderlich neue Strategien zur Untersuchung der Membranprotein-Faltung zu entwickeln bzw. vorhandene zu modifizieren. Trotzdem konnten wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiet erzielt werden. 1990 wurde die Membranprotein-Faltung in einem Zwei-Stufen-Modell beschrieben (Abbildung 2, Popot und Engelman, 1990). Der erste Schritt beinhaltet die Ausbildung unabhängiger helikaler Faltungseinheiten in der Membran und die zweite Stufe ihre laterale sequenzspezifische Interaktion, die zur nativen Struktur des Proteins führt. Dieser vereinfachten Betrachtungsweise liegt die Annahme zu Grunde, dass eine α -Helix eine stabile

Struktur ausbildet, sobald sie in die Membran integriert ist. Wie bereits unter 1.1.2 erläutert, haben intrahelikale Wasserstoffbrücken in einer Membran einen stärkeren stabilisierenden Effekt auf TM-Helices als auf Helices in wässriger Umgebung. Außerdem besitzt die α -Helix, aufgrund der maximal gesättigten intramolekularen Wasserstoffbrückenbin-

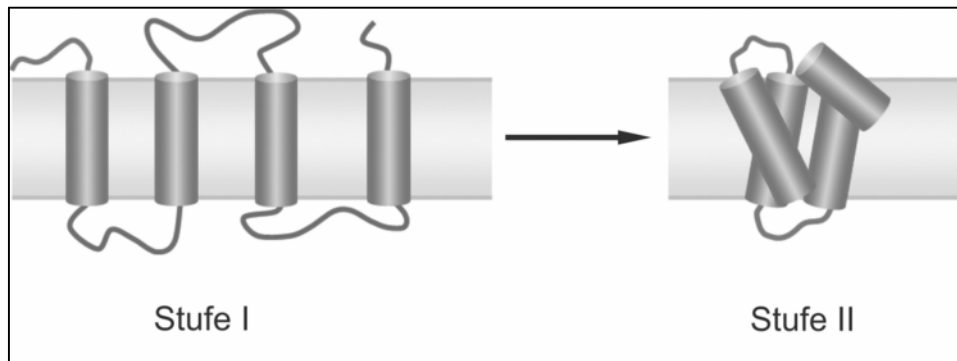


Abbildung 2: Zwei-Stufen-Modell zur Faltung α -helikaler Membranproteine.

In der ersten Stufe der Membranproteinfaltung kommt es, begünstigt durch intrahelikale Wasserstoffbrückenbindungen und den hydrophoben Effekt, zur Ausbildung stabiler α -Helices in der Membran. Durch die Ausbildung von Helix-Helix-Interaktionen assemblieren die Helices zu einem funktionalen Protein in der zweiten Stufe.

dungen, energetisch betrachtet eine vorteilhafte Struktur. Die Entfaltung der α -Helix, und der damit verbundene Kontakt zwischen hydrophilen Gruppen des Polypeptidrückgrats und Lipiden, wäre nur mit einem hohen Energieaufwand möglich und daher unwahrscheinlich. Ebenso ist der Austritt der Helix in das wässrige Milieu erschwert, da der hydrophobe Effekt die Einbettung hydrophober Aminosäureketten in die Membran fördert (White und von Heijne, 2008, White und von Heijne, 2005).

1.1.3.1 Wechselwirkungen membranständiger α -Helices

Bei der Betrachtung der Helix-Assoziation müssen wenigstens drei mögliche Wechselwirkungen berücksichtigt werden: Lipid-Helix-, Lipid-Lipid- und Helix-Helix-Interaktionen. Sobald Helix-Helix- und Lipid-Lipid-Interaktion energetisch vorteilhafter sind als die Helix-Lipid-Interaktion, wird die Assoziation von TM-Helices bevorzugt. Eine einzelne α -Helix bildet nach ihrer Insertion in die Membran hydrophobe Wechselwirkungen mit den umgebenden Lipidmolekülen aus. Kommt es zur Interaktion mit einer anderen Helix, bedeutet das die Freisetzung von Lipid-Molekülen und eine Entropiezunahme der Lipidmoleküle und damit des gesamten Systems (Schneider, 2004). Dies wirkt sich günstig auf die Helix-Helix-Interaktionen aus. Die Interaktion von TM-Helices wird aufgrund der damit verbundenen Einschränkungen der Freiheitsgrade von einem Entropieverlust begleitet, der sich energetisch ungünstig auf die Interaktion auswirkt. Außerdem kommt es zu einem Entro-

pieverlust des Polypeptidrückgrads infolge der Helix-Helix-Interaktion. Dieser ist jedoch relativ gering, da die Helices bereits vor ihrer Interaktion α -helikal gefaltet sind und somit mit einer relativ festgelegten Orientierung in der Membran vorliegen. Ferner kommt es zum Verlust der Seitenketten-Entropie von Aminosäuren an der Helix-Helix-Kontaktfläche durch die Reduktion der möglichen Seitenketten-Rotamere. Dies wirkt sich allerdings nur in geringem Maße negativ auf die Interaktion aus, da es bereits bei der Ausbildung der helikalen Struktur zur Reduktion der verfügbaren Rotamere bei vielen Aminosäuren kommt. Trotz der entropischen Kosten, werden Helix-Helix-Interaktionen ausgebildet. Günstig wirkt sich dabei die Entropiezunahme des gesamten Systems aufgrund der Freisetzung von Lipid-Molekülen aus. Der hydrophobe Effekt scheint, aufgrund der mangelnden Wassermoleküle im Membrankern, keine Rolle bei der Helix-Assoziation zu spielen (Fiedler *et al.*, 2010, Hedin *et al.*, 2011).

Die maßgeblichen zwischenmolekularen Kräfte zwischen TM-Helices sind elektrostatischer Natur. Dazu zählen Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen. Die schwächsten Anziehungskräfte üben Van-der-Waals-Kräfte aus. Diese können zwischen permanenten Dipolen, permanenten und induzierten sowie zwischen induzierten Dipolen ausgebildet werden. Ihre Stärke hängt von der Polarität, der Polarisierbarkeit und dem Abstand der beteiligten Moleküle ab. Mit zunehmendem Abstand nimmt ihre Energie ab, d. h. sie wirken nur über kurze Distanzen (Stryer, 1996). Für die Assemblierung von Membranproteinen sind sie dennoch überaus wichtig, da sie zwischen allen Atomen und Molekülen (also allen Aminosäuren) auftreten und sich ihre Beiträge akkumulieren können. Dies gewinnt besonders dann an Bedeutung, wenn die Kontaktflächen der Transmembran (TM)-Helices über einen großen Bereich hinweg komplementär sind und somit ein enger Kontakt zwischen den Seitenketten oder Peptidrückgraten entsteht (Fiedler *et al.*, 2010). Der enge Kontakt zwischen den Helices wird durch ein reisverschlussartiges Ineinandergreifen der Aminosäuren hergestellt. Hier gilt die Vorstellung, dass die Seitenketten einer Helix Ausbuchtungen darstellen, die optimal in Vertiefungen einer anderen Helix passen (Langosch und Heringa, 1998). Die daraus entstehende dichte Packung begünstigt die Ausbildung stabilisierender Van-der-Waals-Wechselwirkungen (White und Wimley, 1999). Wasserstoffbrückenbindungen sind stärker als Van-der-Waals-Wechselwirkungen und treten zwischen zwei elektronegativen Atomen, die um ein Wasserstoffatom konkurrieren, auf. Das Wasserstoffatom ist dabei kovalent an den Wasserstoffbrückendonator gebunden und trägt aufgrund der höheren Partialladung des Donors, eine positive Partialladung. Dadurch kann das Wasserstoffatom zeitgleich mit einem zweiten elektronegativen Atom, dem Wasserstoffbrückenakzeptor, in Wechselwirkung treten.

Länge und Stärke einer Wasserstoffbrücke hängen von der Elektronegativität von Donor und Akzeptor sowie ihrer geometrischen Ausrichtung zueinander ab. Je elektronegativer die Atome sind und je optimaler Donor, Akzeptor und das Wasserstoffatom auf einer Linie liegen, desto stärker ist ihre Bindung (Stryer, 1996). In Membranproteinen können interhelikale Wasserstoffbrücken zwischen den Seitenketten polarer und/oder ionisierbarer Aminosäuren sowie zwischen C_{α} -H-Atomen und Carbonylgruppen bzw. polaren oder aromatischen Seitenketten des benachbarten Polypeptidrückgrats auftreten (Fiedler *et al.*, 2010). Die stärksten nicht-kovalente Interaktionen finden zwischen Ionen statt, die gegensätzlich geladen sind und sich anziehen. Die Energie dieser Interaktion nimmt mit zunehmendem Abstand zwischen den Ionen ab (Fiedler *et al.*, 2010). Ob ionisierbare Aminosäuren in der Membran geladen oder ungeladen vorliegen hängt vermutlich stark von ihrem unmittelbaren Umfeld ab. Stark geladene Aminosäuren (Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Lysin und Arginin) kommen jedoch selten in der Membran vor, da ihre Insertion in die Membran energetisch ungünstig ist (Gratkowski *et al.*, 2001, Ulmschneider *et al.*, 2005). Schwächer geladene Aminosäuren wie Serin, Cystein und Threonin kommen relativ häufig in Membranproteinen vor (Arkin und Brunger, 1998). Salzbrücken sind im hydrophoben Kern der Membran selten zu beobachten. Ungepaarte geladene Aminosäuren treten öfter in der Grenzschicht der Membran auf und bestimmen dadurch die Topologie des Proteins (von Heijne, 1986). Generell können Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen zur erhöhten Stabilität einer durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen vermittelten Helix-Helix-Interaktion beitragen. Der relative Anteil der zusammenwirkenden Kräfte variiert und wird von der Aminosäurezusammensetzung und –Sequenz bestimmt. Neben den interhelikalen Wechselwirkungen können wasserlösliche Domänen, membranextrinsische *Loops* oder Kofaktoren die Faltung von Membranproteinen beeinflussen (Popot und Engelman, 2000, Booth, 2000). So besteht das Monomer des trimeren Lichtsammel-Komplex II (*light-harvesting complex II*, LHC II) aus drei α -Helices die mehrere Karotinoide und Chlorophylle binden (Kuhlbrandt *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass die Ausbildung einer funktionalen Struktur dieses Komplexes abhängig von der Bindung der Kofaktoren ist (Horn und Paulsen, 2002, Paulsen *et al.*, 1993). Am Beispiel der Integrine wurde gezeigt, dass die wasserlöslichen Domänen an der spezifischen Helix-Helix-Interaktion beteiligt sind (Schneider und Engelman, 2004, Schneider und Engelman, 2003, Frachet *et al.*, 1992).

1.1.4 Einfluss interhelikaler *Loops* auf die Faltung von Membranproteinen

Die Peptidkette eines polytopen Membranproteins durchquert die Membran mehrfach. Neben den in der Membran verankerten, TM-Helices bildet die Polypeptidkette *Loops* (Schleifen), die aus der Membran in die wässrige Umgebung ragen. *Loops* sind weniger einheitlich strukturiert und schwieriger zu klassifizieren als α -Helices oder β -Faltblätter. Umfangreiche Klassifizierungen von *Loops* basieren auf der statistischen Auswertung von Daten aus aufgelösten 3D Proteinstrukturen, die eine Vorhersage einer *Loop*-Struktur für Proteinmodellierungen ermöglichen sollen. Die Klassifizierungen erfolgen nach der Aminosäuresequenz, der geometrischen Form, der Sekundärstruktur der Elemente, die durch den *Loop* verbunden werden und dem Abstand zwischen diesen Elementen (Wojcik *et al.*, 1999, Vanhee *et al.*, 2011). Die Anzahl der Aminosäuren in *Loops* kann entweder einige wenige Aminosäuren oder bis zu über 100 Aminosäuren betragen (Tusnady und Simon, 1998, Jones *et al.*, 1994). Der Abstand zwischen den TM-Helices, die durch einen *Loop* verbunden werden, hängt dabei nicht notwendigerweise mit der Länge des *Loops* zusammen. Ein relativ langer *Loop* erhöht nicht immer die Distanz zwischen zwei TM-Helices im Vergleich zu einem kürzeren *Loop*. Der Abstand zwischen zwei Sekundärelementen wird vermutlich vorwiegend durch die dichte Packung des gefalteten Proteins bestimmt (Choi *et al.*, 2013). Ferner wurde die Präferenz einzelner Aminosäuren für das Vorkommen in *Loops* untersucht. In polytopen MP kommen Arginin, Glycin, Histidin, Lysin und Prolin gehäuft vor. Die membranextrinsischen Bereiche bitoper Proteine weisen mit Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Prolin, Threonin, Tryptophan und Valin eine größere Variabilität auf (Jones *et al.*, 1994). Weiterhin wurde untersucht, welche Aminosäuren die Ausbildung eines *Loops* fördern. Dazu wurde die Fähigkeit der 20 proteinogenen Aminosäuren eine kurze Schleife in einer TM-Helix zu induzieren untersucht und eine sogenannte „turn propensity scale“ aufgestellt (Nilsson und von Heijne, 1998, Monne *et al.*, 1999a, Monne *et al.*, 1999b). Jeweils eine der 20 Aminosäuren wurde in die Mitte einer 40 Aminosäuren langen Poly-Leucin-Helix inseriert und beobachtet, ob und wie effizient die Insertion eine *Hairpin*-Bildung induziert. Hydrophobe Aminosäuren bevorzugen die unpolare Membranumgebung und induzieren die *Hairpin*-Bildung nicht (Wimley und White, 1996). Aminosäuren, deren Seitenreste polar oder ionisierbar sind, meiden die hydrophobe Membran und zeigen die größte Tendenz eine *Hairpin*-Bildung zu induzieren. Diese Tatsache stellt einen signifikanten Unterschied zu wasserlöslichen Proteinen dar. In globulären Proteinen zeigen polare und ionisierbare Aminosäuren eine sehr geringe Tendenz einen *Hairpin* zu induzieren (Monne *et al.*, 1999a). Außerdem zeigen die als Helix-Brecher bekannten Aminosäuren Prolin und Glycin eine große Tendenz, eine *Hairpin*-Bildung zu induzieren. Die Sequenz der interhelikalen *Loops* kann

außerdem einen signifikanten Einfluss auf die Sekundärstruktur der verbundenen TM-Helices haben. So führte die Insertion von Prolin und Glycin in einen kurzen *Loop* eines α -helikalen *Hairpins* dazu, dass die Sekundärstruktur der TM-Segmente in zwei β -Faltblätter umgewandelt wurde (Nadeau und Deber, 2013). Ein Einfluss der Aminosäurezusammensetzung der *Loops* auf die Topologie eines polytopen α -helikalen Membranproteins wurde bereits 1986 beschrieben. Es wurde ein gehäuftes Vorkommen an positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin) in zytoplasmatischen *Loops* bakterieller MP beobachtet (von Heijne, 1986). Die topogene Wirkung dieser Aminosäureverteilung wurde dadurch verdeutlicht, dass sich die Membrantopologie durch Veränderung der Ladungsverteilung umkehren ließ (von Heijne, 1989, Beltzer *et al.*, 1991). Es wurde die sogenannte „*positive-inside-rule*“ aufgestellt, die besagt, dass die Seite eines Membranproteins, die die meisten positiven Ladungen trägt, ins Zytosol (oder das entsprechende Kompartiment in Mitochondrien bzw. Chloroplasten) weist (Abbildung 3). Dies trifft, unabhängig vom Membransystem und Organismus, so gut wie auf alle TM Helix-Bündel zu (von Heijne, 2007, von Heijne, 1986). *Loops* scheinen aber nicht nur die Orientierung einer TM-Helix zu bestimmen, sondern können auch die Insertion der Helix in die Membran fördern. Dies geschieht vermutlich durch eine stabilisierende Interaktion zwischen dem *Loop* und der TM-Helix (Hedin *et al.*, 2010). Die bisher beschriebenen Eigenschaften der *Loops* beeinflussen vorwiegend die erste Stufe, die Insertion in die Membran, des Zwei- Stufen-Modells der Membranprotein-Faltung. Während der zweiten Stufe, der Assemblierung der einzelnen

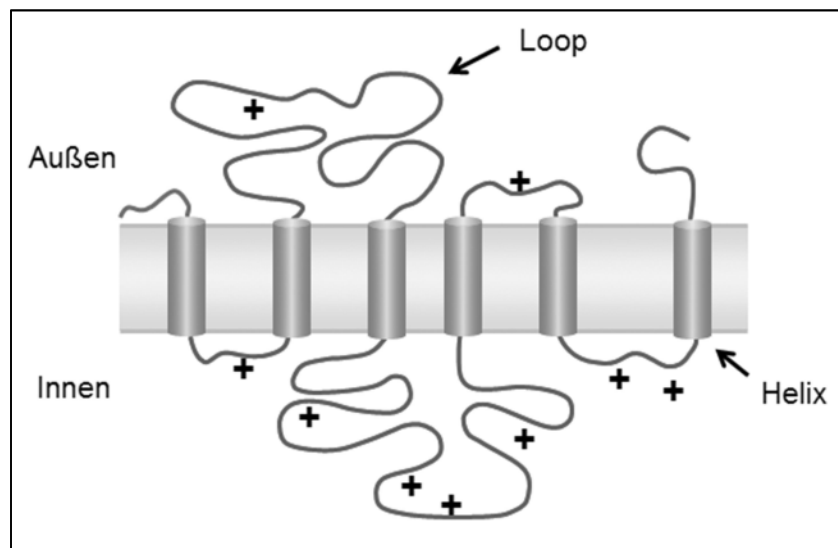


Abbildung 3: Topologie-Modell eines Membranproteins („*positiv-inside-rule*“).

Anordnung der Helices und *Loops* eines integralen α -helikalen Membranproteins. Die *Loops* im Inneren weisen einen höheren Anteil an positiv geladenen Aminosäuren auf als die nach außen ragenden *Loops*. Innen bzw. außen bezeichnen das Zytosol bzw. den extrazellulären Raum oder die äquivalenten Kompartimente in Mitochondrien bzw. Chloroplasten.

Helices, können die *Loops* eine unterstützende Funktion haben und in manchen Fällen sogar essentiell sein. Zwei TM α -helikale MP wurden im Hinblick auf die Funktion der *Loops* während der Assemblierung untersucht: Bacteriorhodopsin aus dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* und Rhodopsin, das Sehpigment in der Netzhaut der Augen von Säugetieren (Abbildung 4, Tastan *et al.*, 2013). Beide Proteine sind dicht gepackte Helix-Bündel, die aus sieben TM-Helices (A bis G) und einem kovalent gebundenen Kofaktor, Retinal, bestehen (Abbildung 4). Um die Rolle der *Loops* zu untersuchen wurden Fragmentassemblierungsstudien durchgeführt. Komplementäre Fragmente des Bacteriorhodopsins wurden separat exprimiert, gereinigt und anschließend die Fähigkeit der Fragmente *in vitro* zu einem funktionalen Protein zu assemblieren untersucht. Es stellte sich heraus, dass sämtliche möglichen Fragment-Kombinationen zu einem funktionalen Protein assemblieren. Jedoch zeigten die Fragmente eine verringerte Stabilität, die auch durch Veränderungen in den *Loops* (Mutationen, Deletionen und Substitutionen von Aminosäuren) hervorgerufen wurde (Tastan *et al.*, 2009, Marti, 1998, Huang *et al.*, 1981, Landin *et al.*, 2001). Keiner der sechs *Loops* des Bacteriorhodopsins ist somit für die Assemblierung essentiell. Die Funktion der *Loops* liegt mehr in der Stabilisierung des Proteins. Vergleichbare *in vitro* Studien konnten mit Rhodopsin nicht durchgeführt werden, da sich die einzelnen Fragmente nicht isolieren und rekonstituieren ließen. Dafür wurden komplementäre Abschnitte des Rhodopsin-Gens in Zellen exprimiert und die Assemblierung der Fragmente *in vivo* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur die Spaltung in den zytoplasmatischen *Loops* zwischen den Helices D und E und den Helices F und G die

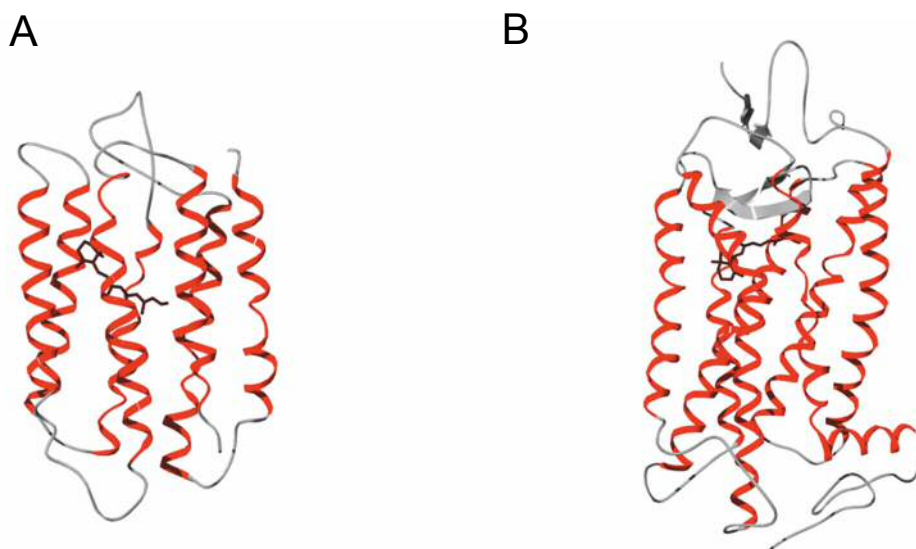


Abbildung 4: 3D-Strukturen von Bacteriorhodopsin (A) und Rhodopsin (B).

Bacteriorhodopsin (A) und Rhodopsin (B) bestehen jeweils aus sieben TM-Helices, die den Kofaktor Retinal kovalent gebunden haben. Bacteriorhodopsin des Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum* (PDB-Datei 1AP9). Rhodopsin aus dem Rind (*Bos taurus*, PDB-Datei 2PED).

Ausbildung einer funktionalen Rhodopsin-Struktur zuließ. Spaltungen in den extrazellulären *Loops* verhinderten die Assemblierung (Landin *et al.*, 2001, Ridge, 1996, Booth *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Bacteriorhodopsin sind, zumindest die extrazellulären *Loops* des Rhodopsins essentiell für die Faltung des Proteins (Klein-Seetharaman, 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Beitrag der interhelikalen *Loops* zur Assemblierung eines kofaktortragenden TM-Proteins unterschiedlich sein kann und individueller Untersuchungen bedarf.

1.2 Cytochrome

Cytochrome zählen zu den Hämoproteinen und bestehen aus einem Apo-Protein und dem Kofaktor Häm. Sie fungieren als Redoxkatalysatoren bei der Zellatmung, Photosynthese und einigen anaeroben bakteriellen Vorgängen. Durch den reversiblen Valenzwechsel des zentralen Eisen-Ions ($\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$) des Häms, dienen sie als Elektronendonoren und -akzeptoren. Die Grundstruktur des Häms stellt das Protoporphyrin IX-Ringsystem dar, dessen Substituenten variieren können. Die Bindung an das Apo-Protein erfolgt entweder kovalent oder nicht-kovalent. Anhand der Art der Bindung des Häms an das Apo-Protein und der Struktur der Ringsubstituenten unterscheidet man fünf Hauptgruppen, die Cytochrome a, b, c, d und o (Abbildung 5). Aufgrund der strukturellen Unterschiede, zeigen die Cytochrome Absorptionsspektren, die durch spezifische Absorptionsmaxima charakterisiert sind (siehe 1.2.2.1). Die Absorptionsbanden eines Cytochrom-Spektrums werden als α -, β - und γ -Bande bezeichnet, wobei die γ -Bande auch Soret-Bande genannt wird (Abbildung 6). Der Redoxzustand des Eisen-Ions hat einen maßgeblichen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften des Häms. Eine Veränderung der Oxidationszahl des Eisens hat eine deutlich sichtbare Verschiebung der Soret-Bande zur Folge. Die Absorptions-Banden der einzelnen Cytochrome sind spezifisch und werden deshalb zur Identifizierung der Proteine genutzt. Die Bindung des Häms an die Polypeptidkette erfolgt bei allen Cytochromen, bis auf c-Typ Cytochrome, nicht-kovalent (Thöny-Meyer, 1997). Die nicht-kovalente, koordinative Bindung des zentralen Eisen-Ions wird durch konservierte Aminosäuren bewerkstelligt. Häufig dient Histidin als fünfter und sechster Ligand des Eisens, Methionin, Cystein, Tryptophan, Lysin und Tyrosin kommen ebenfalls vor (von Jagow und Sebald, 1980, Yun *et al.*, 1991). Die kovalente Bindung des Häms bei c-Typ Cytochromen erfolgt über Thioetherbindungen, die meist zwischen zwei Cysteinen und zwei Vinyl-Gruppen des Häms ausgebildet werden. Die beteiligten Cysteine befinden sich in einem charakteristischen CxxCH-Aminosäure-Motiv (Koch, 2007).

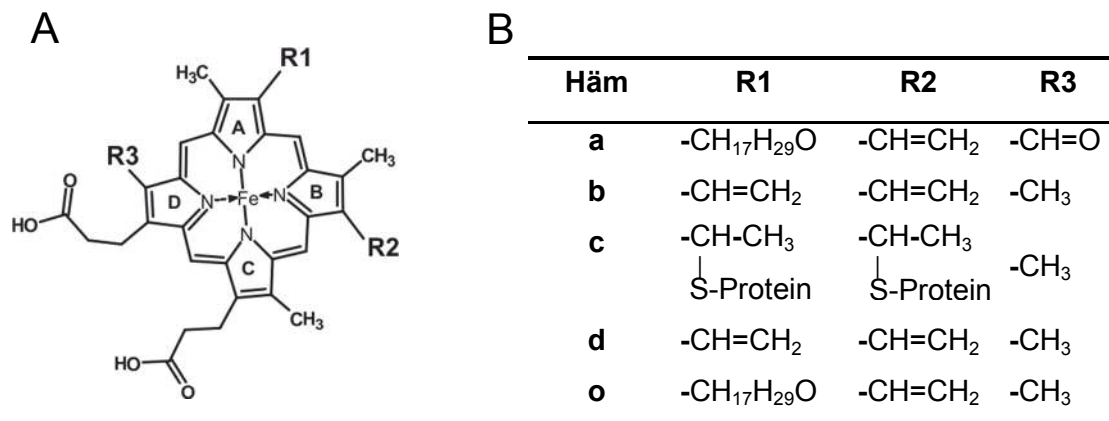


Abbildung 5: Häm-Strukturen der fünf Cytochrom-Gruppen.

Protoporphyrin IX ist das gemeinsame Grundgerüst der verschiedenen Häme (A). Es besteht aus einem Pyrrol-Ringsystem (Ringe A bis D), in dem das zentrale Eisen-Ion über vier Stickstoffatome ligiert wird. Die Substituenten der Ringe können an den Positionen R1, R2 und R3 variieren. Die Kombination der unterschiedlichen Substituenten spezifiziert die unterschiedlichen Häm-Typen a, b, c, d und o (B). Cytochrome werden oft nach dem Häm-Typ, den sie gebunden haben benannt. Modifiziert nach (Koch, 2007).

TM Cytochrome sind essentielle Bestandteile von Elektronentransportketten und kommen in Membranen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien vor. In *E. coli* ist beispielsweise das b-Typ Cytochrom b₅₅₆ Teil des Komplexes II der Atmungskette (Yankovskaya *et al.*, 2003). Purpurbakterien besitzen hingegen aa₃- und cbb₃-Cytochrom-Oxidasen, die am Elektronentransport der Atmungskette beteiligt sind (Gray *et al.*, 1994). Weiterhin ist Cytochrom b ein Teil des Cytochrom bc₁-Komplexes in der Atmungskette von Mitochondrien und vielen Bakterien (Darrouzet *et al.*, 2004). In dem Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* fungiert das c-Typ Cytochrom Cyt c_y sowohl in der Atmungskette als auch in der Photosynthese als Elektronentransporter (Jenney und Daldal, 1993). In der Elektronentransportkette vieler photosynthetisch aktiver Organismen sind Cytochrome ebenfalls beschrieben worden (Cramer und Whitmarsh, 1977). Cytochrome sind Bestandteil des Photosystems II und des Cytochrom-b₆f-Komplexes in Chloroplasten und Cyanobakterien. Beispielsweise ist Cyt b₅₅₉ eine Untereinheit des Photosystem II und Cytochrom b₆ (Cyt b₆) des Cytochrom-b₆f-Komplexes (Ferreira *et al.*, 2004, Kurisu *et al.*, 2003).

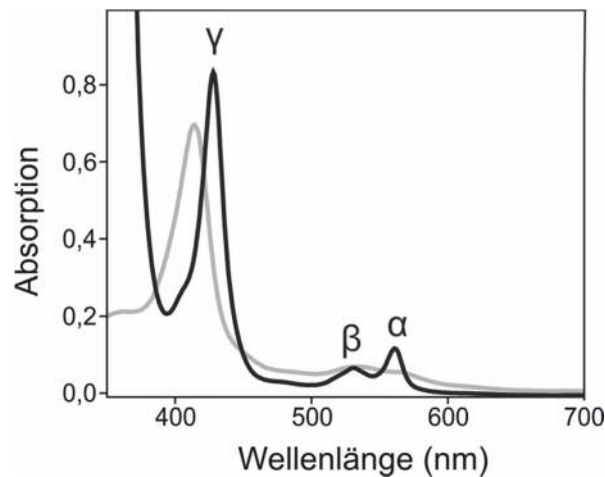


Abbildung 6: Absorptionsspektrum des Cytochrom b_6 aus Spinat.

Das typische Absorptionsspektrum eines Cytochroms weist drei charakteristische Banden auf, die als α -, β - und γ -Bande (auch Soret-Bande genannt) bezeichnet werden. Die Maxima der α -, β - und γ -Bande sind für jedes Cytochrom spezifisch. Die abgebildeten Absorptionsspektren wurden unter oxidierenden (grau) und reduzierenden (schwarz) Bedingungen aufgenommen. Der Redoxzustand des Häms beeinflusst die spektroskopischen Eigenschaften, was sich in einer Verschiebung der Banden äußert. Die α - und die β -Bande sind unter reduzierenden Bedingungen deutlicher ausgeprägt als unter oxidierenden. Die Wellenlänge, bei der sich das Maximum der α -Bande befindet, dient der Benennung mancher Cytochrome.

1.2.1 Das transmembrane Cytochrom b_6

1.2.1.1 Struktur und Funktion von Cytochrom b_6

Als eine Untereinheit des Cytochrom- b_6f -Komplexes, ist Cyt b_6 ein wichtiger Bestandteil der photosynthetischen Elektronentransportkette. Die Elektronentransportkette besteht aus drei TM Protein-Komplexen (Photosystem II, Cytochrom- b_6f -Komplex, Photosystem I) und den beweglichen Komponenten Plastochinon, Plastocyanin und Ferredoxin (Abbildung 7). Absorbierte Strahlung löst im Photosystem II die Spaltung von Wasser unter Freisetzung von Elektronen aus. Die Elektronen werden über Plastochinon, den Cytochrom- b_6f -Komplex und Plastocyanin zum Photosystem I transportiert. Am Photosystem I erfolgt die Reduktion von Ferredoxin, welches an die Ferredoxin-NADP-Reduktase bindet. Dieses Enzym überträgt die Elektronen an den finalen Akzeptor NADP^+ , der zu NADPH reduziert wird. NADPH steht für die Dunkelreaktion zur Verfügung. Außerdem entsteht durch den Elektronentransport ein elektrochemischer Protonengradient, der von der ATP-Synthase zur ATP-Gewinnung genutzt wird. Die Strukturen des Cytochrom- b_6f -Komplexes aus den Cyanobakterien *Mastigocladus laminosus* Nostoc sp. PCC 7120 und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurden gelöst und geben Aufschluss über den

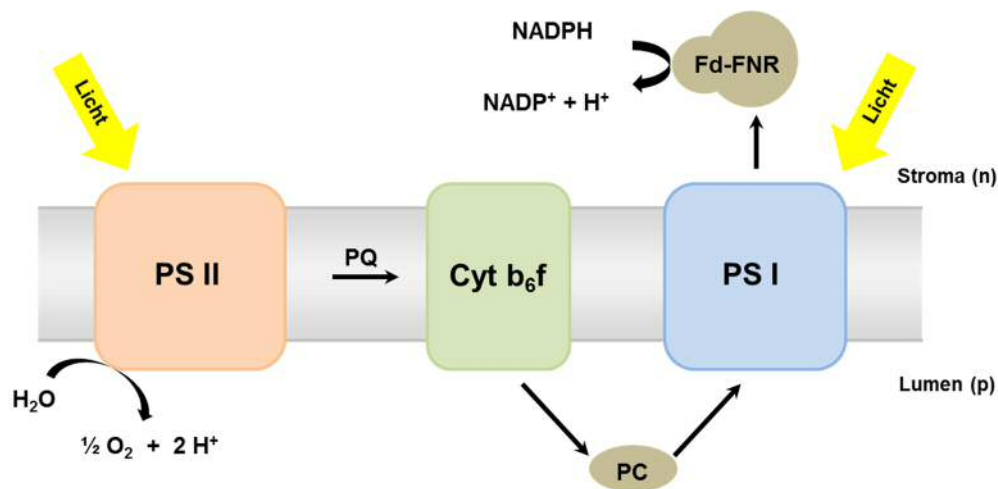


Abbildung 7: Schematische Darstellung der photosynthetischen Elektronentransportkette.

Dargestellt ist die Anordnung der Komponenten in der Thylakoidmembran. Photosystem II (PS II), Photosystem I (PS I) und der Cytochrom b_6f Komplex (Cyt b_6f) sind integrale MP, während Plastochinon (PQ) in der Membran diffundieren kann und den Elektronentransport zwischen PS II und Cyt b_6f vermittelt. Plastocyanin (PC) und der Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase-Komplex (Fd-FNR) sind wasserlösliche Elektronentransport-Proteine. Das Thylakoidlumen ist elektropositiv (p) und das Stroma der Chloroplasten elektronegativ (n).

Aufbau des Komplexes (Abbildung 8, Stroebel *et al.*, 2003, Kurisu *et al.*, 2003, Banilius *et al.*, 2009). Der Cytochrom- b_6f -Komplex ist ein symmetrisches Dimer, bestehend aus acht TM Polypeptid-Untereinheiten. Jedes Monomer besteht aus den zwei polytopen MP Cyt b_6 und Untereinheit IV, die gemeinsam den Kern bilden. An den Kern assoziiert, liegen die kleinen Untereinheiten Cytochrom f, das Rieske Protein und vier kleine α -helikale Polypeptide (Pet G, Pet L, Pet M, Pet N). Cytochrom f und das Rieske Protein besitzen zwei große wasserlösliche Domänen, die in das Thylakoidlumen gerichtet sind. An der Elektronenübertragung sind die drei Häme des Cyt b_6 , das Häm des Cyt f und der Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske Proteins beteiligt (Hasan und Cramer, 2014). Neben diesen Kofaktoren sind je ein Chlorophyll a und ein β -Karotin im Komplex gebunden. Die Funktion dieser Moleküle ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Bisherige Untersuchungen deuten jedoch eher eine strukturelle als eine photochemische Funktion der beiden Pigmente an (Hasan *et al.*, 2013b). Das Helix-Bündel Cyt b_6 besteht aus vier TM-Helices, die über *Loops* miteinander verbunden sind (Abbildung 9). Zwei Häm-Kofaktoren werden über konservierte Histidine in den Helices B und D nicht-kovalent an die Polypeptidkette gebunden. Die Histidine fungieren als fünfter und sechster axialer Ligand des zentralen Eisen-Ions. Die Häme werden entsprechend ihres Mittelpunktspotentials b_H (*high-potential*) und b_L (*low-potential*) genannt. Ein drittes Häm-Molekül, Häm c_n , ist über eine Thioetherbindung kovalent mit einem Cystein in Helix A verbunden (Kurisu *et al.*, 2003, Stroebel *et al.*, 2003). Häm c_n besitzt als fünften axialen Liganden ein Wasser- oder Hyd-

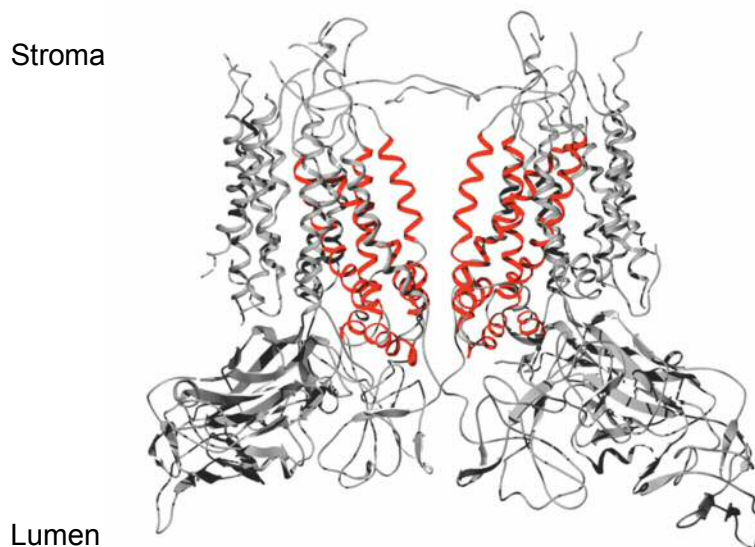


Abbildung 8: Struktur des Cytochrom- b_6f -Komplexes.

Struktur des dimeren, membranintegralen Proteinkomplexes aus dem Cyanobakterium *Mastigocladus laminosus* (PDB-Datei: 1VF5). Die TM-Helices von Cyt b_6 sind in Rot hervorgehoben.

oxid-Molekül, während die sechste Liganden-Bindestelle nicht besetzt ist (Twigg *et al.*, 2009, Yamashita *et al.*, 2007). Vermutlich liegt die Funktion des Häm c_n in der Bindung des Plastochinols, das als Elektronen- und Protonen-Donator im Q-Zyklus fungiert (Hasan *et al.*, 2013a). Der Cytochrom- b_6f -Komplex ist, neben dem linearen Elektronentransport, am Q-Zyklus beteiligt. Der Q-Zyklus koppelt die Elektronenübertragung von Plastochinol zu Plastocyanin an den Protonentransfer über die Membran und trägt maßgeblich zum Aufbau des thylakoidalen Protonengradienten bei. Dabei nimmt Cyt b_6 eine zentrale Rolle als Elektronenüberträger ein. Der Cytochrom- b_6f -Komplex besitzt zwei Plastochinol-Bindestellen, von denen sich eine an der Stroma- (Q_r) und die andere an der Lumenseite (Q_o) der Thylakoidmembran befindet (Abbildung 10). Plastochinon wird am Photosystem II unter Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen zu Plastochinol reduziert und diffundiert zum Cytochrom- b_6f -Komplex. An der Q_o -Bindestelle wird Plastochinol unter Freisetzung von zwei Elektronen und zwei Protonen oxidiert. Als Elektronenakzeptor dient zum einen das Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske-Proteins, das über Cytochrom f und Plastocyanin ein Elektron an das Photosystem I weitergibt. Da Plastocyanin nur ein Elektron aufnehmen kann, wird das zweite Elektron an Häm b_L des Cyt b_6 weitergegeben. Über Häm b_H und Häm c_n wird das Elektron zu einem Plastochinon-Molekül an der Q_r -Bindestelle transportiert, welches zum Plastosemichinon-Radikal reduziert wird. Das Plastochinol an der Q_o -Bindestelle gibt seine beiden Protonen ins Lumen ab und diffun-

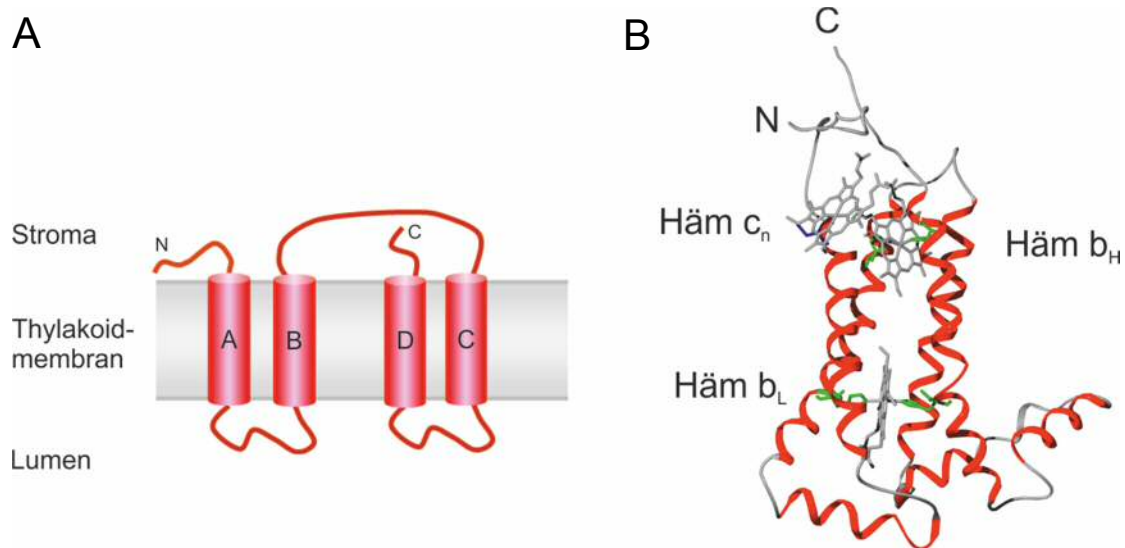


Abbildung 9: Topologie-Modell (A) und 3D-Struktur (B) des Cytochrom b_6 .

Cytochrom b_6 besteht aus vier TM-Helices (Zylinder, A-D). Abbildung (A) zeigt die Anordnung der Helices in der Thylakoidmembran eines Chloroplasten. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen auf der zum Stroma weisenden Seite der Membran. Die interhelikalen *Loops* weisen sowohl ins Lumen als auch ins Stroma. Die 3D-Struktur des Proteins (B) zeigt zwei nicht-kovalent gebundene Häme b_L und b_H (grau), sowie ein kovalent verknüpftes Häm c_H . Die Koordination der Häme erfolgt über Histidine (grün). In Rot sind die TM-Helices dargestellt. Die Struktur wurde aus dem Cytochrom b_6f -Komplex des Cyanobakteriums *Mastigocladus laminosus* entnommen (PDB-Datei 1VF5).

diert von der Bindestelle. In einem zweiten Zyklus bindet erneut ein Plastochinol an die Q_o -Bindestelle und der Elektronentransfer läuft analog ab. Das radikalische Plastosemichinon an der Q_r -Bindestelle wird durch die Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma und eines zweiten Elektrons zu Plastochinol reduziert (Cramer *et al.*, 2011, Hasan *et al.*, 2013b).

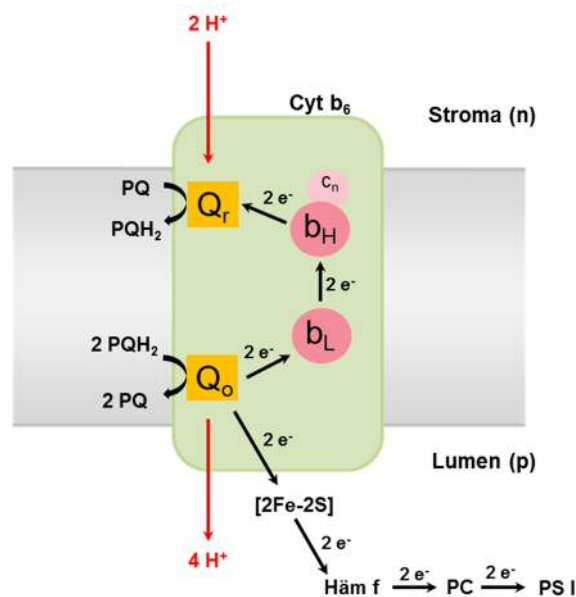


Abbildung 10: Modell des Q-Zyklus am Cytochrom b_6 -Komplex.

Darstellung des Elektronen- und Protonentransfers durch den Cytochrom b_6 -Komplex in der Thylakoidmembran. Die Nettobilanz des Q-Zyklus beträgt vier ins Lumen transportierte Protonen, zwei Elektronen die an Plastocyanin (PC) abgegeben werden und ein Plastochinol (PQH_2), welches zu Plastoquinon (PQ) reduziert wird. Ausführliche Beschreibung siehe Text. Q_r : Plastoquinon-reduzierende Bindestelle, Q_o : Plastoquinol-oxidierende Bindestelle, b_L , b_H , c_n : Häme des Cyt b_6 , $[2Fe-2S]$: Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske-Proteins, Häm f: Häm-Kofaktor des Cyt f. Abbildung gestaltet nach Cramer *et al.*, 2011.

1.2.1.2 Assemblierung von Cytochrom b_6

Für die Assemblierung kofaktortragender MP wurde ein erweitertes Zwei-Stufen-Modell beschrieben (Engelman *et al.*, 2003). Die Bindung des Kofaktors findet in einer dritten Stufe, die sich an die Integration des Apo-Proteins in die Membran und die Assoziation der Helices anschließt, statt. Die Assemblierung von Cyt b_6 ist von zentraler Bedeutung, für die Stabilität des Cyt b_6 und des gesamten Cytochrom- b_6 -Komplexes (Hasan *et al.*, 2013b). Basierend auf *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit Cyt b_6 aus Spinat wurde ein Assemblierungs-Modell für Cyt b_6 vorgeschlagen, das mit dem Drei-Stufen-Modell übereinstimmt (Kuras *et al.*, 1997, Dreher *et al.*, 2008). Apo-Cyt b_6 integriert in die Membran und nimmt eine Konformation ein, die eine anschließende effiziente Häm-Bindung erlaubt (Dreher *et al.*, 2007). Jedoch erfolgt die Bindung der beiden Kofaktoren nicht in einem Schritt, sondern in zwei aufeinander folgenden. Mutation des Histidin 86 auf Helix B, das für die Koordination des Häm b_L verantwortlich ist, verhinderte die Bindung beider Kofaktoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Diese Beobachtung zeigt, dass Häm b_L zuerst an das Apo-Cyt b_6 bindet und dies die Voraussetzung für die Bindung des Häm b_H zu sein scheint (Abbildung 11). Konformationsänderungen in der Polypeptidkette, die mit der sequentiellen Bindung der Häme einhergehen, wären denkbar, konnten jedoch noch nicht

durch Experimente bestätigt werden. Für Cytochrom b aus dem Komplex III der Atmungskette und Cyt b_6 des Cytochrom- b_6f -Komplexes aus *Chlamydomonas* wurde eine analoge Assemblierungsabfolge gezeigt (Hildenbeutel *et al.*, 2014, Yun *et al.*, 1991). Da auch bei diesen beiden Cytochromen zuerst die Bindung des Häms b_L gefolgt von Häm b_H stattfindet, könnte es sich um einen konservierten Mechanismus handeln. Über die Beteiligung von Chaperonen bzw. Faktoren an der Assemblierung von TM b-Typ Cytochromen *in vivo*, ist bislang nicht viel bekannt. Kürzlich wurden für Cytochrom b des Komplex III aus Mitochondrien vier Faktoren (Cbp3, Cbp6, Cbp4 und Qcr7), die an der Assemblierung des Holo-Cytochroms beteiligt sind beschrieben (Hildenbeutel *et al.*, 2014). Ob diese oder ähnliche Faktoren bei der Assemblierung von Cyt b_6 eine Rolle spielen, bedarf zukünftiger Untersuchungen. Obwohl bei der Faltung von Cyt b_6 eine Mitwirkung von Assemblierungshelfern bei der Bindung der nicht-kovalent gebundenen Häme *in vivo* vermutet wird, konnten bislang keine Faktoren identifiziert werden (Kroliczewski *et al.*, 2011). Die Assemblierung von c-Typ Cytochromen ist im Vergleich zu b-Typ Cytochromen gut untersucht. Es wurden drei verschiedene Systeme (Systeme I, II, III und IV) beschrieben. Jedes System besteht aus mehreren Faktoren, die an der kovalenten Bindung der Häme beteiligt sind. In Prokaryoten, Chloroplasten und pflanzlichen Mitochondrien wurden das System I und II identifiziert, während in den Mitochondrien von Pilzen, Vertebraten und Invertebraten das System III verwendet wird (Thöny-Meyer, 1997, Thöny-Meyer, 2002, Kranz *et al.*, 1998). An der kovalenten Bindung des Häms c_n an Apo-Cyt b_6 ist das System IV beteiligt (de Vitry, 2011).

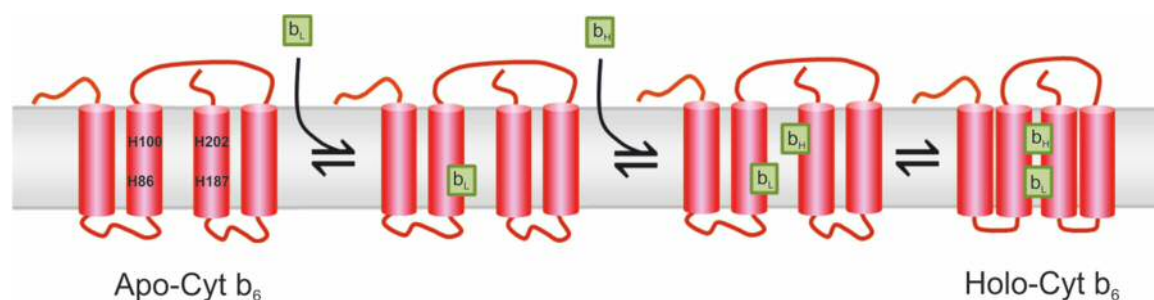


Abbildung 11: Sequentielle Bindung zweier Häme an Cyt b_6 .

Nach der Insertion des Apo-Cyt b_6 in die Membran bindet zunächst Häm b_L über Histidin 86 und in einem zweiten Schritt Häm b_H über Histidin 202 an das Protein. Die Histidine 100 und 187 sind an der Stabilisierung der gebundenen Häme beteiligt. Während der Assemblierung finden vermutlich strukturelle Umordnungen statt, die schließlich zur dichten Packung des Helix-Bündels führen.

1.2.2 Struktur und Biosynthese zyklischer Tetrapyrrole

Häm und Chlorophyll sind makrozyklische Tetrapyrrole (Abbildung 12). Sie besitzen als gemeinsames Strukturelement einen Porphyrinring, der aus vier Pyrrolringen (A-D), die über Methinbrücken verknüpft sind, aufgebaut ist. Die Ringsubstituenten können variieren, wodurch die unterschiedlichen Chlorophyll-Typen (siehe 1.2), die Chlorophyll a und b, Sirohäm und Phytychromobilin entstehen. Die Biogenese der Tetrapyrrole erfolgt weitestgehend über identische Zwischenstufen (Tanaka und Tanaka, 2007). An dieser Stelle soll nur auf die Häm- und Chlorophyll-Synthese näher eingegangen werden. Orte der Biosynthese in Pflanzen sind die Chloroplasten, wobei die letzten beiden Schritte der Häm-Synthese in Chloroplasten und Mitochondrien ablaufen (Cornah *et al.*, 2003). Die erste universelle Vorstufe aller Tetrapyrrole ist die 5-Aminolävulinsäure (Abbildung 13). In Pflanzen, Cyanobakterien und Algen wird sie aus Glutamat und in Bakterien, Pilzen, Säugern und Hefen durch eine Kondensierung von Glycin und Succinyl-Coenzym A synthetisiert. Zwei Moleküle 5-Aminolävulinsäure kondensieren zu Porphobilinogen, einem Pyrrol Molekül. Aus vier Porphobilinogen Molekülen entsteht ein lineares Tetrapyrrol, das

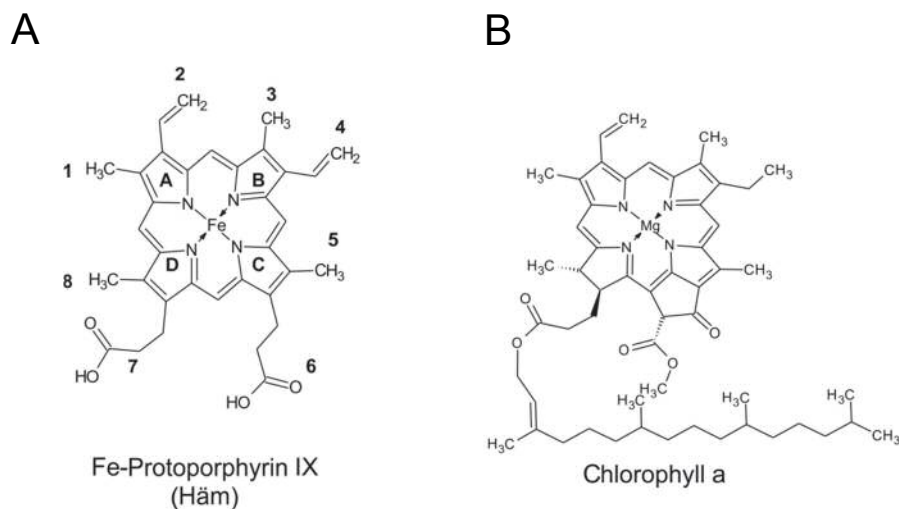


Abbildung 12: Strukturen von Häm (A) und Chlorophyll (B).

Die Grundstruktur der Makrozyklen stellen vier Pyrrolringe A-D dar. Die Substituenten der Ringe an den Positionen 1 bis 8 können variieren. Chlorophyll a besitzt beispielsweise einen langen Phytolrest an Position 7 sowie einen fünften Ring, der an Ring C anschließt.

1-Hydroxymethylbilan. Es folgt ein Ringschluss, wodurch aus 1-Hydroxymethylbilan ein zyklisches Tetrapyrrol, Uroporphyrinogen III, entsteht. Durch Decarboxylierungsreaktionen entsteht aus Uroporphyrinogen III Coproporphyrinogen III und daraus wiederum Protoporphyrinogen IX. Schließlich wird Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX oxidiert. Nach dieser Zwischenstufe spalten sich die Synthesewege für Häm und die Chlorophylle.

Durch Insertion eines Magnesium-Ions in den Tetrapyrrolring des Protoporphyrin IX entsteht Mg-Protoporphyrin IX. Dieses wird über fünf Zwischenstufen, welche die Synthese des fünften Rings (E-Ring) und des Phytolrestes einschließen, zu Chlorophyll a umgewandelt. Aus Chlorophyll a entsteht über den Chlorophyll-Zyklus Chlorophyll b. Die Synthese des Häms ist durch Einlagern eines Eisen-Ions in Protoporphyrin IX abgeschlossen.

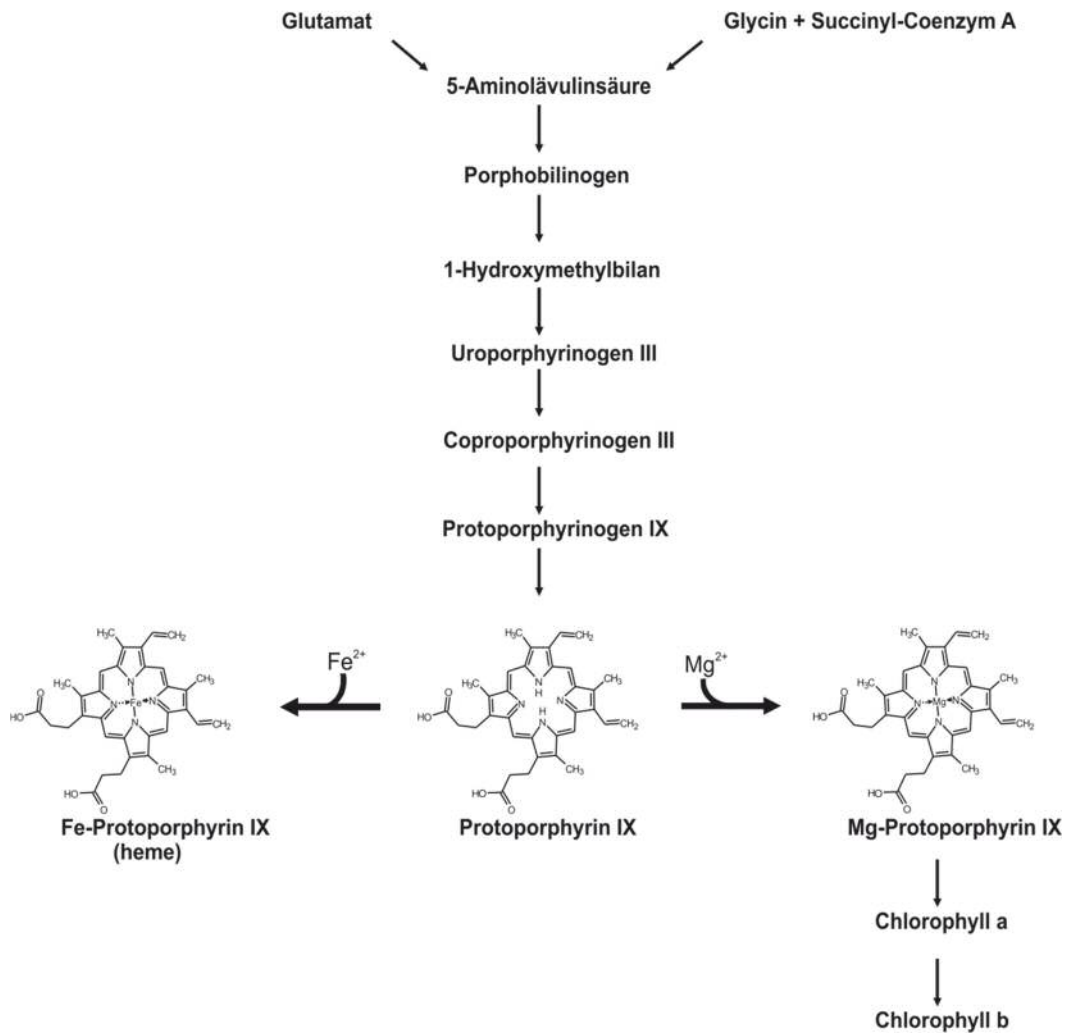


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Tetrapyrrol-Biosynthese.

Die Beschreibung der Reaktionen befindet sich im Text.

1.2.2.1 Absorptionsspektroskopie an zyklischen Tetrapyrrolen

Porphyrine besitzen ein ausgedehntes konjugiertes π -Elektronensystem, dessen Doppelbindungen ein aromatisches System bilden (Kaim, 1991). Sie stellen vierzählige Chelatliganden dar, die über die vier Stickstoffatome des Tetrapyrrolrings Metallionen koordinativ binden können. Als Folge des delokalisierten π -Elektronensystems zeigen die Porphyrin-Liganden und deren Metallkomplexe eine intensive Absorption im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Die Absorptionsbanden der Porphyrine entstehen durch Elektronenübergänge zwischen den Molekülorbitalen des Tetrapyrrols und können mit dem von Gouterman entwickelten 4-Orbital-Modell erklärt werden (Abbildung 14, Gouterman, 1963). Nach diesem Modell besitzt ein Tetrapyrrol zwei vollständig besetzte Molekülorbitale (b_1 und b_2 , HOMO, *highest occupied molecular orbital*) und zwei unbesetzte Orbitale (c_1 und c_2 , LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*). Daraus ergeben sich prinzipiell vier energiegleiche Elektronenübergänge ($b_1 \rightarrow c_1$, $b_1 \rightarrow c_2$, $b_2 \rightarrow c_1$, $b_2 \rightarrow c_2$). Nach Anregung eines Elektrons aus dem HOMO b_2 in das LUMO c_2 ändert sich die Symmetrie des Systems, was zur Energieerhöhung des b_2 -Orbitals führt. Übergänge aus dem b_2 -Orbital resultieren in niederenergetischen Absorptionsbanden (langwelliger Bereich des elektromagnetischen Spektrums), die im Absorptionsspektrum des Cyt b_6 der α - und β -Bande entsprechen und nach Gouterman als Q-Banden bezeichnet werden (Ab-

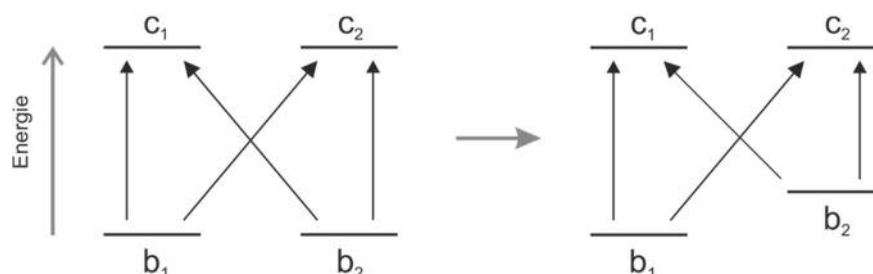


Abbildung 14: Energieniveaus der Molekülorbitale eines Porphyrins nach Gouterman.

Es existieren zwei entartete HOMO b_1 und b_2 , sowie zwei energiegleiche LUMO c_1 und c_2 . Theoretisch sind vier energiegleiche Elektronenübergänge möglich (schwarze Pfeile), jedoch kommt es nach Anregung eines Elektrons vom b_2 Orbital ins c_2 Orbital zu einer Energieerhöhung des b_2 Orbitals. Elektronenübergänge aus dem b_1 Orbital sind energiereich, während Elektronenübergänge aus dem b_2 Orbital energiearm sind.

bildung 6). Höherenergetische Absorptionsbanden sind auf Übergänge aus dem b_1 -Orbital zurückzuführen und werden als Soret- oder B-Banden bezeichnet. Soret-Banden liegen im nahen UV-Bereich, während die Q-Banden im VIS-Bereich von 500-600 nm vorkommen. Die Lage und Intensität der Soret-Bande wird durch die Substituenten des Tetrapyrrolrings, die axialen Liganden und den Redoxzustand des ligierten Zentralmetalls beeinflusst. Kommt es durch diese Veränderungen zur Abnahme der Energiedifferenz zwischen

den HOMOs und LUMOs, ist eine bathochrome Verschiebung (Rotverschiebung) der Soret-Bande zu beobachten. Nimmt die Energiedifferenz zu, so ist eine hypsochrome Verschiebung (Blauverschiebung) das Resultat. Sowohl die freien als auch die an das Apo-Protein koordinierten Porphyrine, zeigen typische Soret- und Q-Banden, die sich in ihren Absorptionsmaxima unterscheiden. Dadurch lassen sich Interaktionen zwischen Porphyrinen und Apo-Proteinen spektroskopisch nachweisen.

1.3 Ziele der Arbeit

Die Vielfalt und Komplexität der Proteinarchitektur wirft die Frage auf, wie aus einer Aminosäuresequenz die native dreidimensionale Struktur eines Proteins entsteht. Die Faltung und Assemblierung kofaktortragender integraler Membranproteine, und insbesondere TM b-Typ Cytochrome, ist bislang noch wenig verstanden. Am Modellprotein Cytochrom b_6 soll im Rahmen dieser Arbeit der Faltungsweg eines TM Cytochroms untersucht werden. Cytochrom b_6 besitzt einen einfachen Aufbau bestehend aus vier, über interhelikale *Loops* miteinander verbundenen, TM-Helices (A-D) und zwei nicht-kovalent gebundenen Häm-Kofaktoren. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit sollte auf der Funktion der *Loops* während der Assemblierung liegen. Interhelikale *Loops* können entscheidend die Assemblierung und Stabilität eines Membranproteins beeinflussen, in dem sie die Bewegungsfreiheit der Helices einschränken und dadurch spezifische intermolekulare Interaktionen fördern. Die beiden Kofaktoren des Cytochrom b_6 sind in der Häm-Bindespalte zwischen den zwei Cytochrom b_6 -Hälften lokalisiert. Es sollte untersucht werden, ob eine Verlängerung des *Loops*, der die beiden Hälften verbindet, die Assemblierung und Stabilität des Proteins *in vitro* beeinflusst. Dazu sollten durch Mutation des Cytochrom b_6 -Gens Glycine in den *Loop* inseriert, und die heterologe Expression in *E. coli* sowie die Reinigung der Cytochrom b_6 -Varianten etabliert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, ob die getrennten Cytochrom b_6 -Hälften mit Häm assemblieren können. Zu diesem Zweck sollten geeignete Bedingungen zur heterologen Expression und Reinigung der einzelnen Cytochrom b_6 -Hälften etabliert und die Bindung des Häms getestet werden. Zudem sollte diese Arbeit klären, ob das Holo-Cytochrom b_6 nur aus den vier TM-Helices und Häm gebildet werden kann. Nach der proteolytischen Spaltung der drei interhelikalen *Loops* sollte überprüft werden, ob die TM-Helices ohne eine kovalente Verbindung die Kofaktoren binden können. Außerdem sollte die Assemblierung des Holo-Cytochroms aus vier synthetisch hergestellten Peptiden, deren Sequenz den vier TM-Helices entspricht, getestet werden. Die Bindung der Kofaktoren an das Apo-Protein erfolgt über die Koordination des Eisen-Ions des Häms durch Histidine auf den Helices B und D. Mit Hilfe der Peptide soll herausgearbeitet werden, ob die Helices B und D für die Häm-Bindung ausreichen bzw. welche TM-Helices für die Bindung der Häme minimal notwendig sind. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte auf der Identifikation struktureller Merkmale des Häms, die die spezifische Bindung an das Apo-Protein gewährleisten, liegen. Bislang blieb die Frage, wie die spezifische Bindung des Häms an Apo-Cytochrom b_6 vermittelt und die Bindung strukturell ähnlicher natürlich vorkommender Porphyrine verhindert wird, ungeklärt. Es soll die Bindung von Protoporphyrin IX-Derivaten, die sich entweder im Zentral-

metall oder in den Ringsubstituenten des Porphyrinrings des Häms unterscheiden, an Apo-Cytochrom b_6 überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabellarisch zusammengefasst sind die verwendeten Geräte (Tabelle 1), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2), Bakterienstämme (Tabelle 4), Plasmide (Tabelle 5), Oligonukleotide (Tabelle 6), primäre (Tabelle 7) und sekundäre (Tabelle 8) Antikörper, Computerprogramme (Tabelle 9) sowie die Zusammensetzung der Puffer, Lösungen und Medien (Tabelle 3).

2.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Blotapparatur	Trans-Blot® SD Semi-Dry Mini Trans-Blot® Electro- phoretic Transfer Cell (Wet- Blot)	Bio-Rad, München
Brutschrank	B28	Binder, Tuttlingen
Detektion von Chemilumines- zenz	Stella	Raytest, Straubenhardt
Elektrophoresekammern	Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad, München
	Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, München
	PerfectBlue Gelsystem Mini S, M, L	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese-Netzgeräte	PowerPac Basic™	Bio-Rad, München
	PowerPac HC™	Bio-Rad, München
	peqPower 300 Volt	Peqlab, Erlangen
Dokumentationssystem für Agarosegele	Quantum-ST4 1100/26 MX	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Multitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Magnetrührer	MR Hei Standard	Heidolph, Schwabach

Fortsetzung Tabelle 1:

Gerät	Typ	Hersteller
Mikrowelle	MD 6459	Microstar
pH-Meter	pH 211 Microprocessor	Hanna instruments, Kehl
Photometer	Lambda 35 UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Polarimeter	Jasco J-815 CD spectrometer	Jasco, Gross-Umstadt
Speedvac	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler	TGradient Thermocycler 96	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad	USC500T	VWR, Ismaning
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson, Danbury, CT, USA
Vortex-Mixer	Reagenzglasschüttler	VWR, Ismaning
Wasserbad	W6	Medingen, Dresden
Zentrifugen	Avanti® J-26 XP	Beckmann Coulter, Krefeld
	Optima™ L Series Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
	Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
	5415R	Eppendorf, Hamburg
	5424	Eppendorf, Hamburg
	MLA-130	Beckmann Coulter, Krefeld
	JA-25.50	Beckmann Coulter, Krefeld
	JLA-16.250	Beckmann Coulter, Krefeld
	JA-25.15	Beckmann Coulter, Krefeld
	TLA 100	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifugenrotoren	TLA 120.2	Beckmann Coulter, Krefeld
	90 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Dialyseschlauch	Spectra/Por® Membrane	Spectrumlabs, Breda, Niederlande
Einmalspritzen	Omnifix® 1-10 ml	Braun, Melsungen
Gel-Blotting-Papier	Protean® XL Size	Bio-Rad, München
PVDF-Membran	Roti®-PVDF	Roth, Karlsruhe
Spritzenfilter	Rotilabo®-Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt und bei Bedarf durch Autoklavieren sterilisiert. Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Finnzymes (Espoo, Finnland), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), Gibco (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen.

2.1.3.1 Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 3: Eingesetzte Puffer, Lösungen und Medien.

Puffer	Zusammensetzung
Alkalische-Phosphatase Puffer	100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver in TBST-Puffer
Coomassie-Färbelösung	45% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,2% Coomassie R250
6 x DNA-Gelladepuffer	50% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol
DDM-Phosphatpuffer	10 mM Phosphatpuffer pH 8,0, 5 mM DDM
DDM-Puffer	50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM DDM
DDM-Waschpuffer	50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM DDM
Dialysepuffer	50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl
Elutionspuffer	10 mM Tris pH 4,5, 100 mM Phosphatpuffer, 2 mM SDS
Entfärber-Lösung	45% Ethanol, 10% Essigsäure

Fortsetzung Tabelle 3.

Puffer	Zusammensetzung
Ethidiumbromidlösung	1 µg/ml in 1 x TAE-Puffer
HEPES-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5, 10 mM EDTA
Imidazol-Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM DDM, 500 mM Imidazol
Laufpuffer	25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS
LB-Medium	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, ad 1 l dH ₂ O
5 x Protein-Gelladepuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 50% Glycerol, 500 mM β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS
<i>Semi-dry</i> Blotting-Puffer	20% Methanol, 25 mM Tris, 0,192 M Glycin
Solubilisierungspuffer	10 mM Tris pH 8,0, 100 mM Phosphatpuffer, 50 mM SDS
Tank-Blot Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS
50 x TAE Puffer	0,4 M Tris pH 8, 10 mM EDTA, 200 mM Essigsäure
TBST-Puffer	20 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween
Waschpuffer	10 mM Tris pH 8,0, 100 mM Phosphatpuffer, 2 mM SDS

2.1.4 *E. coli*-BakterienstämmeTabelle 4: Verwendete *E. coli*-Bakterienstämme und deren Genotyp.

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk, mk ⁺) Rif ^R <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdLSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3)	(Studier und Moffatt, 1986)
BL21 (DE3) [pLysS]	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdLSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3) pLysS (Cam ^R)	(Moffatt und Studier, 1987)
BL21 (DE3) [pLysE]	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdLSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3) pLysE (Cam ^R)	(Moffatt und Studier, 1987)
HMS174 (DE3) [pLysS]	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (rK ₁₂ ⁻ mK ₁₂ ⁻) (DE3) pLysS (Cam ^R , Rif ^R)	(Studier und Moffatt, 1986)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10(Tet ^r)] ^c	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)

2.1.5 Kulturmedien für *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurden entweder LB-Flüssigmedium oder LB-Agarplatten (15 g/l Agar-Agar) verwendet. Für die Herstellung von Selektivmedium wurden nach dem Autoklavieren die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Chloramphenicol (30 µg/ml) zum Medium bzw. zum Agar dazu gegeben. Die Flüssigkulturen wurden in einem Rundschtüttler bei 200 rpm und 37 °C, die Bakterien auf festem Medium in einem Brutschrank bei 37 °C, kultiviert.

2.1.6 Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Referenz
pRSET-His	Ampicillin	(Schoepfer, 1993)
pRSET-His[malEb ₆ spoI]	Ampicillin	(Prodöhl <i>et al.</i> , 2007)
pRSET-His[malEb ₆ spoIAB5GlyCD]	Ampicillin	diese Arbeit
pRSET-His[malEb ₆ spoIAB10GlyCD]	Ampicillin	diese Arbeit
pRSET-His[malEb ₆ spoIAB15GlyCD]	Ampicillin	diese Arbeit
pRSET-His[malE] mit Stoppcodon	Ampicillin	(Prodöhl, 2006)
pRSET-His[b ₆ spoIAB]	Ampicillin	(Prodöhl, 2006)
pRSET-His[b ₆ spoICD]	Ampicillin	(Prodöhl, 2006)

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Nr.	Bezeichnung	5' → 3' Sequenz
1	b ₆ AB5GlyloopCDfw	GGAGGTGGAGGTGGACGAGAATTGACTTGGGTTTCAGGC
2	b ₆ AB5GlyloopCDrev	TCCACCTCCACCTCCAGGTTTTTTAAACCCACCGGTAAG
3	b ₆ AB10GlyloopCDfw	GGTGGAGGTGGAGGTGGAGGAGGTGAGGTCGAGAAT-GACTTGGGTTACAGGC
4	b ₆ AB10GlyloopCDrev	ACCTCCACCTCCTCCACCTCCACCTCCACCAGGTTTTT-TAAACCCACCGGTAAG

Nr.	Bezeichnung	5' → 3' Sequenz
5	b ₆ AB15GlyloopCDfw	GGTGGAGGTGGAGGTGGAGGAGGTGGAGGTG- GAGGTGGAGGTGGACGAGAATTGACTTGGGTTACAGGC
6	b ₆ AB15GlyloopCDrev	TCCACCTCCACCTCCACCTCCACCTCCTCCACCTCCAC- CTCCACCAGGTTTTTTAAACCCACCGGTAAG
7	NTb ₆ spol SacI	GCAGACTAATTCGAGCTCGAACAAC
8	CTb ₆ spol-psbF-BamHI	CGCGGATCCCGTTGTAAACGACGGC
9	T7-Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG

2.1.8 Längen- und Größenstandards

Es wurden folgende Längen- und Größenstandards verwendet (Fermentas, St. Leon-Rot):

DNA: Gene Ruler™ 1 kb Ladder
 Gene Ruler™ 50 bp Ladder

Proteine: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (10-200 kDa)
 PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)

2.1.9 Antikörper

Tabelle 7: Eingesetzte primäre Antikörper.

Antikörper	gerichtet gegen	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Anti-Cyt b ₆ N-Terminus	SKVYDWFEERLEIQA (polyklonal, Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:10000
Anti-Cyt b ₆ C-Terminus	EIRKQGIGSPL (polyklonal, Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:10000
His-Tag® Antibody HRP Conjugate Kit	His ₅ (monoklonal)	Novagen, Darmstadt	1:1000

Tabelle 8: Eingesetzte sekundäre Antikörper.

Antikörper	Konjugat	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Anti-Rabbit IgG	HRP	Sigma-Aldrich	1:10000
Anti-Rabbit IgG	AP	Sigma-Aldrich	1:30000

2.1.10 Computerprogramme

Tabelle 9: Verwendete Computerprogramme.

Anwendung	Programm
Textverarbeitung	Microsoft Word 2010
	Endnote X2
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0.1
	CorelDRAW X6
Diagramme und Tabellen	Origin 6.0
	Microsoft Excel 2010
DNA-/Proteinanalysen	Genamics Expression
Analyse der Absorptionsspektren	PeakFit 4.12
Vorhersage der TM-Bereiche von Cyt b ₆	TMHMM 2.0

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid DNA

Für die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde das *High-Speed Plasmid Mini Kit* (AveGene, Taipei City, Taiwan) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration und -Reinheit wurden mittels UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entspricht die Absorption $A_{260} = 1$ einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/µl. Die Konzentration wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung wurde der Quotient aus A_{260}/A_{280} gebildet. Eine reine DNA-Lösung hat einen Quotienten von 1,8. Ist dieser Wert höher, liegt eine Verunreinigung mit RNA vor. Bei niedrigeren Werten ist die Probe mit Proteinen kontaminiert.

2.2.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von Plasmiden und PCR Produkten wurden Restriktionsenzyme der Firmen New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) bzw. Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,5 µg DNA in einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt und nach Herstellerangaben verdaut. Präparative Restriktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, wobei 1 µg DNA eingesetzt wurde. Die restringierte DNA wurde im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Abhängig von der Länge der zu untersuchenden DNA wurden 0,7-2%ige Agarosegele hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Hitze gelöst, anschließend luftblasenfrei in die entsprechende Kammer gegossen und der

Probenkamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit sechsfachem DNA Gelladepuffer gemischt und nach dem Aushärten auf das mit TAE-Puffer überschichtete Gel geladen. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung 60-90 min bei 100-130 V. Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung 10-20 min angefärbt und unter UV-Licht im Geldokumentationssystem „Quantum“ analysiert.

2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Detektion selektiv aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpells auf einem UV-Leuchttisch herausgeschnitten. Die Isolation der DNA erfolgte mit dem Geextraktionskit *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* (Avegene, Taipei City, Taiwan) nach Herstellerangaben, wobei die Elution der DNA mit 20-30 µl autoklaviertem H₂O erfolgte.

2.2.1.6 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Verhältnis von Vektor zu *Insert* betrug 1:3 bzw. 1:5. Die DNA-Fragmente wurden bei 16 °C zwei bis vier Stunden ligiert.

2.2.1.7 Zielgerichtete Mutagenese durch *Overlap Extension PCR*

Die *Overlap Extension* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine gentechnische Methode, die genutzt wird um Gene zielgerichtet zu mutieren (Horton *et al.*, 1989). In zwei Polymerase-Kettenreaktionen werden durch Primer, welche die gewünschte Mutation enthalten, zwei sich ergänzende Teile des Zielgens mutiert (Abbildung 15). Die resultierenden PCR-Produkte überlappen im Bereich der eingefügten Mutation. Durch eine dritte PCR, in der das 3'-Ende des einen Fragments als Primer für die Synthese des anderen, dient werden die Fragmente verbunden. Eine mögliche genetische Veränderung ist die Insertion von Nukleotiden in ein Gen. In dieser Arbeit wurde die *Overlap Extension* PCR verwendet um Codone, die für Glycin kodieren, in die Wildtyp-Sequenz des Fusionsgens *malE-cyt b₆* einzufügen. Es wurden Primer entworfen, die am 5'-Ende die Codone für die Glycine enthalten (P2 und P3 in Abbildung 15). Das 3'-Ende ist komplementär zur *cyt b₆* Sequenz vor bzw. nach der Insertionsstelle Prolin 523 (Primersequenzen siehe Tabelle 6, Nr. 1-6). Des Weiteren wurden Primer verwendet, die komplementär zum N- bzw. C-Terminus von *cyt b₆* sind (P1, P4 in Abbildung 15, Primersequenzen Tabelle 6, Nr. 7, 8).

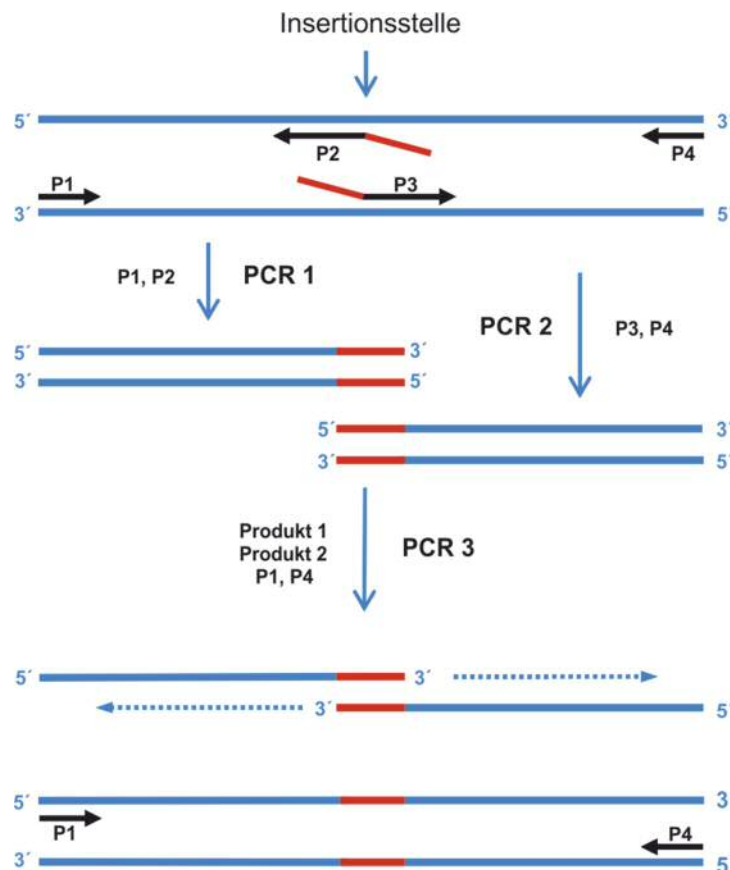


Abbildung 15: Schema der *Overlap Extension* PCR.

Die *Overlap Extension* PCR wurde angewandt um Glycine in das *cyt b*₆-Gen einzufügen. In blau ist die *cyt b*₆ DNA-Sequenz, in schwarz die zu *cyt b*₆ komplementäre Sequenz der Primer 1-4 und in Rot die Glycin-Sequenz dargestellt. Das 5'-Ende der Primer P2 und P3 enthält die Sequenz für die Glycine, die 3'-Enden sind komplementär zur *cyt b*₆-Sequenz vor bzw. nach der Insertionsstelle (P523). Das Produkt aus PCR 1 besteht aus der *cyt b*₆-Sequenz vor der Insertionsstelle verlängert um die Glycin-Sequenz. Analog dazu besteht das Produkt aus PCR 2 aus der Glycin-Sequenz und der *cyt b*₆-Sequenz nach der Insertionsstelle. In der dritten PCR wurden die Amplifikate aus den PCR-Reaktionen 1 und 2 fusioniert. Die Amplifikate hybridisieren im Bereich der Glycine und werden an ihrem 3'-Ende verlängert. Das endgültige Konstrukt enthält an der Insertionsstelle die gewünschte Sequenz für die Glycine und wird mit den Primern P1 und P4 vervielfältigt.

PCR-Reaktionen 1 bzw. 2 wurden, wie in Tabelle 10 beschrieben, in einem Endvolumen von 50 µl auf Eis zusammen pipettiert.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Denaturierung	1x	95 °C	3 min
Denaturierung	35 x	95 °C	30 s
Hybridisierung		60 °C	30 s
Elongation		72 °C	60 s
Elongation	1 x	72 °C	10 min

Tabelle 10: Zusammensetzung der ersten und zweiten Reaktion der *Overlap Extension* PCR.

Reaktionsansatz 1		Reaktionsansatz 2	
10 x Polymerase-Puffer	1 x	10 x Polymerase-Puffer	1 x
dNTP-Mix [2mM]	200 µM	dNTP-Mix [2mM]	200 µM
<i>Forward</i> -Primer [100 pmol/µl]		<i>Forward</i> -Primer [100 pmol/µl]	
(Tabelle 6, Nr. 7)	0,25 µM	(Tabelle 6, Nr. 1, 3 oder 5)	0,25 µM
<i>Reverse</i> -Primer [100 pmol/µl]		<i>Reverse</i> -Primer [100 pmol/µl]	
(Tabelle 6, Nr. 2, 4 oder 6)	0,25 µM	(Tabelle 6, Nr. 8)	0,25 µM
pRSET-His[malEb ₆ spol]	50 ng	pRSET-His[malEb ₆ spol]	50 ng
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	2,5 U	<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	2,5 U
H ₂ O steril	ad 50 µl	H ₂ O steril	ad 50 µl

Nach der Reaktion wurde das Restriktionsenzym *DpnI* zum Reaktionsansatz dazu gegeben und die Matrizen-DNA nach Herstellerangaben verdaut. Im Anschluss wurden die PCR-Amplifikate mit dem *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* (Avegene, Taipei City, Taiwan) nach Herstellerangaben gereinigt und in 20 µl dH₂O eluiert. Parallel dazu wurde ein Aliquot aus den PCR-Reaktionen auf ein Agarosegel geladen, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. In einer dritten PCR-Reaktion wurden diese Amplifikate fusioniert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammensetzung der dritten Reaktion der *Overlap Extension* PCR.

Reaktionsansatz 3	
10 x Polymerase-Puffer	1 x
dNTP-Mix [2 mM]	200 µM
<i>Forward</i> -Primer (Tabelle 6, Nr. 7) [100 pmol/µl]	0,25 µM
<i>Reverse</i> -Primer (Tabelle 6, Nr. 8) [100 pmol/µl]	0,25 µM
PCR-Amplifikat 1	2 µl
PCR-Amplifikat 2	2 µl
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	2,5 U
H ₂ O steril	ad 50 µl

Folgendes PCR-Programm wurde für die dritte PCR verwendet:

Denaturierung	1x	95 °C	3 min
Denaturierung	35 x	95 °C	30 s
Hybridisierung		60 °C	30 s
Elongation		72 °C	90 s
Elongation	1 x	72 °C	10 min

Der Reaktionsansatz der dritten PCR wurde auf ein Agarosegel geladen und das Amplifikat isoliert. Anschließend wurde das PCR-Produkt restringiert und in den Vektor pRSET-His[malEb₆spol] ligiert.

2.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG (Martinsried) durchgeführt.

2.2.1.9 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Chung *et al.* (Chung *et al.*, 1989). Die zu transformierenden Zellen wurden mit 50-500 ng DNA versetzt und 20 min auf Eis belassen. Nach dem zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt. Der Zugabe von 1 ml LB-Medium folgte eine einstündige Inkubation der Zellen bei 37 °C und 180 rpm. Zur Selektion transformierter Zellen wurden 200-1000 µl der *E. coli*-Zellsuspension auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Heterologe Expression in *E. coli*

Um rekombinante Proteine in großen Mengen zu gewinnen, wurden diese heterolog in *E. coli* exprimiert. Zunächst wurden *E. coli*-Zellen mit einem Expressionsplasmid transformiert, auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden für die Vorkultur 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wurde mit der Vorkultur so angeimpft, dass die OD₆₀₀ etwa 0,2 betrug. Anschließend wurde die Flüssigkultur bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 inkubiert. Die Induktion der vierstündigen Expression erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Die Zellen wurden geerntet (15 min, 6000 x g, 4 °C), in HEPES-Puffer suspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall

E. coli-Zellen, die rekombinantes Protein enthielten, wurden mittels Ultraschall aufgebrochen. Die Beschallung erfolgte in vier bis fünf Intervallen von 4 min mit der Makrospitze bei definierter Geräteeinstellung (Duty Cycle 50%, Output Control 8). Die Einschlusskörperchen wurden nach dem Aufbruch durch Zentrifugation (15 min, 12000 x g, 4 °C) sedimentiert, in HEPES-Puffer suspendiert und bis zur Reinigung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.3 Solubilisierung von Membranproteinen aus Einschlusskörperchen

Die Solubilisierung des Cyt b₆ aus Einschlusskörperchen wurde von einem früheren Doktoranden der AG Schneider etabliert und das Protokoll in dieser Arbeit auch für Cyt b₆-Varianten verwendet (Prodöhl *et al.*, 2007). Die in HEPES-Puffer gelagerten Einschlusskörperchen wurden zentrifugiert (3 min, 20500 x g, 4 °C) und anschließend im Solubilisierungspuffer aufgenommen. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 90 °C in einem Wasserbad unter regelmäßigem Rühren der Probe. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 17500 x g, 4 °C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.2.4 Ni²⁺-Affinitätschromatographie und *in vitro* Rückfaltung

Die Reinigung des in SDS solubilisierten Cyt b₆ Proteins bzw. der Cyt b₆-Varianten erfolgte über den angefügten deca-Histidin-Tag mittels Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Agarose der Firma Qiagen (Hilden). Die Reinigung des Cyt b₆ Proteins wurde bereits etabliert (Prodöhl *et al.*, 2007).

Vorbereitung der heterolog exprimierten Proteine

Um die SDS-Konzentration der Proteinlösung zu reduzieren, wurde diese durch schrittweise Zugabe von KCl auf eine Endkonzentration von 5 mM gesenkt. Die KDS-Fällung erfolgte durch eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Das präzipitierte KDS wurde durch Zentrifugation (10 min, 17500 x g, 4 °C) entfernt.

Vorbereitung der zellfrei synthetisierten Proteine

Cyt b₆ und die beiden Cyt b₆-Hälften wurden ohne das fusionierte Maltose-Bindeprotein (MBP) zellfrei im CECF (*continuous exchange cell-free system*)-Verfahren von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von XXX (Institut für Biophysik und Biochemie, Universität Frankfurt a.M.) hergestellt und die präzipitierten Proteine als Suspension verschickt (Schwarz *et al.*, 2007). Die Proteine wurden vor der Reinigung pelletiert und in Solubilisierungspuffer aufgenommen.

Vorbereitung des Säulenmaterials

Die Ni-NTA-Agarose wurde drei Mal mit zwei Säulenvolumen Wasser gewaschen und ebenfalls drei Mal mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert.

Reinigung

Die Proteinprobe und das Säulenmaterial wurden zusammengegeben und 90 min auf einem Taumelschüttler auf Eis geschwenkt. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose in eine Plastiksäule gegossen und fünf Mal mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde mit zwei Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert und mittels Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 20, Ausschlussgröße 50 kDa, Sartorius, Göttingen) fünf- bis zehnfach konzentriert.

*Rückfaltung der Membranproteine *in vitro**

Da die Rekonstitution von Cyt b₆ sowie den Cyt b₆-Varianten in dem nichtionischen Detergenz Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) erfolgt, muss das anionische Detergenz SDS nach der Reinigung vollständig gegen DDM ausgetauscht werden. Zunächst wurde 1 bzw. 5 mM

DDM zum eluierten Protein gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das restliche SDS zu entfernen, wurde anschließend 5 mM KCl hinzu gegeben und die Proteinlösung 15 min auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation (10 min, 17500 x g, 4 °C) wurde das gefällte KDS entfernt und die Proteinlösung über Nacht gegen Dialysepuffer dialysiert.

2.2.2.5 Ni²⁺-Affinitätschromatographie nach Häm- bzw. Chlorophyll-Zugabe

Gereinigtes Cyt b₆ (2.2.2.4) wurde mit einem Überschuss an Häm oder Chlorophyll a (Herstellung der Porphyrinlösungen siehe 2.2.2.13) gemischt und anschließend affinitätschromatographisch gereinigt, um ungebundenes Porphyrin zu entfernen. Die Reinigung erfolgte wie unter 2.2.2.4 beschrieben, wurde jedoch geringfügig verändert. Zum einen wurde das Säulenmaterial mit DDM-Waschpuffer äquilibriert und das gereinigte Protein dazu gegeben. Zum anderen erfolgte die Elution mit Imidazol-Elutionspuffer. Um das Imidazol für weitere spektroskopische Untersuchungen zu entfernen, folgte direkt eine dreistündige Dialyse gegen Dialysepuffer mit dreifachem Pufferwechsel.

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde das *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce, Reckford, IL, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.7 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure

Trichloressigsäure wurde in dieser Arbeit verwendet um gering konzentrierte Proteine auszufällen. Die Lösung mit dem zu fällenden Protein wurde mit ½ Volumen eiskalter 50%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 17500 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zwei Mal mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Die Probe wurde abermals zentrifugiert (15 min, 17500 x g, 4 °C), der Überstand vollständig entfernt und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Für die SDS-PAGE wurde das Pellet in 20 µl zweifachem Protein-Gelladepuffer aufgenommen. Eine Gelbfärbung der Probe ist auf TCA-Rückstände zurückzuführen und wurde durch Zugabe weniger Körnchen Tris neutralisiert.

2.2.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts in einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli getrennt (Laemmli, 1970). Die verwendeten

Gele (8,5 cm x 7,5 cm x 1,0 mm) enthielten 14 bzw. 18% Acrylamid und setzten sich wie in Tabelle 12 beschrieben zusammen. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der jeweilige Probenkamm eingesetzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit fünffachem Protein-Gelladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel geladen. Proben der zellfrei exprimierten Cytochrome wurden nicht erhitzt. Der Lauf erfolgte in Laufpuffer, wobei zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel eine Spannung von 100 V angelegt wurde. Sobald die Proben das Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Der Lauf wurde beendet, sobald die Laufront den unteren Rand des Gels erreichte.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Acrylamidgele.

Trenngel			Sammelgel	
	14% Acrylamid	18% Acrylamid	6% Acrylamid	
dH ₂ O	4 ml	3 ml	dH ₂ O	6 ml
Acrylamid 40%	3,5 ml	4,5 ml	Acrylamid 40%	1,5 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	Sammelgelpuffer	2,5 ml
APS (10%)	25 µl	25 µl	APS (10%)	25 µl
TEMED	40 µl	40 µl	TEMED	40 µl

2.2.2.9 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen in Acrylamid-Gelen erfolgte mit einer Coomassie-Färbelösung. Dazu wurden die Gele zunächst 5 min in dH₂O gewaschen um das überschüssige SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel 20-60 min in einer Coomassie-Färbelösung auf einem Taumelschüttler bei RT geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte in der Entfärber-Lösung bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war.

2.2.2.10 Semi-dry Western-Blot

Mit dem *Semi-dry* Verfahren wurden aufgetrennte Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Roti® PVDF Membran (Roth, Karlsruhe) übertragen. Die Membran wurde in Methanol aktiviert und anschließend in *Semi-dry* Blotting-Puffer geschwenkt. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben (BioRad, München) aufgebaut. Die Dauer des Transfers betrug 20 min bei 20 V.

2.2.2.11 Western-Blot mit dem Tank-Blot-System

Mit Hilfe des Tank-Blot Verfahrens wurden Proteine aus einem Acrylamid-Gel auf eine PVDF Membran übertragen. Hierzu wurde die Membran ebenfalls mit Methanol aktiviert und anschließend in Tank-Blot Puffer geschwenkt. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben (BioRad, München) aufgebaut und der Transfer erfolgte 60 min bei 100 V und 4 °C.

2.2.2.12 Immunodetektion von Proteinen

Um unspezifische Antikörper Bindestellen zu sättigen, wurde die PVDF Membran nach dem Blotten für mindestens 1 h in einer Blockierungslösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte à 10 min mit TBST-Puffer und eine einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:10000 in TBST-Puffer). Im Anschluss wurden die Waschschrte wiederholt, gefolgt von einer einstündigen Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper. Die Membran wurde mit TBST-Puffer gewaschen, bevor detektiert werden konnte. War an den sekundären Antikörper die Meerrettichperoxidase gekoppelt, erfolgte die Proteindetektion mit dem Pierce *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA) nach Herstellerangaben. Alternativ wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, an den die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. In diesem Fall wurde die Membran vor der Entwicklung 10 min im Alkalische-Phosphatase Puffer äquilibriert, und die Proteine nach Angaben des Herstellers mit NBT/BCIP (AppliChem, Darmstadt) detektiert.

2.2.2.13 Rekonstitution der Cytochrome

Herstellung einer Hämlösung

Zur Untersuchung der Assemblierung von Cyt b_6 und den Cyt b_6 -Varianten wurde zunächst eine Hämlösung hergestellt. Dazu wurde eine Spatelspitze Fe(III)Protoporphyrin IX chlorid (Hemin, Sigma-Aldrich, München) zu 250 μ l 50%igem Ethanol gegeben und durch Zugabe von 10 μ l einer 0,1 M NaOH-Lösung gelöst. Die Lösung wurde mit DDM-Puffer dreifach verdünnt und filtriert (Spritzenfilter 0,22 μ m, Roth, Karlsruhe). Die Häm-Konzentration wurde anhand des Extinktionskoeffizienten 56 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 385 nm spektroskopisch bestimmt (Ozols und Strittmatter, 1964).

Herstellung von Porphyrinlösungen

Um die Bindung verschiedener Protoporphyrin IX-Derivate an Cyt b_6 zu untersuchen, wurden 5 mM Stammlösungen der einzelnen Porphyrine (Fe(III)Protoporphyrin IX dimethylesterchlorid, Fe(III)Deuteroporphyrin IX chlorid, Mn(III)Protoporphyrin IX chlorid, Mg-Protoporphyrin IX dinatriumsalz, Zn-Protoporphyrin IX, Protoporphyrin IX dinatriumsalz) bzw. Chlorophyll a in DMSO angesetzt und bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde die Stammlösung auf 0,5 mM in DDM-Puffer verdünnt.

Die Bindung der Protoporphyrin IX-Derivate, der synthetisch hergestellten Cyt b_6 TM-Peptide (2.2.2.18) oder Häm wurde spektroskopisch untersucht. Das Protein wurde im molaren Verhältnis von 1:2 mit den gelösten Porphyrinen gemischt und Absorptionsspektren im Bereich von 350-700 nm mit einer Spaltbreite von 0,5 nm aufgenommen. Es wurde unter luftoxidierenden Bedingungen und nach Reduktion des Häms durch Zugabe von 5 mM Natriumdithionit gemessen.

2.2.2.14 Titration von Porphyrinen mit Cytochromen

Um die Bindungsverhältnisse der einzelnen Porphyrine an Cyt b_6 bzw. an die Cyt b_6 -Varianten zu bestimmen, wurden Titrations durchgeführt. In individuellen Ansätzen wurden, bei gleich bleibender Konzentration an Porphyrin (5 μ M), steigende Mengen an Protein zugegeben und Absorptionsspektren im Bereich von 350-700 nm aufgenommen. Die Proteinmenge wurde solange erhöht, bis das Absorptionsmaximum der Soret-Bande konstant blieb. Um das Porphyrin-Cytochrom-Bindungsverhältnis graphisch zu bestimmen, wurde die relative Änderung des Maximums der Soret-Bande im Vergleich zum Wert des Maximums ohne Protein bestimmt und gegen das Protein-zu-Porphyrin-Verhältnis aufgetragen. Am Knick der Sättigungskurve wurde das Protein-zu-Porphyrin-Verhältnis abgelesen.

2.2.2.15 SDS-Titration

Zur Untersuchung der Stabilität von Cyt b_6 und der verschiedenen Cyt b_6 -Varianten wurde in individuellen Ansätzen zum rekonstituierten Cytochrom (2.2.2.13) zunehmende Mengen an SDS hinzugegeben. Die Molfraktion SDS wurde dabei von 0 auf 0,98 erhöht und von jedem Titrationsschritt ein Absorptionsspektrum von 350-700 nm unter luftoxidierenden Bedingungen und nach Reduktion mit 5 mM Natriumdithionit aufgenommen. Für die Auswertung wurde bei jeder SDS-Konzentration der Quotient aus dem Maximum der Soret-

Bande mit und ohne Cytochrom berechnet und gegen die SDS-Konzentration aufgetragen.

2.2.2.16 Proteolytischer Verdau von Cytochrom b₆

Rekonstituiertes Cyt b₆ (2.2.2.5) wurde einem proteolytischen Verdau mit Proteinase K (Serva, Heidelberg) unterzogen. Es wurde eine Proteinase K-Stammlösung nach Herstellerangaben hergestellt und für den Verdau verwendet. Dabei wurde pro Milligramm rekonstituiertem Cyt b₆ 0,02 mg Proteinase K hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten, wurden Aliquots entnommen und der Verdau durch Zugabe von 5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) gestoppt. Anschließend wurden Absorptionsspektren im Bereich von 350-700 nm aufgenommen und die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zur weiteren Analyse wurden die Proteine mit Coomassie gefärbt bzw. immunologisch detektiert.

2.2.2.17 Präparative Gelfiltration

Die nach dem Proteinase K-Verdau entstandenen Cyt b₆-Fragmente wurden in einer Gelfiltration ihrer Größe nach getrennt. Zu diesem Zweck wurde eine „Superose™ 12 10/300 GL“-Säule (GE Healthcare) eingesetzt. Der Trennbereich der Säule liegt zwischen einer molekularen Masse von $1 \cdot 10^3$ – $3 \cdot 10^5$ Da. Die Säule wurde mit DDM-Waschpuffer nach Herstellerangaben äquilibriert, der ebenfalls als Laufpuffer verwendet wurde. Für den Chromatographie-Lauf wurde das Protein in einem Volumen von 0,5 ml auf die Säule geladen.

2.2.2.18 Herstellung einer Peptidlösung

Peptide, die den vier TM-Helices von Cyt b₆ entsprechen (Tabelle 13), wurden von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg) synthetisiert. Es wurden Stammlösungen der einzelnen Peptide in 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) angesetzt und zur spektroskopischen Konzentrationsbestimmung über die Absorption bei 280 nm in DDM-Phosphatpuffer verdünnt. Für die Durchführung der Experimente wurde die benötigte Menge aus der Stammlösung entnommen, in ein Reaktionsgefäß gegeben und unter einem schwachen Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde direkt DDM-Phosphatpuffer auf den getrockneten Peptidfilm gegeben und bei 3 °C und 1400 rpm 3,5 h inkubiert. Für die absorptionsspektroskopische Untersuchung der Häm-Bindung

betrug die Endkonzentration der Peptide 20 μM (2.2.2.13). Für Untersuchungen mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie betrug die Endkonzentration 50 μM .

Tabelle 13: Sequenzen der synthetisierten Cyt b_6 Peptide.

Die TM-Bereiche sind fett hervorgehoben.

Peptid	Sequenz
Transmembranhelix A	KKVNIFY CLGGITLTCFLVQVATGF AMTFYK
Transmembranhelix B	GWLIRSVHRWS ASMMVLMMILHVFRVYLTGG FKK
Transmembranhelix C	KKGRELT TWVTGVVLGVLTASFGVTG YSK
Transmembranhelix D	TRFYSLHTFVL PLLTAVFMLMHFLM TRK

2.2.2.19 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur der gelösten Peptide wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Peptidproben wurden wie unter 2.2.2.18 beschrieben vorbereitet, wobei die Peptidkonzentration 50 μM betrug. Für die Messung wurden Hellma Präzisions Küvetten aus Quarzglas-SUPRASIL[®] der Größe 10x1 mm verwendet. Es wurden jeweils drei Spektren aufgenommen, gemittelt und das Pufferspektrum subtrahiert. Die Messparameter sind in (Tabelle 14) zusammengefasst.

Tabelle 14: Messparameter der CD-Spektroskopie.

Messparameter	Auswahl
Spektrum	190-260 nm
Messdatenabstand	1 nm
Empfindlichkeit	Standard
Integrationszeit	1 sec
Bandbreite	1 nm
Scangeschwindigkeit	100 nm/min

Die mittlere molare Elliptizität $[\theta]_{\lambda}$ wurde aus dem erhaltenen CD-Signal wie folgt ermittelt:

$$[\theta]_{\lambda} = 0,1 \frac{\theta_{\lambda}}{c \cdot d \cdot n} \left(\frac{mdeg}{cm \cdot M} \right)$$

(Formel 1)

θ_{λ} ist die gemessene Elliptizität in Grad, c die Proteinkonzentration in mol/l, d die Pfadlänge in cm und n die Anzahl der Aminosäuren im Peptid. Für die Bestimmung des α -helikalen Anteils wurde die gemessene Elliptizität bei 222 nm (θ_{222}) in (Formel 1) eingesetzt. Die hierdurch berechnete mittlere molare Elliptizität bei 222 nm ($[\theta]_{222}$) wurde in Relation zum Referenzwert gesetzt und dadurch der α -helikale Anteil ermittelt. Als Referenzwert für einen 100%igen Anteil an α -Helix diene $[\theta]_{222} = -32000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ (Pace, 1989, Mennenga, 2007).

3 Ergebnisse

3.1 Das Modellprotein Cytochrom b_6 zur Untersuchung kofaktor-tragender Membranproteine

Das TM-Protein Cyt b_6 aus *Spinacia oleracea* L. ist ein geeignetes System für die Untersuchung struktureller Merkmale, die Einfluss auf die Assemblierung und Kofaktor-Bindung TM Cytochrome haben (Dreher, 2009). Einen großen Vorteil stellt der einfache Aufbau des Proteins dar. Cyt b_6 besteht aus vier TM-Helices (A-D), die über vier konservierte Histidine zwei Häme nicht-kovalent binden. Ein drittes Häm (Häm c_n) wird von einem Cystein über eine Thioetherbindung kovalent gebunden. Dieses ist jedoch für die Assemblierung des Proteins *in vitro* nicht essentiell. Absorptionsspektren der mit Häm rekonstituierten Cyt b_6 C35A-Mutante, die Häm c_n nicht mehr binden kann, zeigten im Vergleich zum wild-typischen Cyt b_6 identische Absorptionsmaxima (Dreher *et al.*, 2008). Der Einbau der nicht-kovalent gebundenen Häme in das Apo-Cyt b_6 dient als Nachweis für die erfolgreiche Rückfaltung und Rekonstitution des Proteins. Die Bindung der Häme wird durch spezifische Absorptionsbanden belegt. Um ausschließlich den Einbau der nicht-kovalent gebundenen Kofaktoren verfolgen zu können, wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Assemblierungsversuche die Cyt b_6 C35A-Mutante eingesetzt. Absorption des kovalent gebundenen Häms c_n konnte dadurch ausgeschlossen werden. Da sich die Expression von wildtypischem Cyt b_6 in *E. coli* als erfolglos herausstellte, ist für die heterologe Expression des Proteins eine Fusionierung an das wasserlösliche Maltose-Bindeprotein (MBP) notwendig (Dreher *et al.*, 2007, Kroliczewski *et al.*, 2005, Kroliczewski und Szczepaniak, 2002). Für eine affinitätschromatographische Reinigung wurde ein N-terminaler deca-Histidin-Tag angefügt. Weder MBP noch der Histidin-Tag beeinflussen die Assemblierung des Cyt b_6 nicht (Dreher *et al.*, 2008). Zur Vereinfachung wird im Folgenden das chimäre Fusionsprotein MBP-Cyt b_6 C35A je nach Kontext als Apo-Cyt b_6 bzw. Cyt b_6 bezeichnet.

3.1.1 Expression, Reinigung und Rekonstitution von Cytochrom b_6

Apo-Cyt b_6 wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die Expression in einem Coomassie-gefärbten Acrylamid-Gel überprüft (Abbildung 16). Vor Induktion der Expression mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) ist in der Probe des Gesamtzellextrakts keine Ban-

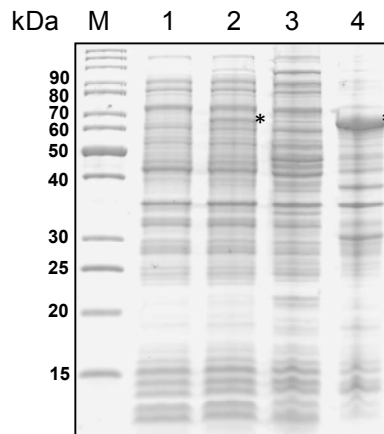


Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Apo-Cyt b_6 Expression in *E. coli* BL21(DE3).

Proben des Gesamtzellextraktes und der Fraktionen nach Aufbruch der Zellen mittels Ultraschall wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spur 1: Gesamtzellextrakt vor Induktion der Expression, Spur 2: Gesamtzellextrakt nach vierstündiger Expression, Spur 3: lösliche Fraktion und Spur 4: Einschlusskörperchen. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“. Der Stern in Spur 2 und 4 markiert das exprimierte Apo-Cyt b_6 mit einem berechneten Molekulargewicht von 69,3 kDa.

de bei etwa 69,3 kDa, die dem erwarteten Molekulargewicht von Apo-Cyt b_6 entsprechen würde, zu sehen (Abbildung 16, Spur 1). Nach vierstündiger Expression ist im Gesamtzellextrakt eine deutliche Bande bei etwa 70 kDa sichtbar, die auf eine erfolgreiche Expression des Apo-Cyt b_6 hinweist (Abbildung 16, Spur 2). Im Anschluss an die Expression wurden die Apo-Cyt b_6 -exprimierenden *E. coli* Zellen mittels Ultraschall aufgebrochen und die Fraktion der Einschlusskörperchen durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen und Membranen getrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-gefärbt (Abbildung 16, Spuren 3 und 4). In der Fraktion der Einschlusskörperchen ist eine deutliche Bande bei etwa 70 kDa zu sehen, die dem berechneten Molekulargewicht des Apo-Cyt b_6 entspricht (Abbildung 16, Spur 4). In der Probe der löslichen Proteine und Membranen ist nur eine schwache Bande auf der Höhe von 70 kDa zu sehen (Abbildung 16, Spur 3). Das exprimierte Apo-Cyt b_6 reicherte sich hauptsächlich in Einschlusskörperchen im Zytoplasma der *E. coli* Zelle an, in denen es denaturiert vorlag. Das Protein wurde durch einen SDS-haltigen Puffer (50 mM SDS) aus den Einschlusskörperchen solubilisiert und die SDS-Konzentration anschließend auf 5 mM reduziert, sodass eine affinitätschromatographische Reinigung mittels Ni-NTA möglich war. Proben der einzelnen Reinigungsschritte wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt (Abbildung 17). Im Durchfluss sind die Proteine zu sehen, die nicht an die Ni-NTA gebunden haben. Bei 70 kDa ist keine dominante Bande, die ungebundenem Apo-Cyt b_6 entsprechen würde, zu sehen

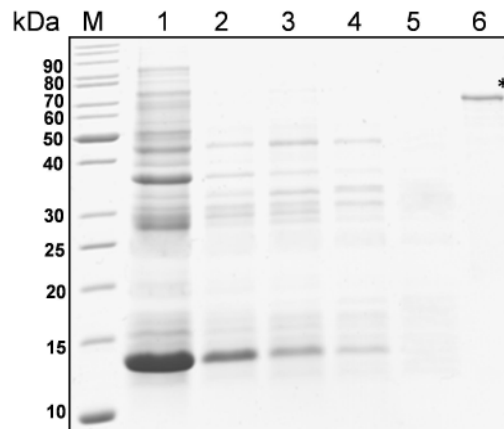


Abbildung 17: Elektrophoretische Analyse der Apo-Cyt b_6 Reinigung.

Fractionen der affinitätschromatographischen Reinigung von Apo-Cyt b_6 mittels Ni-NTA wurden in einem 14%igen SDS-Gel getrennt und Coomassie-gefärbt. Spur 1: Durchfluss, Spur 2: Waschfraktion 1, Spur 3: Waschfraktion 2, Spur 4: Waschfraktion 3, Spur 5: Waschfraktion 4, Spur 6: Elutionsfraktion, M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“. Der Stern in Spur 6 markiert das gereinigte Apo-Cyt b_6 mit einem berechneten Molekulargewicht von 69,3 kDa.

(Abbildung 17, Spur 1). Die Waschfraktionen zeigen ebenfalls keine Bande bei 70 kDa, sondern nur Proteine, die unspezifisch mit dem Säulenmaterial assoziiert waren und durch den Waschpuffer von der Säule entfernt wurden (Abbildung 17, Spuren 2 bis 5). In der Elutionsfraktion ist eine Bande bei 70 kDa zu sehen, die dem gereinigten Apo-Cyt b_6 entspricht (Abbildung 17, Spur 6). Das gereinigte Protein ist elektrophoretisch rein frei von Kontaminationen, da in der Elution keine weiteren Proteinbanden zu sehen sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass Apo-Cyt b_6 über den deca-Histidin-Tag spezifisch an die Ni-NTA bindet und gezielt durch Elution von der Säule entfernt wird. Nach der Reinigung erfolgte die Rückfaltung des Proteins. Da SDS ein stark denaturierendes Detergenz ist, erwies es sich in früheren Arbeiten als ungeeignet für die *in vitro* Rekonstitution von Apo-Cyt b_6 . Die Verwendung des milden nicht-ionischen Detergenz DDM lieferte eine qualitativ bessere Rekonstitution (Prodohl *et al.*, 2007, Dreher, 2009). Um SDS gegen DDM auszutauschen, wurde DDM zum gereinigten Apo-Cyt b_6 gegeben, sodass sich gemischte SDS/DDM Mizellen ausbildeten. Durch Zugabe von KCl wurde das SDS in Form von KDS ausgefällt. Es folgte eine Dialyse gegen Detergenz-freien Puffer, um SDS Rückstände zu entfernen. Die erfolgreiche Rückfaltung kann, wie bereits erwähnt, in diesem einfachen System durch den Einbau des Häm-Kofaktors absorptionsspektroskopisch verfolgt werden. Für die Assemblierung des Apo-Cyt b_6 mit Häm wurde der Kofaktor in einem molaren Protein-zu-Häm-Verhältnis von 1:2 zu Apo-Cyt b_6 gegeben und Absorptionsspektren aufgenommen. Abbildung 18 zeigt die Absorptionsspektren des freien Häms im Vergleich zu Holo-Cyt b_6 unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. Unter oxidierenden Bedingungen zeigt das Absorptionsspektrum des freien Häms eine Soret-Bande mit der höch-

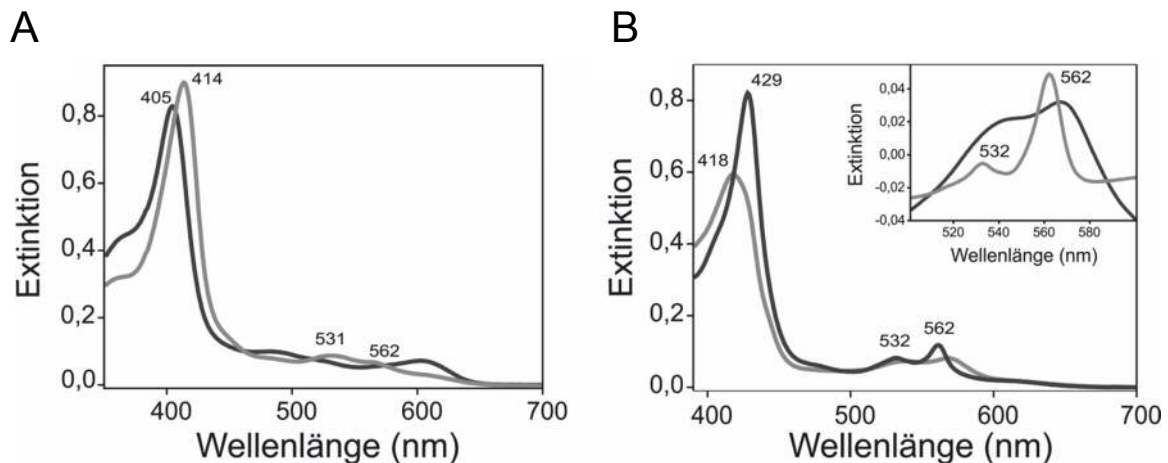


Abbildung 18: UV/VIS-Spektren von freiem Häm und nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 unter oxidierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen.

Das Spektrum des freien Häms (A, schwarz) zeigt unter oxidierenden Bedingungen ein Maximum der Soret-Bande bei 405 nm. Nach Assemblierung von Apo-Cyt b_6 mit Häm (A, grau) findet eine Rotverschiebung der Soret-Bande zu 414 nm statt. Die Maxima der α - bzw. β -Bande liegen bei 562 bzw. 531 nm. Unter reduzierenden Bedingungen liegt die höchste Absorptionsintensität der Soret-Bande des freien Häms bei 418 nm (B, schwarz). Nach Assemblierung von Apo-Cyt b_6 mit Häm verschiebt sich die Soret-Bande zu 429 nm (B, grau). Die Maxima der α - und β -Bande liegen bei 562 nm bzw. 532 nm. Das *Insert* zeigt die Redoxdifferenzspektren mit den α - und β -Banden des Spektrums von freiem Häm (schwarz) und nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 (grau).

ten Absorptionsintensität bei 405 nm und keine breite Absorptionsbande im Wellenlängenbereich von 590 bis 620 nm. Nach Zugabe des Häms zu Apo-Cyt b_6 zeigt das Absorptionsspektrum eine Rotverschiebung der Soret-Bande zu 414 nm sowie eine Zunahme der Absorptionsintensität (Abbildung 18 A). Es treten α - und β -Maxima bei 562 und 531 nm auf, die deutlich schwächer ausgeprägt sind als die Soret-Bande. Die breite Absorptionsbande im Bereich von 590 bis 620 nm ist nicht mehr zu sehen. Die Reduktion des Eisen-Ions von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch Natriumdithionit lässt sich ebenfalls spektroskopisch nachweisen. Im reduzierten Zustand zeigt das Absorptionsspektrum des freien Häms eine Soret-Bande bei 418 nm, eine α -Bande bei 569 nm und eine β -Bande bei 541 nm (Abbildung 18 B). Nach Zugabe von Häm zu Apo-Cyt b_6 , ist eine Rotverschiebung des Maximums der Soret-Bande zu 429 nm und eine deutliche Zunahme der Absorptionsintensität zu beobachten. Die Absorptionsintensität der α -Bande (562 nm) nimmt ebenfalls deutlich zu, während sich die Intensität der β -Bande (532 nm) kaum verändert. Das Redoxdifferenzspektrum des freien Häms, welches die Differenz zwischen dem Spektrum unter oxidierenden und dem Spektrum unter reduzierenden Bedingungen darstellt, zeigt keine deutlich ausgeprägte α - und β -Bande. Im Redoxdifferenzspektrum des Holo-Cyt b_6 hingegen sind eine markante α -Bande bei 562 und eine β -Bande bei 532 nm zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die spontane Bindung des Kofaktors zur Holo-

Cyt b_6 -Bildung *in vitro* kommt. Die Absorptionsspektren des freien und des gebundenen Häms zeigen sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand unterschiedliche Absorptionsmaxima. Die Rotverschiebung und Intensitätszunahme der Soret-Bande, sowie das Verschwinden der Absorptionsbande im Bereich von 590 bis 620 nm unter oxidierenden Bedingungen nach Zugabe von Häm zu Apo-Cyt b_6 , sind charakteristisch für eine *bis*-Histidin Koordination des Häms durch das Protein (Moore G.R., 1990, Brill und Williams, 1961). Die Absorptionsmaxima des rekombinant hergestellten und *in vitro* mit Häm assembliertem Cyt b_6 sind nahezu identisch mit den beobachteten Absorptionsbanden des aus Chloroplasten isolierten Cyt b_6 (Stuart und Wasserman, 1973).

3.2 Untersuchungen zum Einfluss interhelikaler *Loops* auf die Faltung, Assemblierung und Stabilität von Cytochrom b_6

Um ein umfassendes Verständnis für den Faltungsprozess TM Cytochrome zu bekommen, ist es wichtig den Beitrag der *Loops* zur Assemblierung des Proteins zu untersuchen. Im Folgenden wurde am Modellprotein Cyt b_6 die Rolle der interhelikalen *Loops* bei der Faltung und Assemblierung analysiert.

3.2.1 Expression, Reinigung und Rekonstitution der Cytochrom b_6 Gly_n-Varianten

Die vier α -Helices des Cyt b_6 sind über *Loops* miteinander verbunden und die Hämligierenden Histidine befinden sich in Helix B und D. Die Helices A und B bzw. die Helices C und D bilden jeweils eine *coiled coil* Struktur aus (Stroebel *et al.*, 2003, Cramer *et al.*, 2005). Die gebundenen Häme befinden sich in der Spalte zwischen den beiden *coiled coil* Strukturen, die im weiteren Verlauf als „Hälften“ bezeichnet werden (Abbildung 19). Zunächst wurde untersucht, ob eine Verlängerung des verbindenden *Loops* zwischen Helix B und C (BC-*Loop*) einen Einfluss auf die Assemblierung von Cyt b_6 hat. Durch die Verlängerung wurde die Distanz zwischen den beiden Hälften und die Flexibilität des *Loops* schrittweise erhöht. Sollte der kurze BC-*Loop* notwendig sein, um die beiden Hälften in räumliche Nähe zu bringen, würde eine Verlängerung die Assemblierung möglicherweise erschweren. Der relativ kleine BC-*Loop* besteht aus fünf Aminosäuren (Lys-Lys-Pro-Arg-Glu). Für die Verlängerung des BC-*Loops* wurden mit Hilfe der *Overlap Extension* PCR fünf, zehn oder 15 Glycine an Position P523 in das Cyt b_6 -Gen *petB* aus *Spinacia oleracea*

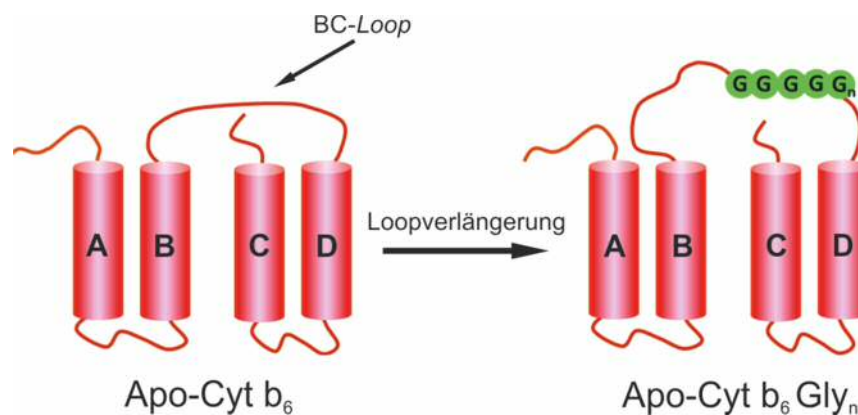


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Verlängerung des BC-Loops von Cyt b_6 .

In den verbindenden *Loop* zwischen den Helices B und C (BC-*Loop*), bestehend aus den Aminosäuren KKP_{RE}, wurden fünf, zehn oder 15 Glycine eingefügt. Die Insertion fand nach Prolin 523 statt. α -Helices sind durch rote Zylinder dargestellt.

cea L eingefügt und in den Expressionsvektor pRSET kloniert (Abbildung 15). Das Konstrukt enthielt weiterhin N-terminal einen deca-Histidin-Tag und das MBP. Sämtliche Apo-Cyt b_6 Gly_n-Varianten, wobei n der Anzahl der eingefügten Glycine entspricht, konnten in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Abbildung 20 zeigt exemplarisch ein Coomassie-gefärbtes Gel der Apo-Cyt b_6 Gly₁₀ Expression. Vier Stunden nach Induktion des Promo-

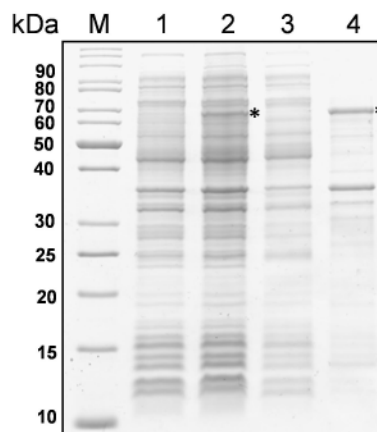


Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse der Proben nach heterologer Expression von Apo-Cyt b_6 Gly₁₀ in *E. coli* BL21(DE3) pLysE.

Die *E. coli* Zellen wurden nach der Expression mittels Ultraschall aufgebrochen. Der Gesamtzellextrakt zu Beginn und am Ende der Expression sowie wie die Fraktionen nach dem Aufbruch wurden in einem 14%igen SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt. Die mit einem Stern markierten Banden markieren das erfolgreich exprimierte Apo-Cyt b_6 Gly₁₀. Spur 1: Gesamtzellextrakt vor Induktion der Expression, Spur 2: Gesamtzellextrakt nach vierstündiger Expression, Spur 3: lösliche Fraktion und Spur 4: Einschlusskörperchen. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

tors mit IPTG ist im Gesamtzellextrakt eine deutliche Bande bei etwa 70 kDa zu sehen (Spur 2). Diese stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht des Proteins von 69,9 kDa überein. Nach Aufbruch der Zellen wurde die Fraktion der Einschlusskörperchen von den löslichen Proteinen und Membranen getrennt und ebenfalls in einer SDS-PAGE analysiert. Aus dem Coomassie-gefärbten Gel in Abbildung 20 geht hervor, dass sich das exprimierte Apo-Cyt b₆ Gly₁₀ in Einschlusskörperchen anreicherte. Ebenso verhielt es sich auch mit Apo-Cyt b₆ Gly₅ und -Gly₁₅, wie Abbildung 44 im Anhang dieser Arbeit zeigt. Die exprimierten Proteine wurden mit dem ionischen Detergenz SDS aus den Einschlusskörperchen solubilisiert und für die affinitätschromatographische Reinigung mittels Ni-NTA Agarose eingesetzt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen der Apo-Cyt b₆ Gly₁₀-Reinigung wurden in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt (Abbildung 21). Apo-Cyt b₆ Gly₁₀ konnte weder im Durchfluss noch in den Waschfraktionen detektiert werden. In der Elutionsfraktion ist eine Bande bei etwa 70 kDa zu sehen, die dem Molekulargewicht des Apo-Cyt b₆ Gly₁₀ entspricht. Die Elutionsfraktion ist elektrophoretisch rein und frei von Kontaminationen, was für einen hohen Reinheitsgrad des Apo-Cyt b₆ Gly₁₀ spricht. Apo-Cyt b₆ Gly₅ und Apo-Cyt b₆ Gly₁₅ konnten ebenfalls erfolgreich gereinigt werden (Abbildung 44 im Anhang). Für die Rückfaltung der denaturierten Proteine erfolgte ein Austausch des SDS gegen das Detergenz DDM. Im Anschluss wurde mittels Absorptionsspektroskopie untersucht, ob die Apo-Cyt b₆ Gly_n-Proteine Häm binden können. Dazu wurden die Proteine mit Häm in einem molaren Verhältnis von 1:2 gemischt und Absorptionsspektren im Bereich von 350-700 nm aufgenom-

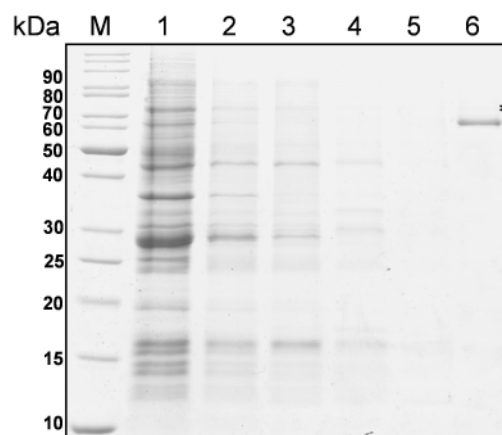


Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel nach affinitätschromatographischer Reinigung von Apo-Cyt b₆ Gly₁₀.

Apo-Cyt b₆ Gly₁₀ wurde unter Verwendung von Ni-NTA Agarose gereinigt und die Proteine der einzelnen Fraktionen in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Stern markiert das gereinigte Apo-Cyt b₆. Spur 1: Durchfluss, Spur 2: Waschfraktion 1, Spur 3: Waschfraktion 2, Spur 4: Waschfraktion 3, Spur 5: Waschfraktion 4, Spur 5: Elutionsfraktion, M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

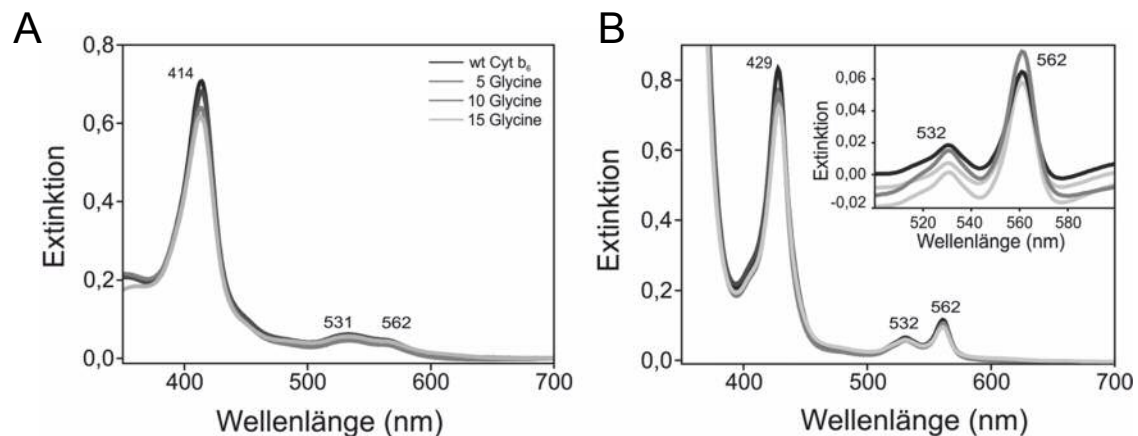


Abbildung 22: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der *in vitro* Rekonstitution der Apo-Cyt b_6 Gly $_n$ -Varianten mit Häm.

Die Apo-Cyt b_6 Gly $_n$ -Varianten wurden zu freiem Häm gegeben und Absorptionsspektren aufgenommen. Die Absorptionsspektren der untersuchten Proteine zeigen identische Maxima, die unter oxidierenden Bedingungen bei 414, 532 und 561 nm liegen (A). Unter reduzierenden Bedingungen sind Maxima der α -, β -, γ -Banden bei 562, 532 und 429 nm zu erkennen (B). Die Redoxdifferenzspektren zeigen eine stark ausgeprägte α -Bande mit einem Maximum bei 562 nm und eine β -Bande mit einem Maximum bei 532 nm (*Insert* unter B). Die Cyt b_6 Gly $_n$ -Varianten können Häm spezifisch binden. Die Zuordnung der Farben zu den einzelnen Proteinen befindet sich in Abbildung A und gilt ebenso für Abbildung B. Gly $_n$: n steht für die Anzahl der in den BC-Loop eingefügten Glycine.

men (Abbildung 22). Die Absorptionsspektren der drei Apo-Cyt b_6 Gly $_n$ -Proteine zeigen identische Maxima der γ -, β - und α -Banden, die unter oxidierenden Bedingungen bei 414, 531 und 562 nm (Abbildung 22 A). Nach Reduktion mit Natriumdithionit zeigen die Absorptionsspektren der Cytochrome ein ausgeprägtes Soret-Maximum bei 429 nm und eine α - und β -Bande mit Maxima bei 562 und 532 nm (Abbildung 22 B). Zudem ist in den Redoxdifferenzspektren ein für Holo-Cyt b_6 typisches, ausgeprägtes Maximum der α -Bande bei 562 nm und eine schwächer definierte β -Bande bei 532 nm zu sehen (*Insert* in Abbildung 22 B). Sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen sind die Absorptionsbanden deutlich ausgeprägt und die Maxima stimmen mit den Werten der Maxima des Holo-Cyt b_6 überein. Diese Ergebnisse belegen, dass die Cyt b_6 Gly $_n$ -Varianten in der Lage sind Häm effizient zu binden. Ein verlängerter BC-Loop scheint die Assemblierung von Cyt b_6 nicht zu beeinflussen. Trotz der größeren Distanz und der erhöhten Flexibilität zwischen den Cyt b_6 -Hälften, ist die Häm-Bindung nicht beeinträchtigt. Eine durch den BC-Loop vermittelte räumliche Nähe scheint für die Assemblierung nicht unbedingt notwendig zu sein.

3.2.2 Bestimmung der Protein-zu-Häm Verhältnisse der Cytochrom b_6 Gly_n-Varianten

Um die Assemblierung der Cyt b_6 Gly_n-Varianten näher zu charakterisieren, wurden die Protein-zu-Häm-Verhältnisse der Cytochrome mit Hilfe von Titrationsexperimenten bestimmt. Dabei wurde in individuellen Ansätzen eine konstante Häm-Menge mit steigenden Mengen an gereinigtem Protein titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein Absorptionsspektrum unter oxidierenden Bedingungen aufgenommen und die Absorptionsintensität der Soret-Bande bei 414 nm verfolgt (Abbildung 23). Unter reduzierenden Bedingungen konnten keine Titrationen durchgeführt werden, da die Proteine instabil waren. Anschließend wurde die relative Absorptionsänderung der Soret-Bande gegen das Protein-zu-Häm-Verhältnis aufgetragen. Die relative Absorptionsänderung stellt den Quotienten aus der Absorption bei 414 nm (Maximum der Soret-Bande des gebundenen Häms) und der Absorption bei 404 nm (Maximum der Soret-Bande des freien Häms) des jeweiligen Absorptionsspektrums dar. In die Titrationskurven wurden eine Gerade an das Plateau und eine zweite an die ansteigende Phase der Kurve angelegt. Am Schnittpunkt der Geraden wurde das Protein-zu-Häm-Verhältnis abgelesen. Da es zur Degradation des Häms durch Natriumdithionit kam, streuen die Messwerte und werden hier nicht gezeigt (Knipp *et al.*, 2011). Bei den Titrationen des Cyt b_6 und den drei Cyt b_6 Gly_n-Varianten

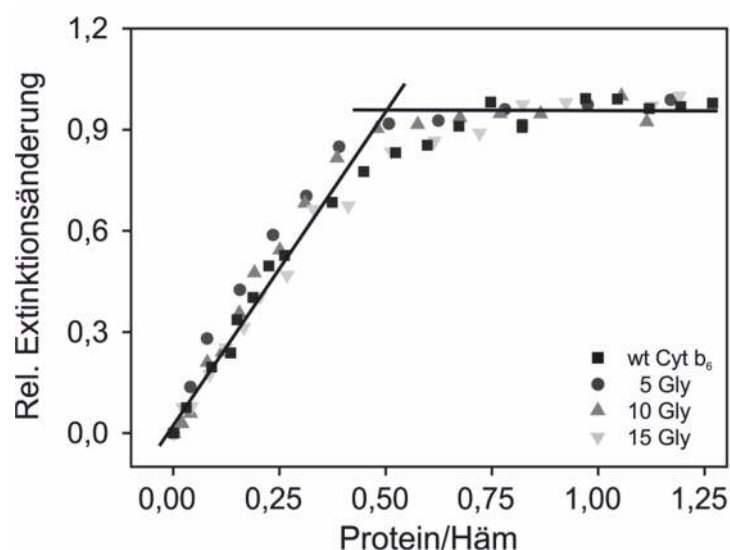


Abbildung 23: Titration von Häm mit Apo-Cyt b_6 und den Apo-Cyt b_6 Gly_n-Varianten.

Zur Untersuchung des Protein-zu-Häm Bindungsverhältnisses wurden in separaten Ansätzen zu 5 μ M Häm zunehmende Proteinmengen titriert und Absorptionsspektren unter oxidierenden Bedingungen aufgenommen. Die relative Intensitätsänderung des Soret-Maximums wurde gegen das Protein-zu-Häm-Verhältnis aufgetragen. Die relative Absorptionsänderung stellt den Quotienten aus der Absorption bei 414 nm (Maximum der Soret-Bande des assemblierten Cyt b_6) und der Absorption bei 404 nm (Maximum der Soret-Bande des freien Häms) des jeweiligen Absorptionsspektrums dar. Bei einem Verhältnis von etwa 0,5 tritt bei allen vier Titrationen eine Sättigung ein.

konnte eine Zunahme der relativen Intensität der Soret-Bande mit steigender Proteinkonzentration beobachtet werden, die sich bei weiterer Protein-Zugabe nicht mehr änderte (Abbildung 23). An diesem Punkt lag das vorgelegte Häm vollständig gebunden vor. Die graphische Auswertung der Titrationsen in Abbildung 23 zeigt, dass dieser Punkt sowohl bei Cyt b_6 als auch bei den Cyt b_6 Gly_n-Varianten bei einem Protein-zu-Häm-Verhältnis von 0,5 erreicht wird. Ein Apo-Cytochrom bindet demnach statistisch gesehen zwei Häm-Moleküle. Die Bindung der Kofaktoren ist durch den verlängerten BC-Loop nicht beeinträchtigt.

3.2.3 Untersuchungen zur Stabilität der Cytochrom b_6 Gly_n-Varianten

Zur näheren Charakterisierung wurde die Stabilität der Cyt b_6 Gly_n-Varianten mit Hilfe von SDS-Titrationsen untersucht. Diese Methode wurde etabliert, um die Stabilität α -helikaler MP zu analysieren und wurde bereits bei verschiedenen α -helikalen MP erfolgreich angewandt (Lau und Bowie, 1997, Otzen, 2003, Sehgal *et al.*, 2005). Bei einer SDS-Titration wird ein Membranprotein in einem nicht-ionischen Detergenz (z. B. DDM) gelöst und stufenweise mit zunehmenden SDS-Mengen titriert. Die Zugabe von SDS führt zur Auflösung der Tertiärstruktur, genauer gesagt zur Dissoziation der Helices, während die α -helikale Sekundärstruktur größtenteils erhalten bleibt (Anbazhagan *et al.*, 2010). Im Falle von Cyt b_6 und den Cyt b_6 Gly_n-Varianten resultiert die Dissoziation der Helices in der Freisetzung des Häm-Kofaktors, die absorptionsspektroskopisch in Form einer Abnahme der Absorptionsintensität der Soret-Bande beobachtet werden kann. Für die Durchführung der Experimente wurden die gereinigten Apo-Cyt b_6 Gly_n-Varianten und Cyt b_6 mit Häm assembliert. Eine definierte Menge des jeweiligen Proteins wurde in individuellen Ansätzen mit steigenden Mengen an SDS titriert und nach jedem Titrationschritt UV/VIS-Spektren im Bereich von 350-700 nm aufgenommen. Die Auswertung der Titrationsen erfolgt durch die Auftragung der relativen Absorptionsänderung der Soret-Bande unter oxidierenden Bedingungen gegen die SDS-Konzentration (Abbildung 24). Unter reduzierenden Bedingungen kommt es, aufgrund der Degradation des Häms durch das Reduktionsmittel Natriumdithionit, zur Streuung der Messwerte (Knipp *et al.*, 2011). Diese Werte sind hier daher nicht gezeigt. Bei niedrigen SDS-Konzentrationen zu Beginn der Messung zeigen die Titrationskurven aller Cytochrome ein Plateau (Abbildung 24 A-D). Es ist keine Freisetzung des Häms erkennbar. Bei weiterer Zugabe von SDS fallen die Titrationskurven kontinuierlich ab. Die Helices dissoziieren zunehmend und setzen Häm frei. Cyt b_6 , Cyt b_6 Gly₅ und Cyt b_6 Gly₁₀ setzen Häm ab einer SDS-Konzentration von etwa 4 bis 5 mM frei (Abbildung 24 A-C). Die Titrationskurve von Cyt b_6 Gly₁₅ zeigt bei diesen SDS-Konzentrationen hingegen keinen Abfall der Kurve. Die Häm-Freisetzung der Cyt b_6 -

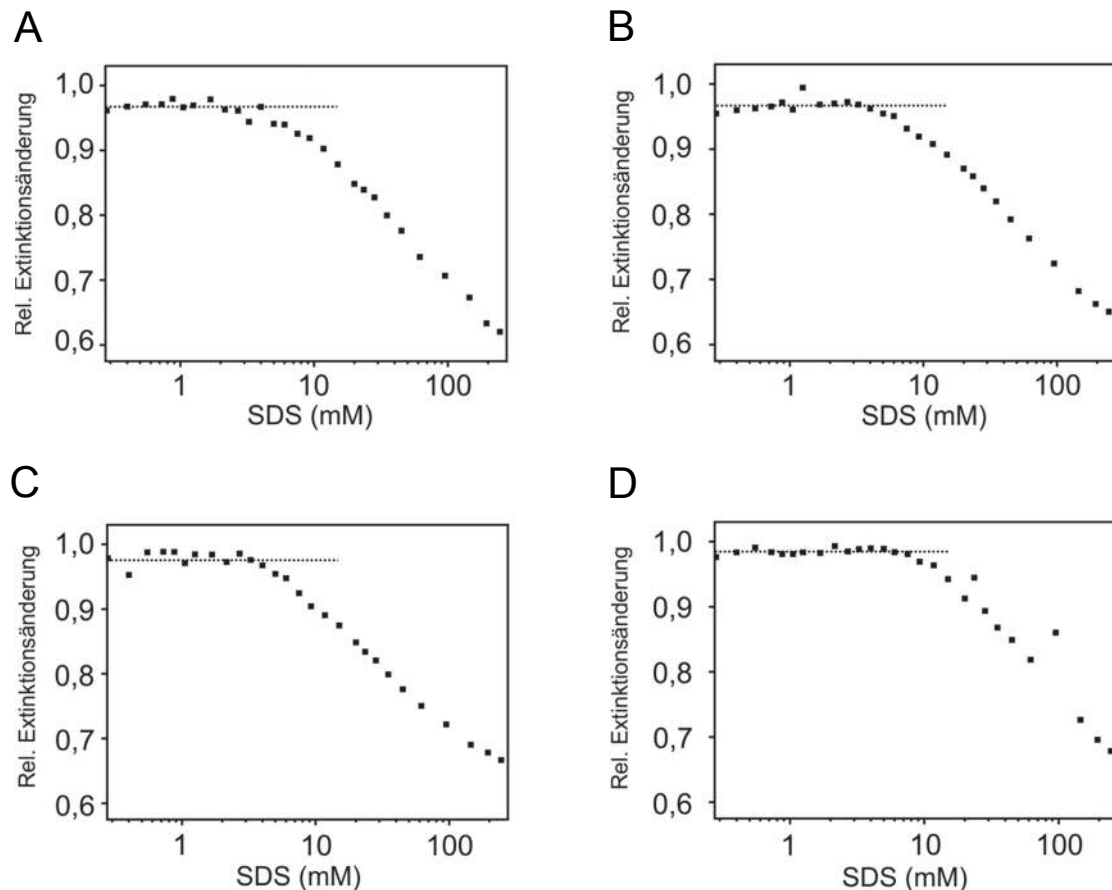


Abbildung 24: SDS-Titration von Cyt b_6 und den Cyt b_6 Gly $_n$ -Varianten mit verlängertem BC-Loop unter oxidierenden Bedingungen.

Die Stabilität des wildtypischen Cyt b_6 und der Cyt b_6 Gly $_n$ -Varianten gegenüber einer Denaturierung durch SDS wurde untersucht. Zunehmende SDS-Mengen wurden in individuellen Ansätzen zu rekonstituiertem Cytochrom titriert und Absorptionsspektren aufgenommen. Zur graphischen Auswertung wurde die relative Absorptionsänderung gegen die SDS-Konzentration aufgetragen. Die relative Absorptionsänderung stellt den Quotienten aus der Absorption bei 414 nm (Maximum der Soret-Bande des assemblierten Cyt b_6) und der Absorption bei 404 nm (Maximum der Soret-Bande des freien Häms) dar. Jeder Datenpunkt entspricht einer Messung. Je größer die relative Änderung des Absorptionsmaximums ist, desto stabiler ist das Cytochrom gegenüber der Denaturierung durch SDS. (A) Cyt b_6 , (B) Cyt b_6 Gly $_5$, (C) Cyt b_6 Gly $_{10}$, (D) Cyt b_6 Gly $_{15}$.

Gly $_{15}$ -Variante beginnt erst bei 8 mM SDS. Um Rückschlüsse auf die Stabilität der Cytochrome aus den Titrations schließen zu können, werden die SDS-Konzentrationen beim Einsetzen der Häm-Freisetzung verglichen. Je geringer die SDS-Konzentration, bei der die Helices zu dissoziieren beginnen, ist, desto instabiler ist das Cytochrom. Da Cyt b_6 , Cyt b_6 Gly $_5$ und Cyt b_6 Gly $_{10}$ ab der gleichen SDS-Konzentration beginnen Häm freizusetzen, hat die Verlängerung des BC-Loops um fünf oder zehn Glycine keinen Einfluss auf die Stabilität. Das Einfügen von 15 Glycinen hingegen, scheint die Stabilität zu erhöhen. Die Cyt b_6 Gly $_{15}$ -Variante beginnt ab einer deutlich höheren SDS-Konzentration den Kofaktor freizusetzen. Die erhöhte Flexibilität des BC-Loops durch die Insertion von

15 Glycinen wirkt sich positiv auf die Assoziation der Helices und die Bindung des Kofaktors aus.

3.2.4 Untersuchungen zur Assemblierung getrennter Cytochrom b_6 -Hälften

Die bisher dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass der BC-Loop für die Cyt b_6 Assemblierung nicht essentiell ist. Um dieser These weiter nachzugehen, wurde im Folgenden untersucht, ob der Kofaktor von getrennten Cyt b_6 -Hälften gebunden werden kann. Dazu war es notwendig die Hälften, bestehend aus den Helices AB bzw. CD, separat zu exprimieren. Sämtliche Versuche die Hälften in einem *E. coli* Expressionsstamm heterolog zu exprimieren, blieben, trotz Fusionierung an MBP, erfolglos. Deswegen wurde für die rekombinante Herstellung der Cyt b_6 -Hälften im präparativen Maßstab ein zellfreies Expressionssystem, die CECF (*continuous exchange cell-free system*)-Methode, herangezogen. Die Expressionen wurden in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von XXX (Institut für Biophysik und Biochemie, Universität Frankfurt a. M.) durchgeführt. Das verwendete System ist ein gekoppeltes Transkriptions-Translationsverfahren bei dem die Expression in einem *E. coli* Zellextrakt stattfindet, das die essentiellen Komponenten für die Translation enthält (Schwarz *et al.*, 2007). Die Transkription ist dabei unter der Kontrolle der T7-RNA Polymerase. Dieses System bietet die Möglichkeit MP ohne Fusionierung an MBP zu exprimieren. Die exprimierten Hälften, die im Folgenden zf (zell-frei)-Cyt b_6 AB und zf-Cyt b_6 CD bezeichnet werden, besaßen N-terminal ausschließlich einen deca-Histidin-Tag. Weiterhin wurde das Volllängen-Apo-Cyt b_6 mit der CECF-Methode exprimiert (zf-Apo-Cyt b_6) und besaß N-terminal, ebenso wie die Cyt b_6 -Hälften, nur einen deca-Histidin-Tag. Nach der Expression lagen die Proteine als Präzipitat vor und konnten im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von SDS solubilisiert werden. Eine affinitätschromatographische Reinigung erfolgte mit Hilfe der Ni-NTA Agarose (2.2.2.4). Die Qualität der Reinigung wurde anschließend in einer SDS-PAGE überprüft und die Proteine in einer Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 25). Das Protein zf-Cyt b_6 AB ist im Coomassie-gefärbten Gel der Reinigung weder im Durchfluss noch in den Waschfraktionen zu sehen (Abbildung 25 A, Spuren 2 bis 4). Im Präzipitat vor der Reinigung und in der Elutionsfraktion ist jedoch eine dominante Proteinbande auf der Höhe der 14 kDa-Bande des Markers sichtbar (Abbildung 25 A, Spuren 1 und 5). Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den Cyt b_6 N-Terminus gerichtet ist, wurde in einer Western-Blot-Analyse ebenfalls ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa vor der Reinigung und in der Elutionsfraktion detektiert (Abbildung 25 C, Spuren 1 und 5). Die Western-Blot-Analyse bestätigt, dass es sich bei dem Protein um zf-Cyt b_6 AB handelt. Zf-Cyt b_6 AB wurde erfolgreich exprimiert

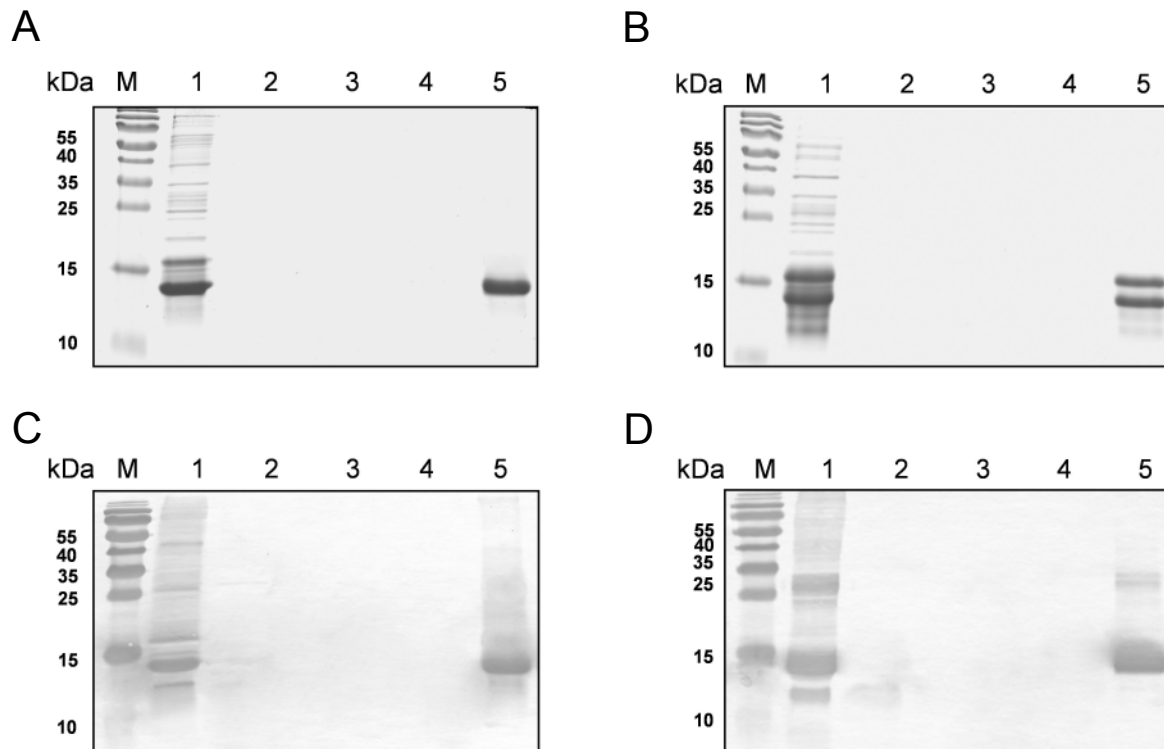


Abbildung 25: SDS-PAGE- (A, B) und Western-Blot-Analyse (C, D) der zf-Cyt b₆ AB und zf-Cyt b₆ CD Reinigung.

Fractionen der affinitätschromatographischen Reinigung mittels Ni-NTA von zf-Cyt b₆ AB und zf-Cyt b₆ CD wurden in 18%igen Acrylamidgelen aufgetrennt und Coomassie-gefärbt (A bzw. B). Es folgte ein Western-Blot-Transfer mit anschließender immunologischer Detektion der gereinigten Proteine. Verwendet wurden der Anti-Cyt b₆ N-Terminus Antikörper zur Detektion von Cyt b₆ AB (C) bzw. der Anti-Cyt b₆ C-Terminus Antikörper zur Detektion von Cyt b₆ CD (D). Die Proteine wurden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase angefärbt. Spur 1: Präzipitat vor der Reinigung, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: Waschfraktion 1, Spur 4: Waschfraktion 2, Spur 5: Elutionsfraktion und M: „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“.

und gereinigt. Die Elutionsfraktion zeigt außerdem keine Kontaminationen, was für einen hohen Reinheitsgrad des Proteins spricht. Anhand des verwendeten Größenstandards, bestehend aus wasserlöslichen Proteinen, wurde in der SDS-PAGE-Analyse ein Molekulargewicht von zf-Cyt b₆ AB von etwa 14 kDa ermittelt. Dieser Wert liegt etwas unterhalb des berechneten Molekulargewichtes von 15,5 kDa. Dies lässt sich mit der Beobachtung erklären, dass MP in SDS-PAGE-Analysen ein vom Molekulargewicht abweichendes Laufverhalten zeigen können (Rath und Deber, 2013). Die nachfolgend beschriebene erfolgreiche Assemblierung mit Häm belegt ebenfalls, dass es sich bei dem gereinigten Protein um zf-Cyt b₆ AB handelt. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel der zf-Cyt b₆ CD Reinigung, ist das Protein ebenfalls weder im Durchfluss noch in den Waschfraktionen zu sehen (Abbildung 25 B, Spuren 2 bis 4). Im Präzipitat vor der Reinigung und in der Elutionsfraktion sind zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 14 und 15,5 kDa sichtbar, die schätzungsweise in äquivalenten Mengen in der Probe enthalten sind (Abbil-

dung 25 B, Spuren 1 und 5). Diese Proben wurden in separaten Western-Blot-Analysen mit zwei verschiedenen Antikörpern immunologisch untersucht. Es wurde ein Anti-His₅-Tag Antikörper eingesetzt, mit dem die Detektion des 14 und 15,5 kDa schweren Proteins möglich war (Abbildung 26, Spuren 1 und 5).

Weiterhin wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper durchgeführt, der gegen den C-Terminus von Cyt b₆ gerichtet ist. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte lediglich das 15,5 kDa-schwere Protein detektiert werden (Abbildung 25 D, Spuren 1 und 5). Bei dem 14 kDa schweren Protein handelt es sich wahrscheinlich um ein verkürztes zf-Cyt b₆ CD-Protein, das durch den Abbruch der Translation während der *in vitro* Proteinsynthese entstanden ist. Der geschätzte Gewichtsunterschied zwischen den beiden Proteinen von etwa 1,5 kDa entspricht 13 Aminosäuren, die C-terminal im 14 kDa schweren Protein fehlen. Diese 13 Aminosäuren schließen das Epitop, gegen den der C-Terminus spezifische Antikörper gerichtet ist, ein. Da dem 14 kDa schweren Protein das Epitop fehlt, wird es vom Antikörper in der Western-Blot-Analyse nicht erkannt. Weiterhin zeigen folgende Ergebnisse, dass es bei dem 14 kDa schweren Protein nicht um ein unspezifisches Protein handelt: Das Coomassie-gefärbte Gel der affinitätschromatographischen Reinigung belegt, dass beide Proteine spezifisch mit der Ni-NTA interagieren. Wäre die Interaktion des 14 kDa-schweren Proteins mit der Ni-NTA unspezifisch, so wäre das Protein erwartungsgemäß im Durchfluss bzw. in den Waschfraktionen sichtbar. Dies ist jedoch nicht der

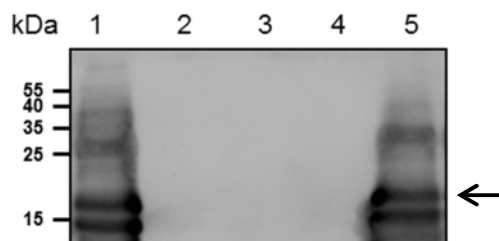


Abbildung 26: Western-Blot-Analyse der zf-Cyt b₆ CD Reinigung.

Die einzelnen Fraktionen der zf-Cyt b₆ CD Reinigung wurden in einer Western-Blot-Analyse mit einem Anti-His₅-Tag Antikörper untersucht. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Chemilumineszenz. Der Pfeil markiert die Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von 15,5 kDa. Spur 1: Präzipitat vor Reinigung, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: Waschfraktion 1, Spur 4: Waschfraktion 2 und Spur 5: Elutionsfraktion.

Fall, da im Durchfluss und in den Waschfraktionen keine Proteine zu sehen sind (Abbildung 25 B, Spuren 2 bis 4). Außerdem wird durch die Western-Blot-Analyse mit dem Anti-His₅-Tag Antikörper bestätigt, dass das Protein einen His-Tag besitzt. Das spricht dafür, dass das 14 kDa-schwere Protein vom Expressionsplasmid translatiert wurde. Weiterhin ist im Coomassie-gefärbten Gel der Reinigung zu sehen, dass beide Proteine in deutlich

größeren Mengen vorkommen als die restlichen Proteine in der Probe (Abbildung 25 B, Spuren 1 und 5). Das spricht ebenfalls dafür, dass es sich um ein Expressionsprodukt handelt. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse aus der absorptionsspektroskopischen Analyse der Cyt b_6 -Hälften unterstützen ebenfalls die Vermutung, dass es sich bei dem 14 kDa-schweren Protein um zf-Cyt b_6 CD handelt.

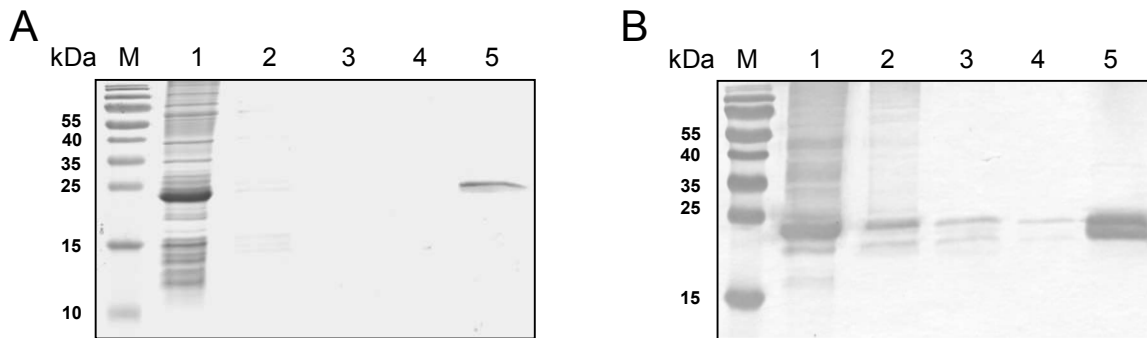


Abbildung 27: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse der zf-Apo-Cyt b_6 -Reinigung.

Die einzelnen Fraktionen der zf-Apo-Cyt b_6 -Reinigung mittels Ni-NTA wurden in einem 18%igen SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt (A). Der immunologische Nachweis des Proteins erfolgte nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mit Hilfe des Anti-Cyt b_6 N-Terminus Antikörpers (B). Die Membran wurde mit NBT/BCIP entwickelt. Spur 1: Präzipitat vor Reinigung, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: Waschfraktion 1, Spur 4: Waschfraktion 2, Spur 5: Elutionsfraktion und M: „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“.

Die Fraktionen der Reinigung des zf-Apo-Cyt b_6 -Proteins wurden ebenfalls in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Das Ergebnis zeigt im Präzipitat vor der Reinigung und in der Elutionsfraktion ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa (Abbildung 27 A), das mit dem berechneten Molekulargewicht von 26,9 kDa des zf-Apo-Cyt b_6 übereinstimmt. In einer Western-Blot-Analyse detektiert der Anti-Cyt b_6 N-Terminus Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa im Präzipitat vor der Reinigung und in der Elutionsfraktion (Abbildung 27 B, Spur 1 und 5). Dies bestätigt, dass es sich bei dem Protein um das gereinigte zf-Apo-Cyt b_6 handelt. Da im Coomassie-gefärbten Gel in der Elutionsfraktion keine weiteren Proteine sichtbar sind, ist von einem hohen Reinheitsgrad des Proteins auszugehen. Anhand von Absorptionsspektren wurde überprüft, ob sich zf-Apo-Cyt b_6 rückfalten und mit Häm rekonstituieren lässt. Da sich DDM für die Rekonstitution des an MBP fusionierten Apo-Cyt b_6 als geeignet erwiesen hat, wurde es für die Rekonstitution der Cyt b_6 -Hälften und des zf-Apo-Cyt b_6 eingesetzt. Nach der Reinigung der Proteine erfolgte ein Austausch des SDS gegen DDM. Anschließend wurde Häm zu zf-Cyt b_6 in einem molaren Protein-zu-Häm-Verhältnis von 1:2 gegeben und Absorptionsspektren im Bereich von 350-700 nm aufgenommen. Sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen sind die für Holo-Cyt b_6 charakteristischen Absorptionsmaxima zu sehen (Abbildung 28 A). Das Absorptionsspektrum

zeigt unter oxidierenden Bedingungen eine Soret-Bande mit einem Maximum bei 414 nm und schwächer ausgeprägte α - und β -Banden bei 531 und 562 nm. Die Absorptionsbande bei 590 bis 620 nm, die unter oxidierenden Bedingungen typisch für freies Häm ist, ist nicht sichtbar. Unter reduzierenden Bedingungen liegen die Maxima der α -, β - und γ -Banden bei 562, 532 und 429 nm. Im Redoxdifferenzspektrum sind die typische α -Bande bei 562 nm und die typische β -Bande bei 532 nm zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das zellfrei exprimierte zf-Apo-Cyt b_6 *in vitro* rückgefaltet werden konnte und nach Häm-Zugabe spontan zu Holo-Cyt b_6 assembliert. Daraufhin wurde untersucht, ob die beiden getrennten Cyt b_6 -Hälften ebenfalls mit Häm assemblieren können. Dazu wurden die gereinigten zf-Cyt b_6 -Hälften im molaren Verhältnis von 1:1 zusammengegeben und mit Häm in einem molaren Gesamtprotein-zu-Häm-Verhältnis von 1:2 versetzt. Die aufgenommenen Absorptionsspektren wiesen typische Holo-Cyt b_6 Absorptionsmaxima auf (Abbildung 28 B). Unter oxidierenden Bedingungen ist ein definiertes Maximum der Soret-Bande bei 414 nm zusehen, ebenso wie die schwächer ausgeprägten α - und β -Banden bei 531 und 562 nm. Eine Absorptionsbande im Bereich von 590-620 nm, die kennzeichnend für freies Häm ist, ist auch hier nicht sichtbar. Unter reduzierenden Bedingungen sind die ausgeprägten Maxima der α -, β - und γ -Banden bei 562, 532 und 429 nm zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass Häm vollständig von den Cyt b_6 -Hälften gebunden wurde. Das Gesamtprotein-zu-Häm-Verhältnis bezieht sich auf eine Proteinmenge, die sowohl das 14 kDa- als auch das 15,5 kDa-schwere Protein berücksichtigt. Das bedeutet, dass die kürzere Form der Cyt b_6 CD-Hälfte Häm binden kann. Wäre das 14 kDa schwere Protein in der Elutionsfraktion des zf-Cyt b_6 CD ein unspezifisches Protein, dann wäre der Kofaktor nicht vollständig gebunden worden. In diesem Fall wären Kennzeichen des freien Häms, wie eine Blauverschiebung der Soret-Banden und Absorption im Bereich von 590-620 nm unter oxidierenden Bedingungen, in den Absorptionsspektren zu erwarten. Jede Cyt b_6 Hälfte besitzt jeweils zwei Häm-ligierende Histidine, die auf den Helices B bzw. D liegen. Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass zwei Moleküle einer einzelnen Cyt b_6 -Hälfte ebenfalls Häm binden können. Um dies zu untersuchen, wurde zu jeweils einer Hälfte Häm im molaren Protein-zu-Häm-Verhältnis von 1:2 gegeben und die Assemblierung spektroskopisch verfolgt. Die Absorptionsspektren von zf-Cyt b_6 AB zeigen unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen die typischen gut definierten Holo-Cyt b_6 Absorptionsmaxima (Abbildung 28 C). Zf-Cyt b_6 AB ist demnach alleine in der Lage Häm zu binden. Das Absorptionsspektrum von Cyt b_6 CD zeigt unter oxidierenden Bedingungen eine Soret-Bande mit einem Maximum bei 414 nm (Abbildung 28 D). Unter reduzierenden Bedingungen sind eine breite Absorptionsbande im Bereich von 420 bis 430 nm und kein definierter Absorptionspeak zu sehen. Dies deutet auf eine unvollständige Bindung des Häms durch das Protein hin. Zf-Cyt b_6 CD ist in der Lage alleine Häm zu binden,

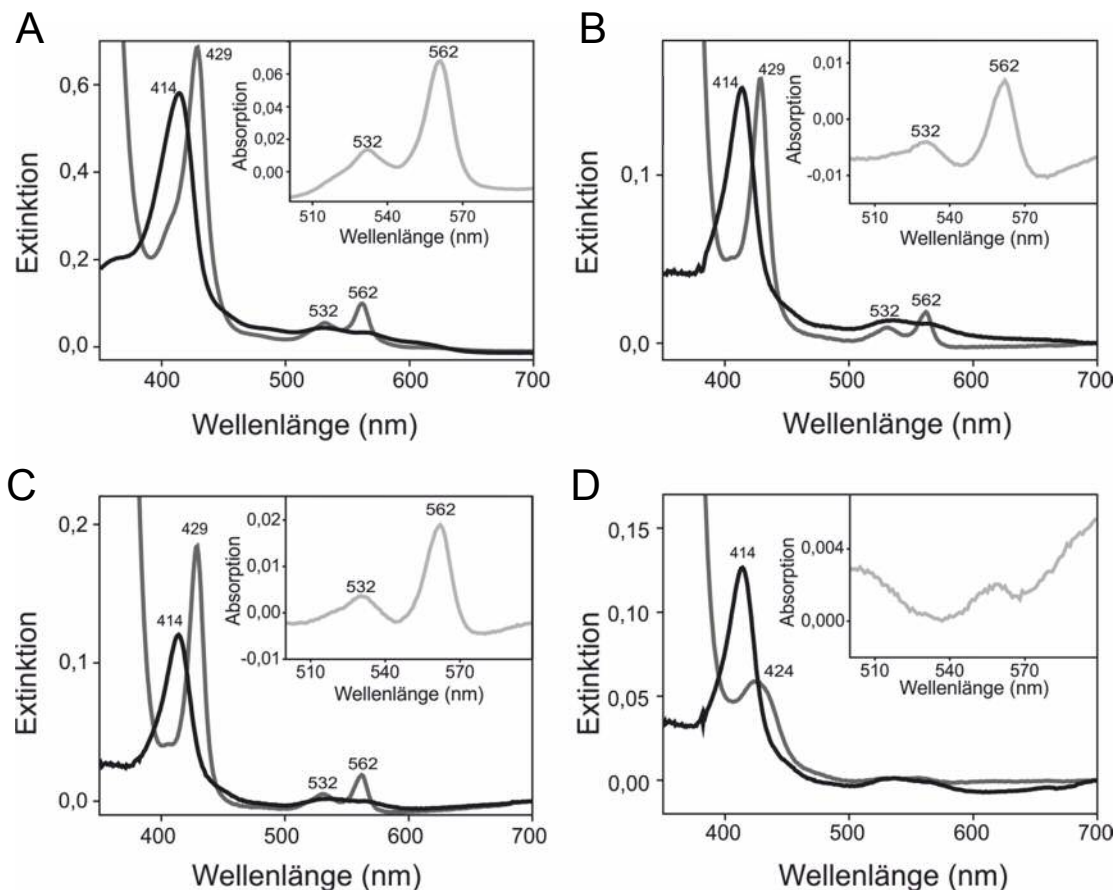


Abbildung 28: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der *in vitro* Assemblierung von zf-Apo-Cyt b_6 , zf-Apo-Cyt b_6 AB und zf-Apo-Cyt b_6 CD mit Häm.

Die gereinigten Proteine wurden wie folgt zu Häm dazugegeben: (A) zf-Apo-Cyt b_6 , (B) zf-Apo-Cyt b_6 AB und zf-Apo-Cyt b_6 CD in einem molaren Verhältnis von 1:1, (C) zf-Apo-Cyt b_6 AB und (D) zf-Apo-Cyt b_6 CD. Das molare Gesamtprotein-zu-Häm-Verhältnis betrug 1:2. Der Einbau des Kofaktors wurde unter oxidierenden (schwarz) und reduzierenden (dunkelgrau) Bedingungen verfolgt. Das *Insert* zeigt das jeweilige Redoxdifferenzspektrum. Die angegebenen Absorptionsmaxima sind typisch für Holo-Cyt b_6 . Eine Ausnahme stellt das Spektrum von Cyt b_6 CD (D) dar, das unter reduzierenden Bedingungen eine für Cyt b_6 untypische Bande bei 424 nm zeigt. Zf-Apo-Cyt b_6 AB alleine und beide Cyt b_6 -Hälften gemeinsam können Häm effizient binden. Zf-Holo-Cyt b_6 CD ist vermutlich nur unter oxidierenden Bedingungen stabil.

jedoch scheint die Bindung des Häms unter reduzierenden Bedingungen instabil zu sein. Im vorangegangenen Experiment, in dem beide Hälften im gleichen Verhältnis zusammengegeben wurden, wäre es denkbar, dass zwei Proteine des Cyt b_6 AB Häm binden und gemeinsam mit Cyt b_6 CD. In diesem Fall wäre nicht die gesamte Häm Menge gebunden worden, was in den Absorptionsspektren sichtbar wäre. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cyt b_6 -Hälften Häm einbauen können ohne kovalent miteinander verbunden zu sein. Die Cyt b_6 AB-Hälfte ist sogar alleine in der Lage den Kofaktor effizient zu binden, wenn die Helices C und D nicht vorhanden sind. Cyt b_6 CD bindet Häm ebenfalls alleine, jedoch ist die Bindung unter oxidierenden Bedingungen stabiler als unter reduzierenden Bedingungen.

3.2.5 Untersuchungen zur Assemblierung transmembraner Fragmente des Cytochrom b_6

Da der BC-Loop keinen signifikanten Einfluss auf die Assemblierung von Cyt b_6 zu haben scheint, wurden im nächsten Schritt die drei Helix-verbindenden, wasserlöslichen *Loops* proteolytisch verdaut und die Fähigkeit der verbleibenden TM-Fragmente zur Häm-Bindung untersucht. Dazu wurde Apo-Cyt b_6 *in vitro* rekonstituiert und durch Zugabe von Proteinase K proteolytisch verdaut. Proteinase K ist eine Subtilisin-ähnliche Serinprotease, die unspezifisch nach hydrophoben, aliphatischen und aromatischen Aminosäuren Peptidbindungen hydrolysiert (Ebeling *et al.*, 1974). Sie besitzt endo- und exoproteolytische Aktivität und ist in der Lage Proteine vollständig zu degradieren (Sambrook und Russell, 2001). Eine komplette Degradation des Cyt b_6 wurde jedoch nicht erwartet, da sich die hydrophoben TM-Helices des Cyt b_6 -Proteins in einer Detergenzmizelle befanden und dadurch vor der Proteolyse geschützt sein sollten. Nach der Proteolyse wurde anhand von Absorptionsspektren untersucht, ob die entstandenen TM-Fragmente immer noch Häm gebunden hatten. Der Verdau des rekonstituierten Cyt b_6 durch Proteinase K wurde nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h bzw. 5 h gestoppt und im Anschluss Absorptionsspektren aufgenommen. Sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen zeigen die Absorptionsspektren des unterschiedlich lang verdauten Cyt b_6 charak-

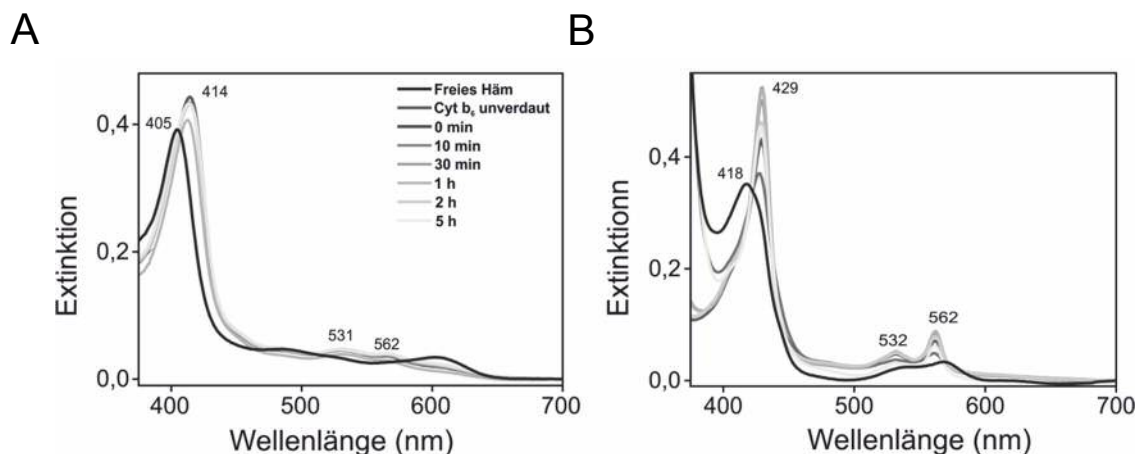


Abbildung 29: UV/VIS-Spektren der Cyt b_6 Fragmente nach Proteolyse.

Rekonstituiertes Cyt b_6 wurde einem proteolytischen Verdau mit Proteinase K unterzogen. Nach definierten Zeitpunkten (10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 5 h, Grautöne siehe Legende A) wurde der Verdau mit dem Proteaseinhibitor PMSF gestoppt und Absorptionsspektren unter oxidierenden Bedingungen (A) und nach Reduktion mit Natriumdithionit (B) gemessen. Als Kontrolle dienen Absorptionsspektren des unverdauten, rekonstituierten Cyt b_6 und des freien Häms (ebenfalls Legende unter A). Die Absorptionsspektren des verdauten Cyt b_6 zeigen die für Holo-Cyt b_6 typischen Maxima, die den Graphen zu entnehmen sind.

teristische Absorptionsmaxima des assemblierten Cyt b_6 (Abbildung 29). Im Vergleich zum Spektrum des freien Häms, zeigen die Spektren des teilweise hydrolysierten Cyt b_6 eine deutliche Rotverschiebung des Maximums der Soret-Bande von 405 zu 414 nm unter oxidierenden (Abbildung 29 A) und von 418 zu 429 nm unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 29 B). Die Maxima der α - und β -Bande liegen unter oxidierenden Bedingungen bei 562 und 531 nm. Außerdem ist die Absorptionsbande im Bereich von 590 bis 620 nm, die typisch für freies Häm ist, nicht sichtbar. Nach Reduktion mit Natriumdithionit nimmt die Intensität der α -Bande zu. Diese spektroskopischen Eigenschaften sind charakteristisch für eine sechsfache Koordination des zentralen Eisen-Ions des Häms im Cyt b_6 und zeigen keine Unterschiede zu den Absorptionsmaxima des Holo-Cyt b_6 . Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kofaktoren nach der Proteolyse gebunden blieben. Aliquoten des verdauten Cyt b_6 wurden auf ein 18%iges Acrylamidgel geladen und entsprechend ihres Molekulargewichtes in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Coomassie-gefärbten Gel ist das intakte Volllängen-Cyt b_6 in den Kontrollen (Abbildung 30 Spuren 2 und 3) aber nicht in den Proben des hydrolysierten Cyt b_6 zu sehen. In Spur drei wurde eine Probe des Cyt b_6 vor Proteinase K-Zugabe geladen, die belegt, dass Cyt b_6 vor Protease-Zugabe nicht bereits degradiert war. Nach 10-, 30- und 60-minütigem Verdau sind nur Proteinfragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 8-15 kDa sichtbar (Abbildung 30 A, Spuren 4-6). Nach zweistündiger Inkubation mit Proteinase K sind kleinere Fragmente mit einem geschätzten Molekulargewicht von etwa 8-11 kDa und nach fünfstündigem Verdau keine Proteinfragmente mehr zu sehen (Abbildung 30 A, Spuren 7 und 8). Um eine Hydrolyse durch eine unspezifische Protease ausschließen zu können, wurde Cyt b_6 ohne Proteinase K-Zugabe unter identischen Versuchsbedingungen inkubiert. Diese Probe zeigt außer dem intakten Cyt b_6 keine weiteren Fragmente, die auf einen proteolytischen Verdau durch unspezifische Proteasen hinweisen würden (Abbildung 30, Spur 2). Die Absorptionsspektren dieser Probe sind typisch für Holo-Cyt b_6 . Über einen Zeitraum von 5 h, der längsten Inkubationszeit mit Proteinase K, kam es nicht zur unspezifischen Degradation des Proteins. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Für einen immunologischen Nachweis wurden zwei Cyt b_6 -spezifische Anti-körper, gerichtet gegen den N- bzw. C-Terminus, verwendet (Abbildung 30). Die Western-Blot-Analyse mit dem Anti-Cyt b_6 C-Terminus Antikörper zeigt Fragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 8-10 kDa in den Proben, die 10 min bis 2 h mit Proteinase K inkubiert wurden (Abbildung 30, Spuren 4-7). Fünf Stunden nach Protease-Zugabe sind keine Fragmente mehr zu sehen (Abbildung 30 C, Spur 8). Der Anti-Cyt b_6 N-Terminus Antikörper hingegen, detektierte nur das Volllängen-Cyt b_6 in den Kontrollen, jedoch nicht die Fragmente nach der Proteolyse (Abbildung 30 B). Das Epitop des Anti-Cyt b_6 N-Terminus Antikörpers wurde, wie nachfolgende massenspektrometri-

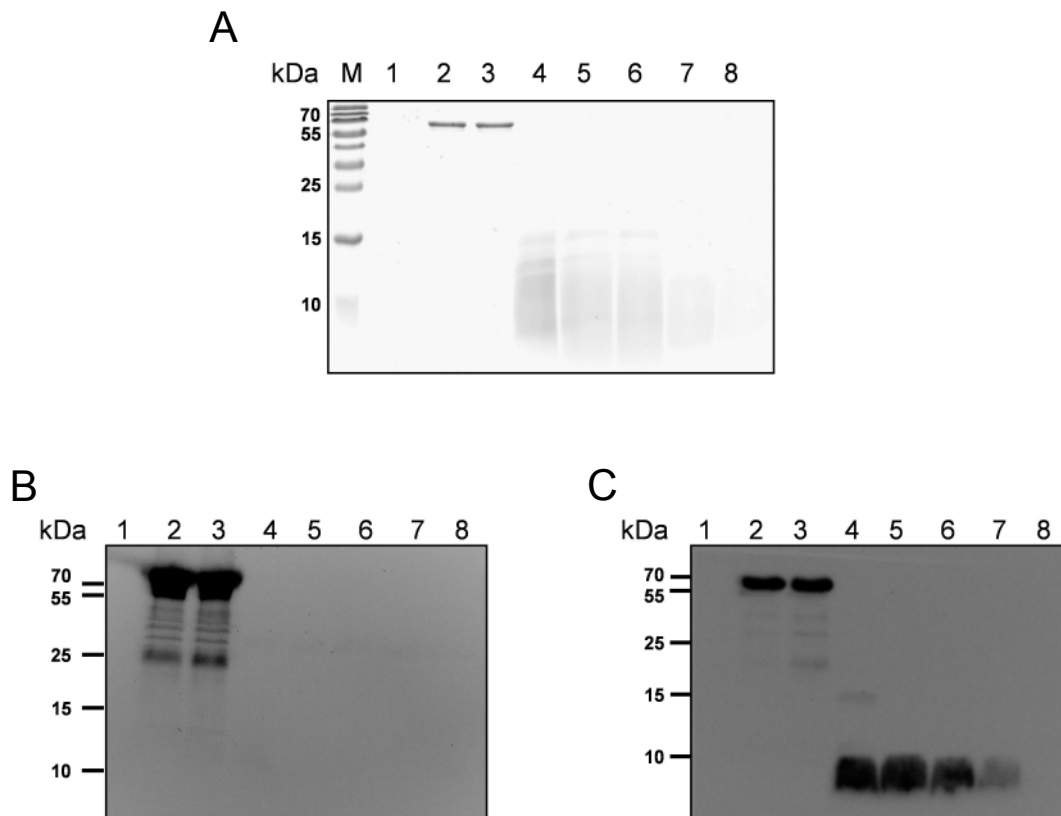


Abbildung 30: Coomassie-gefärbte Gele und Immunoblots zur Analyse des proteolytisch verdauten Cyt b_6 .

Die Hydrolyse von rekonstituiertem Cyt b_6 durch Proteinase K wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Proben wurden entnommen und äquivalente Mengen in einem 18%igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie gefärbt (A) und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit anti-Peptid-Antikörpern gerichtet gegen den N- bzw. C-Terminus von Cyt b_6 (Abbildung B bzw. C). Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Spur 1: Proteinase K, Spur 2: Negativkontrolle: 5-stündige Inkubation von Cyt b_6 unter Versuchsbedingungen ohne Zugabe von Proteinase K, Spur 3: Cyt b_6 vor dem Verdau, Spur 4: 10 min Verdau, Spur 5: 30 min Verdau, Spur 6: 1 h Verdau, Spur 7: 2 h Verdau, Spur 8: 5 h Verdau. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

sche Analysen ergaben, durch Proteinase K hydrolysiert (siehe Tabelle 17 im Anhang). Das intakte Volllängen-Cyt b_6 wurde, ebenso wie im Coomassie-gefärbten Gel, von beiden Antikörpern in den Proben des verdauten Cyt b_6 nicht detektiert. Fünf Stunden nach Protease-Zugabe konnten keine Protein-Fragmente mehr mittels Coomassie bzw. durch Cyt b_6 -spezifische Antikörper nachgewiesen werden, aber Absorptionsspektren mit charakteristischen Holo-Cyt b_6 Maxima gemessen werden. Um die Fragmente, die nach der Proteolyse Häm binden, näher charakterisieren zu können, wurden sie gemeinsam mit Häm über eine Größenausschlusschromatographie von den restlichen Fragmenten isoliert. Dazu wurde rekonstituiertes Cyt b_6 einem fünfstündigen Verdau mit Proteinase K un-

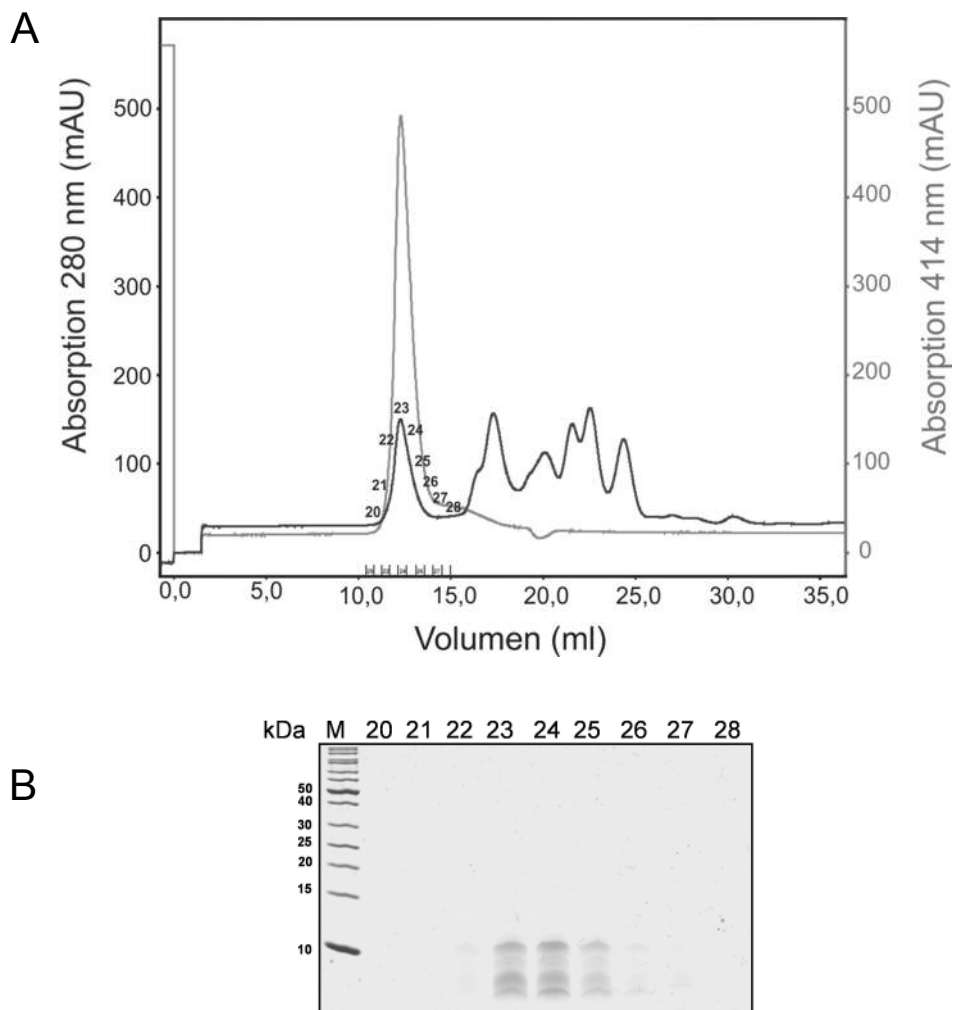


Abbildung 31: Gelfiltrationschromatographie (A) und SDS-PAGE-Analyse (B) des proteolytisch verdauten Cyt b_6 .

Das Elutionsdiagramm der Gelfiltration über eine „Superose™ 12 10/300 GL“-Säule (GE Healthcare) ist unter (A) zu sehen. Es wurden 0,5 mg des mit Proteinase K inkubierten Cyt b_6 in einem Volumen von 0,5 ml auf die Säule geladen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mit 50 mM Tris-Puffer pH 8 mit 50 mM NaCl und 1 mM DDM. Im Chromatogramm sind die Absorption bei 280 nm (aromatische Proteine) und bei 414 nm (Häm) zu sehen. Es wurde je 1 ml der gesammelten Elutionsfraktionen mit TCA gefällt, mittels SDS-PAGE in einem 18%igen Gel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt (B). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht der Nummerierung der gesammelten Elutionsfraktionen, die im Chromatogramm angegeben sind. M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

terzogen und anschließend mit Hilfe einer präparativen Gelfiltration aufgetrennt. Es wurde eine „Superose™ 12 10/300 GL“-Säule verwendet und die Absorption während der Auftrennung bei 280 und 414 nm verfolgt. Über die Absorption bei 280 nm, bei der aromatische Aminosäuren absorbieren, wurde die Elution der Fragmente und über die Absorption bei 414 nm die Elution des Häms verfolgt. Im Chromatogramm der Gelfiltration zeigen die Absorptionen bei 414 nm und 280 nm gleichzeitig einen Peak (Abbildung 31 A). Die Frak-

tionen dieses Elutionspeaks wurden nach einer Proteinfällung mittels Trichloressigsäure, in einer SDS-PAGE untersucht. Im Coomassie-gefärbten Gel sind Proteinfragmente mit einem Molekulargewicht von 5 bis 10 kDa sichtbar (Abbildung 31 B). Um diese Fragmente eindeutig zu identifizieren, wurde eine massenspektroskopische Untersuchung in Zusammenarbeit mit Dr. XXX (Universität Mainz, Institut für Immunologie) durchgeführt. In den analysierten Elutionsfraktionen konnten alle vier Cyt b_6 TM-Helices nachgewiesen werden, die nicht mehr durch *Loops* verbunden waren. Die identifizierten Fragmente bestehen aus jeweils einer TM-Helix und einigen Aminosäuren der flankierenden *Loops*. Die Hydrolyse durch Proteinase K erfolgte in den *Loop*-Regionen, so dass die Helices A-D wie erwartet intakt blieben, aber nicht mehr miteinander verbunden waren. Es wurden nur die wasserlöslichen Bereiche des Cyt b_6 , bestehend aus dem MBP und den interhelikalen *Loops* hydrolysiert. Eine detaillierte Auflistung der identifizierten Proteinfragmente befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cyt b_6 TM-Helices durch die Detergenzmizelle vor der Proteolyse geschützt sind. Die TM-Helices sind nach der Proteolyse nicht mehr über interhelikale *Loops* miteinander verbunden, bleiben aber mit dem Häm assembliert.

3.2.6 Untersuchung der Häm-Bindung an synthetisierten transmembranen Cytochrom b_6 Peptiden

Da die zuvor gezeigten Ergebnisse des proteolytisch degradierten Cyt b_6 darauf hindeuten, dass schon die isolierten Helices von Cyt b_6 Häm binden können, wurde untersucht, ob einzelne, synthetisch hergestellte Cyt b_6 TM-Helices mit Häm assemblieren können. Zu diesem Zweck wurden TM-Peptide mit den Sequenzen der vier Cyt b_6 Helices A bis D synthetisch hergestellt (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg). Die Peptide sollten solubilisiert und mit Häm versetzt werden, um die mögliche Assemblierung mit Häm spektroskopisch verfolgen zu können. Das Solubilisieren der hydrophoben TM-Peptide stellt eine große Herausforderung dar, da Bedingungen gewählt werden müssen, die eine effiziente Häm-Bindung und gleichzeitig eine Solubilisierung der Peptide ermöglicht. Untersuchungen mit dem wildtypischen, an MBP fusionierten Cyt b_6 ergaben, dass das milde nicht-ionische Detergenz DDM am besten für die Assemblierung mit Häm geeignet ist. In stärker denaturierenden Detergenzien war eine Rekonstitution deutlich erschwert (Prodohl *et al.*, 2007). Aus diesem Grund, und um vergleichbare Bedingungen zu den voran gegangenen Versuchen zu schaffen, wurde für das Solubilisieren der vier TM-Peptide DDM verwendet. Der Erfolg des Solubilisierens wurde mit Hilfe der Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie verfolgt. Von den vier TM-Peptiden konnte lediglich das Peptid

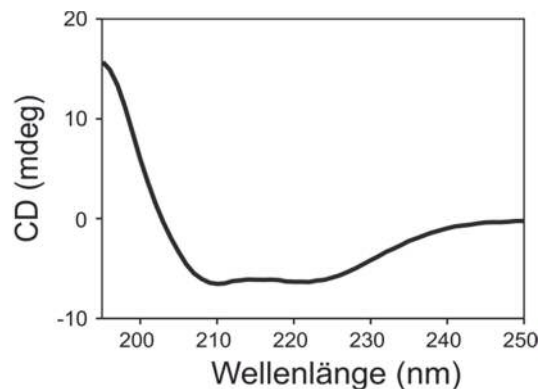


Abbildung 32: CD-Spektrum der Cyt b_6 TM-Helix B.

Für die Messung wurden 50 μ M des synthetisierten Peptids mit der Sequenz der TM-Helix B von Cyt b_6 in DDM-Phosphatpuffer (5 mM DDM) gelöst. Das Spektrum zeigt die für α -helikale Strukturen charakteristischen negativen Banden bei 208 und 222 nm. Es wurde ein α -helikaler Anteil von 58,4% bestimmt.

mit der Helix B-Sequenz in DDM solubilisiert werden. Das CD-Spektrum des Peptids zeigt zwei charakteristische Minima bei 208 und 222 nm, die für eine vorwiegend α -helikale Struktur sprechen (Abbildung 32). Mit Hilfe der mittleren molaren Elliptizität bei 222 nm konnte ein α -helikaler Anteil von 58,4% ermittelt werden (Formel 1). Mit Hilfe des Programms TMHMM 2.0 wurde der TM-Bereich des Peptids ermittelt. Anhand dieser Vorhersage wurde ein α -helikalen Anteil von 62% erwartet, der mit dem experimentell ermittelten Wert annähernd übereinstimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Peptid mit der Helix B-Sequenz solubilisiert wurde und α -helikal vorliegt. Da Helix B zwei Häm-ligierenden Histidine enthält, wurde untersucht, ob dieses Peptid alleine Häm binden kann. Der Kofaktor wurde zum solubilisierten Peptid gegeben und Absorptionsspektren unter reduzierenden Bedingungen aufgenommen (Abbildung 33). Das Spektrum zeigt eine deutliche Rotverschiebung der Soret-Bande um 8 nm im Vergleich zum Spektrum des freien Häms. Das Maximum liegt jedoch bei 425 nm und nicht, wie bei Koordination im Cyt b_6 zusehen, bei 429 nm. Die α - und β -Bande zeigen die charakteristischen Maxima, haben aber eine schwache Intensität. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine sechsfache Koordination der Kofaktoren stattfindet, diese jedoch schwach ausgeprägt ist. Unter oxidierenden Bedingungen konnte keine Interaktion zwischen Häm und dem Peptid beobachtet werden. Das Peptid mit der Sequenz der Helix B ist in der Lage mit dem Kofaktor zu interagieren, jedoch ist die Bindung des Häms nicht so effizient wie im wildtypischen Cyt b_6 . Auch ist die Bindung des Häms von Cyt b_6 AB alleine effizienter als nur von Helix B (vergleiche 3.2.5).

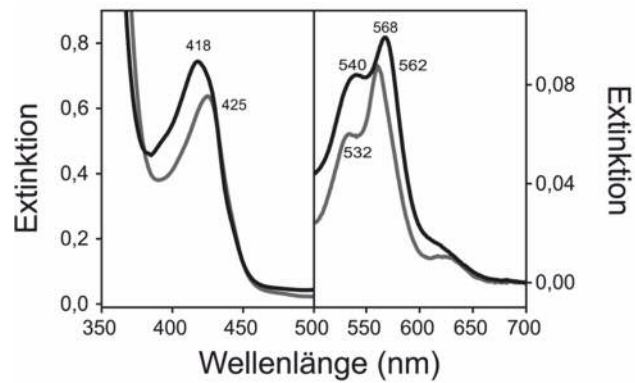


Abbildung 33: UV/VIS-Spektren von freiem Häm (schwarz) und nach Helix B-Zugabe (grau).

Das synthetisch hergestellte TM-Peptid mit der Sequenz der Cyt b_6 Helix B wurde in DDM gelöst, mit Häm versetzt und Absorptionsspektren unter reduzierenden Bedingungen aufgenommen. Im Vergleich zum Spektrum des freien Häms ist eine deutliche Rotverschiebung der Soret-Bande (Maximum bei 425 nm) im Spektrum des an das TM-Peptid gebundenen Häms zu sehen. Die rechte Hälfte zeigt eine vergrößerte Ansicht der typischen α - und β -Banden bei 562 und 532 nm.

3.3 Untersuchungen zur Spezifität der Häm-Bindung

Chlorophylle und Häme gehören zur Stoffklasse der Tetrapyrrole, deren Biosynthese über identische Zwischenstufen abläuft. Da Chlorophylle und Häme eine strukturelle Ähnlichkeit besitzen und es zu keiner räumlichen Trennung von Häm und Chlorophyll nach der Synthese kommt, stellt sich die Frage, wie Pflanzen eine spezifische Bindung von Häm an Apo-Cyt b_6 gewährleistet und die Bindung von Chlorophyll oder Chlorophyll-Vorstufen verhindern. Im Folgenden wurden strukturelle Merkmale des Häms, die für die spezifische Bindung an Apo-Cyt b_6 notwendig sind, untersucht.

3.3.1 Bindungsverhalten von Chlorophyll a an Apo-Cytochrom b_6

Zunächst wurde eine mögliche Bindung von Chlorophyll a an Apo-Cyt b_6 untersucht. Apo-Cyt b_6 wurde wie unter 3.1.1 beschrieben heterolog exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Nach dem Austausch des SDS gegen DDM wurde Apo-Cyt b_6 mit Chlorophyll a versetzt und Absorptionsspektren aufgenommen. Die Absorptionsspektren des freien Chlorophyll a zeigen Maxima bei 378, 416, 439, 588, 626 und 671 nm (Abbildung 34, Tabelle 15). Nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 ist keine Veränderung der Absorptionsmaxima zu beobachten. Die spektroskopischen Eigenschaften des Chlorophylls haben sich nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe nicht verändert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es zu keiner spezifischen Interaktion zwischen Apo-Cyt b_6 und Chlorophyll a kam. Um zu bestä-

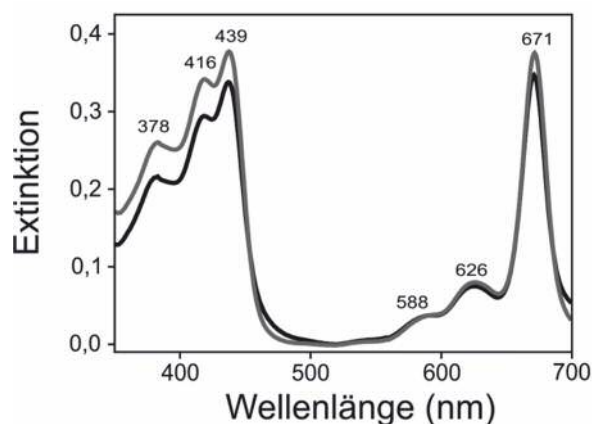


Abbildung 34: UV/VIS-Spektren von freiem Chlorophyll a (schwarz) und nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 (grau).

Zur Untersuchung der Bindung von Chlorophyll a an Apo-Cyt b_6 , wurden Absorptionsspektren unter oxidierenden Bedingungen aufgenommen. Da beide Absorptionsspektren identische Maxima zeigen, kam es *in vitro* nicht zur Bindung des Kofaktors durch Apo-Cyt b_6 . (In Zusammenarbeit mit Cornelia Schätzkel erstellt.)

Tabelle 15: Absorptionsmaxima mit den entsprechenden Halbwertsbreiten der freien Protoporphyrin IX-Derivate (ohne Cyt b₆) und nach Zugabe von Apo-Cyt b₆ (mit Apo-Cyt b₆).

Für das Soret-Maximum jedes Absorptionsspektrums ist die Halbwertsbreite FWHM (*full width at half maximum*) angegeben. Die Absorptionsmaxima und die FWHM-Werte wurden durch Gauß'schen Dekonvolution des jeweiligen Soret-Peaks mit Hilfe des Programms PeakFit (Systat Software, Inc.) ermittelt. Protoporphyrin IX-Derivate, die von Apo-Cyt b₆ gebunden werden, sind fett hervorgehoben. Die Absorptionsmaxima und FWHM-Werte des Häms beziehen sich auf Abbildung 18 und Abbildung 35.

Porphyrin	Redox-zustand	ohne Apo-Cyt b ₆		mit Apo-Cyt b ₆	
		Maximum (nm)	FWHM (nm)	Maximum (nm)	FWHM (nm)
Fe-Protoporphyrin IX (Häm)	oxidiert	405	32,7	414	26
		606		531	
				562	
	reduziert	418	39,8	429	22
		541		532	
		569		562	
Chlorophyll a	oxidiert	378	40,1	378	39
		416	24,3	416	23,8
		439	24,7	439	23,4
		588	36,4	590	35,5
		626	32,5	627	32,6
		671	25,7	671	24,5
Protoporphyrin IX	oxidiert	408	38,2	408	39
		506		506	
		541		541	
		578		578	
		632		632	
Mg-Protoporphyrin IX	oxidiert	419	23,7	419	23,3
		551		551	
		588		588	
Fe-Deuteroporphyrin IX	oxidiert	395	33,5	401	33
		478		520	
		592			
	reduziert	408	34,3	411	33,8
		520		525	
		554		549	
Fe-Protoporphyrin-IX-dimethylester	oxidiert	401	22,5	409	23
		571		522	
		602			
	reduziert	409	39,9	425	21,7
		569		530	
		606		559	

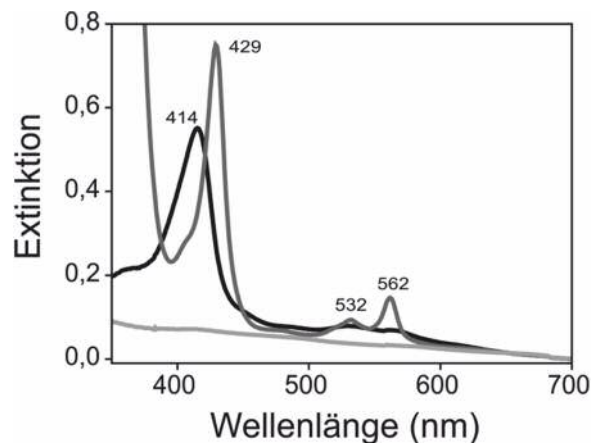


Abbildung 35: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der Bindung von Chlorophyll a bzw. Häm an Apo-Cyt b_6 .

Chlorophyll a bzw. freies Häm wurden zu gereinigtem Apo-Cyt b_6 gegeben und ein weiteres Mal mittels Ni-NTA gereinigt. Anhand der Absorptionsspektren des Eluats, soll untersucht werden, ob Häm bzw. Chlorophyll a an Apo-Cyt b_6 bindet und zusammen mit dem Protein eluiert. Die Absorptionsspektren des Eluats nach Häm-Zugabe zeigen unter oxidierenden (schwarz) und reduzierenden (dunkelgrau) Bedingungen die charakteristischen Absorptionsmaxima des Holo-Cyt b_6 . Das Eluat nach Chlorophyll a-Zugabe zeigte kein Absorptionsspektrum (hellgrau). Häm wurde, im Gegensatz zu Chlorophyll a, von Apo-Cyt b_6 gebunden und eluierte zusammen mit dem Protein von der Säule. (In Zusammenarbeit mit Cornelia Schätzel erstellt.)

tigen, dass Chlorophyll a nicht von Apo-Cyt b_6 gebunden wird, wurden Chlorophyll a und Häm in getrennten Ansätzen zu gereinigtem Apo-Cyt b_6 gegeben und erneut mit Ni-NTA inkubiert. Nach Elution des Cyt b_6 wurde mittels Absorptionsspektroskopie analysiert, ob die Kofaktoren von Apo-Cyt b_6 gebunden wurden und gemeinsam mit dem Protein eluierten. Das Absorptionsspektrum des eluierten Apo-Cyt b_6 , zu dem vor Inkubation mit Ni-NTA Häm gegeben wurde, zeigt unter oxidierenden Bedingungen eine Soret-Bande bei 414 nm. Unter reduzierenden Bedingungen liegen die Maxima bei 429, 532 und 562 nm (Abbildung 35). Erwartungsgemäß wurde Häm von Apo-Cyt b_6 gebunden und eluierte zusammen mit dem Protein von der Säule. Das eluierte Apo-Cyt b_6 , zu dem Chlorophyll a gegeben wurde, zeigt kein Absorptionsspektrum. Weder freies noch gebundenes Chlorophyll a befand sich im Eluat. Es kam somit zu keiner Interaktion zwischen Chlorophyll a und Apo-Cyt b_6 . Dieses Ergebnis bestätigt, dass Apo-Cyt b_6 Chlorophyll a nicht binden kann.

3.3.2 Einfluss des zentralen Eisen-Ions auf die Bindung des Häms an Apo-Cytochrom b_6

Die Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 wurde näher charakterisiert. Dazu wurde die Bindung von Protoporphyrin IX-Derivaten, die sich im Zentralatom von Häm unterscheiden, an Apo-Cyt b_6 untersucht. Protoporphyrin IX besitzt im Gegensatz zu Häm kein zentrales Metallion. Das Absorptionsspektrum des freien Protoporphyrin IX zeigt Absorptionsmaxima bei 408, 506, 541, 578 und 632 nm (Abbildung 36, A). Heterolog exprimiertes, gereinigtes und rückgefaltetes Apo-Cyt b_6 wurde zu Protoporphyrin IX gegeben und untersucht, ob eine Interaktion zwischen dem Porphyrin und Apo-Cyt b_6 stattfindet. Nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 ist keine Veränderung im Absorptionsspektrums zu beobachten. Sowohl die Absorptionsmaxima als auch die Halbwertsbreiten der Absorptionsbanden bleiben unverändert (Tabelle 15). Die Halbwertsbreiten dienen der qualitativen Beurteilung der Absorptionsspektren. Je schmaler der Absorptionspeak ist, desto definierter ist die Proteinumgebung in der sich der Häm-Kofaktor befindet. Ist keine Veränderung der Halbwertsbreite zu beobachten, kommt es nicht zu einer Interaktion zwischen dem Porphyrin und Cyt b_6 . Folglich kam es nicht zu einer Veränderung der Umgebung des Protoporphyrin IX und damit nicht zur Bindung des Porphyrins durch Apo-Cyt b_6 . Aus dieser Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass die Koordination des Metallions durch die Histidine entscheidend für die Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 ist. Um zu untersuchen, ob die Art des

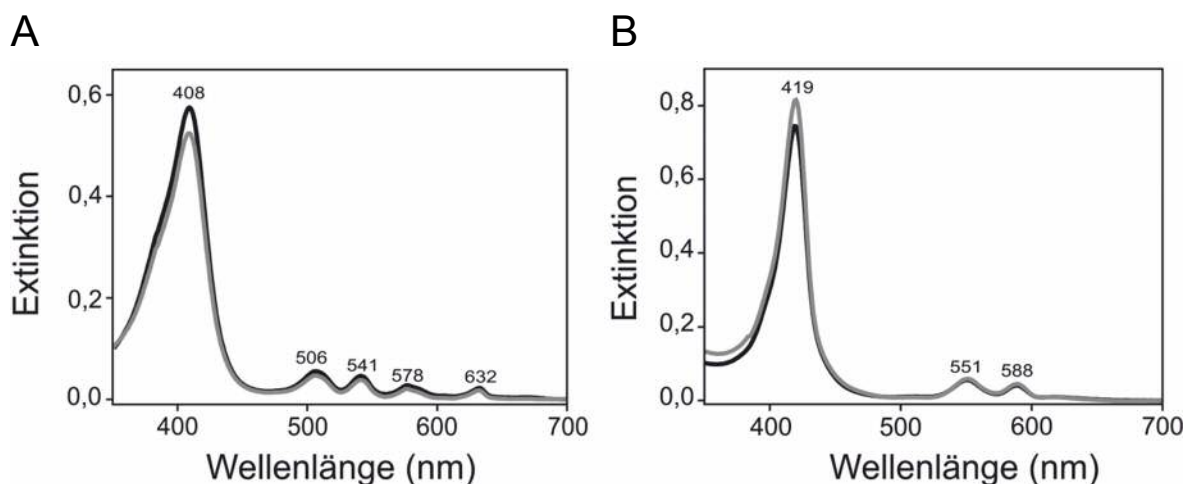


Abbildung 36: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der Bindung von Protoporphyrin IX (A) und Mg-Protoporphyrin IX (B) an Apo-Cyt b_6 .

Absorptionsspektren der freien Protoporphyrin IX-Derivate (schwarz) und der Porphyrine nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 (grau) zeigen unter oxidierenden Bedingungen identische Absorptionsbanden. Da sich die spektroskopischen Eigenschaften der Porphyrine nicht verändern, liegen sie nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe frei vor. Eine Bindung der Porphyrine durch Apo-Cyt b_6 fand nicht statt. (In Zusammenarbeit mit Cornelia Schätzkel erstellt.)

gebundenen Metallions ausschlaggebend für die Bindung ist, wurde Mg-Protoporphyrin IX, ein Zwischenprodukt der Chlorophyll-Biosynthese, untersucht. Mg-Protoporphyrin IX unterscheidet sich strukturell im Vergleich zu Häm nur im zentralen Magnesium-Ion. Die Absorptionsmaxima des freien Mg-Protoporphyrin IX liegen im oxidierten Zustand bei 419, 551 und 588 nm. Nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 ist keine Veränderung der Absorptionsmaxima und Halbwertsbreiten der Absorptionspeaks zu erkennen (Abbildung 36 B, Tabelle 15). Diese Ergebnisse zeigen, dass es nicht zu einer Interaktion zwischen dem Mg-Proto-porphyrin IX und Apo-Cyt b_6 kam. Des Weiteren wurden Protoporphyrin IX-Derivate mit Zink und Mangan als Zentralatom analysiert. Diese Protoporphyrin IX-Derivate wurden ebenfalls nicht von Apo-Cyt b_6 gebunden (siehe Abbildung 45 und Tabelle 16 im Anhang). Diese Ergebnisse zeigen, dass das zentrale Eisen-Ion essentiell für die Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 ist. Ein Austausch des Eisen-Ions oder das Entfernen des zentralen Metallions unterbindet die Koordination des Protoporphyrins durch die Histidine und dadurch dessen Bindung an Apo-Cyt b_6 .

3.3.3 Einfluss der Ethylen- und Propionylseitenketten auf die Bindung des Häms an Apo-Cytochrom b_6

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das zentrale Eisen Ion eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 spielt. Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss der Tetrapyrrol-Seitenketten auf die Bindung des Häms analysiert. Dazu wurden Protoporphyrin IX-Derivate eingesetzt, deren Substituenten am Tetrapyrrolring modifiziert sind. Mittels Absorptionsspektroskopie wurde die Interaktion der Porphyrine mit Apo-Cyt b_6 untersucht. In Fe-Deuteroporphyrin IX sind die Ethylengruppen der Ringe A und B gegen Wasserstoffatome ausgetauscht (Abbildung 37). Unter oxidierenden Bedingungen sind im Absorptionsspektrum des freien Fe-Deuteroporphyrin IX ein Soret-Maximum bei 395 nm und Absorptionsbanden bei 478 und 592 nm zu erkennen (Abbildung 38 A, Tabelle 15). Nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe ist eine deutliche Intensitätszunahme und Rotverschiebung des Soret-Maximums um 6 nm zu beobachten. Außerdem ist keine α -Bande bei 592 nm zu sehen, sondern nur eine β -Bande bei 520 nm. Unter reduzierenden Bedingungen ist eine Intensitätszunahme und eine Rotverschiebung des Soret-Maximums nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe von 3 nm zu beobachten (Abbildung 38 B). Zudem verändern sich die Maxima der α - und β -Banden von 520 und 552 nm des freien Porphyrins zu 525 und 549 nm nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe (Tabelle 15). Im Redoxdifferenzspektrum des freien Porphyrins ist eine breite Bande im Bereich von 500 bis 580 nm ohne ein definiertes Maximum zu sehen, während nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe eine Absorptionsbande bei 549 nm sichtbar wird

(Insert in Abbildung 38 B). Sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen verschmälert sich die Soret-Bande nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe, was auf eine veränderte Umgebung durch die Koordination des zentralen Eisen-Ions hindeutet (Tabelle 15). Die veränderten spektroskopischen Eigenschaften des Fe-Deuteroporphyrin IX nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 zeigen, dass es ohne die Ethylensubstituenten des Porphyrinrings zu einer spezifischen Interaktion zwischen dem Porphyrin und Apo-Cyt b_6 kommt. Somit scheinen die Ethylengruppen für die Bindung des Häms nicht essentiell zu sein.

Interaktionen zwischen den negativ geladenen Propionylseitenketten des Häms und positiv geladenen benachbarten Aminosäuren können eine wichtige Rolle bei der Bindung des Kofaktors spielen. Um diese Interaktionen näher zu analysieren, wurde die Bindung von Fe-Protoporphyrin-IX-dimethylester untersucht. Dieses Protoporphyrin IX-Derivat

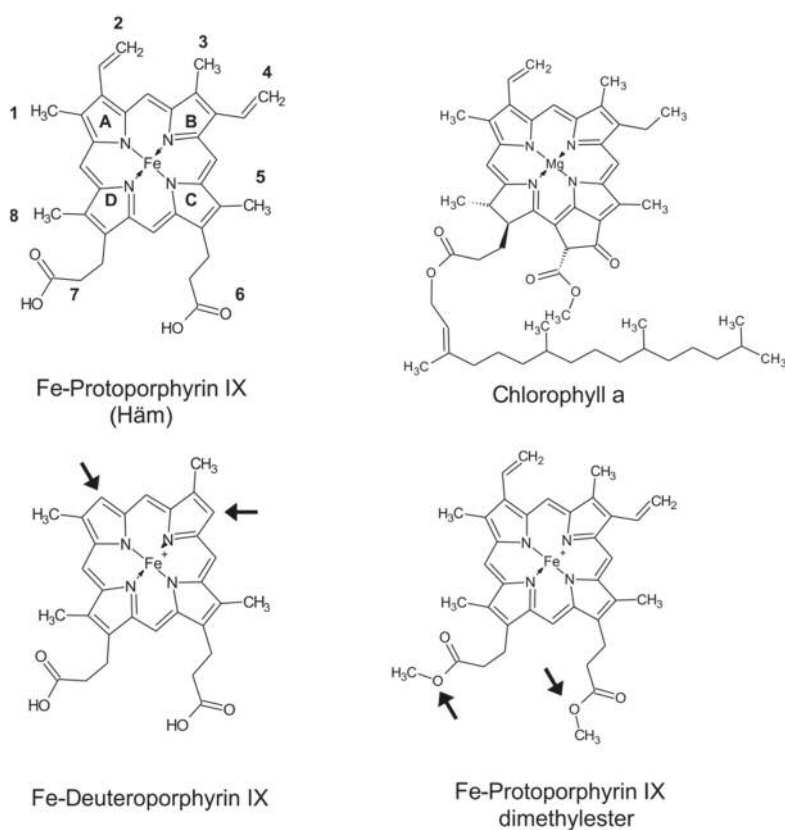


Abbildung 37: Strukturformeln von Häm, Chlorophyll a und den verwendeten Protoporphyrin IX-Derivaten.

Die Pfeile markieren die modifizierten Seitenketten im Vergleich zu Häm. In Fe-Deuteroporphyrin IX wurden die Ethylengruppen an Position 2 und 4 durch Wasserstoffatome substituiert. Fe-Protoporphyrin IX dimethylester ist an den Propionylgruppen der Ringe C und D mit Methylgruppen verestert.

besitzt im Vergleich zu Häm veresterte Propionylgruppen an den Ringen C und D, wodurch eine elektrostatische Wechselwirkung mit benachbarten Aminosäuren verhindert wird (Abbildung 37). Unter oxidierenden Bedingungen zeigt das Absorptionsspektrum des Porphyrins nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe eine Verschiebung der Soret-Bande um 8 nm im Vergleich zum freien Porphyrin (Abbildung 38 C). Weitere Absorptionsmaxima des freien Porphyrins liegen bei 571 und 602 nm. Nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe ist die Absorptionsbande bei 602 nicht mehr zu sehen, sondern nur ein Maximum bei 522 nm (Tabelle 15). Unter

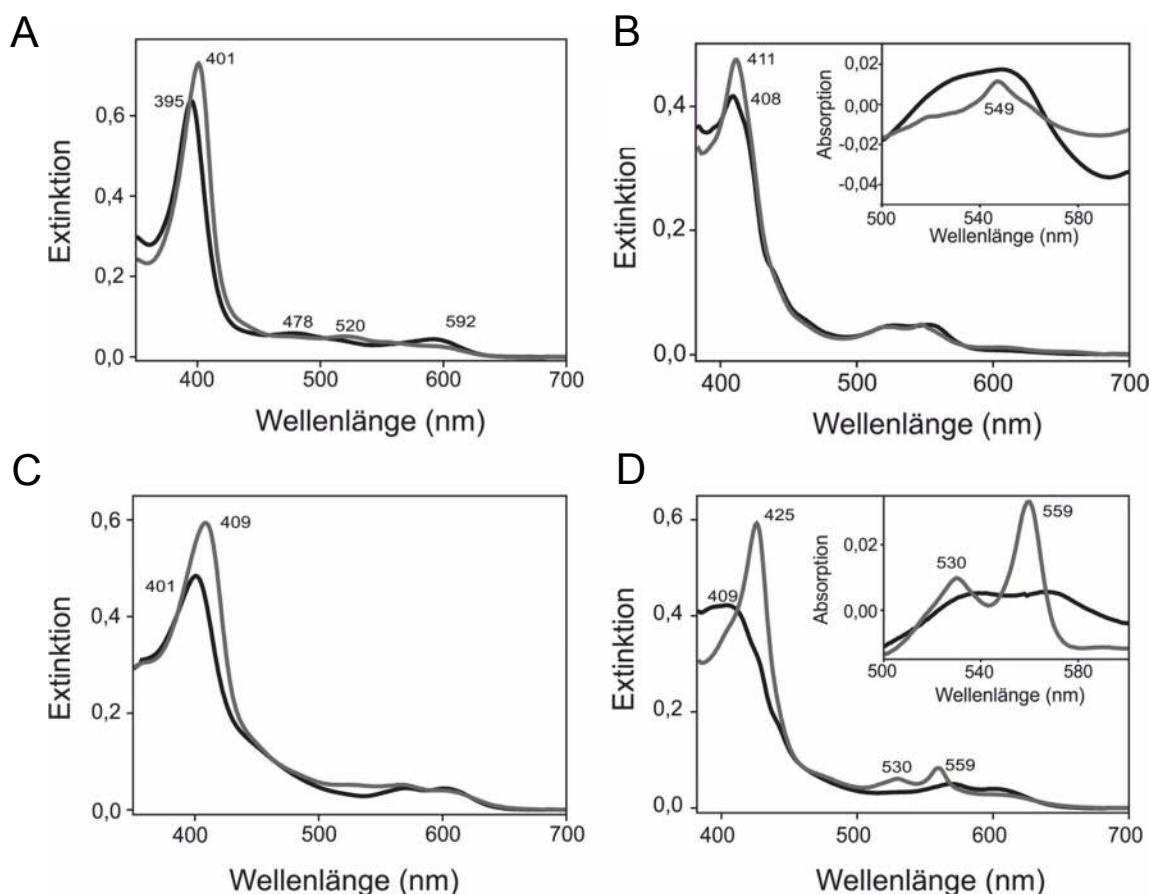


Abbildung 38: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der Bindung von Protoporphyrin IX-Derivaten mit veränderten Seitenketten an Cyt b_6 .

Verglichen werden die Absorptionsspektren der freien Porphyrine (schwarz) und der Porphyrine nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 (grau). Die *Inserts* in B und D zeigen die Redoxdifferenzspektren. Unter oxidierenden Bedingungen zeigt die Soret-Bande des Absorptionsspektrums des freien Fe-Deuteroporphyrin IX ein Maximum bei 395 nm, das nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe zu 401 nm verschoben ist (A). Unter reduzierenden Bedingungen kommt es zu einer Verschiebung der Soret-Bande von 408 zu 411 nm (B). Im Redoxdifferenzspektrum ist nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe ein Maximum bei 549 zu sehen (*Insert* in Abbildung B). Die Absorptionsspektren von Fe-Protoporphyrin IX dimethylester zeigen unter oxidierenden Bedingungen eine Verschiebung der Soret-Bande von 401 zu 409 nm (C). Unter reduzierenden Bedingungen zeigt das Absorptionsspektrum des freien Porphyrins eine breite Bande bei etwa 409 nm (D). Nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe ist ein deutliches Absorptionsmaximum bei 425 nm zu sehen sowie zwei ausgeprägte Absorptionsbanden bei 530 und 559 nm, die auch im Redoxdifferenzspektrum zu sehen sind. (In Zusammenarbeit mit Cornelia Schätzel erstellt.)

reduzierenden Bedingungen sind eine breite Bande zwischen 400 und 409 nm und Absorptionsmaxima bei 606 und 569 nm im Absorptionsspektrum des freien Porphyrins zu sehen (Abbildung 38 D). Nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe ist ein deutlich definiertes Soret-Maximum bei 425 nm zu beobachten, so wie eine Verschiebung der α - und β -Banden zu 559 und 530 nm hin. Die Intensität der Soret-Bande nimmt sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe zu, wobei die Halbwertsbreiten unverändert bleiben (Tabelle 15). Im Redoxdifferenzspektrum ist ebenfalls eine deutliche Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften des Fe-Protoporphyrin IX dimethylesters zu sehen. Während das Redoxdifferenzspektrum des freien Porphyrins keine definierten Maxima zeigt, sind nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe zwei deutlich ausgeprägte Maxima bei 559 und 530 nm zu sehen. Die deutlichen Unterschiede zwischen den Absorptionsspektren des freien Fe-Protoporphyrin IX dimethylesters und des Porphyrins nach Apo-Cyt b_6 -Zugabe, lassen auf eine spezifische Interaktion zwischen dem Porphyrin und Apo-Cyt b_6 schließen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Propionylgruppen und geladenen Aminosäuren sind, ebenso wie Interaktionen der Ethylengruppen, für die Häm-Bindung nicht absolut essentiell. Um die Bindung der Proto-

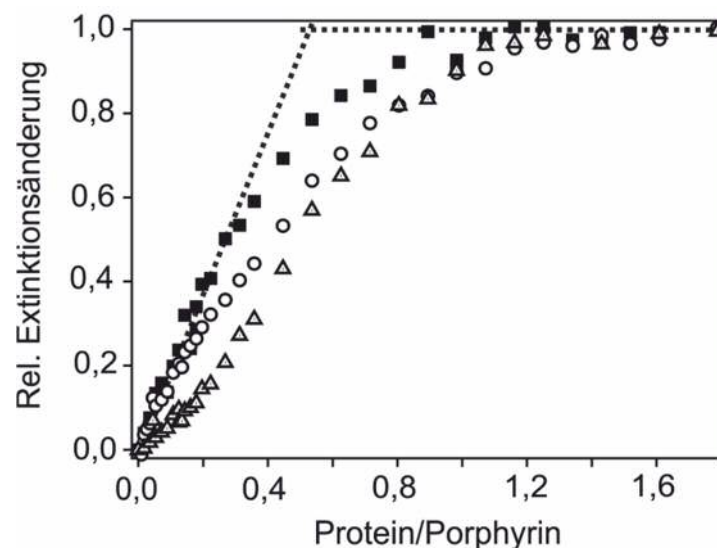


Abbildung 39: Titration von Protoporphyrin X-Derivaten mit Apo-Cyt b_6 zur Untersuchung des Porphyrin-zu-Protein Bindungsverhältnisses.

Zunehmende Mengen von Apo-Cyt b_6 wurden zu 5 μ M Häm (Quadrate), Fe-Deuteroporphyrin IX (Kreise) bzw. Fe-Protoporphyrin IX dimethylester (Dreiecke) titriert. Das Protein-zu-Porphyrin-Verhältnis wurde gegen die relative, normierte Absorptionsänderung der Soret-Bande aufgetragen. Die relative Absorptionsänderung stellt den Quotienten aus der Intensität der Soret-Bande des gebundenen Porphyrins und der Intensität der Soret-Bande des freien Porphyrins des jeweiligen Absorptionsspektrums dar. (In Zusammenarbeit mit Cornelia Schätzel erstellt.)

porphyrin IX-Derivate mit veränderten Seitenketten an Apo-Cyt b_6 näher zu charakterisieren, wurden Titrationsexperimente durchgeführt. Zunehmende Mengen des gereinigten Apo-Cyt b_6 wurden in individuellen Ansätzen zu gleichbleibenden Mengen an Porphyrin titriert und Absorptionsspektren aufgenommen. Die relative Absorptionsänderung der Soret-Bande des jeweiligen Porphyrins wurde gegen das Protein-zu-Porphyrin-Verhältnis aufgetragen. Eine Auswertung der Titrationsen unter reduzierenden Bedingungen war nicht möglich, da das Reduktionsmittel Natriumdithionit dazu neigt die Porphyrine zu degradieren, wodurch es zur Streuung der Werte kommt (Knipp *et al.*, 2011). Abbildung 39 zeigt die Titrationsen von Fe-Deuteroporphyrin IX und Fe-Protoporphyrin IX dimethylesters im Vergleich zur Titration von Häm. Ab einem Protein-zu-Häm-Verhältnis von 0,5, zeigt die Titrationskurve des Häms keine Zunahme der relativen Absorptionsänderung der Soret-Bande mehr. Apo-Cyt b_6 bindet, wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, zwei Häme pro Apo-Cyt b_6 -Molekül. Das Protein-zu-Porphyrin-Verhältnis, bei dem eine Sättigung der Titrationskurve eintritt, liegt im Fall von Fe-Deuteroporphyrin IX und Fe-Protoporphyrin IX dimethylester in etwa bei eins. Diese Ergebnisse zeigen, dass pro Apo-Cyt b_6 Molekül statistisch gesehen nur ein Porphyrin-Molekül gebunden wird. Da es sich bei der Bindung der Kofaktoren an Apo-Cyt b_6 um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, ist im Falle der Protoporphyrin IX-Derivate das Gleichgewicht in Richtung der freien Porphyrine verschoben. Im Vergleich zur Titration des Häms, wird mehr Protein benötigt um das Gleichgewicht auf die Seite der gebundenen Porphyrine zu verschieben. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von Fe-Deuteroporphyrin IX und Fe-Protoporphyrin IX dimethylester durch Apo-Cyt b_6 schwächer ist als die Bindung des Häms. Außerdem zeigt die Titrationskurve des Fe-Protoporphyrin IX dimethylesters einen sigmoidalen Verlauf, was auf eine kooperative Bindung des Porphyrins hinweisen könnte. Obwohl die Ethylen- und Propionylseitenketten nicht essentiell für die Bindung des Häms zu sein scheinen, tragen sie zur Stabilität der Häm-Bindung bei.

4 Diskussion

4.1 Cytochrom b_6 als transmembranes Modellprotein

Der Vorgang der Faltung und Assemblierung TM Proteine ist bislang nicht vollständig verstanden worden. Der Grund dafür ist der hydrophobe Charakter der MP, der das experimentelle Arbeiten besonders erschwert. Für *in vitro* Untersuchungen zur Faltung von MP mittels biochemischer oder biophysikalischer Methoden sind Proteinmengen im Milligramm-Maßstab erforderlich. Für die Gewinnung solcher Mengen eignet sich, aufgrund des schnellen Wachstums unter kostengünstigen Kultivierungsbedingungen, die heterologe Expression in bakteriellen Organismen, wie z. B. in *E. coli*. Die Expression von MP ist jedoch oft toxisch für den Wirtsorganismus, so dass die Expressionsrate niedrig oder die Expression unmöglich ist (Terpe, 2006). Durch Fusionierung der hydrophoben Proteine an größere, wasserlösliche Proteine, wie z. B. das Maltose-Bindeprotein (MBP), kann die Expression in hohem Maße gesteigert werden (Sorensen und Mortensen, 2005). Exprimierte MP, die nicht in die Membran inseriert werden, reichern sich in Einschlusskörperchen an und sind dadurch nicht länger toxisch für die Zelle. Jedoch liegen sie im denaturierten Zustand vor und geeignete Rückfaltungsprotokolle müssen, unter Verwendung von Detergenzien oder Lipiden, empirisch entwickelt werden. Niedrige Expressionsraten oder erfolglose Rückfaltungen sind die häufigsten Probleme, die Untersuchungen von MP erschweren oder gar unmöglich machen (Kiefer, 2003). Das in dieser Arbeit untersuchte Modellprotein Cyt b_6 aus *Spinacia oleracea* L. ist ein Membranprotein, das sich für biochemische Untersuchungen zur Faltung und Assemblierung kofaktortragender MP eignet. Das Protein besitzt einen einfachen Aufbau bestehend aus vier α -Helices, die über vier konservierte Histidine zwei Häm-Kofaktoren nicht-kovalent binden. Fusioniert an MBP, ließ sich das chimäre Protein in ausreichenden Mengen heterolog in *E. coli* exprimieren (Abbildung 16). Das denaturierte Protein lag in Einschlusskörperchen innerhalb der *E. coli* Zelle vor, wurde affinitätschromatographisch gereinigt und in dem Detergenz DDM *in vitro* rückgefaltet (Abbildung 17). Ein Vorteil von Cyt b_6 ist die spontane Bindung der beiden nicht-kovalent gebundenen Kofaktoren *in vitro*, die spektroskopisch direkt verfolgt werden kann. Der korrekte Einbau der Kofaktoren in das Apo-Cyt b_6 konnte durch spezifische Absorptionsbanden nachgewiesen werden (Abbildung 18). In der vorliegenden Arbeit wurde am Modellprotein Cyt b_6 die Rolle der interhelikalen *Loops* bei der Faltung und Assemblierung des Proteins und die strukturellen Merkmale des Häms, die die Spezifität der Häm-Bindung vermitteln, untersucht.

4.2 Einfluss der interhelikalen *Loops* auf die Faltung und Assemblierung von Cytochrom b_6

Für einige α -helikale MP wurde beobachtet, dass *Loops* eine wichtige Funktion bei der Assemblierung und Stabilisierung der Proteine ausüben (Booth *et al.*, 2001). Modifikationen der *Loops* durch Veränderung der Aminosäuresequenz, Variation der *Loop*-Länge oder deren Spaltung können nicht nur die Stabilität, sondern auch die Faltung und Funktion von MP gravierend beeinträchtigen. Die Faltung eines Membranproteins erfordert zum einen das Zusammenwirken verschiedener inter- und intramolekularer Kräfte, aber auch strukturelle Komponenten können die Faltung fördern. Ein wichtiger Schritt bei der Faltung eines Membranproteins ist die Assoziation der Helices. Diese kann durch interhelikale, nicht-kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte), Kofaktoren, Interaktionen mit der Lipid-Umgebung und durch die kovalente Verbindung der interhelikalen *Loops* vermittelt werden (Popot und Engelman, 2000). *Loops* stellen kovalente Verbindungen zwischen Helices dar und definieren durch ihre Länge und Flexibilität die Bewegungsfreiheit der einzelnen Helices. Vor allem kurze *Loops* können notwendig sein, um Helices in räumliche Nähe zu bringen und somit eine Assoziation zu begünstigen. Für ein umfassendes Verständnis des Faltungswegs eines Membranproteins ist es deshalb notwendig den Beitrag der *Loops* zur Faltung, Assemblierung und Stabilität zu verstehen.

4.2.1 Einfluss der Länge des BC-*Loops* auf die Assemblierung und Stabilität von Cytochrom b_6

4.2.1.1 Die Verlängerung des BC-*Loops* beeinträchtigt nicht die Assemblierung von Cytochrom b_6

Je zwei Helices des Cyt b_6 bilden eine *coiled coil* Struktur aus und stellen die homologen Cyt b_6 -Hälften Cyt b_6 AB und Cyt b_6 CD dar (Cramer *et al.*, 2005, Stroebel *et al.*, 2003, Esposti *et al.*, 1993). Die Hälften sind über eine Schleife, den BC-*Loop*, miteinander verbunden. Die beiden Kofaktoren befinden sich in der Häm-Bindespalte zwischen den beiden Hälften und werden jeweils von zwei Histidinen, die auf den Helices B und D lokalisiert sind, an das Protein gebunden. Zunächst wurde untersucht, ob eine Verlängerung des BC-*Loops* die Assemblierung und somit auch die Faltung des Cyt b_6 beeinflusst. Mit Hilfe der *Overlap Extension PCR* wurden fünf, zehn oder 15 Glycine in den BC-*Loop* von

Cyt b_6 inseriert, was zu einer Verdopplung, Verdreifachung bzw. Vervierfachung der Länge des BC-Loops führte. Die Aminosäure Glycin wurde aus im Folgenden erläuterten Gründen ausgewählt: Glycin kommt häufig in den Loops TM helikaler Proteine vor und zeigt beispielsweise eine starke Tendenz einen Loop innerhalb einer hydrophoben Poly-Leucin Helix zu induzieren (Monne *et al.*, 1999b, Monne *et al.*, 1999a, Jones *et al.*, 1994). Außerdem ist Glycin eine häufig vorkommende Aminosäure in Loops wasserlöslicher Proteine mit einer geringen Neigung in wässriger Umgebung α -Helices auszubilden (Chou und Fasman, 1974, Chou, 1978). Da der BC-Loop aus hydrophilen, geladenen Aminosäuren besteht, befindet er sich außerhalb der DDM-Mizelle und wird nicht von Detergenzmolekülen eingeschlossen. Dadurch sind auch die inserierten Glycine in einer wässrigen Umgebung lokalisiert. Eine Verlängerung der α -helikalen Struktur durch Insertion der Glycine kann demnach ausgeschlossen werden. Weiterhin sind, aufgrund der kleinen Seitenkette, keine Wechselwirkungen zwischen Glycinen innerhalb des Loops bzw. den Glycinen und Aminosäuren der angrenzenden Helices, welche die Assemblierung beeinflussen könnten, zu erwarten. Die Aminosäuren des BC-Loops (Lys-Lys-Pro-Arg-Glu) besitzen große Seitenketten und sind deshalb in ihrer Rotationsfreiheit im Polypeptidrückgrat eingeschränkt. Verstärkt wird die im Vergleich starre Konformation durch den heterozyklischen Prolinring, der eine freie Drehung um die C_α -N Bindung verhindert. Der minimale Platzbedarf des Wasserstoffatoms von Glycin ermöglicht eine größere sterische Flexibilität des BC-Loops. Ab einer Kettenlänge von zehn Glycinen entspricht die Bewegungsfreiheit des Poly-Glycin-Rückgrats näherungsweise der einer frei beweglichen Kette (Flory und Schimmel, 1967). Durch die Insertion der Poly-Glycin-Kette wird somit nicht nur die Distanz, sondern auch die Bewegungsfreiheit zwischen den Cyt b_6 -Hälften erhöht und deren Auswirkung auf die Assemblierung von Cyt b_6 untersucht. Die Cyt b_6 -Varianten, deren BC-Loop verlängert wurde (Cyt b_6 Gly_n-Varianten), konnten jeweils in ein Expressionsplasmid kloniert und erfolgreich heterolog in *E. coli*-Stämmen exprimiert werden (Abbildung 20 und Abbildung 44). Mit Hilfe des N-terminal angefügten deca-Histidin-Tags wurden alle drei Cyt b_6 Gly_n-Varianten affinitätschromatographisch über Ni-NTA bis zur Homogenität gereinigt (Abbildung 21 und Abbildung 44). Die Rückfaltung erfolgte durch einen Austausch des SDS gegen das milde und nicht-ionische Detergenz DDM und der Einbau des Häm wurde anhand von Absorptionsspektren verfolgt. Die Absorptionsmaxima der drei Cyt b_6 Gly_n-Varianten sind sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen identisch mit den Maxima des wildtypischen Cyt b_6 . Damit wurde nachgewiesen, dass die Cyt b_6 Gly_n-Varianten, trotz der Verlängerung des BC-Loops, Häm effizient binden können (Abbildung 22).

Eine weitere Möglichkeit die Assemblierung eines Cytochroms zu charakterisieren stellen Häm-Titrationsexperimente dar. Sie dienen der Bestimmung des Protein-zu-Häm Bindungsverhältnisses. Das Protein-zu-Häm-Verhältnis beträgt bei Cyt b_6 1:2, da ein Cyt b_6 -Molekül zwei Häm-Kofaktoren bindet. Dieses konnte experimentell bestimmt werden und bestätigt frühere Ergebnisse (Prodohl *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein-zu-Häm Bindungsverhältnis der drei Cyt b_6 Gly_n-Varianten untersucht. Die ermittelten Verhältnisse von 0,5 entsprachen den stöchiometrisch erwarteten Werten. Die Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 ist eine Gleichgewichtsreaktion. Das Gleichgewicht liegt bei einem Protein-zu-Häm-Verhältnis von 0,5 auf der Seite des gebundenen Häms. Die Häm-Titrationen zeigten, dass es durch die Verlängerung des BC-Loops nicht zu einer Verschiebung des Gleichgewichts kam. Aus den Absorptionsspektren der Holo-Cyt b_6 Gly_n-Varianten und die Häm-Titrationen ging hervor, dass die Verlängerung des BC-Loops die Assemblierung der Cyt b_6 Gly_n-Varianten nicht beeinträchtigt. Eine enge räumliche Nähe zwischen beiden Cyt b_6 -Hälften, die möglicherweise durch einen kurzen BC-Loop vermittelt wird, ist somit keine Voraussetzung für eine effiziente Häm-Bindung. Cyt b_6 toleriert eine Verdopplung, Verdreifachung und sogar eine Vervierfachung des BC-Loops ohne eine nachweisbare Beeinträchtigung der Häm-Bindung. Die erhöhte Flexibilität, die durch die Insertion der Glycine entsteht, beeinflusst die Häm-Bindung ebenfalls nicht. Aus den Häm-Titrationsexperimenten lässt sich außerdem schließen, dass die Affinität der Cyt b_6 Gly_n-Varianten zum Kofaktor im Rahmen der Meßgenauigkeit unverändert bleibt. Wäre die Affinität des Cyt b_6 nach Insertion der Glycine niedriger, dann wäre im Vergleich zum Wildtyp mehr Protein notwendig gewesen, um die gleiche Häm-Menge zu binden. Dadurch hätte sich das Protein-zu-Häm-Verhältnis zu höheren Werten verschoben.

4.2.1.2 Ein verlängerter BC-Loops stabilisiert ab einer kritischen Länge Cytochrom b_6

Zur weiteren Charakterisierung der Cyt b_6 Gly_n-Varianten wurde die Stabilität der Cytochrome *in vitro* untersucht. Eine geeignete Methode für die Untersuchung der Stabilität polytoper MP stellt die SDS-Titration dar. Dabei wird ein Membranprotein in einem nicht-ionischen Detergenz solubilisiert und schrittweise mit einem anionischen Detergenz (z. B. SDS) denaturiert (Bowie, 1997, Chen und Gouaux, 1999, Otzen, 2003). SDS bietet im Gegensatz zu anderen denaturierenden Agenzien, wie Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff, den Vorteil, dass SDS und DDM bei gleicher Acylkettenlänge gemischte Mizellen ausbilden und Untersuchungen in einer membranähnlichen Umgebung möglich sind (Otzen, 2005, Aniansson, 1974). Im Gegensatz zu wasserlöslichen Proteinen kommt es

durch die Zugabe von SDS nicht zu einem vollständigen Verlust der Sekundärstruktur des Proteins. Aufgrund der negativen Ladungen der SDS-Moleküle in der Mizelle, wird die Ausbildung der Tertiärstruktur von MP gestört (Reynolds und Tanford, 1970, Mattice *et al.*, 1976, Montserret *et al.*, 2000). Dies führt zur Dissoziation der Helices, wobei der α -helikale Anteil oft erhalten bleibt (Anbazhagan *et al.*, 2010). Die Dissoziation der α -Helices resultiert im Falle des Cyt b_6 in der Freisetzung der Kofaktoren, die spektroskopisch durch eine Intensitätsabnahme des Soret-Maximums verfolgt werden kann. Aus der Titrationskurve des Cyt b_6 ging hervor, dass die Freisetzung des Häms bei 5 mM SDS beginnt und bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten (Abbildung 24, Prodöhl *et al.*, 2007). Die Stabilität der Cyt b_6 -Varianten, deren Loop um fünf bzw. zehn Glycine verlängert wurde, ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert, da die Häm-Freisetzung ebenfalls bei 4-5 mM SDS einsetzte. Die Helices der Cyt b_6 Gly₁₅-Variante dissoziierten hingegen erst ab 8 mM SDS. Die Verlängerung des BC-Loops um 15 Glycine führt somit anscheinend zu einer erhöhten Stabilität gegenüber der Denaturierung durch SDS. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Verlängerung des BC-Loops weder die Bindung der Kofaktoren noch die Stabilität des Proteins negativ beeinflusst. Für die Assemblierung ist daher eine räumliche Nähe, die durch den BC-Loop entstehen könnte und dadurch die Bewegungsfreiheit der beiden Hälften einschränken würde, nicht notwendig.

In der Literatur wurden einige Proteine beschrieben, deren Funktion und Assemblierung durch Veränderung der Loops nicht beeinträchtigt wurde, sich jedoch negativ auf die Stabilität der Proteine auswirkte. Das am besten untersuchte kofaktortragende helikale Membranprotein ist das Bacteriorhodopsin, eine von Lichtenergie getriebene Protonenpumpe aus *Halobacterium salinarum*. Es besteht aus sieben TM-Helices (A bis G) und einem kovalent gebundenen Retinal als Kofaktor. Jeweils ein Loop des Helix-Bündels wurde gegen eine sich wiederholende Gly-Gly-Ser-Sequenz ausgetauscht, ohne die Länge des Loops zu variieren (Allen *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2001). Keines der sechs mutierten Proteine zeigte eine Beeinträchtigung in der Funktion oder Assemblierung. Allerdings nahm die Stabilität der Mutanten in Vergleich zum Wildtyp ab. Bacteriorhodopsin ist, ebenso wie Cyt b_6 ein dicht gepacktes Helix-Bündel. Es besitzt jedoch 3 TM-Helices mehr als Cyt b_6 . Denkbar wäre, dass sich die Veränderung der Loops bei größeren TM Proteinen stärker destabilisierend auswirkt, als bei kleineren, wie Cyt b_6 . Außerdem sollte noch erwähnt werden, dass Bacteriorhodopsin für die Untersuchung der Stabilität bis auf die Primärsequenz entfaltet wurde, wohingegen bei Cyt b_6 nur die Tertiärkontakte zerstört wurden. Da sich die Entfaltungsmethoden unterscheiden, ist ein Vergleich nur bedingt möglich. Weiterhin sind Informationen zur Funktion der Loops bei der Faltung eines Proteins aus Untersuchungen mit wasserlöslichen Proteinen bekannt.

Das 4-Helix-Bündel Cytochrom b_{562} bindet einen Kofaktor nicht-kovalent. Die Mutation eines zum Häm distal gelegenen *Loops* beeinträchtigte die Assemblierung und Sekundärstruktur des Proteins *in vivo* nicht (Brunet *et al.*, 1993). Ein weiteres Beispiel ist das homodimere 4-Helix Bündel Protein ROP, welches aus zwei α -helikalen Haarnadelstrukturen besteht. Eine Verlängerung des interhelikalen *Loops* durch Insertion von Glycinen wirkte sich stark destabilisierend aus, während die native Struktur und die Funktion des Proteins erhalten blieben (Nagi *et al.*, 1999, Nagi und Regan, 1997). Ähnliche Ergebnisse lieferte ein Austausch des verbindenden *Loops* zwischen der N-terminalen α -Helix und den C-terminalen β -Faltblättern des Chymotrypsin Inhibitor-2 gegen eine Poly-Glycin Sequenz. Die Stabilität des Proteins wurde nur geringfügig beeinträchtigt, wobei die Struktur des Proteins nicht verändert wurde (Ladurner und Fersht, 1997). Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass in vielen Fällen Veränderungen in den Schleifen von Proteinen sich nicht auf die Funktion und die Gesamtstruktur des Proteins auswirken aber zu einer Destabilisierung des Proteins führen. Der Vergleich zwischen den Untersuchungen zur Stabilität wasserlöslicher Proteine und den SDS-Titrations von MP ist jedoch nicht ohne weiteres möglich (Fiedler *et al.*, 2010). Aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Umgebungen sind die Wechselwirkungen zwischen den Helices in einer hydrophoben Umgebung stärker als in einer wässrigen und leisten einen größeren Beitrag zur Stabilität eines Membranproteins als bei wasserlöslichen Proteinen (Bowie, 2005). Des Weiteren kann die Assoziation zwischen MP und den Detergenzmolekülen die Stabilität der partiell denaturierten MP beeinflussen. Wie bereits beschrieben ist im Fall von SDS eine Stabilisierung der α -helikalen Struktur zu beobachten.

Die Verlängerung des BC-*Loops* des Modellproteins Cyt b_6 beeinträchtigt nicht dessen Assemblierung. Ebenso konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Destabilisierung gemessen werden. Eine Vervierfachung des BC-*Loops* scheint sogar die Stabilität des Proteins im Vergleich zum Wildtyp zu erhöhen. Im Umkehrschluss sollte dies bedeuten, dass die Stabilität des Cyt b_6 hauptsächlich durch inter- und intrahelikale Wechselwirkungen gewährleistet wird. Wobei der Beitrag der zwei weiteren *Loops* des Cyt b_6 berücksichtigt werden muss und im Abschnitt 4.2.3 diskutiert wird.

4.2.2 Eine kovalente Verknüpfung der Cytochrom b_6 -Hälften ist für die Häm-Bindung nicht essentiell

Auf Grund der Tatsache, dass eine Verlängerung des BC-Loops die Faltung des Cyt b_6 nicht beeinträchtigt, stellte sich die Frage, ob eine kovalente Verbindung zwischen den Cyt b_6 -Hälften für die Assemblierung notwendig ist. Um dies zu untersuchen, wurden die beiden Cyt b_6 -Hälften in einem zellfreien Expressionssystem (CECF) von der Arbeitsgruppe von XXX generiert (Schwarz *et al.*, 2007). Die exprimierten Proteine konnten über den N-terminalen deca-Histidin-Tag affinitätschromatographisch gereinigt werden. Das gereinigte Cyt b_6 AB war frei von Kontaminationen und konnte in einer Western-Blot-Analyse eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 25). Die Cyt b_6 CD-Hälfte zeigte im Coomassie-gefärbten Gel zwei Proteinbanden, die beide mit dem berechneten Molekulargewicht korrelieren. In einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen den Cyt b_6 C-Terminus gerichteten Antikörper wurde nur das 15,5 kDa schwere Protein detektiert (Abbildung 25). Bei dem leichteren, 14 kDa schweren Protein handelt es sich vermutlich um eine verkürzte Form von Cyt b_6 CD, die durch einen Abbruch der Proteinsynthese entstanden ist. Die Anzahl der am C-Terminus fehlenden Aminosäuren beträgt schätzungsweise 13 und schließt die Sequenz des Epitops, gegen das der Peptidantikörper gerichtet ist, mit ein. Aufgrund dieser Tatsache, kann der Anti-C-Terminus-Antikörper die leichtere Bande nicht detektieren. Ein gegen den Histidin-Tag gerichteter Antikörper detektierte jedoch beide Proteine in einer Western-Blot-Analyse die belegte, dass beide Proteine einen Histidin-Tag besitzen und auf dem Expressionsplasmid kodiert sein müssen. (Abbildung 26). Beide Proteine waren außerdem sehr dominant in der Probe des Präzipitats vor der Reinigung des Coomassie-gefärbten Gels und wurden schätzungsweise in gleichen Mengen exprimiert (Abbildung 25). Obwohl der spezifische, gegen den C-Terminus von Cyt b_6 gerichtete Antikörper eines der beiden Proteine nicht erkannt hat, handelt es sich bei diesem Protein vermutlich um ein Genprodukt des Expressionsplasmons. Unterstützt wird diese Annahme durch die nachfolgend diskutierten absorptionsspektroskopischen Untersuchungen.

Um zu untersuchen, ob die separaten Cyt b_6 -Hälften Häm binden können, wurden die Proteine in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt. Die zugegebene Häm-Menge wurde so gewählt, dass ein molares Gesamtprotein-zu-Häm-Verhältnis von 1:2 erreicht wurde. Die aufgenommenen Absorptionsspektren zeigten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen Absorptionsmaxima, die typisch für Holo-Cyt b_6 sind (Abbildung 28). Es fand eine effiziente Bindung des Häms durch beide Hälften statt. Die eindeutigen Absorptionsmaxima unterstützen die Hypothese, dass es sich bei beiden Banden im SDS-

Gel um Cyt b_6 CD handelt. Würde es sich bei dem 14 kDa schweren Protein um eine unspezifische Kontamination handeln, wäre das Protein vermutlich nicht in der Lage Häm in diesem Verhältnis zu binden. Das würde sich in einer verringerten Qualität der Spektren und einer Blauverschiebung des Soret-Maximums äußern. Die Absorptionsspektren zeigten, dass die Cyt b_6 -Hälften *in vitro* ohne kovalente Verbindung zwischen den Hälften mit Häm assemblieren können. Jede Hälfte bildet jeweils eine Struktur aus, die stabil genug ist, um nach Vereinigung der beiden Hälften, Häm zu binden. Dies unterstützt Ergebnisse, die aus den Versuchen mit den Cyt b_6 Gly_n-Varianten gewonnen wurden. Eine kovalente Verbindung der beiden Hälften und die räumliche Orientierung und Positionierung der Hälften durch den BC-Loop ist somit für die Assoziation der Hälften nicht essentiell. Die interhelikalen Bindungen, sowie die Wechselwirkungen zwischen den Kofaktoren mit den benachbarten Aminosäuren, scheinen für die Assemblierung der Cyt b_6 -Hälften ausreichend zu sein.

Ähnliche Ergebnisse wurden aus Untersuchungen mit verschiedenen MP gewonnen. Bacteriorhodopsin kann aus zwei komplementären, nicht kovalent verbundenen Fragmenten, die durch Spaltung des AB-, BC bzw. CD-Loops erzeugt wurden, *in vitro* zu einem funktionalen Protein assemblieren (Kahn und Engelman, 1992, Huang *et al.*, 1981). In einer umfangreicheren *in vitro* Studie wurden sämtliche möglichen komplementären Fragmente separat hergestellt und deren Fähigkeit zu einem funktionalen Protein zu assemblieren untersucht (Marti, 1998). Es stellte sich heraus, dass keiner der Loops für eine korrekte Assoziation der Helices essentiell ist. Nicht nur die Aminosäurezusammensetzung sondern auch die Spaltung der Loops beeinträchtigte nicht die Assemblierung des Bacteriorhodopsins. Rhodopsin, eines der Sehpigmente in der Netzhaut der Augen von Säugetieren, besteht wie Bacteriorhodopsin ebenfalls aus sieben TM-Helices und einem kovalent gebundenem Retinal. Im Gegensatz zu Bacteriorhodopsin, wurde in Koexpressionsstudien in Säugerzellen gezeigt, dass die meisten kovalenten interhelikalen Verknüpfungen essentiell für die Assemblierung eines funktionalen Rhodopsins sind (Ridge, 1996). Lediglich Spaltungen in den CD- und EF-Loops konnten toleriert werden (Landin *et al.*, 2001). Sowohl bei Bacteriorhodopsin als auch bei Rhodopsin interagieren die α -Helices direkt miteinander, wohingegen die Interaktion der Helices im Cyt b_6 Häm vermittelt ist. Bei direkter Interaktion der Helices spielen Loops möglicherweise eine wichtigere Rolle während der Assemblierung, in dem sie die Orientierung und räumliche Nähe der Helices vermitteln. Weitere MP, die aus komplementären Fragmenten zu einem funktionalen Protein assemblieren können, sind unter anderem der Glucosetransporter GLUT1 (Cope *et al.*, 1994), die Laktose-Permease (Zen *et al.*, 1994) und der *E. coli* Glucose-transporter IICB^{Glc} (Beutler *et al.*, 2000). Diese Proteine tolerieren jedoch nur Spaltungen

in bestimmten *Loops* und nur einige Kombinationen aus komplementären Fragmenten können zu einem funktionalen Protein assemblieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Loops* innerhalb eines Membranproteins unterschiedliche Beiträge zur Stabilität und Funktion eines Proteins leisten können. Einige kovalente Verbindungen zwischen α -Helices können für die Faltung, Assemblierung und Stabilität von MP essentiell sein. Sie können jedoch auch, so wie im Fall des BC-*Loops* des Cyt b_6 , eine untergeordnete Funktion haben. Aus diesem Grund war es notwendig zu untersuchen, ob die TM-Helices des Cyt b_6 ohne jegliche kovalente Verbindung assembliert bleiben.

4.2.3 Cytochrom b_6 bleibt nach proteolytischer Spaltung der *Loops* assembliert

Da die getrennten Cyt b_6 -Hälften Häm binden können, stellte sich die Frage, ob die interhelikalen *Loops* grundsätzlich notwendig für eine Assemblierung des Cyt b_6 sind. Um dies zu untersuchen, wurden die löslichen *Loops* des Holo-Cyt b_6 mit Proteinase K verdaut und untersucht, ob die entstandenen Cyt b_6 -Fragmente assembliert blieben. Nach fünfstündiger Hydrolyse des Cyt b_6 waren weder im Coomassie-gefärbten Acrylamidgel noch in der Western-Blot-Analyse Proteine detektierbar (Abbildung 30). Die Absorptionsspektren dieser Probe zeigten aber die charakteristischen Maxima, die auf eine sechsfache Koordination des zentralen Eisen-Ions des Häms im Cyt b_6 schließen ließen (Abbildung 29). Um die Fragmente, die Häm binden, zu identifizieren, wurde das hydrolysierte Cyt b_6 einer Größenausschlusschromatographie unterzogen (Abbildung 31). Die Fragmente, die zeitgleich mit Häm von der Säule eluierten, wurden anschließend massenspektroskopisch analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den isolierten Fragmenten um die Cyt b_6 TM-Helices handelt, die nicht nur über interhelikale *Loops* miteinander verbunden sind (Tabelle 17). Da sich das rekonstituierte Cyt b_6 in einer Detergenzmizelle befand, waren die hydrophoben TM-Bereiche von den Detergenzmolekülen umschlossen und somit vor der Hydrolyse durch die Protease geschützt. Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass die TM-Helices nach Spaltung der interhelikalen *Loops in vitro* assembliert bleiben. Die getrennten TM-Fragmente des Cyt b_6 sind in der Lage den Kofaktor zu binden. Nicht nur die kovalente Verbindung zwischen den beiden Cyt b_6 -Hälften, sondern auch die zwei weiteren interhelikalen *Loops* zwischen den Helices A und B bzw. C und D sind für die Assemblierung nicht notwendig. Daraus ergibt sich, dass die Assemblierung von Cyt b_6 durch interhelikale Wechselwirkungen im TM-Bereich vermittelt werden kann. Interaktionen zwischen Helices können unspezifische Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Salzbrückenbindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen sein. In welchem Maß die Interaktionen im Einzelnen zur Assemblierung und Stabilität des Cyt b_6

beitragen, bedarf jedoch zukünftiger Untersuchungen. Es ist davon auszugehen, dass die Interaktionen zwischen den beiden Kofaktoren und dem Apo-Protein einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des Proteins leisten. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Cyt b_6 nach Verlust der Kofaktoren anfällig für proteolytische Degradation ist (Kuras *et al.*, 1995, Kuras *et al.*, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Mutation eines der vier Häm-ligierenden Histidine des Cyt b_6 in *Chlamydomonas reinhardtii* zur Destabilisierung des Proteins führte (de Vitry *et al.*, 2004). In Untersuchungen mit wasserlöslichen b-Typ Cytochromen ist ebenfalls der Beitrag des Häms zur Stabilität des Proteins beschrieben worden. So erhöhte die Bindung des Häms die Stabilität von Cytochrom b_{562} und Cytochrom b_5 (Feng und Sligar, 1991, Mukhopadhyay und Lecomte, 2004). Zudem wurde die Bindung von Häm an Cytochrom-*Maquettes* untersucht. *Maquettes* sind entworfene wasserlöslichen 4-Helix-Bündel, die sich in vielen Fällen von natürlichen TM Cytochromen ableiten. Es wurde gezeigt, dass die Bindung des Häms die Stabilität einer Cytochrom b_5 -*Maquette* erhöhte (Robertson *et al.*, 1994). Ferner wurde für Bacteriorhodopsin gezeigt, dass der Kofaktor signifikant zur Stabilisierung eines Helix-Bündels beitragen kann, da der Verlust des Kofaktors Retinal zu einer Destabilisierung des Proteins um etwa 60 kcal/mol führte (Kahn *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der Kofaktor auch entscheidend zur Stabilisierung des Cyt b_6 beiträgt. Für eine nähere Betrachtung der Häm-Bindung müssen mehrere Interaktionen berücksichtigt werden. Neben der koordinativen Bindung des zentralen Eisen-Ions sind weitere stabilisierende Interaktionen zwischen Häm und den benachbarten Aminosäuren möglich. Dazu gehören Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem planaren Porphyrinring und umliegenden Aminosäuren und Interaktionen zwischen den Tetrapyrrol-Seitenketten und den benachbarten Aminosäuren. Letztere werden unter 4.3.2 näher diskutiert.

4.2.4 Welches Strukturelement ist die kleinste Häm-bindende Einheit?

Die bisherigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die interhelikalen *Loops* für die Assemblierung von Cyt b_6 nicht essentiell sind. Denkbar ist daher, dass das Helix-Bündel *in vitro* ausschließlich über intra- und interhelikale Wechselwirkungen im TM-Bereich stabilisiert wird und die Bindung der Kofaktoren über die Interaktionen des Häms mit den Helices erfolgt. Daraus ergibt sich die Frage, wie viele Helices minimal notwendig sind um die Kofaktoren zu binden. Können die beiden Helices B und D, die die Häm-ligierenden Histidine enthalten, alleine die Kofaktoren binden oder sind dazu Interaktionen mit den Helices A und C notwendig? Zunächst wurde untersucht, ob die jeweiligen Cyt b_6 -Hälften alleine Häm binden können. Die beiden Cyt b_6 -Hälften sind homolog und vermutlich aus einem Vorläuferprotein entstanden. Daher wäre es denkbar, dass zwei Moleküle einer

Hälfte alleine Häm binden können. Um dies zu untersuchen wurden die gereinigten Cyt b_6 -Hälften jeweils im molaren Protein-zu-Häm-Verhältnis von 1:2 mit Häm versetzt und Absorptionsspektren aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass zf-Cyt b_6 AB sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen alleine Häm binden kann (Abbildung 28 C). Die Absorptionsspektren des rekonstituierten zf-Cyt b_6 CD zeigten nur unter oxidierenden Bedingungen charakteristische Absorptionsbanden, die auf eine sechsfache Koordination des Häms schließen lassen (Abbildung 28 D). Unter reduzierenden Bedingungen waren keine definierten Absorptionspeaks, sondern eine breite Bande im Bereich der erwarteten Soret-Bande zu sehen. Eine effiziente Bindung des Häms war nur unter oxidierenden Bedingungen zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der *hairpin*, bestehend aus den Helices A und B, eine stabile Einheit darstellt und *in vitro* eine Konformation einnimmt, die die Bindung des Häms ermöglicht. Für die Ausbildung der stabilen Struktur unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen sind stabilisierende Wechselwirkungen zu den Helices C und D nicht notwendig. Die Helices C und D sind ebenfalls in der Lage die Kofaktoren alleine zu binden. Jedoch kam es unter reduzierenden Bedingungen zu einer verschlechterten Häm-Bindung. Für eine stabile Häm-Bindung sind Interaktionen zu den Helices A und B notwendig. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass die TM-Helices nach proteolytischer Spaltung der *Loops* assembliert blieben, führten zu der Frage, ob Holo-Cyt b_6 aus einzelnen TM-Helices assembliert werden kann. Dazu wurden Peptide chemisch synthetisiert, deren Aminosäuresequenz der Sequenz der vier Cyt b_6 TM-Helices entsprach. Von den vier Peptiden ließ sich nur das Helix B-Peptid in DDM solubilisieren. Mittels CD-Spektroskopie konnte eine vorwiegend α -helikale Struktur des Peptids nachgewiesen werden (Abbildung 32). Es ist davon auszugehen, dass es zu einer Aggregation der drei restlichen Helices in dem verwendeten wässrigen Detergenz-Puffer kam. Nach Zugabe von Häm zu Helix B wurden Absorptionsspektren aufgenommen und die Häm-Bindung verfolgt (Abbildung 33). Unter reduzierenden Bedingungen konnte eine schwache Interaktion zwischen Peptid und Kofaktor beobachtet werden. Die Maxima der α - und β -Bande sind typisch für ein sechsfach koordiniertes Eisen-Ion des Häms, jedoch spricht die geringe Intensität der Banden für eine schwache Häm-Bindung. Die Rotverschiebung des Maximums der Soret-Bande betrug 7 nm und nicht, wie für Holo-Cyt b_6 erwartet, 9 nm (Abbildung 33). Dies spricht ebenfalls für eine schwache Häm-Bindung. Helix B stellt *in vivo* eine individuelle und stabile Faltungseinheit dar, die jedoch nicht in der Lage ist die Kofaktoren alleine stabil zu binden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass für eine stabile Häm-Bindung Interaktionen zumindest zwischen Helix A und B notwendig zu sein scheinen. Die Helices C und D können die Kofaktoren nicht ohne Interaktionen zu den Helices A und B stabil binden. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die finale Struktur erst nach der Bindung der Kofaktoren ausge-

bildet wird. Ähnliche Ergebnisse wurden aus Untersuchungen mit Bacteriorhodopsin gewonnen. Die Sekundärstruktur und Stabilität der sieben TM-Helices des Bacteriorhodopsin wurden untersucht, indem jede Helix individuell exprimiert und rückgefaltet wurde. Es stellte sich heraus, dass Helices A, B, D, E α -helikale Sekundärstrukturen ausbildeten. Helix G hingegen zeigte isoliert eine β -Faltblatt und Helix F keine erkennbare Sekundärstruktur. (Hunt *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass Bacteriorhodopsin über eine Zwischenstufe faltet. Kürzlich wurde die Sekundärstruktur der einzelnen Helices im Übergangszustand analysiert. Auch im Übergangszustand liegen die N-terminal gelegenen Helices gefaltet vor, während die C-terminalen Helices nicht gefaltet sind (Booth, 2012). Erst nach der Bindung des Kofaktors wird die endgültige native Konformation ausgebildet (Booth und Farooq, 1997).

4.2.5 Der Assemblierungsweg von Cytochrom b_6

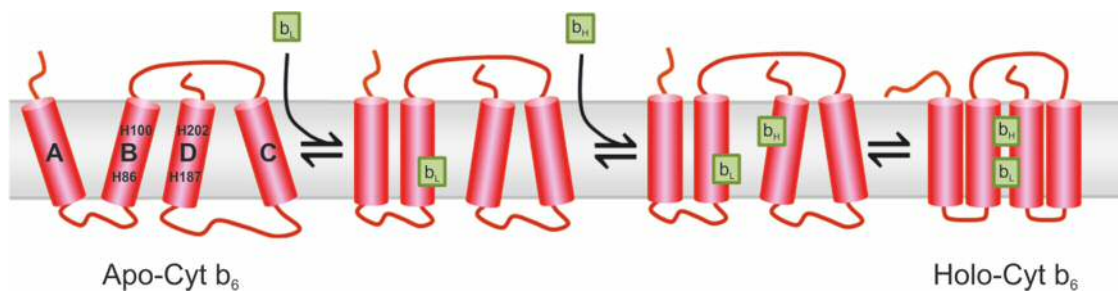


Abbildung 40: Modell zur Assemblierung von Cyt b_6 .

Die Assemblierung des Cyt b_6 erfolgt in mehreren Stufen. Nach der Insertion des Apo-Cyt b_6 in die Membran bindet zunächst Häm b_L an His86 auf Helix A und daraufhin Häm b_H an His202 auf Helix D. Die Koordination der Häme durch die gegenüberliegenden Histidine bilden sich intramolekulare Wechselwirkungen aus, die die Gesamtstruktur stabilisieren.

Der Assemblierungsweg von Cyt b_6 wurde bereits im Hinblick auf die Kofaktoren beschrieben. In Versuchen mit einem *E. coli* Stamm, dessen Häm-Synthese inhibiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Membraninsertion des Apo-Proteins unabhängig von den Kofaktoren stattfinden kann. Apo-Cyt b_6 ist in der Lage unabhängig vom Kofaktor in die Zytoplasmamembran von *E. coli* zu inserieren. Nach externer Zugabe von Häm zu isolierten Membranen konnte eine spontane Assemblierung des Holo-Cyt b_6 beobachtet werden (Dreher *et al.*, 2007). Das Apo-Protein nimmt somit in der Membran eine Konformation ein, die eine effiziente Bindung der Kofaktoren erlaubt. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte eine sequentielle Bindung der beiden Kofaktoren gezeigt werden (Dreher *et al.*, 2008, Kuras *et al.*, 1997). Zunächst wird Häm b_L an His 86 (Helix B) und im Anschluss Häm b_H an His 202 (Helix D) koordiniert. In einem weiteren Schritt erfolgt die Bindung der

Häm-Kofaktoren durch die gegenüberliegenden His 100 und His 187 (Dreher *et al.*, 2008). Es wurde vermutet, dass die Bindung der Kofaktoren mit Änderungen in der Struktur der Polypeptidkette einhergeht. Wie diese Umlagerungen ablaufen und wie die Struktur des Apo-Proteins aussieht, war jedoch bislang nicht bekannt. Die bisher dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen nun eine detailliertere Beschreibung der *in vitro* Assemblierung (Abbildung 40). Die Cyt b_6 AB-Hälfte bildet im Apo-Protein vermutlich eine stabile Struktur aus, welche die Bindung des ersten Häms an Histidin 86 ermöglicht. Die Bindung des zweiten Häms erfolgt an Histidin 202 auf Helix D. Nach der Bindung des zweiten Häms folgt die Koordination beider Häme durch die gegenüberliegenden Histidine. Dadurch werden zum einen Kontakte innerhalb des Moleküls ausgebildet, welche die Gesamtstruktur stabilisieren. Zum anderen finden strukturelle Veränderungen innerhalb der Polypeptidkette statt, die zur Ausbildung der finalen stabilen Struktur führen. Für die dargestellten Abläufe während der Assemblierung des Cyt b_6 sind die interhelikalen *Loops* nicht essentiell. *In vivo* sind *Loops* vermutlich während der Insertion der Helices in die Membran für die Ausbildung der Topologie der Helices von größerer Bedeutung. Außerdem würden die Helices innerhalb der Membran ohne die *Loops* nach der Insertion frei diffundieren und gegebenenfalls unspezifische Interaktionen eingehen.

4.3 Die Spezifität der Häm-Bindung an Apo-Cytochrom b_6 wird durch das zentrale Eisen-Ion vermittelt

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Rolle der kovalenten interhelikalen Verbindungen für die Faltung und Assemblierung von Cyt b_6 untersucht. Wie aus *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen hervorgeht, erfolgt die Bindung der Tetrapyrrol-Kofaktoren an b-Typ Cytochrome spontan (Dreher *et al.*, 2007, Francke *et al.*, 1999, Cordova *et al.*, 2007, Korendovych *et al.*, 2010, Lujan *et al.*, 2012). Im Gegensatz zur kovalenten Häm-Bindung an c-Typ Cytochrome, die von vier Proteinsystemen katalysiert wird (Thöny-Meyer, 1997, de Vitry, 2011, Travaglini-Allocatelli, 2013), konnten bisher keine Proteine identifiziert werden, die an der Assemblierung von b-Typ Cytochromen beteiligt sind. In der Thylakoidmembran der Chloroplasten sind neben dem Cytochrom- b_6f -Komplex TM Proteine der Photosysteme I und II enthalten, die Chlorophylle nicht-kovalent binden. Dazu gehört der mit Photosystem II assoziierte Lichtsammelkomplex LHCII (*light-harvesting complex associated with photosystem II*). Für den LHCII Komplex konnte gezeigt werden, dass die Assoziation des Apo-Proteins mit den Pigmenten Chlorophyll a und b, ähnlich wie die

Assemblierung des Apo-Cyt b_6 mit Häm, *in vitro* spontan erfolgt und keine weiteren Faktoren für die Assemblierung benötigt werden (Paulsen *et al.*, 1990, Horn *et al.*, 2007, Cammarata und Schmidt, 1992). Die nicht-kovalent gebundenen Chlorophylle des LHCII werden, unter anderem von Histidinen, axial ligiert (Heimdal *et al.*, 2007). In Photosystem II wurde ebenfalls eine axiale koordinative Bindung der Chlorophylle durch Histidine beobachtet (Kamiya und Shen, 2003, Zouni *et al.*, 2001). Chlorophylle und Häm sind makrozyklische Tetrapyrrole, die über gemeinsame Zwischenstufen synthetisiert werden. In Pflanzen findet die Tetrapyrrol-Biosynthese in Chloroplasten statt und nur die letzten beiden Schritte der Häm-Synthese sind in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert (Tanaka und Tanaka, 2007, Cornah *et al.*, 2003). Demzufolge liegen sowohl Chlorophylle als auch Häm nach der Synthese in den Thylakoiden vor und können von den entsprechenden Apo-Proteinen gebunden werden. Die Chlorophyll-Konzentration in den Chloroplasten kann bis zu 100-fach höher sein als die Häm-Konzentration (Moulin und Smith, 2005). Vor dem Hintergrund, dass Häm und Chlorophyll strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und beide axial gebunden werden können, stellt sich die Frage, wieso Chlorophylle bzw. Chlorophyll-Vorstufen *in vivo* nicht von Apo-Cyt b_6 gebunden werden. Im Folgenden wurden strukturelle Merkmale des Häms untersucht, die für die spezifische Bindung durch Cyt b_6 notwendig sind.

4.3.1 Das zentrale Eisen-Ion des Häms ist essentiell für die Bindung der Kofaktoren an Apo-Cytochrom b_6

Zunächst wurde untersucht, ob Chlorophyll a *in vitro* an Apo-Cyt b_6 binden kann. Dazu wurden gelöstes Chlorophyll a zum heterolog exprimierten und affinitätschromatographisch gereinigten Apo-Cyt b_6 gegeben und Absorptionsspektren aufgenommen. Da sich die spektroskopischen Eigenschaften des freien Chlorophylls nach Zugabe des Apo-Cyt b_6 nicht geändert haben, konnte keine Bindung von Chlorophyll a an Apo-Cyt b_6 beobachtet werden (Abbildung 34). Zusätzlich wurden in getrennten Ansätzen Chlorophyll a und Häm zu Apo-Cyt b_6 gegeben und das Protein erneut affinitätschromatographisch gereinigt. Es konnte beobachtet werden, dass Häm, aber nicht Chlorophyll a zusammen mit dem Protein eluiert. Häm wurde, wie erwartet von Apo-Cyt b_6 gebunden, Chlorophyll a jedoch nicht (Abbildung 35). Weder *in vivo* noch *in vitro* findet eine Bindung von Chlorophyll a an Apo-Cyt b_6 statt. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die spezifische Bindung des Häms durch Häm-spezifische strukturelle Merkmale vermittelt wird. Chlorophyll a und Häm besitzen zwar das gleiche Porphyrin-Grundgerüst, unterscheiden sich aber in einigen strukturellen Merkmalen: Chlorophyll a besitzt im Gegensatz zu Häm

einen zusätzlichen fünften Ring (E-Ring) und beide Moleküle unterscheiden sich teilweise in den Ring-Substituenten (Willows, 2003, Tanaka und Tanaka, 2007). Außerdem enthält Chlorophyll a Magnesium als zentrales Ion, während Häm ein zentrales Eisen-Ion besitzt (Abbildung 37). Inwiefern das zentrale Ion wichtig für die spezifische Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 ist, wurde durch Versuche mit Protoporphyrin IX-Derivaten mit verschiedenen Zentralatomen untersucht. Protoporphyrin IX besitzt kein zentrales Ion und stellt die gemeinsame Zwischenstufe der Häm- und Chlorophyll a-Synthese dar, an der sich die beiden Synthesewege trennen (Abbildung 13). Die Bindung des Protoporphyrin IX an Apo-Cyt b_6 wurde spektroskopisch untersucht, wobei keine Interaktion des Porphyrins mit Apo-Cyt b_6 beobachtet werden konnte (Abbildung 36). Die koordinative Bindung des zentralen Eisen-Ions durch die konservierten Histidine des Cyt b_6 ist für die Bindung des Häms entscheidend. Dies wird durch Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt, die gezeigt haben, dass die Bindung des Häms durch Mutation der Häm-ligierenden Histidine zu Alanin unterbunden werden kann (Kuras *et al.*, 1997, Dreher *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob die Art des Metallions wichtig ist, wurde die Bindung von Mg-Protoporphyrin IX analysiert. Mg-Protoporphyrin IX ist ein Zwischenprodukt in der Chlorophyllsynthese und unterscheidet sich nur im zentralen Metallion von Häm. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnte keine Bindung des Porphyrins an Apo-Cyt b_6 beobachtet werden (Abbildung 36). Der Austausch des Eisen-Ions gegen Magnesium war somit ausschlaggebend, um eine Bindung an Apo-Cyt b_6 zu verhindern. Neben Mg-Protoporphyrin IX wurde die Bindung von Protoporphyrin IX-Derivaten mit Mangan und Zink als zentralem Metallion untersucht (Abbildung 45 und Tabelle 16). Bei keinem der Protoporphyrin IX-Derivate konnte eine Bindung an Apo-Cyt b_6 beobachtet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das zentrale Eisen-Ion essentiell für die spezifische Bindung des Häms ist. Sowohl das Entfernen als auch ein Austausch des zentralen Ions führten dazu, dass die Bindung an Apo-Cyt b_6 verhindert wird. Eine mögliche Ursache dafür, dass Chlorophyll a und Mg-Protoporphyrin IX nicht gebunden werden, könnte die bevorzugte fünffache Koordination des Magnesium-Ions *in vivo* sein. Während das Eisen-Ion in Cytochromen *in vivo* sechsfach koordiniert vorliegt, wird das Magnesium-Ion der Chlorophylle in der Regel nur fünffach koordiniert (Cogdell *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2010). Das Magnesium-Ion ist zu groß um mit dem Porphyringerüst exakt eine Ebene zu bilden. Dadurch liegt es etwas außerhalb der äquatorialen Ebene und ein sechster Ligand könnte energetisch ungünstig sein (Storm und Koshland, 1970).

Weiterhin wäre es denkbar, dass der lange Phytol-Rest (Ring D) und nicht das Magnesium-Ion des Chlorophyll a die Bindung an Apo-Cyt b_6 sterisch behindert (Abbildung 37). Allerdings wäre dann die Bindung von Mg-Protoporphyrin IX möglich. Die entscheidende

Rolle des zentralen Eisen-Ions wird durch Untersuchungen mit dem TM Cytochroms b_{556} aus *E. coli* unterstützt. Es wurde gezeigt, dass das Eisen-Ion für die Assemblierung des Cytochroms zu einem funktionalen Protein essentiell ist (Nihei *et al.*, 2001). Es kommen aber auch andere Faktoren in Frage, die die spezifische Bindung von Tetrapyrrolen an die entsprechenden Apo-Proteine vermitteln können. So wurde z. B. auch beschrieben, dass die Konformation der Histidine, die an der Ligation der Kofaktoren beteiligt sind, ausschlaggebend sein kann (Braun *et al.*, 2010). Außerdem tragen, wie nachfolgend diskutiert, die Tetrapyrrol-Seitenketten zur spezifischen Häm-Bindung bei.

4.3.2 Die Ethylen- und Propionylseitenketten stabilisieren die Häm-Bindung an Apo-Cytochrom b_6

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bindung der beiden Kofaktoren vermutlich zur Stabilität des Cyt b_6 beiträgt (siehe 4.2.3). Neben der koordinativen Bindung des zentralen Eisen-Ions bestehen Wechselwirkungen zwischen den Tetrapyrrol-Seitenketten und den umliegenden Aminosäuren. Diese Wechselwirkungen können Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Interaktionen und Salzbrücken sein. In dieser Arbeit wurden die Interaktionen zwischen den Ethylen- bzw. Propionylgruppen des Häms und den benachbarten Aminosäuren untersucht. Die beiden Ethylengruppen des Häms, die sich an den Ringen A

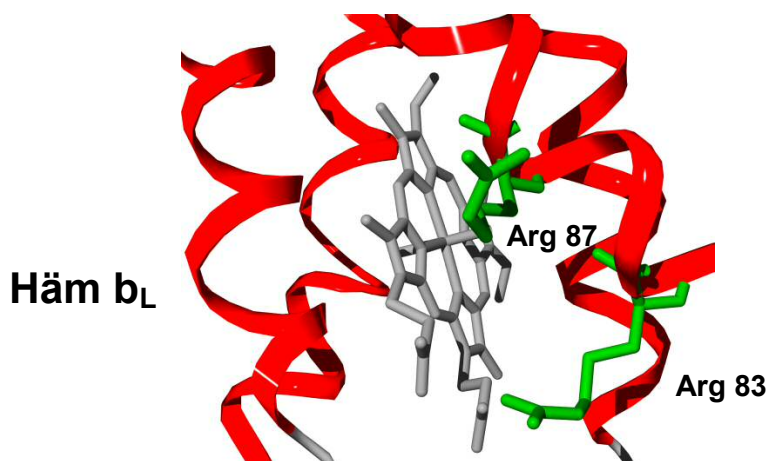


Abbildung 41: Strukturausschnitt von Cytochrom b_6 mit gebundenem Häm b_L .

Dargestellt sind die basischen Aminosäuren Arg 83 und 87 (grün) aus Helix B, die möglicherweise mit den Propionylgruppen des Häm b_L (grau) interagieren. Die vier TM-Helices sind in Rot gezeigt. Die Struktur wurde aus dem Cytochrom b_6 Komplex von *Mastigocladus laminosus* entnommen (PDB-Datei 1VF5).

und B befinden (Abbildung 37), können van-der-Waals-Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren ausbilden. Durch den Austausch der Ethylengruppen gegen Wasser-

stoffatome im Fe-Deuteroporphyrin IX, bietet sich die Möglichkeit zu untersuchen, ob diese Wechselwirkungen für die Bindung des Häms essentiell sind. Fe-Deuteroporphyrin IX wurde zu gereinigtem Apo-Cyt b_6 gegeben und die Interaktion spektroskopisch verfolgt. Aus den Absorptionsspektren ging hervor, dass das Fe-Deuteroporphyrin IX von Apo-Cyt b_6 gebunden wird (Abbildung 38). Die geringen Intensitätszunahmen der Soret-, α - und β -Bande deuten eine schwache Bindung der Kofaktoren an. Durch den Austausch der Ethylengruppen, könnte die Kofaktor-Bindung aufgrund der fehlenden Van-der-Waals-Wechselwirkungen destabilisiert werden. Die Wechselwirkungen zwischen den Ethylengruppen und den benachbarten Aminosäuren sind zwar nicht essentiell für die Häm-Bindung an sich, scheinen diese aber zu stabilisieren.

Weiterhin können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Propionylgruppen der Ringe C und D und benachbarten positiv geladenen Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Häm-Bindung spielen (Abbildung 37). Entsprechende Wechselwirkungen wurden bereits für b-Typ Cytochrome diskutiert. Untersuchungen am wasserlöslichen Cytochrom b_{562} zeigten, dass die Seitenkette eines Arginins durch Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Propionylgruppe des Häms zur Stabilisierung des Proteins beitragen könnte (Arnesano *et al.*, 2000). Die gleiche Beobachtung wurde auch

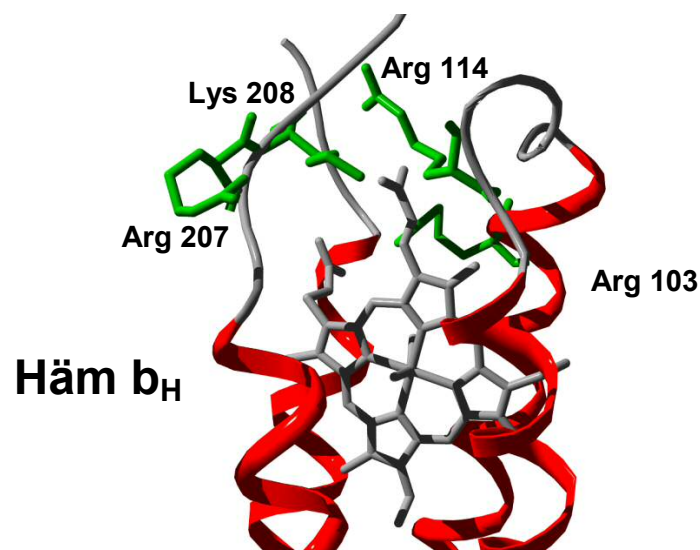


Abbildung 42: Strukturausschnitt von Cytochrom b_6 mit gebundenem Häm b_H .

Die basischen Aminosäuren Arg103, 114, 207 und Lys208 (grün) befinden sich in räumlicher Nähe zum Häm b_H (grau). Sie können möglicherweise elektrostatische Wechselwirkungen zu den Propionylgruppen des Häms b_H eingehen. In Rot sind die TM-Helices dargestellt. Die Struktur wurde aus dem Cytochrom b_6f Komplex von *Mastigocladus laminosus* entnommen (PDB-Datei 1VF5).

für das TM Cytochrom b_{599} gemacht. Für Cytochrom b_{599} wurde vorgeschlagen, dass Arginin 18 über die Wechselwirkung mit dem Häm-Kofaktor das Cytochrom stabilisiert (Weber, 2010, Prodohl *et al.*, 2005). Auch im Fall des Cyt b_6 sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Propionylgruppen und basischen Aminosäuren möglich. Eine Analyse der Cyt b_6 Kristallstruktur zeigte, dass zwei Arginine in unmittelbarer Nähe des Häm b_L (Arg83 und 87, Abbildung 41) und drei Arginine und ein Lysin in der Nähe des Häm b_H liegen (Arg103, 114, 207 und Lys208, Abbildung 42, Kurisu *et al.*, 2003, Stroebel *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob Interaktionen zwischen den Propionylseitenketten und den basischen Aminosäuren stattfinden, wurde die Bindung von Fe-Protoporphyrin IX dimethylester an Apo-Cyt b_6 analysiert. Dieses Protoporphyrin-Derivat besitzt veresterte Propionylgruppen, wodurch keine elektrostatischen Wechselwirkungen ausgebildet werden können (Abbildung 37). Die Absorptionsspektren des Fe-Protoporphyrin IX dimethylesters zeigten nach Zugabe von Apo-Cyt b_6 Unterschiede im Vergleich zu den Spektren des freien Porphyrins. Dies lässt darauf schließen, dass das Porphyrin von Apo-Cyt b_6 gebunden wird. Jedoch ist die Interaktion schwächer als die Bindung von Häm, da die Halbwertsbreiten der Absorptionspeaks nahezu unverändert blieben. Obwohl die Ausbildung der elektrostatischen Wechselwirkungen durch die Veresterung verhindert wurde, fand eine Interaktion zwischen dem Porphyrin-Derivat und Apo-Cyt b_6 statt. Eine Interaktion in Form einer Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff des Esters wäre allerdings weiterhin möglich, die die Bindung des Porphyrin-Derivats stabilisieren könnte. Ebenso wie die Ethylengruppen, sind auch die Propionylgruppen nicht essentiell für die Bindung des Häms an Apo-Cyt b_6 . Dennoch ist von einem stabilisierenden Einfluss der Propionylgruppen auszugehen, da nur eine schwächere Bindung des Fe-Protoporphyrin IX dimethylesters beobachtet wurde. Eine nähere Charakterisierung der Bindung von Fe-Deutroporphyrin IX und Fe-Protoporphyrin IX dimethylester erfolgte durch Titrationskurven der Porphyrine mit Apo-Cyt b_6 . Die Titrationskurven zeigten ebenfalls eine schwächere Bindung der beiden Protoporphyrin IX-Derivate im Vergleich zum Häm. Das ermittelte Protein-zu-Porphyrin-Verhältnis betrug 1:1 und belegt, dass sich das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung des freien Häms verschoben hat. Statistisch gesehen hat ein Cyt b_6 -Molekül nur ein Häm gebunden. Durch die strukturellen Veränderungen der Seitenketten wurden die Porphyrine vermutlich mit einer geringeren Affinität gebunden als Häm. Der sigmoidale Verlauf der Fe-Protoporphyrin IX dimethylester Titrationskurve deutet eine kooperative Bindung des Porphyrins an. Diese Beobachtung unterstützt die bereits beschriebene sequentielle Bindung der beiden Häme an Apo-Cyt b_6 (siehe 4.2.5 und Dreher *et al.*, 2008, Kuras *et al.*, 1997). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder die Ethylen- noch die Propi-

onylgruppen für die Bindung des Häm-Kofaktors essentiell sind. Dennoch tragen sie zur Stabilität der Kofaktor-Bindung bei und ermöglichen eine starke spezifische Bindung.

4.3.3 Die Eisenchelatase ist das Schlüsselenzym Cyt b₆-Biosynthese

In Pflanzen findet die Biosynthese von Häm und Chlorophyll a über einen gemeinsamen Tetrapyrrol-Biosyntheseweg in den Chloroplasten statt (Abbildung 43). Nur die letzten beiden Schritte der Häm-Synthese sind ebenfalls in Mitochondrien lokalisiert (Cornah *et al.*, 2003). Die erste Vorstufe stellt die 5-Aminolävulinsäure dar, die aus Glutamat synthetisiert wird (Beale, 1999). Anschließend kondensieren zwei 5-Aminolävulinat-Moleküle zu Porphobilinogen, welches polymerisiert und das lineare Tetrapyrrol 1-Hydroxymethylbilan

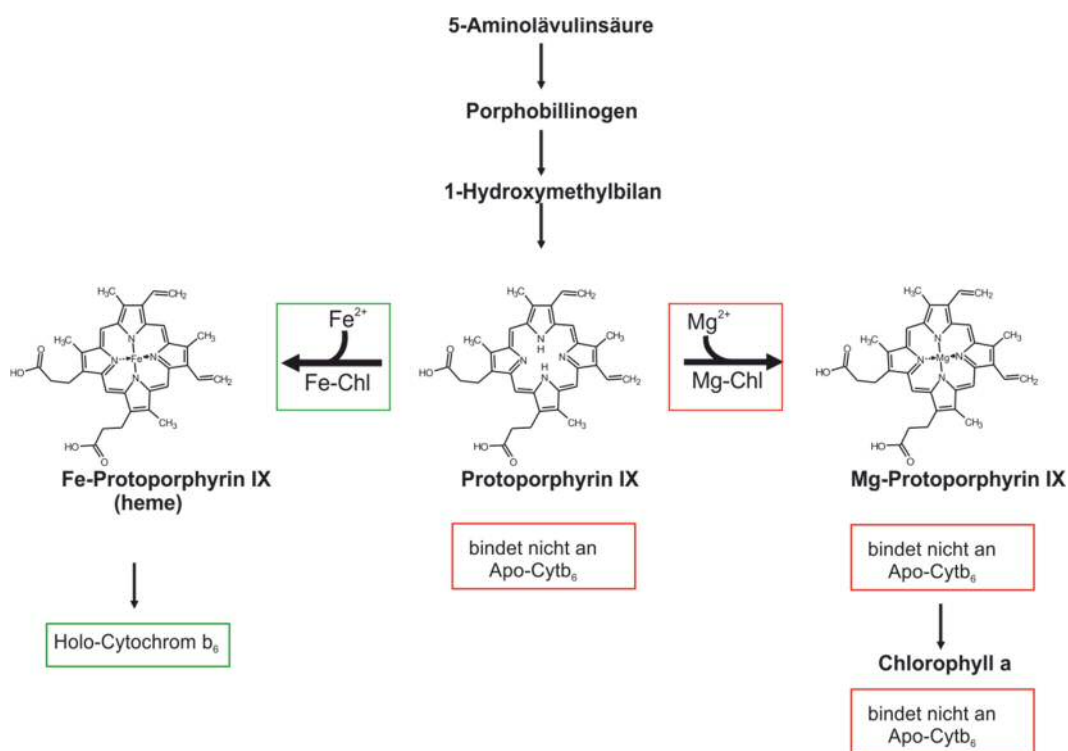


Abbildung 43: Die Eisen-Chelatase ist das Schlüsselenzym der Häm-Biosynthese.

Ausgehend von Glutamat wird über mehrere Zwischenstufen Protoporphyrin IX synthetisiert.

Magnesium wird mit Hilfe der Magnesium-Chelatase (Mg-Chl) inseriert, wodurch Mg-Protoporphyrin IX entsteht. Über einige Zwischenstufen entsteht daraus Chlorophyll a. Protoporphyrin IX, Mg-Protoporphyrin IX und Chlorophyll a werden nicht von Apo-Cyt b₆ gebunden. Die Eisen-Chelatase (Fe-Chl) katalysiert die Insertion von Eisen in Protoporphyrin IX, wodurch die Bindung des Porphyrins an Apo-Cyt b₆ ermöglicht wird.

bildet. Das lineare Molekül wird in ein zyklisches Tetrapyrrol umgewandelt, gefolgt von mehreren Decarboxylierungen und Oxidationen, die zur Bildung des makrozyklischen Protoporphyrin IX führen (Tanaka und Tanaka, 2007). Protoporphyrin IX ist die gemein-

same Vorstufe von Häm und Chlorophyll a, an der sich die Synthesewege beider Moleküle trennen. Die Mg-Chelatase katalysiert die Insertion eines Magnesium-Ions, wodurch Mg-Protoporphyrin IX entsteht. Dieses wird über mehrere Zwischenschritte zu Chlorophyll a umgewandelt. Die Insertion eines Eisen-Ions durch die Fe-Chelatase hingegen führt direkt zur Bildung von Fe-Protoporphyrin IX (Häm). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bindung des Porphyrins erst nach der Insertion des Eisen-Ions, dem letzten Schritt der Synthese, erfolgen kann. Protoporphyrin IX, die Vorstufe des Häms, kann von Apo-Cyt b₆ nicht gebunden werden. Zudem führt der Austausch des Eisen-Ions gegen ein anderes Ion, wie z. B. Magnesium in Mg-Protoporphyrin IX, dazu, dass das Porphyrin nicht von Apo-Cyt b₆ gebunden wird. Das Eisen-Ion stellt das entscheidende strukturelle Merkmal dar, dass für die spezifische Bindung des Häms entscheidend ist. Die Fe-Chelatase ermöglicht durch die Insertion des Eisen-Ions die Bindung des Häms an Cyt b₆.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Beitrag der interhelikalen Loops zur Faltung, Assemblierung und Stabilität des kofaktortragenden TM-Proteins Cytochrom b_6 *in vitro* untersucht. Cytochrom b_6 ist aus vier TM-Helices aufgebaut, die über drei Loops miteinander verbunden sind. Die beiden nicht-kovalent gebundenen Kofaktoren sind in der Häm-Bindespalte zwischen den zwei Cytochrom b_6 -Hälften lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung des Loops, der die beiden Hälften verbindet, die Assemblierung des Proteins nicht beeinflusste. Das stöchiometrische Protein-zu-Häm Bindungsverhältnis blieb dabei auch unverändert, was auf eine korrekte Faltung des Proteins zurückzuführen ist. Eine drei- bzw. vierfache Verlängerung des Loops wirkte sich nicht auf die Stabilität des Proteins aus, wobei sich bei einer vierfachen Verlängerung sogar die Stabilität erhöhte. Dies könnte auf eine dichtere Packung des Proteins zurückgeführt werden. Da eine Verlängerung des Loops, welcher beide Hälften des Proteins verbindet, keinen Einfluss auf dessen Assemblierung hatte, wurden in einem nächsten Schritt Auswirkungen des fehlenden Loops näher betrachtet. Dazu wurden separat exprimierte Cytochrom b_6 -Hälften in einem Verhältnis von 1:1 zusammengegeben und gezeigt, dass sie Häm effizient binden konnten. Der Loop zwischen den Hälften ist folglich für eine räumliche Positionierung und Orientierung der Hälften während der Assemblierung nicht essentiell. Weiterhin wurde untersucht, ob eine kovalente Verbindung zwischen allen vier Helices für die Bindung des Häms notwendig ist. Cytochrom b_6 wurde in einem Detergenz rückgefaltet, mit Häm rekonstituiert und anschließend einem proteolytischen Verdau unterzogen. Dabei wurden nur die wasserlöslichen Loops, die sich außerhalb der Mizelle befanden, degradiert, während die TM-Bereiche intakt und mit Häm assoziiert blieben. Keiner der drei interhelikalen Loops scheint somit für die Bindung der Kofaktoren notwendig zu sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Cytochrom b_6 -Hälfte, bestehend aus den Helices A und B, eine Konformation besitzt, die stabil genug ist, um Häm alleine zu binden. Ebenso zeigte die isolierte Helix B alleine eine α -helikale Struktur und war ebenfalls in der Lage Häm zu binden. Die Cytochrom b_6 -Hälfte, bestehend aus den Helices C und D, hingegen konnte Häm nicht so effizient wie Cyt b_6 AB binden, was auf eine verringerte Stabilität schließen lässt. Für eine stabile Bindung der Kofaktoren durch Cyt b_6 CD sind daher Interaktionen zu den Helices A und B notwendig. Vermutlich bildet sich die finale Konformation von Cyt b_6 CD erst nach Bindung der Kofaktoren in Verbindung mit Cyt b_6 AB aus, was in einer stabilen Struktur des gesamten Proteins resultiert. In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die interhelikalen Loops nicht essentiell für die Assemblierung

des Holo-Proteins sind, jedoch einen stabilisierenden Einfluss auf das assemblierte Protein haben.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität der Häm-Bindung an Apo-Cyt b_6 untersucht. Es wurden strukturelle Merkmale des Häms identifiziert, die eine spezifische Bindung des Kofaktors ermöglichen. Essentiell ist dabei das zentrale Eisen-Ion. Ein Austausch des Zentralmetalls oder dessen Eliminierung führen dazu, dass der Kofaktor nicht mehr an das Apo-Cytochrom binden kann. Durch Modifikation der Porphyrinsubstituenten wurden Interaktionen zwischen den Seitenketten und benachbarten Aminosäuren unterbrochen, was zu einer schwachen Bindung der Protoporphyrin IX-Derivate führte. Das ermittelte Protein-zu-Häm-Verhältnis von eins weist zudem auf eine schwächere Bindung der Derivate hin. Folglich sind die Seitenkettenketten des Porphyrins zwar nicht essentiell, aber für eine stabile und spezifische Bindung des Häms an Cyt b_6 unerlässlich. Es konnte gezeigt werden, dass nur Häm spezifisch und stabil an Cyt b_6 binden kann und jegliche Veränderung des Porphyrins die Bindung stark beeinträchtigt. Die Interaktionen zwischen Häm und Apo-Cyt b_6 sind sehr spezifisch und verhindern, dass ungewollte Protoporphyrin IX-Derivate, die im Organismus vorkommen, an das Protein binden und womöglich dessen Funktion beeinflussen.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Ergebnisse

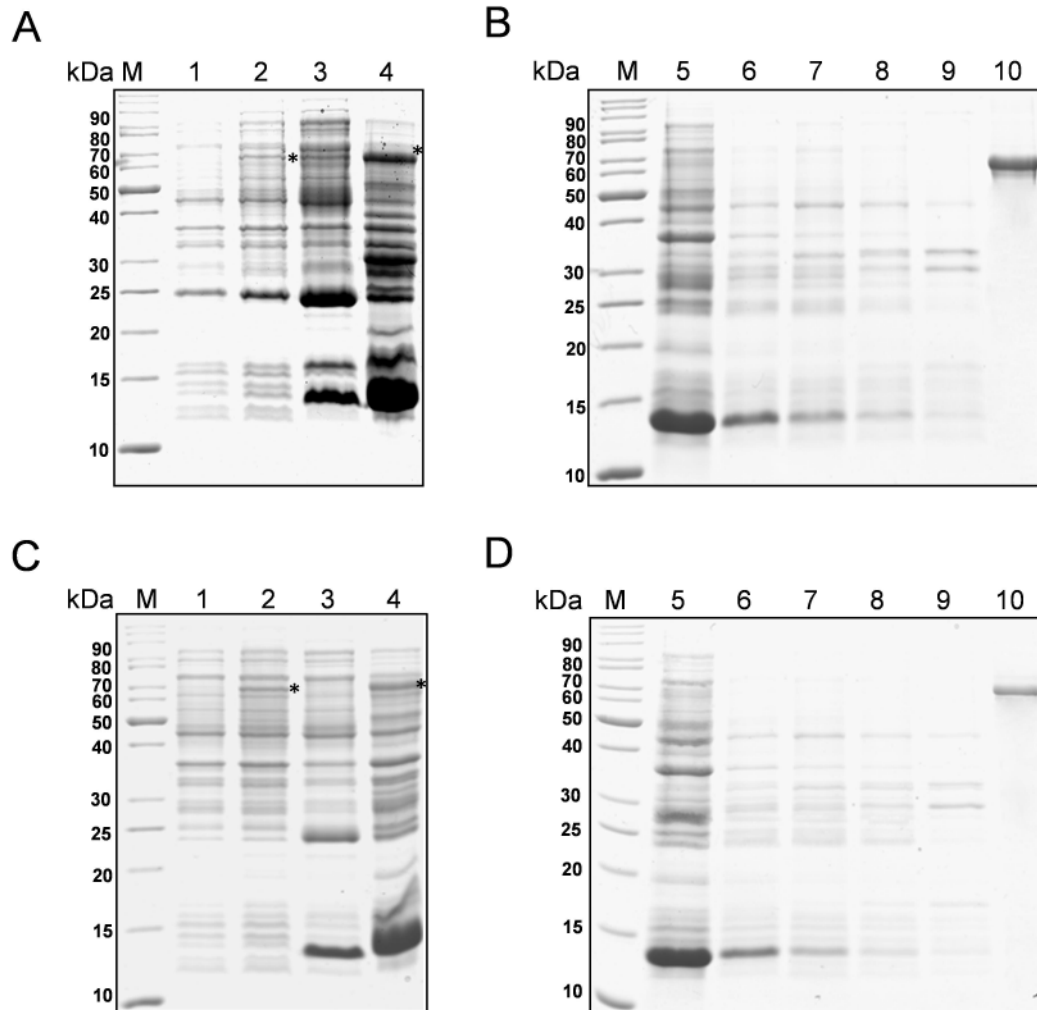


Abbildung 44: Coomassie-gefärbte SDS-Gele zur Überprüfung der Apo-Cyt b_6 Gly₅ bzw. Apo-Cyt b_6 Gly₁₅ Expression und Reinigung.

Apo-Cyt b_6 Gly₅ bzw. Apo-Cyt b_6 Gly₁₅ wurde in *E. coli* BL21(DE3) pLysS exprimiert, mittels Ultraschall aufgebrochen, die Zellfraktionen in einem 14%igen SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Im Anschluss an den Zellaufbruch erfolgten eine Reinigung mittels Ni-NTA und eine Analyse der Reinigungsschritte in einem 14%igen Coomassie-gefärbten SDS-Gel. Nach vierstündiger Expression ist im Gesamtzellextrakt eine Bande bei etwa 70 kDa zu sehen, die dem Molekulargewicht von Apo-Cyt b_6 Gly₅ von 69,7 kDa entspricht. Diese Bande ist ebenfalls in der Fraktion der Einschlusskörperchen zu sehen (Stern, Abbildung A). Das SDS-Gel der Reinigung zeigt, dass sich Apo-Cyt b_6 Gly₅ nur in der Elutionsfraktion befindet (Stern, Abbildung B). Apo-Cyt b_6 Gly₁₅ ist im Gesamtzellextrakt nach vierstündiger Expression und in der Fraktion der Einschlusskörperchen zu sehen. Die mit einem Stern markierten Banden bei etwa 70 kDa entsprechen dem Molekulargewicht von Apo-Cyt b_6 Gly₁₅ von 70,8 kDa (Abbildung C). Das SDS-Gel der Apo-Cyt b_6 Gly₁₅ Reinigung zeigt ebenfalls eine Bande bei 70 kDa in der Elution (Stern, Abbildung D). Spur 1: Gesamtzellextrakt vor Induktion der Expression, Spur 2: Gesamtzellextrakt 4 h nach Induktion mit 0,05 mM

IPTG, Spur 3: lösliche Fraktion, Spur 4: Einschlusskörperchen. Spur 5: Durchfluss, Spur 6: Waschfraktion 1, Spur 7: Waschfraktion 2, Spur 8: Waschfraktion 3, Spur 9: Waschfraktion 4, Spur 10: Elutionsfraktion, M: „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“.

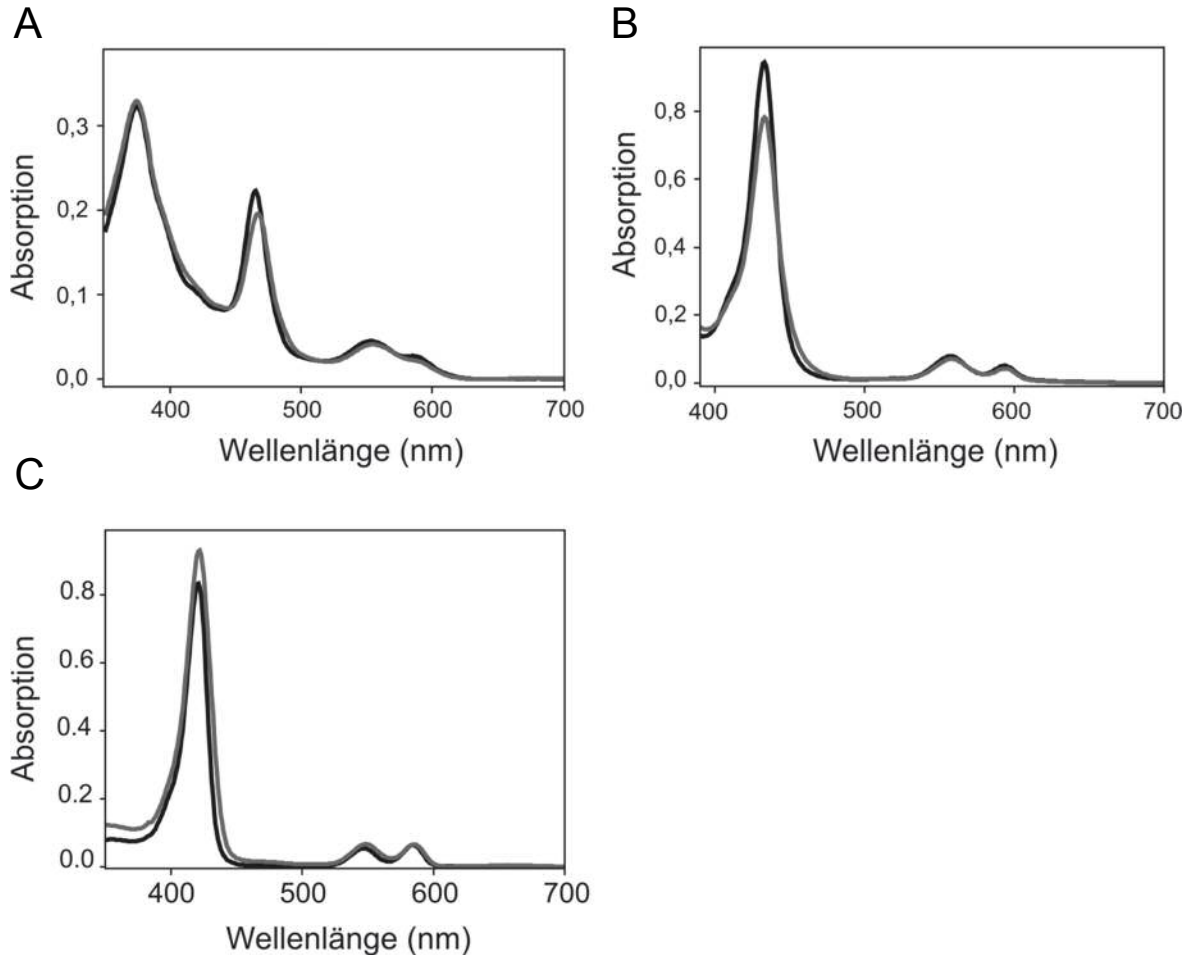


Abbildung 45: UV/VIS-Spektren von freiem Mn-Protoporphyrin IX bzw. Zn-Protoporphyrin IX und nach Apo-Cyt b₆-Zugabe.

Sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen zeigen die Absorptionsspektren des freien Mn-Protoporphyrin IX und nach Zugabe von Apo-Cyt b₆ identische Absorptionsbanden (Abbildung A bzw. B). Die Absorptionsmaxima des freien Zn-Protoporphyrin IX und nach Zugabe von Apo-Cyt b₆ sind unter oxidierenden Bedingungen gleich (Abbildung C). Da sich die Absorptionsmaxima nicht unterscheiden, findet keine Bindung der Porphyrine an Cyt b₆ statt.

Tabelle 16: Auflistung der Absorptionsmaxima und FWHM-Werte von Mn-Protoporphyrin IX und Zn-Protoporphyrin IX.

Die Maxima und FWHM-Werte wurden durch Gauß'sche Dekonvolution mit Hilfe des Programms PeakFit (Systat Software, Inc.) ermittelt.

Porphyrin	Redoxzustand	ohne Cyt b ₆		mit Cyt b ₆	
		Maximum	FWHM	Maximum	FWHM
Mn-Protoporphyrin IX	oxidiert	374	23.5	374	22.8
		464		464	
		554		554	
		586		586	
	reduziert	433	19.4	433	21.4
		557		557	
		593		593	
Zn-Protoporphyrin IX	oxidiert	421	14	421	16.4
		548		548	
		585		585	

Tabelle 17: Massenspektroskopisch identifizierten Sequenzen nach der proteolytischen Spaltung von Cyt b₆ mit Proteinase K.

Sämtliche Fragmente enthalten entweder eine vollständige oder einen Teil einer Cyt b₆ TM-Helix. Die TM-Bereiche sind rot unterlegt.

Länge AS	MW (Da)	Start	Ende	TM-Helix	Sequenz
36	3923,05	426	462	A	(Q)AIADDITSKYVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF (A)
35	3856,12	430	465	A	(D)DITSKYVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMT(F)
37	4267,27	434	471	A	(S)KYVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPT(V)
41	4672,42	435	476	A	(K)YVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPTVTDAF(A)
38	4339,29	435	473	A	(K)YVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPTVT(D)
38	4355,27	435	473	A	(K)YVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPTVT(D)
36	4155,16	435	471	A	(K)YVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPT(V)
36	4139,17	435	471	A	(K)YVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPT(V)
31	3458,83	435	466	A	(K)YVPPHVNI IFYALGGITLTAFLVQVATGF AMTF(Y)
27	3072,60	444	471	A	(F) YALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPT(V)
27	3088,59	444	471	A	(F) YALGGITLTAFLVQVATGF AMTFYYRPT(V)
21	2498,28	450	471	A	(I) TLTAFLVQVATGF AMTFYYRPT(V)
42	5135,74	484	526	B	(M)TEVNFGLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVYLTGGFKKPREL(T)
42	5151,74	484	526	B	(M)TEVNFGLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVYLTGGFKKPREL(T)
33	4123,17	484	517	B	(M)TEVNFGLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVYLT(G)
31	3909,03	484	515	B	(M)TEVNFGLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVY(L)
41	5034,69	485	526	B	(T)EVNFGLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVYLTGGFKKPREL(T)
41	5050,68	485	526	B	(T)EVNFGLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVYLTGGFKKPREL(T)
32	3993,21	490	522	B	(G)WLIRSVHRWS ASMMVLMMLHVF RVYLTGGFKK(P)
36	4191,34	503	539	B	(M) MVLMMLHVF RVYLTGGFKKPRELTWVTGVLGLTA(S)

37	4222,32	506	543	B	(L)MMILHVFRVYLTGGFKKPRELTWVTGVVLGVLTA SFGV(T)
17	2197,22	511	528	B	(H)VFRVYLTGGFKKPRELTW(V)
39	4339,29	524	563	C	(P)REL TWVTGVVLGVLTA SFGVTGYSLPWDQIGYWAVKIVTG(V)
49	5167,74	530	579	C	(V)TGVVLGVLTA SFGVTGYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIGSPLVELL(R)
42	4402,40	531	573	C	(T)GVVLGVLTA SFGVTGYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIGS(P)
41	4315,36	531	572	C	(T)GVVLGVLTA SFGVTGYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIG(S)
36	4023,13	544	580	C	(V)TGYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIGSPLVELL(R)
34	3766,07	545	579	C	(T)GYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIGSPLVELL(R)
30	3311,78	545	575	C	(T)GYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIGSPL(V)
27	3014,62	545	572	C	(T)GYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIG(S)
19	2234,17	545	564	C	(T)GYSLPWDQIGYWAVKIVTGVPDAIPVIG(P)
37	3984,19	563	600	D	(T)GVPDAIPVIGSPLVELL RGSASVGQSTL TRFYS LHTFV(L)
38	4395,42	575	613	D	(P)LVELL RGSASVGQSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
38	4395,42	576	614	D	(L)VELL RGSASVGQSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
35	4128,26	582	617	D	(G)SASVGQSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
40	4663,57	585	625	D	(S)VGQSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
39	4564,48	586	625	D	(V)GQSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
38	4507,48	587	625	D	(G)QSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
38	4523,47	587	625	D	(G)QSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
38	4523,47	587	625	D	(G)QSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
35	4256,30	587	622	D	(G)QSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
35	4240,32	587	622	D	(G)QSTL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
37	4379,42	588	625	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
37	4395,41	588	625	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
37	4411,39	588	625	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
37	4361,39	588	625	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
34	4112,25	588	622	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
34	4144,24	588	622	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
31	3855,12	588	619	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
31	3871,12	588	619	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
31	3837,11	588	619	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
29	3598,97	588	617	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
16	1990,12	588	604	D	(Q)STL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
12	1553,81	588	600	D	(Q)STL TRFYS LHTFV(L)
12	1553,82	588	600	D	(Q)STL TRFYS LHTFV(L)
36	4292,39	589	625	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
36	4324,37	589	625	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
36	4308,38	589	625	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
33	4025,23	589	622	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
33	4041,22	589	622	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
30	3768,09	589	619	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
28	3511,93	589	617	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
14	1790,00	589	603	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP(L)
14	1790,01	589	603	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP(L)
12	1579,87	589	601	D	(S)TL TRFYS LHTFVLP(L)
35	4207,33	590	625	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
35	4223,33	590	625	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
35	4191,32	590	625	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
35	4207,33	590	625	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
32	3924,18	590	622	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
29	3667,03	590	619	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
29	3683,04	590	619	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
29	3683,03	590	619	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
27	3410,88	590	617	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
27	3426,88	590	617	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
24	3010,66	590	614	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
15	1903,09	590	605	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
14	1802,04	590	604	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)
13	1688,96	590	603	D	(T)LTRFYS LHTFVLP LLTAVFMLMHF(L)

12	1575,87	590	602	D	(T)LTRFYSLHTFVLP(L)
12	1575,87	590	602	D	(T)LTRFYSLHTFVLP(L)
11	1478,82	590	601	D	(T)LTRFYSLHTFVL(P)
10	1365,74	590	600	D	(T)LTRFYSLHTFV(L)
34	4078,26	591	625	D	(L)TRFYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
31	3811,10	591	622	D	(L)TRFYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
33	3977,21	592	625	D	(T)RFYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
30	3710,05	592	622	D	(T)RFYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
27	3452,91	592	619	D	(T)RFYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
15	1877,04	592	607	D	(T)RFYSLHTFVLPLLTAV(F)
32	3821,10	593	625	D	(R)FYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
26	3296,80	593	619	D	(R)FYSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
31	3674,03	594	625	D	(F)YSLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
30	3510,97	595	625	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
30	3526,97	595	625	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
30	3526,97	595	625	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
27	3259,80	595	622	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
24	2986,66	595	619	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
24	3002,67	595	619	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
24	3002,66	595	619	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
24	3002,67	595	619	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
22	2730,52	595	617	D	(Y)SLHTFVLPLLTAVFMLMHFLMIR(K)
28	3310,84	597	625	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
28	3326,85	597	625	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
28	3326,85	597	625	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
28	3326,84	597	625	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
25	3043,70	597	622	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
22	2786,54	597	619	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
22	2802,54	597	619	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
22	2802,54	597	619	D	(L)HTFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
7	921,56	597	604	D	(L)HTFVLPLL(T)
6	808,47	597	603	D	(L)HTFVLP(L)
4	598,34	597	601	D	(L)HTFVL(P)
27	3173,79	598	625	D	(H)TFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
21	2649,49	598	619	D	(H)TFVLPLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
25	2925,67	600	625	D	(F)VLPLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
23	2713,52	602	625	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
23	2713,51	602	625	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
23	2729,52	602	625	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
21	2503,38	602	623	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQGISG(P)
17	2189,23	602	619	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
17	2189,22	602	619	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
17	2189,22	602	619	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
17	2205,22	602	619	D	(L)PLLTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
21	2503,38	604	625	D	(L)LTAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
18	2236,22	604	622	D	(L)LTAVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
15	1979,09	604	619	D	(L)LTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
15	1979,08	604	619	D	(L)LTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
15	1995,08	604	619	D	(L)LTAVFMLMHFLMIRKQ(G)
20	2390,30	605	625	D	(L)TAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
20	2406,30	605	625	D	(L)TAVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
17	2123,14	605	622	D	(L)TAVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
14	1866,00	605	619	D	(L)TAVFMLMHFLMIRKQ(G)
14	1866,00	605	619	D	(L)TAVFMLMHFLMIRKQ(G)
14	1881,99	605	619	D	(L)TAVFMLMHFLMIRKQ(G)
19	2289,25	606	625	D	(T)AVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
19	2305,25	606	625	D	(T)AVFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
16	2022,09	606	622	D	(T)AVFMLMHFLMIRKQGIS(G)
13	1764,96	606	619	D	(T)AVFMLMHFLMIRKQ(G)

18	2218,21	607	625	D	(A)VFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
18	2234,21	607	625	D	(A)VFMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
15	1951,06	607	622	D	(A)VFMLMHFLMIRKQGIS(G)
12	1693,92	607	619	D	(A)VFMLMHFLMIRKQ(G)
12	1693,92	607	619	D	(A)VFMLMHFLMIRKQ(G)
17	2119,14	608	625	D	(V)FMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
17	2119,14	608	625	D	(V)FMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
17	2119,14	608	625	D	(V)FMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
17	2135,14	608	625	D	(V)FMLMHFLMIRKQGISGPL(-)
11	1594,84	608	619	D	(V)FMLMHFLMIRKQ(G)
11	1594,85	608	619	D	(V)FMLMHFLMIRKQ(G)
11	1610,84	608	619	D	(V)FMLMHFLMIRKQ(G)
16	1972,07	609	625	D	(F)MLMHFLMIRKQGISGPL(-)

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstrom
APS	Amoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
cat/cm ^R	Chloramphenicol
CD	„circular dichroism“
Cyt b ₆	Cytochrom b ₆
dH ₂ O	destilliertes H ₂ O
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fd-FNR	Ferredoxin-NADP+-Reduktase

g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HRP	„horse radish peroxidase“
IPTG	Isopropylthiogalctosid
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
Mg	Magnesium
MP	Membranproteine
MBP	Maltose-Bindeprotein
N-	Amino-
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQ	Plastoquinon
PQH ₂	Plastoquinol
PC	Plastocyanin
PCR	„polymerase chain reaction“
PDB	Protein Data Bank“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	„rotations per minute“

SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris bufferd saline
TBST	Tris bufferd saline-Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Amino-Methan
UV/VIS	„ultraviolet/visible“
TM	Transmembran
zf	zell-frei

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung von Membranproteinen.....	3
Abbildung 2: Zwei-Stufen-Modell zur Faltung α -helikaler Membranproteine.	5
Abbildung 3: Topologie-Modell eines Membranproteins („ <i>positiv-inside-rule</i> “).	9
Abbildung 4: 3D-Strukturen von Bacteriorhodopsin (A) und Rhodopsin (B).	10
Abbildung 5: Häm-Strukturen der fünf Cytochrom-Gruppen.	12
Abbildung 6: Absorptionsspektrum des Cytochrom b_6 aus Spinat.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der photosynthetischen Elektronentransportkette.	14
Abbildung 8: Struktur des Cytochrom- b_6f -Komplexes.	15
Abbildung 9: Topologie-Modell (A) und 3D-Struktur (B) des Cytochrom b_6	16
Abbildung 10: Modell des Q-Zyklus am Cytochrom b_6f -Komplex.	17
Abbildung 11: Sequentielle Bindung zweier Häme an Cyt b_6	18
Abbildung 12: Strukturen von Häm (A) und Chlorophyll (B).	19
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Tetrapyrrol-Biosynthese.	20

Abbildung 14: Energieniveaus der Molekülorbitale eines Porphyrins nach Gouterman.	21
Abbildung 15: Schema der <i>Overlap Extension</i> PCR.	34
Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Apo-Cyt b ₆ Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3).	47
Abbildung 17: Elektrophoretische Analyse der Apo-Cyt b ₆ Reinigung.	48
Abbildung 18: UV/VIS-Spektren von freiem Häm und nach Zugabe von Apo-Cyt b ₆ unter oxidierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen.	49
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Verlängerung des BC-Loops von Cyt b ₆	51
Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse der Proben nach heterologer Expression von Apo-Cyt b ₆ Gly ₁₀ in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE.	51
Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel nach affinitätschromatographischer Reinigung von Apo-Cyt b ₆ Gly ₁₀	52
Abbildung 22: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der <i>in vitro</i> Rekonstitution der Apo-Cyt b ₆ Gly _n -Varianten mit Häm.	53
Abbildung 23: Titration von Häm mit Apo-Cyt b ₆ und den Apo-Cyt b ₆ Gly _n -Varianten.	54
Abbildung 24: SDS-Titration von Cyt b ₆ und den Cyt b ₆ Gly _n -Varianten mit verlängertem BC-Loop unter oxidierenden Bedingungen.	56
Abbildung 25: SDS-PAGE- (A, B) und Western-Blot-Analyse (C, D) der zf-Cyt b ₆ AB und zf-Cyt b ₆ CD Reinigung.	58
Abbildung 26: Western-Blot-Analyse der zf-Cyt b ₆ CD Reinigung.	59
Abbildung 27: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse der zf-Apo-Cyt b ₆ Reinigung.	60
Abbildung 28: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der <i>in vitro</i> Assemblierung von zf-Apo-Cyt b ₆ , zf-Apo-Cyt b ₆ AB und zf-Apo-Cyt b ₆ CD mit Häm.	62
Abbildung 29: UV/VIS-Spektren der Cyt b ₆ Fragmente nach Proteolyse.	64
Abbildung 30: Coomassie-gefärbte Gele und Immunoblots zur Analyse des proteolytisch verdauten Cyt b ₆	65
Abbildung 31: Gelfiltrationschromatographie (A) und SDS-PAGE-Analyse (B) des proteolytisch verdauten Cyt b ₆	66
Abbildung 32: CD-Spektrum der Cyt b ₆ TM-Helix B.	68
Abbildung 33: UV/VIS-Spektren von freiem Häm (schwarz) und nach Helix B-Zugabe (grau).	69
Abbildung 34: UV/VIS-Spektren von freiem Chlorophyll a (schwarz) und nach Zugabe von Apo-Cyt b ₆ (grau).	70

Abbildung 35: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der Bindung von Chlorophyll a bzw. Häm an Apo-Cyt b ₆ .	72
Abbildung 36: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der Bindung von Protoporphyrin IX (A) und Mg-Protoporphyrin IX (B) an Apo-Cyt b ₆ .	74
Abbildung 37: Strukturformeln von Häm, Chlorophyll a und den verwendeten Protoporphyrin IX-Derivaten.	76
Abbildung 38: UV/VIS-Spektren zur Untersuchung der Bindung von Protoporphyrin IX-Derivaten mit veränderten Seitenketten an Cyt b ₆ .	77
Abbildung 39: Porphyrin-Titration von Apo-Cyt b ₆ zur Untersuchung des Porphyrin-zu-Protein Bindungsverhältnisses.	78
Abbildung 40: Modell zur Assemblierung von Cyt b ₆ .	92
Abbildung 41: Strukturausschnitt von Cytochrom b ₆ mit gebundenem Häm b _L .	96
Abbildung 42: Strukturausschnitt von Cytochrom b ₆ mit gebundenem Häm b _H .	97
Abbildung 43: Die Eisen-Chelatase ist das Schlüsselenzym der Häm-Biosynthese.	99
Abbildung 44: Coomassie-gefärbte SDS-Gele zur Überprüfung der Apo-Cyt b ₆ Gly ₅ bzw. Apo-Cyt b ₆ Gly ₁₅ Expression und Reinigung.	103
Abbildung 45: UV/VIS-Spektren von freiem Mn-Protoporphyrin IX bzw. Zn-Protoporphyrin IX und nach Apo-Cyt b ₆ -Zugabe.	104

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.	25
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	27
Tabelle 3: Eingesetzte Puffer, Lösungen und Medien.	27
Tabelle 4: Verwendete <i>E. coli</i> -Bakterienstämme und deren Genotyp.	28
Tabelle 5: Verwendete Plasmide.	29
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.	29
Tabelle 7: Eingesetzte primäre Antikörper.	30
Tabelle 8: Eingesetzte sekundäre Antikörper.	30
Tabelle 9: Verwendete Computerprogramme.	31

Tabelle 10: Zusammensetzung der ersten und zweiten Reaktion der <i>Overlap Extension</i> PCR.	34
Tabelle 11: Zusammensetzung der dritten Reaktion der <i>Overlap Extension</i> PCR.	35
Tabelle 12: Zusammensetzung der Acrylamidgele.	40
Tabelle 13: Sequenzen der synthetisierten Cyt b ₆ Peptide.	44
Tabelle 14: Messparameter der CD-Spektroskopie.	44
Tabelle 15: Absorptionsmaxima mit den entsprechenden Halbwertsbreiten der freien Protoporphyrin IX-Derivate (ohne Cyt b ₆) und nach Zugabe von Apo-Cyt b ₆ (mit Apo-Cyt b ₆).	71
Tabelle 16: Auflistung der Absorptionsmaxima und FWHM-Werte von Mn-Protoporphyrin IX und Zn-Protoporphyrin IX.	105
Tabelle 17: Massenspektroskopisch identifizierten Sequenzen nach der proteolytischen Spaltung von Cyt b ₆ mit Proteinase K.	105

6.5 Literatur

- ALLEN, S. J., KIM, J. M., KHORANA, H. G., LU, H. & BOOTH, P. J. (2001) Structure and function in bacteriorhodopsin: the effect of the interhelical loops on the protein folding kinetics. *J Mol Biol*, 308, 423-35.
- ANBAZHAGAN, V., CYMER, F. & SCHNEIDER, D. (2010) Unfolding a transmembrane helix dimer: A FRET study in mixed micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495, 159-164.
- ANIANSSON, E. A. G. W., S. N (1974) On the Kinetics of Step-Wise Micelle Association. *J Phys Chem* 78, 1024–1030.
- ARKIN, I. T. & BRUNGER, A. T. (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta*, 1429, 113-28.
- ARNESANO, F., BANCİ, L., BERTINI, I., CIOFI-BAFFONI, S., WOODYEAR, T. L., JOHNSON, C. M. & BARKER, P. D. (2000) Structural consequences of b- to c-type heme conversion in oxidized Escherichia coli cytochrome b562. *Biochemistry*, 39, 1499-514.
- BARRETT, P. J., SONG, Y., VAN HORN, W. D., HUSTEDT, E. J., SCHAFER, J. M., HADZISELIMOVIC, A., BEEL, A. J. & SANDERS, C. R. (2012) The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*, 336, 1168-71.
- BEALE, S. I. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 60, 43-73.
- BELTZER, J. P., FIEDLER, K., FUHRER, C., GEFFEN, I., HANDSCHIN, C., WESSELS, H. P. & SPIESS, M. (1991) Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *J Biol Chem*, 266, 973-8.
- BEUTLER, R., KAUFMANN, M., RUGGIERO, F. & ERNI, B. (2000) The glucose transporter of the Escherichia coli phosphotransferase system: linker insertion mutants and split variants. *Biochemistry*, 39, 3745-50.
- BLOBEL, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 1496-500.
- BOOTH, P. J. (2000) Unravelling the folding of bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta*, 1460, 4-14.
- BOOTH, P. J. (2012) A successful change of circumstance: a transition state for membrane protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 22, 469-75.
- BOOTH, P. J. & FAROOQ, A. (1997) Intermediates in the assembly of bacteriorhodopsin investigated by time-resolved absorption spectroscopy. *European Journal of Biochemistry*, 246, 674-680.

- BOOTH, P. J., TEMPLER, R. H., MEIJBERG, W., ALLEN, S. J., CURRAN, A. R. & LORCH, M. (2001) In vitro studies of membrane protein folding. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36, 501-603.
- BOWIE, J. U. (1997) Helix packing in membrane proteins. *J Mol Biol*, 272, 780-9.
- BOWIE, J. U. (2005) Solving the membrane protein folding problem. *Nature*, 438, 581-9.
- BOWIE, J. U. (2013) Structural biology. Membrane protein twists and turns. *Science*, 339, 398-9.
- BRAUN, P., GOLDBERG, E., NEGRON, C., VON JAN, M., XU, F., NANDA, V., KODER, R. L. & NOY, D. (2010) Design principles for chlorophyll-binding sites in helical proteins. *Proteins*, 79, 463-76.
- BRILL, A. S. & WILLIAMS, R. J. (1961) The absorption spectra, magnetic moments and the binding of iron in some haemoproteins. *Biochem J*, 78, 246-53.
- BRUNET, A. P., HUANG, E. S., HUFFINE, M. E., LOEB, J. E., WELTMAN, R. J. & HECHT, M. H. (1993) The role of turns in the structure of an alpha-helical protein. *Nature*, 364, 355-8.
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M. & SHORT, J. M. (1987) XL1-B: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, 5, 376.
- CAMMARATA, K. V. & SCHMIDT, G. W. (1992) In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: deletion mutagenesis and analyses of pigment binding. *Biochemistry*, 31, 2779-89.
- CAO, Z. & BOWIE, J. U. (2012) Shifting hydrogen bonds may produce flexible transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 8121-6.
- CHEN, G. Q. & GOUAUX, E. (1999) Probing the folding and unfolding of wild-type and mutant forms of bacteriorhodopsin in micellar solutions: evaluation of reversible unfolding conditions. *Biochemistry*, 38, 15380-7.
- CHOI, Y., AGARWAL, S. & DEANE, C. M. (2013) How long is a piece of loop? *PeerJ*, 1, e1.
- CHOU, P. Y. & FASMAN, G. D. (1974) Conformational Parameters for Amino-Acids in Helical, Beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry*, 13, 211-222.
- CHOU, P. Y. A. F., G.D. (1978) Predictions of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.*, 45-148.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2172-5.
- COGDELL, R. J., ISAACS, N. W., FREER, A. A., HOWARD, T. D., GARDINER, A. T., PRINCE, S. M. & PAPIZ, M. Z. (2003) The structural basis of light-harvesting in purple bacteria. *FEBS Lett*, 555, 35-9.

- COPE, D. L., HOLMAN, G. D., BALDWIN, S. A. & WOLSTENHOLME, A. J. (1994) Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J*, 300 (Pt 2), 291-4.
- CORDOVA, J. M., NOACK, P. L., HILCOVE, S. A., LEAR, J. D. & GHIRLANDA, G. (2007) Design of a functional membrane protein by engineering a heme-binding site in glycophorin A. *J Am Chem Soc*, 129, 512-8.
- CORNAH, J. E., TERRY, M. J. & SMITH, A. G. (2003) Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends Plant Sci*, 8, 224-30.
- CRAMER, W. A., HASAN, S. S. & YAMASHITA, E. (2011) The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 788-802.
- CRAMER, W. A. & WHITMARSH, J. (1977) Photosynthetic Cytochromes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 28, 133-172.
- CRAMER, W. A., YAN, J., ZHANG, H., KURISU, G. & SMITH, J. L. (2005) Structure of the cytochrome b₆f complex: new prosthetic groups, Q-space, and the 'hors d'oeuvres hypothesis' for assembly of the complex. *Photosynth Res*, 85, 133-43.
- BANILIUS, D., YAMASHITA, E., WHITELEGGE, J.P., ZATSMAN, A.I., HENDRICH, M.P., HASAN, S.S., RYAN, C.M., CRAMER, W.A. (2009) Structure-Function, Stability, and Chemical Modification of the Cyanobacterial Cytochrome b₆f Complex from Nostoc sp. PCC 7120. *J.Biol.Chem.* 284, 9861-9869.
- DANIELLI, J. F. & Davson, H.J. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 495-508.
- DARROUZET, E., COOLEY, J. W. & DALDAL, F. (2004) The Cytochrome bc (1) Complex and its Homologue the b (6) f Complex: Similarities and Differences. *Photosynth Res*, 79, 25-44.
- DE VITRY, C. (2011) Cytochrome c maturation system on the negative side of bioenergetic membranes: CCB or System IV. *FEBS J*, 278, 4189-97.
- DILGER, J. P., FISHER, L.R., HAYDON, D.A. (1982) A critical comparison of electrical and optical methods for bilayer thickness determination. *Chemistry and Physics of Lipids*, 30, 159-176.
- DREHER, C. (2009) Heme binding properties of the transmembrane cytochrome b₆: Implications for assembly, stability and function. *Fakultät für Biologie und Medizinische Fakultät*. Freiburg im Breisgau, Albert-Ludwigs-Universität.
- DREHER, C., PRODOHL, A., HIELSCHER, R., HELLWIG, P. & SCHNEIDER, D. (2008) Multiple step assembly of the transmembrane cytochrome b₆. *J Mol Biol*, 382, 1057-65.
- DREHER, C., PRODOHL, A., WEBER, M. & SCHNEIDER, D. (2007) Heme binding properties of heterologously expressed spinach cytochrome b(6): implications for transmembrane b-type cytochrome formation. *FEBS Lett*, 581, 2647-51.

- EBELING, W., HENNRICH, N., KLOCKOW, M., METZ, H., ORTH, H. D. & LANG, H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium-Album Limber*. *European Journal of Biochemistry*, 47, 91-97.
- ENGELMAN, D. M., CHEN, Y., CHIN, C. N., CURRAN, A. R., DIXON, A. M., DUPUY, A. D., LEE, A. S., LEHNERT, U., MATTHEWS, E. E., RESHETNYAK, Y. K., SENES, A. & POPOT, J. L. (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett*, 555, 122-5.
- ESPOSTI, M.D., DE VRIES, S., CRIMI, M., GHELLI, A., PATARNELLO, T., MEYER, A. (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143, 243-271.
- FENG, Y. Q. & SLIGAR, S. G. (1991) Effect of heme binding on the structure and stability of *Escherichia coli* apocytochrome b562. *Biochemistry*, 30, 10150-5.
- FERREIRA, K. N., IVERSON, T. M., MAGHLAOUI, K., BARBER, J. & IWATA, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303, 1831-8.
- FIEDLER, S., BROECKER, J. & KELLER, S. (2010) Protein folding in membranes. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1779-98.
- FLORY, P. J. & SCHIMMEL, P. R. (1967) Dipole moments in relation to configuration of polypeptide chains. *J Am Chem Soc*, 89, 6807-13.
- FRACHET, P., DUPERRAY, A., DELACHANAL, E. & MARGUERIE, G. (1992) Role of the transmembrane and cytoplasmic domains in the assembly and surface exposure of the platelet integrin GPIIb/IIIa. *Biochemistry*, 31, 2408-15.
- FRANCKE, C., LOYAL, R., OHAD, I. & HAEHNEL, W. (1999) In vitro assembly of a beta2 cytochrome b559-like complex from the chemically synthesised beta-subunit encoded by the *Synechocystis* sp. 6803 psbF gene. *FEBS Lett*, 442, 75-8.
- GOLDHOR, S. (1968) Protein: lipid ratios of liver mitochondria during development. *J Cell Biol*, 37, 823-5.
- GONI, F. M. (2014) The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim Biophys Acta*, 1838, 1467-76.
- GOUTERMAN, M. A. W., G.H. (1963) Spectra of Porphyrins. Part II. Four Orbital Model. *Journal of molecular Spectroscopy*, 11, 108-127.
- GRATKOWSKI, H., LEAR, J. D. & DEGRADO, W. F. (2001) Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 880-5.
- GRAY, K. A., GROOMS, M., MYLLYKALLIO, H., MOOMAW, C., SLAUGHTER, C. & DALDAL, F. (1994) *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a CuA center. *Biochemistry*, 33, 3120-7.
- HALTIA, T. & FREIRE, E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1228, 1-27.
- HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.

- HASAN, S. S. & CRAMER, W. A. (2014) Internal Lipid Architecture of the Hetero-Oligomeric Cytochrome bf Complex. *Structure*.
- HASAN, S. S., YAMASHITA, E., BANIULIS, D. & CRAMER, W. A. (2013a) Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome b6f complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4297-302.
- HASAN, S. S., YAMASHITA, E. & CRAMER, W. A. (2013b) Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome bf-lipidic charge transfer complex. *Biochim Biophys Acta*.
- HEDIN, L. E., ILLERGARD, K. & ELOFSSON, A. (2011) An introduction to membrane proteins. *J Proteome Res*, 10, 3324-31.
- HEDIN, L. E., OJEMALM, K., BERNSEL, A., HENNERDAL, A., ILLERGARD, K., ENQUIST, K., KAUKO, A., CRISTOBAL, S., VON HEIJNE, G., LERCH-BADER, M., NILSSON, I. & ELOFSSON, A. (2010) Membrane Insertion of Marginally Hydrophobic Transmembrane Helices Depends on Sequence Context. *Journal of Molecular Biology*, 396, 221-229.
- HEIMDAL, J., JENSEN, K. P., DEVARAJAN, A. & RYDE, U. (2007) The role of axial ligands for the structure and function of chlorophylls. *J Biol Inorg Chem*, 12, 49-61.
- HILDENBEUTEL, M., HEGG, E. L., STEPHAN, K., GRUSCHKE, S., MEUNIER, B. & OTT, M. (2014) Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation. *J Cell Biol*, 205, 511-524.
- HORN, R., GRUNDMANN, G. & PAULSEN, H. (2007) Consecutive binding of chlorophylls a and b during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-a/b protein (LHCIIb). *J Mol Biol*, 366, 1045-54.
- HORN, R. & PAULSEN, H. (2002) Folding in vitro of light-harvesting chlorophyll a/b protein is coupled with pigment binding. *J Mol Biol*, 318, 547-56.
- HORTON, R. M., HUNT, H. D., HO, S. N., PULLEN, J. K. & PEASE, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77, 61-8.
- HUANG, K. S., BAYLEY, H., LIAO, M. J., LONDON, E. & KHORANA, H. G. (1981) Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem*, 256, 3802-9.
- HUNT, J. F., EARNEST, T. N., BOUSCHE, O., KALGHATGI, K., REILLY, K., HORVATH, C., ROTHSCILD, K. J. & ENGELMAN, D. M. (1997) A biophysical study of integral membrane protein folding. *Biochemistry*, 36, 15156-76.
- IMAI, K., GROMIHA, M. M. & HORTON, P. (2008) Mitochondrial beta-barrel proteins, an exclusive club? *Cell*, 135, 1158-9; author reply 1159-60.
- JENNEY, F. E., JR. & DALDAL, F. (1993) A novel membrane-associated c-type cytochrome, cyt cy, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J*, 12, 1283-92.

- JONES, D. T., TAYLOR, W. R. & THORNTON, J. M. (1994) A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry*, 33, 3038-49.
- KAHN, T. W. & ENGELMAN, D. M. (1992) Bacteriorhodopsin can be refolded from two independently stable transmembrane helices and the complementary five-helix fragment. *Biochemistry*, 31, 6144-51.
- KAHN, T. W., STURTEVANT, J. M. & ENGELMAN, D. M. (1992) Thermodynamic measurements of the contributions of helix-connecting loops and of retinal to the stability of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 31, 8829-39.
- KAIM, W. A. S. (1991) *Bioanorganische Chemie*, Stuttgart, B. G. Teubner.
- KAMIYA, N. & SHEN, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 98-103.
- KAUKO, A., ILLERGARD, K. & ELOFSSON, A. (2008) Coils in the membrane core are conserved and functionally important. *J Mol Biol*, 380, 170-80.
- KIEFER, H. (2003) In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1610, 57-62.
- KIM, J. M., BOOTH, P. J., ALLEN, S. J. & KHORANA, H. G. (2001) Structure and function in bacteriorhodopsin: the role of the interhelical loops in the folding and stability of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol*, 308, 409-22.
- KLEIN-SEETHARAMAN, J. (2005) Dual role of interactions between membranous and soluble portions of helical membrane receptors for folding and signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 183-9.
- KNIPP, M., TAING, J. J. & HE, C. (2011) Reduction of the lipocalin type heme containing protein nitrophorin -- sensitivity of the fold-stabilizing cysteine disulfides toward routine heme-iron reduction. *J Inorg Biochem*, 105, 1405-12.
- KOCH, H.-G. & SCHNEIDER, D. (2007) Folding, assembly and stability of transmembrane Cytochromes. *Current Chemical Biology*, 1, 59-74.
- KOREDOVYCH, I. V., SENES, A., KIM, Y. H., LEAR, J. D., FRY, H. C., THERIEN, M. J., BLASIE, J. K., WALKER, F. A. & DEGRADO, W. F. (2010) De novo design and molecular assembly of a transmembrane diporphyrin-binding protein complex. *J Am Chem Soc*, 132, 15516-8.
- KRANZ, R., LILL, R., GOLDMAN, B., BONNARD, G. & MERCHANT, S. (1998) Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Molecular Microbiology*, 29, 383-396.
- KROLICZEWSKI, J., GUBERNATOR, B., ROGNER, M. & SZCZEPANIAK, A. (2011) On the mode of integration of the thylakoid membrane protein cytochrome b(6) into cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Acta Biochim Pol*, 58, 335-43.
- KROLICZEWSKI, J., HOMBEK-URBAN, K. & SZCZEPANIAK, A. (2005) Integration of the thylakoid membrane protein cytochrome b6 in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 44, 7570-6.

- KROLICZEWSKI, J. & SZCZEPANIAK, A. (2002) In vitro reconstitution of the spinach chloroplast cytochrome b6 protein from a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1598, 177-84.
- KUHLBRANDT, W., WANG, D. N. & FUJIYOSHI, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367, 614-21.
- KURAS, R., BUSCHLEN, S. & WOLLMAN, F. A. (1995) Maturation of pre-apocytochrome f in vivo. A site-directed mutagenesis study in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 270, 27797-803.
- KURAS, R., DE VITRY, C., CHOQUET, Y., GIRARD-BASCOU, J., CULLER, D., BUSCHLEN, S., MERCHANT, S. & WOLLMAN, F. A. (1997) Molecular genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome b6. *J Biol Chem*, 272, 32427-35.
- KURISU, G., ZHANG, H., SMITH, J. L. & CRAMER, W. A. (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 302, 1009-14.
- LADURNER, A. G. & FERSHT, A. R. (1997) Glutamine, alanine or glycine repeats inserted into the loop of a protein have minimal effects on stability and folding rates. *J Mol Biol*, 273, 330-7.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANDIN, J. S., KATRAGADDA, M. & ALBERT, A. D. (2001) Thermal destabilization of rhodopsin and opsin by proteolytic cleavage in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochemistry*, 40, 11176-83.
- LANGOSCH, D. & HERINGA, J. (1998) Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins*, 31, 150-9.
- LAU, F. W. & BOWIE, J. U. (1997) A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry*, 36, 5884-92.
- LUJAN, M. A., MARTINEZ, J. I., ALONSO, P. J., GUERRERO, F., RONCEL, M., ORTEGA, J. M., YRUELA, I. & PICOREL, R. (2012) Reconstitution, spectroscopy, and redox properties of the photosynthetic recombinant cytochrome b(559) from higher plants. *Photosynth Res*, 112, 193-204.
- MARTI, T. (1998) Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments. *J Biol Chem*, 273, 9312-9322.
- MATTICE, W. L., RISER, J. M. & CLARK, D. S. (1976) Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry*, 15, 4264-72.
- MENNENGA, A. (2007) Einlagerung von Häm, Chlorophyll- und Bakteriochlorophyllderivaten in *de novo* synthetisierte Peptide als Modellsysteme natürlicher Protein-Kofaktor-Komplexe. *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- MOFFATT, B. A. & STUDIER, F. W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, 49, 221-7.

- MONNE, M., HERMANSSON, M. & VON HEIJNE, G. (1999a) A turn propensity scale for transmembrane helices. *J Mol Biol*, 288, 141-5.
- MONNE, M., NILSSON, I., ELOFSSON, A. & VON HEIJNE, G. (1999b) Turns in transmembrane helices: determination of the minimal length of a "helical hairpin" and derivation of a fine-grained turn propensity scale. *J Mol Biol*, 293, 807-14.
- MONTSERRET, R., MCLEISH, M. J., BOCKMANN, A., GEOURJON, C. & PENIN, F. (2000) Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding. *Biochemistry*, 39, 8362-8373.
- MOORE G.R., P. G. W. (1990) Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. *Springer Verlag*. Berlin/Heidelberg, Springer Verlag.
- MOULIN, M. & SMITH, A. G. (2005) Regulation of tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Biochem Soc Trans*, 33, 737-42.
- MUKHOPADHYAY, K. & LECOMTE, J. T. (2004) A relationship between heme binding and protein stability in cytochrome b5. *Biochemistry*, 43, 12227-36.
- NADEAU, V. G. & DEBER, C. M. (2013) Loop Sequence Dictates the Secondary Structure of a Human Membrane Protein Hairpin. *Biochemistry*, 52, 2419-2426.
- NAGI, A. D., ANDERSON, K. S. & REGAN, L. (1999) Using loop length variants to dissect the folding pathway of a four-helix-bundle protein. *J Mol Biol*, 286, 257-65.
- NAGI, A. D. & REGAN, L. (1997) An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. *Fold Des*, 2, 67-75.
- NIHEI, C., NAKAYASHIKI, T., NAKAMURA, K., INOKUCHI, H., GENNIS, R. B., KOJIMA, S. & KITA, K. (2001) Abortive assembly of succinate-ubiquinone reductase (complex II) in a ferrochelatase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics*, 265, 394-404.
- NILSSON, I. & VON HEIJNE, G. (1998) Breaking the camel's back: proline-induced turns in a model transmembrane helix. *J Mol Biol*, 284, 1185-9.
- OTZEN, D. E. (2003) Folding of DsbB in mixed micelles: a kinetic analysis of the stability of a bacterial membrane protein. *J Mol Biol*, 330, 641-9.
- OTZEN, D. E. (2005) Conformational detours during folding of a collapsed state. *Biochim Biophys Acta*, 1750, 146-53.
- OZOLS, J. & STRITTMATTER, P. (1964) The Interaction of Porphyrins and Metalloporphyrins with Apocytochrome Beta-5. *J Biol Chem*, 239, 1018-23.
- PACE, C. N., SHIRLEY, B.A., THOMPSON, J.A. (1989) Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach.*, Creighton TE (Hrsg.), IRL, Oxford.
- PAULSEN, H., FINKENZELLER, B. & KUHLEIN, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur J Biochem*, 215, 809-16.

- PAULSEN, H., RUMLER, U. & RUDIGER, W. (1990) Reconstitution of Pigment-Containing Complexes from Light-Harvesting Chlorophyll-a/B-Binding Protein Overexpressed in Escherichia-Coli. *Planta*, 181, 204-211.
- POPOT, J. L. & ENGELMAN, D. M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, 29, 4031-7.
- POPOT, J. L. & ENGELMAN, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem*, 69, 881-922.
- PRODÖHL, A. (2006) Transmembrane b-Typ Cytochrome als Modell zur Untersuchung von Assemblierung und Stabilität kofaktortragender Membranproteine. *Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg*.
- PRODOHL, A., DREHER, C., HIELSCHER, R., HELLWIG, P. & SCHNEIDER, D. (2007) Heterologous expression and in vitro assembly of the transmembrane cytochrome b6. *Protein Expr Purif*, 56, 279-85.
- PRODÖHL, A., DREHER, C., HIELSCHER, R., HELLWIG, P. & SCHNEIDER, D. (2007) Heterologous expression and in vitro assembly of the transmembrane cytochrome b6. *Protein Expr Purif*, 56, 279-85.
- PRODOHL, A., VOLKMER, T., FINGER, C. & SCHNEIDER, D. (2005) Defining the structural basis for assembly of a transmembrane cytochrome. *J Mol Biol*, 350, 744-56.
- RATH, A. & DEBER, C. M. (2013) Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 434, 67-72.
- RATH, A., GLIBOWICKA, M., NADEAU, V. G., CHEN, G. & DEBER, C. M. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1760-5.
- REYNOLDS, J. A. & TANFORD, C. (1970) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem*, 245, 5161-5.
- RIDGE, K. D., LEE, S.S., ABDULAEEN, G. (1996) Examining rhodopsin folding and assembly through expression of polypeptide fragments. *J Biol Chem*, 271, 7860-7867.
- ROBERTSON, D. E., FARID, R. S., MOSER, C. C., URBAUER, J. L., MULHOLLAND, S. E., PIDIKITI, R., LEAR, J. D., WAND, A. J., DEGRADO, W. F. & DUTTON, P. L. (1994) Design and synthesis of multi-haem proteins. *Nature*, 368, 425-32.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- SCHNEIDER, D. (2004) Rendezvous in a membrane: close packing, hydrogen bonding, and the formation of transmembrane helix oligomers. *FEBS Lett*, 577, 5-8.
- SCHNEIDER, D. & ENGELMAN, D. M. (2003) GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem*, 278, 3105-11.

- SCHNEIDER, D. & ENGELMAN, D. M. (2004) Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. *J Biol Chem*, 279, 9840-6.
- SCHOEPFER, R. (1993) The pRSET family of T7 promoter expression vectors for Escherichia coli. *Gene*, 124, 83-5.
- SCHWARZ, D., JUNGE, F., DURST, F., FROLICH, N., SCHNEIDER, B., RECKEL, S., SOBHANIFAR, S., DOTSCH, V. & BERNHARD, F. (2007) Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc*, 2, 2945-57.
- SEHGAL, P., MOGENSEN, J. E. & OTZEN, D. E. (2005) Using micellar mole fractions to assess membrane protein stability in mixed micelles. *Biochim Biophys Acta*, 1716, 59-68.
- SINGER, S. J. (1972) A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. *Ann N Y Acad Sci*, 195, 16-23.
- SMITH, L. J., KAHRAMAN, A. & THORNTON, J. M. (2010) Heme proteins--diversity in structural characteristics, function, and folding. *Proteins*, 78, 2349-68.
- SORENSEN, H. P. & MORTENSEN, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *J Biotechnol*, 115, 113-28.
- STORM, D. R. & KOSHLAND, D. E. (1970) A source for the special catalytic power of enzymes: orbital steering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 66, 445-52.
- STROEBEL, D., CHOQUET, Y., POPOT, J. L. & PICOT, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature*, 426, 413-8.
- STRYER, L. (1996) Biochemie. 4 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- STUART, A. L. & WASSERMAN, A. R. (1973) Purification of cytochrome b6. A tightly bound protein in chloroplast membranes. *Biochim Biophys Acta*, 314, 284-97.
- STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189, 113-30.
- TANAKA, R. & TANAKA, A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 58, 321-46.
- TASTAN, O., DUTTA, A., BOOTH, P. & KLEIN-SEETHARAMAN, J. (2013) Retinal proteins as model systems for membrane protein folding. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 656-63.
- TASTAN, O., KLEIN-SEETHARAMAN, J. & MEIROVITCH, H. (2009) The Effect of Loops on the Structural Organization of alpha-Helical Membrane Proteins. *Biophysical Journal*, 96, 2299-2312.
- TERPE, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, 211-22.

- THÖNY-MEYER, L. (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 337-76.
- THÖNY-MEYER, L. (2002) Cytochrome c maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans*, 30, 633-8.
- TRAVAGLINI-ALLOCATELLI, C. (2013) Protein Machineries Involved in the Attachment of Heme to Cytochrome c: Protein Structures and Molecular Mechanisms. *Scientifica (Cairo)*, 505714.
- TUSNADY, G. E. & SIMON, I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol*, 283, 489-506.
- TWIGG, A. I., BANIULIS, D., CRAMER, W. A. & HENDRICH, M. P. (2009) EPR detection of an O(2) surrogate bound to heme c(n) of the cytochrome b(6)f complex. *J Am Chem Soc*, 131, 12536-7.
- ULMSCHNEIDER, M. B. & SANSOM, M. S. (2001) Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*, 1512, 1-14.
- ULMSCHNEIDER, M. B., SANSOM, M. S. & DI NOLA, A. (2005) Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins*, 59, 252-65.
- VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 112-24.
- VANHEE, P., VERSCHUEREN, E., BAETEN, L., STRICHER, F., SERRANO, L., ROUSSEAU, F. & SCHYMKOWITZ, J. (2011) BriX: a database of protein building blocks for structural analysis, modeling and design. *Nucleic Acids Res*, 39, D435-42.
- VON HEIJNE, G. (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature*, 341, 456-8.
- VON HEIJNE, G. (2007) The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J Intern Med*, 261, 543-57.
- VON HEIJNE, G. V. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *Embo J*, 5, 3021-3027.
- VON JAGOW, G. & SEBALD, W. (1980) b-Type cytochromes. *Annu Rev Biochem*, 49, 281-314.
- WEBER, M. (2010) Strukturelle Grundlagen der Assemblierung des Transmembranproteins Cytochrom b559'. *Fakultät für Biologie*. Freiburg i. Braisgau, Albert-Ludwigs-Universität.
- WHITE, S. H. & VON HEIJNE, G. (2005) Transmembrane helices before, during, and after insertion. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 378-86.
- WHITE, S. H. & VON HEIJNE, G. (2008) How translocons select transmembrane helices. *Annu Rev Biophys*, 37, 23-42.
- WHITE, S. H. & WIMLEY, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28, 319-65.

- WIENER, M. C. & WHITE, S. H. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups. *Biophys J*, 61, 428-33.
- WILLOWS, R. D. (2003) Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Nat Prod Rep*, 20, 327-41.
- WIMLEY, W. C. & WHITE, S. H. (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol*, 3, 842-8.
- WOJCIK, J., MORNON, J. P. & CHOMILIER, J. (1999) New efficient statistical sequence-dependent structure prediction of short to medium-sized protein loops based on an exhaustive loop classification. *J Mol Biol*, 289, 1469-90.
- YAMASHITA, E., ZHANG, H. & CRAMER, W. A. (2007) Structure of the cytochrome b6f complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme cn. *J Mol Biol*, 370, 39-52.
- YANKOVSKAYA, V., HORSEFIELD, R., TORNROTH, S., LUNA-CHAVEZ, C., MIYOSHI, H., LEGER, C., BYRNE, B., CECCHINI, G. & IWATA, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299, 700-4.
- YOHANNAN, S., FAHAM, S., YANG, D., WHITELEGGE, J. P. & BOWIE, J. U. (2004) The evolution of transmembrane helix kinks and the structural diversity of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 959-63.
- YUN, C. H., CROFTS, A. R. & GENNIS, R. B. (1991) Assignment of the histidine axial ligands to the cytochrome bH and cytochrome bL components of the bc1 complex from *Rhodobacter sphaeroides* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 30, 6747-54.
- YURLOVA, L., KAHYA, N., AGGARWAL, S., KAISER, H. J., CHIANTIA, S., BAKHTI, M., PEWZNER-JUNG, Y., BEN-DAVID, O., FUTERMAN, A. H., BRUGGER, B. & SIMONS, M. (2011) Self-segregation of myelin membrane lipids in model membranes. *Biophys J*, 101, 2713-20.
- ZEN, K. H., MCKENNA, E., BIBI, E., HARDY, D. & KABACK, H. R. (1994) Expression of lactose permease in contiguous fragments as a probe for membrane-spanning domains. *Biochemistry*, 33, 8198-206.
- ZOUNI, A., WITT, H. T., KERN, J., FROMME, P., KRAUSS, N., SAENGER, W. & ORTH, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 409, 739-43.

6.6 Lebenslauf

6.7 Danksagung