

**Spektroskopische Charakterisierung der
Rubber Oxygenase RoxA
aus *Xanthomonas* sp. 35Y**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Georg Schmitt

aus Bingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Jendrossek

Mitberichter: Prof. Dr. Oliver Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2012

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2012

meinen Eltern

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel angegeben habe.

Stuttgart, den 20. 01. 2012

Georg Schmitt

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | 11 |
| Abkürzungsverzeichnis | 13 |
| Zusammenfassung | 18 |
| Abstract | 20 |
| 1 Einleitung | 22 |
| 1.1 Naturkautschuk ist Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren) | 22 |
| 1.2 Der Abbau von Naturkautschuk | 24 |
| 1.2.1 Kautschuk abbauende Organismen | 25 |
| 1.2.2 <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | 27 |
| 1.3 Die Rubber Oxygenase RoxA ist eine Di-Häm <i>c</i> -Typ-Cytochrom Dioxygenase | 27 |
| 1.4 Die Spaltung und Verwertung von Kautschuk | 30 |
| 1.5 Enzyme mit Ähnlichkeit zu RoxA | 32 |
| 1.5.1 Häm-Oxygenasen | 32 |
| 1.5.2 Bakterielle Cytochrom <i>c</i> Peroxidasen (CCPs) | 34 |
| 1.5.3 MauG | 36 |
| 1.6 Ziele der Arbeit | 37 |
| 2 Material und Methoden | 38 |
| 2.1 Organismen und Plasmide | 38 |
| 2.2 Nährmedien | 41 |
| 2.3 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen | 47 |
| 2.3.1 <i>Escherichia coli</i> | 47 |
| 2.3.2 <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | 47 |
| 2.3.3 <i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365 | 48 |
| 2.4 Zellaufschluss | 49 |
| 2.4.1 Ultraschall | 49 |
| 2.4.2 French Press | 49 |
| 2.5 Periplasmaaufschluss | 49 |
| 2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren | 50 |
| 2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA | 50 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.6.1.1 | Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> | 50 |
| 2.6.1.2 | Plasmidisolierung aus <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | 51 |
| 2.6.2 | Isolierung genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien | 52 |
| 2.6.3 | Übertragung von Nukleinsäuren | 53 |
| 2.6.3.1 | Übertragung von Plasmiden nach <i>E. coli</i> | 53 |
| 2.6.3.2 | Übertragung von Plasmiden nach <i>Xanthomonas</i> sp. | 54 |
| 2.6.4 | Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) | 56 |
| 2.6.5 | Modifikation von DNA | 59 |
| 2.6.5.1 | Restriktion von DNA | 59 |
| 2.6.5.2 | Ligation von linearen DNA Fragmenten | 60 |
| 2.6.6 | DNA-Sequenzierung | 60 |
| 2.6.7 | Agarose-Gelelektrophorese | 60 |
| 2.6.7.1 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 61 |
| 2.7 | Arbeiten mit Proteinen | 62 |
| 2.7.1 | RoxA-Aktivitätstest | 62 |
| 2.7.2 | Peroxidase-Tests | 63 |
| 2.7.2.1 | Peroxidase-Assay mit Pyrogallol | 64 |
| 2.7.2.2 | Peroxidase-Assay mit Guaiacol | 65 |
| 2.7.2.3 | Peroxidase-Assay mit 4-Aminoantipyrin/2,4-Dichlorphenol | 65 |
| 2.7.2.4 | Peroxidase-Assay mit Ferrocytochrom <i>c</i> | 66 |
| 2.7.3 | Proteinbestimmung | 66 |
| 2.7.3.1 | Bradford-Test | 66 |
| 2.7.3.2 | Bicinchoninsäure-Test (BCA-Assay) | 67 |
| 2.7.3.3 | Proteinbestimmung von RoxA | 68 |
| 2.7.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 69 |
| 2.7.4.1 | Coomassie-Färbung | 70 |
| 2.7.4.2 | Silberfärbung | 71 |
| 2.7.4.3 | Hämefärbung | 71 |
| 2.7.5 | Western-Blot und Immunfärbung | 72 |
| 2.7.6 | 2-D-Gelelektrophorese | 73 |
| 2.7.6.1 | Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 74 |
| 2.7.6.2 | SDS-Gelelektrophorese | 75 |
| 2.7.7 | Konzentrierung von Proteinen mit Ultrafiltration | 75 |
| 2.8 | Kultivierung von <i>Xanthomonas</i> sp. 35 Y und Reinigung von RoxA | 76 |
| 2.8.1 | Kultivierung von <i>Xanthomonas</i> sp. in Latexkultur | 76 |
| 2.8.2 | Kultivierung von <i>Xanthomonas</i> sp. p4781.1:: <i>roxA</i> in Vollmedium | 76 |
| 2.9 | Reinigung von RoxA | 77 |
| 2.9.1 | Aufarbeitung des Kulturüberstandes | 77 |
| 2.9.2 | FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) | 77 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 2.9.2.1 | Gelfiltration zur Größentrennung von Proteinen und zur Entsalzung | 78 |
| 2.9.2.2 | Gelfiltration an Superdex G75 | 79 |
| 2.9.2.3 | Anionenaustausch-Chromatographie | 80 |
| 2.9.2.4 | Hydroxyapatit-Chromatographie | 81 |
| 2.10 | Redox titrationen | 82 |
| 2.10.1 | Xanthin/ Xanthin-Oxidase -Methode | 82 |
| 2.10.2 | Photoreduktion mit Deazaflavin | 84 |
| 2.11 | Zersetzung von Latex mit Enzym-Mediator-Systemen | 85 |
| 2.12 | Spektroskopie | 86 |
| 2.12.1 | UV-Vis-Spektroskopie | 86 |
| 2.12.2 | CD-Spektroskopie (Circular Dichroism) | 88 |
| 2.12.3 | EPR-Spektroskopie (Elektronen-Paramagnetische Resonanz) | 93 |
| 2.13 | Chemikalien | 98 |
| 2.14 | Programme | 100 |
| 3 | Ergebnisse | 101 |
| | Teil I Überexpression und Reinigung von RoxA | 101 |
| 3.1 | Überexpression von RoxA | 101 |
| 3.1.1 | Heterologe Überexpression von RoxA in <i>E. coli</i> | 101 |
| 3.1.1.1 | Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors | 101 |
| 3.1.1.2 | Expression von RoxA in <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 104 |
| 3.1.2 | Homologe Überexpression von RoxA in <i>Xanthomonas</i> sp. 35 Y | 107 |
| 3.2 | Expression und Reinigung von RoxA | 109 |
| 3.2.1 | Kultivierung von <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | 109 |
| 3.2.2 | Chromatographische Reinigung von RoxA aus dem Wildtyp | 111 |
| 3.2.3 | Homologe Überexpression in <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y_p4782.1::roxA | 114 |
| | Teil II Allgemeine Untersuchungen | 123 |
| 3.3 | Ermittlung des isoelektrischen Punktes | 123 |
| 3.4 | Induktion der RoxA-Expression | 124 |
| 3.4.1 | RoxA-Expressionsversuche mit <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y ohne Latex | 124 |
| 3.4.2 | Induktion von RoxA mit Spaltprodukten | 124 |
| 3.5 | Korrelation zwischen Enzym- und Substratkonzentration | 127 |
| 3.6 | Aktivität von RoxA in Gegenwart von Inhibitoren | 131 |
| 3.6.1 | Inhibierende Substanzen | 131 |
| 3.6.2 | Auswirkung von Puffer und Versuchsdurchführung auf die Aktivität | 136 |

| | | |
|---|---|------------|
| 3.6.3 | Katalase-Hemmung in verschiedenen Puffern | 138 |
| 3.6.4 | Untersuchung der Peroxidase-Aktivität von RoxA | 140 |
| 3.7 | Konstruktion und Expression von RoxA-Mutanten | 142 |
| 3.7.1 | Konstruktion von <i>roxA</i> -Mutanten | 142 |
| 3.7.2 | Expression von RoxA-Varianten in <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | 143 |
| 3.7.3 | RoxA-Mutante W302L | 144 |
| 3.8 | Untersuchungen zu sequenzähnlichen Proteinen | 149 |
| 3.8.1 | Protein-Blast mit RoxA | 149 |
| 3.8.2 | Kultivierung des Myxobakteriums <i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365 | 153 |
| 3.8.3 | Klonierung des <i>Hoch_1661</i> -Gens und Expressionsversuche | 154 |
| Teil III Spektroskopische Charakterisierung von RoxA | | 156 |
| 3.9 | Untersuchung von RoxA mit UV-Vis-Spektroskopie | 156 |
| 3.9.1 | RoxA "as isolated" mit Reduktionsmitteln | 156 |
| 3.9.2 | RoxA "as isolated" mit Oxidationsmitteln | 160 |
| 3.9.3 | RoxA unter anaeroben Bedingungen | 162 |
| 3.9.4 | Titration von RoxA | 170 |
| 3.9.4.1 | Das Redoxpotential der Hämzentren | 170 |
| 3.9.4.2 | RoxA kann zwei Elektronen aufnehmen | 172 |
| 3.9.5 | UV-Vis-Spektren in Gegenwart von Substrat-ähnlichen Verbindungen | 175 |
| 3.9.6 | Die Wirkung externer Hämliganden | 176 |
| 3.9.6.1 | Der Effekt von Imidazol auf das RoxA-Spektrum | 176 |
| 3.9.6.2 | Die Effekte weiterer N-heterozyklischer Verbindungen | 179 |
| 3.9.6.3 | Spektren nach Entfernung durch Gelfiltration | 186 |
| 3.9.6.4 | Reduktion und Oxidation von RoxA nach Bindung externer Liganden | 187 |
| 3.9.6.5 | Lineare N-Verbindungen | 193 |
| 3.9.6.6 | Anionische Liganden | 193 |
| 3.10 | Untersuchung von RoxA mit CD-Spektroskopie | 194 |
| 3.10.1 | Das CD-Spektrum von RoxA "as isolated" | 194 |
| 3.10.1.1 | Der Fern-UV-Bereich | 194 |
| 3.10.1.2 | Der Nah-UV- und Vis-Bereich | 199 |
| 3.10.2 | RoxA unter reduzierenden Bedingungen | 201 |
| 3.10.3 | Die Wirkung von Wasserstoffperoxid | 206 |
| 3.10.4 | Die Wirkung Substrat-ähnlicher Verbindungen | 209 |
| 3.10.5 | Die Wirkung der externer Hämliganden | 210 |
| 3.11 | Untersuchung von RoxA mit EPR-Spektroskopie | 217 |
| 3.11.1 | RoxA "as isolated" | 217 |

| | | |
|-----------------|---|------------|
| 3.11.2 | RoxA nach Reduktion und Reoxidation | 223 |
| 3.11.3 | RoxA mit Wasserstoffperoxid | 227 |
| 3.11.4 | RoxA unter anaeroben Bedingungen | 229 |
| 3.11.5 | Die Wirkung externer Häm-Liganden | 231 |
| 3.11.6 | Die Wirkung Substrat-ähnlicher Verbindungen | 237 |
| 3.11.7 | Die Wirkung von Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren) | 242 |
| 3.11.8 | Veränderungen mit Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren) unter Sauerstoffausschluss | 247 |
| 3.11.9 | Effekte durch Substrate nach Reduktion und Reoxidation | 249 |
| 3.11.10 | Die Wirkung von Hämliganden auf substratinduzierte Zustände | 256 |
| 4. | Diskussion | 261 |
| Teil I | Überexpression und Reinigung von RoxA | 261 |
| 4.1 | Überexpression und Reinigung von RoxA | 261 |
| 4.1.1 | Überexpression von RoxA | 261 |
| 4.1.2 | Expression und Reinigung von RoxA | 263 |
| Teil II | Allgemeine Untersuchungen | 265 |
| 4.2 | Allgemeine Untersuchungen | 265 |
| 4.2.1 | Induktion der RoxA-Expression | 265 |
| 4.2.2 | Korrelation zwischen Enzym- und Substratkonzentration | 267 |
| 4.2.3 | Bewertung des Aktivitätstest-Verfahrens | 269 |
| 4.2.4 | Inhibierung der RoxA-Aktivität | 271 |
| 4.2.5 | Die RoxA-W302L-Mutante | 274 |
| Teil III | Spektroskopische Charakterisierung von RoxA | 277 |
| 4.3 | Das CD-Spektrum von RoxA | 277 |
| 4.3.1 | Der Fern-UV-Bereich | 277 |
| 4.3.2 | Der Nah-UV-Bereich | 279 |
| 4.3.3 | Der Soret- und Vis-Bereich | 281 |
| 4.3.3.1 | Das N-terminale Hämzentrum zeigt eine CD-Bandenaufspaltung | 284 |
| 4.3.3.2 | Vergleich zur Cytochrom <i>c</i> Peroxidase aus <i>P. aeruginosa</i> | 286 |
| 4.4 | Das optische Absorptionsspektrum | 289 |
| 4.4.1 | Extinktionskoeffizienten von RoxA | 289 |
| 4.4.2 | Redoxpotential von RoxA | 290 |
| 4.4.3 | RoxA ist ein "Spilt- α "-Cytochrom | 293 |

| | | |
|--|--|------------|
| 4.5 | Das EPR-Spektrum von RoxA | 295 |
| 4.6 | Ist RoxA im Grundzustand oxygeniert? | 302 |
| 4.6.1 | RoxA unter Sauerstoffausschluss | 305 |
| 4.7 | Die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit RoxA | 310 |
| 4.8 | <i>High-spin</i> -Zustände in RoxA | 316 |
| 4.9 | Die Wirkung von Häm-Liganden auf RoxA | 319 |
| 4.9.1 | N-Heterozyklen binden am N-terminalen Hämzentrum | 319 |
| 4.9.2 | Die reduzierende Wirkung auf das optische Spektrum | 323 |
| 4.9.2.1 | Hinweise aus dem CD-Spektrum | 324 |
| 4.9.2.2 | Eine Ladungsverschiebung als Ursache | 325 |
| 4.9.3 | Die Geschwindigkeit der Veränderungen | 328 |
| 4.9.4 | Reduktion und Oxidation von RoxA nach Bindung externer Liganden | 330 |
| 4.9.4.1 | Reduktion | 330 |
| 4.9.4.2 | Reoxidation durch Oxidationsmittel | 333 |
| 4.10 | Der Ort der Latexspaltung ist das N-terminale Hämzentrum | 335 |
| Teil IV Reaktionsmechanismus und Ausblick | | 340 |
| 4.11 | Mechanismus der Kautschukspaltung durch RoxA | 340 |
| 4.11.1 | Ergebnis-basierte Überlegungen zum Reaktionsmechanismus | 340 |
| 4.11.2 | Eine oxygeniertes Hämzentrum als Startpunkt der Kautschukspaltung? | 346 |
| 4.11.3 | Informationen aus dem Vergleich mit anderen Hämproteinen | 349 |
| 4.11.4 | Die Rolle des C-terminalen Hämzentrums in RoxA ist unklar | 355 |
| 4.11.5 | Ein hypothetisches Schema der Kautschukspaltung | 357 |
| 4.12 | RoxA aus <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y ist kein Unikat | 360 |
| 4.13 | Hat RoxA bei seinen Nutzern das Monopol zur Kautschukspaltung? | 363 |
| 4.14 | Ausblick | 366 |
| 5 Anhang | | 368 |
| Literaturverzeichnis | | 373 |
| Danksagung | | 393 |
| Lebenslauf | | 395 |

Abbildungsverzeichnis

| Abbildung | Seite | Abbildung | Seite |
|-----------|-------|-----------|-------|
| 1.1 | 23 | 3.22 | 141 |
| 1.2 | 28 | 3.23 | 145 |
| 1.3 | 29 | 3.24 | 146 |
| 1.4 | 30 | 3.25 | 146 |
| 1.5 | 31 | 3.26 | 147 |
| 1.6 | 35 | 3.27 | 148 |
| | | 3.28 | 151 |
| 2.1 | 63 | 3.29 | 152 |
| 2.2 | 64 | 3.30 | 157 |
| 2.3 | 79 | 3.31 | 157 |
| 2.4 | 85 | 3.32 | 158 |
| 2.5 | 89 | 3.33 | 159 |
| 2.6 | 89 | 3.34 | 161 |
| 2.7 | 91 | 3.35 | 163 |
| 2.8 | 92 | 3.36 | 165 |
| 2.9 | 93 | 3.37 | 165 |
| 2.10 | 94 | 3.38 | 166 |
| 2.11 | 95 | 3.39 | 167 |
| 2.12 | 95 | 3.40 | 168 |
| 2.13 | 96 | 3.41 | 169 |
| 2.14 | 97 | 3.42 | 172 |
| | | 3.43 | 173 |
| 3.1 | 102 | 3.44 | 174 |
| 3.2 | 103 | 3.45 | 176 |
| 3.3 | 105 | 3.46 | 178 |
| 3.4 | 106 | 3.47 | 180 |
| 3.5 | 109 | 3.48 | 180 |
| 3.6 | 110 | 3.49 | 181 |
| 3.7 | 112 | 3.50 | 181 |
| 3.8 | 112 | 3.51 | 182 |
| 3.9 | 113 | 3.52 | 184 |
| 3.10 | 116 | 3.53 | 185 |
| 3.11 | 118 | 3.54 | 186 |
| 3.12 | 118 | 3.55 | 188 |
| 3.13 | 119 | 3.56 | 189 |
| 3.14 | 120 | 3.57 | 190 |
| 3.15 | 122 | 3.58 | 190 |
| 3.16 | 122 | 3.59 | 192 |
| 3.17 | 123 | 3.60 | 193 |
| 3.18 | 125 | 3.61 | 195 |
| 3.19 | 128 | 3.62 | 196 |
| 3.20 | 129 | 3.63 | 196 |
| 3.21 | 141 | 3.64 | 198 |

| | | | |
|-------|-----|------------------------|----------|
| 3.65 | 198 | 4.1 | 276 |
| 3.66 | 200 | 4.2 | 284 |
| 3.67 | 202 | 4.3 | 296 |
| 3.68 | 203 | 4.4 | 304 |
| 3.69 | 205 | 4.5 | 345 |
| 3.70 | 206 | 4.6 | 351 |
| 3.71 | 207 | 4.7 | 359 |
| 3.72 | 208 | | |
| 3.73 | 210 | | |
| 3.74 | 211 | <u>Tabellen</u> | |
| 3.75 | 213 | 2.1 | 38 |
| 3.76 | 214 | 2.2 | 40 |
| 3.77 | 215 | 2.3 | 47 |
| 3.78 | 219 | 2.4 | 53 |
| 3.79 | 221 | 2.5 | 57 |
| 3.80 | 222 | 2.6 | 57 |
| 3.81 | 223 | 2.7 | 58 |
| 3.82 | 225 | 2.8 | 59 |
| 3.83 | 226 | 2.9 | 60 |
| 3.84 | 227 | 2.10 | 67 |
| 3.85 | 228 | 2.11 | 68 |
| 3.86 | 230 | 2.12 | 83 |
| 3.87 | 232 | 2.13 | 85, 86 |
| 3.88 | 233 | 2.14 | 98 |
| 3.89 | 234 | 2.15 | 98 |
| 3.90 | 235 | 2.16 | 100 |
| 3.91 | 236 | | |
| 3.92 | 238 | 3.1 | 119 |
| 3.93 | 238 | 3.2 | 132, 133 |
| 3.94 | 240 | 3.3 | 134 |
| 3.95 | 241 | 3.4 | 135 |
| 3.96 | 243 | 3.5 | 136 |
| 3.97 | 244 | 3.6 | 137 |
| 3.98 | 246 | 3.7 | 138 |
| 3.99 | 248 | 3.8 | 139 |
| 3.100 | 248 | 3.9 | 150 |
| 3.101 | 250 | | |
| 3.102 | 251 | 4.1 | 289 |
| 3.103 | 252 | 4.2 | 343 |
| 3.104 | 252 | | |
| 3.105 | 253 | 5.1 | 369 |
| 3.106 | 254 | 5.2 | 372 |
| 3.107 | 255 | | |
| 3.108 | 256 | | |
| 3.109 | 257 | | |
| 3.110 | 258 | | |
| 3.111 | 260 | | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| Å | Ångström |
| aa | Aminosäuren |
| Abb. | Abbildung |
| Abs | Absorption |
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) |
| ADA | <u>A</u> cetonyl- <u>D</u> iprenyl- <u>A</u> cetoaldehyd |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| (d)ATP | (desoxy-) <u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin) |
| °C | Grad Celsius |
| c | Konzentration |
| C | molare Konzentration |
| C- | Kohlenstoff |
| ca. | zirka |
| Ccm/ <i>ccm</i> | <u>c</u> ytochrome <u>c</u> <u>m</u> aturation |
| CCP(s) | Cytochrom <i>c</i> Peroxidase(n) |
| CD | Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>) |
| CHAPS | 3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonium-1-propansulfonat |
| Cm | Chloramphenicol |
| cm | Zentimeter |
| CmR | Chloramphenicol-resistent |
| CO | Kohlenmonoxid |
| CoA | Coenzym A |
| Cond. | <i>conductivity</i> = Leitfähigkeit |
| ct | <i>charge transfer</i> |
| (d)CTP | (desoxy-) <u>C</u> ytosin <u>t</u> riphosphat |
| C-terminal | carboxyterminal |
| cv | Säulenvolumen (<i>column volume</i>) |
| d | Tage ; Durchmesser (Weglänge) |
| (k)Da | (kilo)Dalton |
| d. h. | das heißt |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| deg | <i>degrees</i> |
| dest. | destilliert |

| | |
|-------------------------------|--|
| Dith. | Na ⁺ -Dithionit |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | =DNS (Desoxyribonucleinsäure) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DSMZ | <u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung für <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen |
| DTT | Dithiotreitol |
| E | Extinktion |
| E ₀ ' | Standardpotential (pH 7) |
| EC | <u>E</u> nzyme <u>C</u> ommision (number) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| E-Häm | <i>electron transferring heme</i> |
| EPR | <u>E</u> lektronen- <u>p</u> aramagnetische <u>R</u> esonanz = ESR |
| ESR | <u>E</u> lektronen- <u>S</u> pin <u>R</u> esonanz = EPR |
| <i>et al.</i> | "et alii": und andere |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| F | Faraday-Konstante |
| (μ)F | (mikro)Farad |
| Fa. | Firma |
| Fe(II) | Eisen (reduziert) |
| Fe(III) | Eisen (oxidiert) |
| FeCy | K ⁺ -Ferricyanid |
| ff | folgende |
| FF | <i>Fast Flow</i> |
| FPLC | <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> |
| FPLC | <i>Fluid-Phase Liquid Chromatography</i> |
| g | Gramm |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GPC | <i>Gel Permeations-Chromatographie</i> |
| GPC | Gelpermeations-Chromatographie |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| (d)GTP | (desoxy-) <u>G</u> uanin <u>t</u> riphosphat |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HALS | <i>highly anisotropic low-spin</i> |
| H-Brücke | Wasserstoffbrücke |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase) |
| HT | high tension |

| | |
|------------------|---|
| IDO | Indolamin-2,3-Dioxygenase |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| Imi | Imidazol |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobasen |
| K_m | K_m -Wert (Michaelis-Menten-Kinetik) |
| Km | Kanamycin |
| konz. | konzentriert |
| KP | Kaliumphosphat |
| KPP | Kaliumphosphat-Puffer |
| L | Liter |
| lac | Lactose |
| LB | Luria Bertani |
| LCP | <i>left circular polarized light</i> (links-polarisiertes Licht) |
| Lcp/lcp | <i>Latex Clearing Protein</i> |
| M | molar |
| m | Meter ; Masse |
| M | Molar (mol/Liter) |
| MADH | Methylamin-Dehydrogenase |
| Mau | <i>methylamine utilization</i> |
| Mau/mau | <i>methylamine utilization</i> |
| Max. | Maximum |
| min | Minuten |
| Min. | Minimum |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| MM | Minimalmedium |
| mm | Millimeter |
| ms | milli-Sekunden |
| mS | milli-Siemens |
| MW | <i>molecular weight</i> (Molekulargewicht) |
| μ | mikro |
| μ M | mikromolar |
| n | nano |
| NAD ⁺ | <u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin <u>d</u> inukleotid (oxidiert) |
| NADH | <u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin <u>d</u> inukleotid (reduziert) |
| NB | Nutrient Broth |
| NBT | 4-Nitroblau-tetrazoliumchlorid |
| NEP | <i>Nitrosomonas europaea</i> (Cytochrom <i>c</i> -) Peroxidase |
| ng | nano-Gramm |

| | |
|------------------------------|--|
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| NMR | <i>N</i> uklear <i>m</i> agnetische <i>r</i> esonanz <i>s</i> pektroskopie |
| NR | <i>N</i> atural <i>R</i> ubber |
| nt | Nukleotide |
| N-terminal | aminoterminal |
| O ₂ | (Di)Sauerstoff |
| O ₂ ^{•-} | Superoxid (-anion /-radikal) |
| OD | Optische Dichte |
| ODTD | 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-dien-1-al |
| OH ⁻ | Hydroxid- |
| ORD | <i>O</i> ptical <i>R</i> otatory <i>D</i> ispersion |
| ox. | oxidiert |
| Oxi / oxi | Oxidoreduktase |
| p | piko |
| p.a. | "pro analysis" (zur Analyse) |
| PAGE | <i>P</i> olyacrylamid- <i>G</i> eleelektrophorese |
| PAP | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Cytochrom <i>c</i> -) Peroxidase |
| PCR | <i>P</i> olymerase <i>C</i> hain <i>R</i> eaction |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pers. | persönlich(e) |
| pH | pH-Wert (negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration) |
| P-Häm | <i>peroxidatic heme</i> |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| pK _s | negative dekadische Logarithmus der Säure-Gleichgewichtskonstante |
| PM | <i>P</i> hoto <i>m</i> ultiplier |
| pmol | picomol |
| PMS | <i>P</i> henazin- <i>M</i> etho <i>s</i> ulfat |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| Pyr | Pyridin |
| R | allg. Gaskonstante |
| RCP | <i>Rhodobacter capsulatus</i> (Cytochrom <i>c</i> -) Peroxidase |
| RCP | <i>right circular polarized light</i> (rechts-polarisiertes Licht) |
| red. | reduziert |
| rek. | rekombinant |
| rel. | relativ |
| RNA | =RNS (Ribonukleinsäure) |
| Rox / rox | <i>R</i> ubber <i>O</i> xygenase |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |

| | |
|----------------|---|
| s. | siehe |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunden |
| SL | <u>S</u> purenelement- <u>L</u> ösung |
| sp. | Spezies |
| SWA | <i>Sea water agar</i> |
| SWS | <i>salt water solution</i> |
| T | Temperatur |
| T+T- | Tsuchii- und Takeda- |
| Tab. | Tabelle |
| (T)TBS | (<u>T</u> ween) <u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TDO | Tryptophan-2,3-Dioxygenase |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| T _m | Schmelztemperatur |
| TMBZ | Tetramethylbenzidin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| TTQ | <i>tryptophan tryptophylquinone</i> |
| (d)TTP | (desoxy-) <u>T</u> hymint <u>r</u> iphosphat |
| U | Units |
| u. a. | unter anderem |
| u. U. | unter Umständen |
| ÜN | über Nacht |
| urspr. | ursprünglich |
| UV | <i>ultraviolet</i> |
| (k)V | (kilo)Volt |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| vgl. | vergleiche |
| Vis | <i>visible</i> |
| Vol. | Volumen |
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| Wt | Wildtyp |
| z | Anzahl Elektronen |
| z. B. | Zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |
| Δ | delta, Differenz- |
| ε | molarer Absorptionskoeffizient |
| Ω | Ohm |

Zusammenfassung

Thema dieser Arbeit ist die Charakterisierung der "Rubber Oxygenase A" (RoxA), einer extrazellulären Di-Häm-Dioxygenase aus dem Gram-negativen Bakterium *Xanthomonas* sp. 35Y. RoxA katalysiert die oxidative Spaltung von Naturkautschuk (Poly(*cis*-1,4-isopren)) in Produkte mit Aldehyd- und Keto-Enden.

Es wurde eine eingehende Charakterisierung des Enzyms durch UV-Vis- und EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*)-Spektroskopie durchgeführt. Das EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" weist konstante *low-spin*-Signale der His-His-kooordinierten C-terminalen Hämgruppe und variable *high*- und *low-spin*-Signale der N-terminalen Hämgruppe mit nur einem His-Liganden auf. Ferner wurde erstmals das CD (*Circular Dichroism*)-Spektrum von RoxA beschrieben. Im Rahmen einer Inhibitor-Studie wurde eine Hemmung der RoxA-katalysierten Spaltungsreaktion durch Reduktions- und Oxidationsmittel, substratähnliche Substanzen und typische Hämliganden wie z. B. Imidazol festgestellt. Insgesamt erlaubten diese Untersuchungen auch eine kritische Einschätzung des Aktivitätstest-Verfahrens. Es wurde eine zweistufige chromatographische Reinigung von rekombinant homolog exprimiertem RoxA etabliert. Für reines RoxA wurde ein molarer Extinktionskoeffizient bei 406 nm von $\epsilon_{406} = 2,067 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und eine $\epsilon_{406}/\epsilon_{280}$ -Absorption von 1,35 bestimmt. Anhand unterschiedlicher α -Banden bei 549 nm bzw. 553 nm sind die Hämzentren im reduzierten Zustand zu unterscheiden. Übereinstimmend mit einer sukzessiven, bald aufeinander folgenden Reduktion der Hämgruppen, belegten Redox titrationen kaum unterscheidbare Häm-Redoxpotentiale bei -65 mV und etwa -145 mV . Die räumliche Struktur von RoxA, die in Kooperation mit der AG O. Einsle (Freiburg) in einer Auflösung von $1,8 \text{ \AA}$ erhalten wurde, zeigt das C-terminale Hämzentrum His-His-kooordiniert, das N-terminale Zentrum nur von einem His-Rest und einem "O"-Liganden an sechster Position. Auf dieser Grundlage konnte die spektroskopische Untersuchung das etwas höhere Redoxpotential und die α -Bande bei 549 nm dem N-terminalen Hämzentrum zuordnen und zeigen, dass dieses bereits in RoxA "as isolated" für die Bindung externer Hämliganden zugänglich ist. EPR-Spektren weisen auf die Lokalisierung von Poly(*cis*-1,4-isopren) in der nahen Umgebung, nicht aber direkt am Häm-Fe des gleichen Hämzentrums hin, und veranschaulichen eine erschwerte Hämliganden-Bindung bei Anwesenheit von Latex. Die RoxA-Struktur zeigt eine Ähnlichkeit zu bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen (CCPs) und MauG-Proteinen in der Anordnung beider Hämgruppen, sowie einiger konservierter Aminosäuren in deren Umgebung. Dennoch weist die unpolare Umgebung des katalytischen Zentrums in RoxA einen klaren Unterschied zu diesen Enzymen auf. Aufgrund der fehlenden Peroxidase-Aktivität und Inhibierung durch H_2O_2 , sowie beträchtlicher Unterschiede der Häm-Redoxpotentiale zu CCPs, widerlegen die Ergebnisse eindeutig, dass RoxA eine Funktion als Peroxidase erfüllt. Wichtige Erkenntnisse zu den Redox- und Spinzuständen der beiden Hämzentren in RoxA lieferten Versuchsansätze nach Reduktion und anschließender

Reoxidation durch Luftsauerstoff im Vergleich zu anderen Oxidationsmitteln. Die Untersuchung des in Abwesenheit von Kautschuklatex exprimierten rekombinanten RoxA erlaubte Aussagen zum Grundzustand des Enzyms vor dem Kontakt mit dem Substrat. So unterstützen EPR-Spektren einen diamagnetischen, EPR-unsichtbaren Zustand des N-terminalen Hämzentrums in RoxA "as isolated". Damit zusammenhängend, entsprachen in Gegenwart von Oxidationsmitteln eintretende Veränderungen im optischen Spektrum solchen, die nach Entfernung von Sauerstoff eintraten. Die Annahme einer stabilen Fe(II)–O₂ ↔ Fe(III)–O₂^{•-}-Koordination in RoxA "as isolated" bietet eine gemeinsame Erklärung für diese Phänomene.

Diese erhaltenen Ergebnisse erlauben die Erstellung eines Rahmens für den katalytischen Mechanismus der Kautschukspaltung durch RoxA: Als Startpunkt der Spaltungsreaktion wird ein oxygenierter Grundzustand angenommen, dessen Stabilität darüber hinaus für ein *c*-Typ-Cytochrom sehr ungewöhnlich ist und an ein O₂-Bindeprotein erinnert. Zudem verweisen die Ergebnisse auf den Ablauf der Kautschukspaltung allein am N-terminalen Hämzentrum, das eine Funktion zur Bindung und Aktivierung von O₂ erfüllt. Für eine Beteiligung der C-terminalen Hämgruppe, d. h. für einen Wechsel des Redoxzustandes, sowie des Spinzustandes, gibt es in Übereinstimmung mit einer vergleichbaren Y294H-Mutante von MauG keine Hinweise. Auch zeigt die Struktur von reduziertem RoxA keine Konformationsänderung an. Das Kautschukpolymer könnte durch einen hydrophoben Kanal zum katalytischen Hämzentrum gelangen.

RoxA ist bislang das einzige *c*-Typ-Cytochrom, von dem eine Dioxygenase-Aktivität beschrieben ist. In jüngerer Zeit wurden jedoch zum RoxA-Protein ähnliche Genprodukte in den Gram-negativen *Haliangium ochraceum* (Hoch_1661, Hoch_1441) und *Myxococcus fulvus* (LILAB_11505) mit bis zu 63 % Identität zu RoxA, sowie Ähnlichkeiten in der jeweiligen genomischen Umgebung gefunden. Deren Entdeckung regt die Diskussion über eine Entwicklung unterschiedlicher Kautschuk spaltender Enzyme in Gram-positiven (Lcp) und Gram-negativen Bakterien (RoxA), sowie die Existenz weiterer RoxA-Homologen in *Xanthomonas* sp. an.

Abstract

The subject of this thesis is the characterization of the "Rubber Oxygenase A" (RoxA) from the Gram-negative *Xanthomonas* sp. 35Y. RoxA is an extracellular di-heme dioxygenase and catalyses the cleavage of natural rubber (Poly(*cis*-1,4-isoprene)) in products with aldehyde- and keto-ends.

A detailed characterization of the enzyme with UV-Vis- and EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) -Spectroscopy was carried out. The EPR-spectrum of RoxA as isolated contains non-varying *low-spin*-signals of the His-His-coordinated C-terminal heme group and variable *high*- and *low-spin*-signals of the N-terminal heme with only one His-ligand. For the first time the CD (*Circular Dichroism*) -spectrum of RoxA was described. It was found that an inhibition of the RoxA-catalysed cleavage reaction by reducing- and oxidizing agents, substrate-like compounds and typical heme ligands like imidazole. This inhibitor study enabled a critical evaluation of the activity test procedure. A chromatographic purification from the *Xanthomonas* sp. culture supernatant was established in two steps. For pure RoxA a molar extinction coefficient of $\epsilon_{406} = 2,067 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and an $\epsilon_{406}/\epsilon_{280}$ -absorption of 1,35 was calculated. The heme centers are distinguishable in the reduced state by means of two different α -bands at 549 nm and 553 nm, respectively. In agreement with a fast consecutive reduction of the hemes, redox titrations confirm hardly distinguishable heme-potentials at -65 mV and $\approx -145 \text{ mV}$. The three-dimensional structure of RoxA was solved in cooperation with the group of O. Einsle (Freiburg, Germany) to a resolution of 1.8 Å. It shows the C-terminal heme His-His-coordinated, the N-terminal heme with only one Histidine and one "O"-ligand at the sixth coordination site. Based on this structure the spectroscopic investigation could assign the slightly higher potential and the 549 nm α -band to the N-terminal heme center. It was shown that his heme already is accessible for the binding of external heme ligands in RoxA as isolated. EPR-spectra suggest the localization of Poly(*cis*-1,4-isoprene) in the vicinity of the same heme center, but not directly at the Fe-coordination site, and demonstrate that binding of heme ligands in the presence of rubber latex is hindered. The structure of RoxA exhibits similarity to bacterial cytochrome *c* peroxidases (CCPs) and MauG proteins in the arrangement of both heme groups as well as some surrounding conserved amino acids. However, the unpolar environment of the catalytic center in RoxA demonstrates a distinct difference to these enzymes. Because of the absent peroxidase activity and inhibition by H_2O_2 , as well as significant differences of the heme redox potentials to those of CCPs, the results clearly disprove that RoxA is a peroxidase. Important findings concerning the redox- and spin states of each heme center in RoxA were provided by experiments of reduction and following reoxidation by O_2 compared to other oxidizing agents. The investigation of recombinant RoxA that was expressed in the absence of rubber latex allowed assertions about the ground state of RoxA before contact to the substrate. Therefore, EPR-spectra support a diamagnetic, EPR-silent state at the N-terminal heme in

RoxA as isolated. Connected with this observation, changes in the optical spectrum in the presence of oxidizing agents resemble those after removal of dioxygen. The assumption of a stable $\text{Fe(II)-O}_2 \leftrightarrow \text{Fe(III)-O}_2^{\bullet-}$ -coordination in RoxA as isolated provides a common explanation of these findings.

These obtained results enable set limits to the catalytic mechanism of rubber cleavage by RoxA: The starting point of the cleavage reaction is assumed as an oxygenated ground state, whose stability furthermore is extraordinarily stable for a *c*-type cytochrome and is reminiscent of an O_2 -binding protein. In addition, the results indicate the reaction cycle of rubber cleavage proceeds solely at the N-terminal heme center, which serves a role in binding and activation of dioxygen. In accordance to a comparable Y294H mutant of MauG there is no evidence for an involvement, i. e. a change of the redox- and spin state, of the C-terminal heme. Moreover, the structure of reduced RoxA does not display any conformational change. Possibly the rubber polymer could reach the catalytic heme center through a hydrophobic channel.

So far, RoxA is the only *c*-type cytochrome, of which a dioxygenase activity is described. Recently, similar gene products in Gram-negative *Haliangium ochraceum* (Hoch_1661, Hoch_1441) and *Myxococcus fulvus* (LILAB_11505) with up to 63 % identity to RoxA, as well as similarities in their particular genomic context were found. Their discovery encourages the discussion about the development of different rubber cleaving enzymes in Gram-positive (Lcp) and Gram-negative bacteria (RoxA), as well as the existence of further RoxA homologous in *Xanthomonas* sp. 35Y.

1 Einleitung

1.1 Naturkautschuk ist Poly(*cis*-1,4-isopren)

Eines der wichtigsten Biopolymere unserer Zeit ist zweifellos der Naturkautschuk. Seine einzigartigen Eigenschaften aufgrund seiner Elastizität waren Ausgangspunkt vieler wichtiger Erfindungen und haben den Naturstoff zu einem essentiellen Begleiter unseres Alltags gemacht. So unbemerkt und selbstverständlich wie Kautschuk in unserem täglichen Leben präsent ist, so unverzichtbar ist der Naturstoff für Fortschritt, Komfort und Mobilität geworden. Er stellt einen wesentlichen Bestandteil dar von Fahrzeugreifen, Dichtungen, Isolierungen, Gummihandschuhen, Kondomen, Segeln, Latexkleidung, Schuhwerk und vielem mehr. Der vielseitige Einsatz von Kautschuk lässt seine immense Bedeutung für die Zivilisation unserer Tage erahnen, denn er ist durch kaum ein anderes Material ersetzbar.

Zur Kautschukproduktion sind über 2000 Pflanzen, von denen die meisten zu den Wolfsmilchgewächsen (*Euphorbiaceae*) und Korbblütlern (*Compositaceae*) gehören, sowie einige Pilze in der Lage. Die größte wirtschaftliche Bedeutung kommt dabei dem Gummibaum *Hevea brasiliensis* zu, der zur Gewinnung von etwa 99 % des weltweiten Bedarfs an Kautschuk dient (Tanaka *et al.*, 2001). Der Gummibaum stammt ursprünglich aus Südamerika, ein Großteil (ca. 70 %) der heutigen Weltproduktion erbringen jedoch die Länder Südostasiens, insbesondere Thailand, Malaysia und Indonesien (Rose & Steinbüchel, 2005) mit Erträgen von etwa 2,5 t pro Hektar und Jahr.

Chemisch gesehen ist Naturkautschuk Poly(*cis*-1,4-isopren) und zählt damit zu den ungesättigten Kohlenwasserstoffen und aufgrund seiner Grundstruktur zu den Isoprenoiden. Diese werden auch als Terpenoide oder Terpene bezeichnet und bilden die größte Gruppe natürlicher Verbindungen. Von den etwa 25.000 beschriebenen Strukturen sind neben vielen Carotinoiden und Steroiden nur wenige funktionell charakterisiert (Gershenzon & Dudareva, 2007). Das von *Hevea brasiliensis* synthetisierte Polyisopren weist an den Enden jeweils zwei *trans*-Isopreneinheiten auf, gefolgt von einigen Hundert bis Zehntausend *cis*-Isopreneinheiten (Tanaka *et al.*, 2001) (Abb. 1.1) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 10^6 Da. Das *trans*-Isomer des Polyisoprens wird nur von vergleichsweise wenigen Pflanzen produziert. Bei hochmolekularem Poly(*trans*-isopren) unterscheidet man Gutta Percha (*Palaquium gutta* mit Hauptvorkommen in Südostasien) und Balata (*Manikara bidentata* aus Mittelamerika). Einzigartig ist der Chicle-Baum, der hauptsächlich in Mexiko vorkommt und gleiche Mengen an *cis*- und *trans*-Isopren bildet (Rose & Steinbüchel 2005).

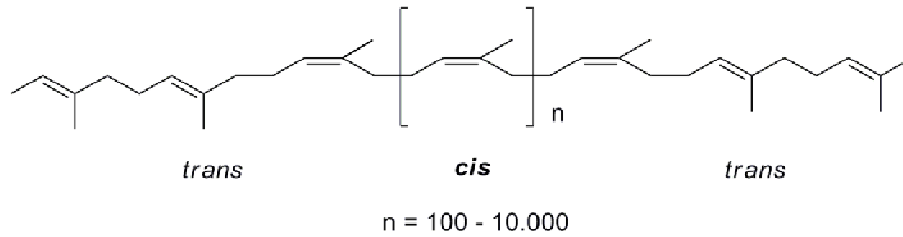


Abb. 1.1: Strukturformel von Poly(*cis*-1,4-isopren). An den Enden liegt jeweils *trans*-Konfiguration vor, die Anzahl von *cis*-Isopreneinheiten variiert zwischen $n = 100$ und ca. 10.000 ($\bar{M}_W \approx 10^6$ Da) (nach Tanaka *et al.*, 1996).

Der Name Kautschuk leitet sich aus der Sprache der Ureinwohner Südamerikas ab, denen die besonderen Eigenschaften des Materials im aggregierten Zustand bereits bekannt waren, und bedeutet "weinender Baum" (*caa*: Tränen; *ochu*: Baum). Latex wird in speziellen Zellen des Phloems, den Latizifers synthetisiert und dient der Pflanze zum raschen Wundverschluss nach Verletzung. Das Polymer liegt in bis zu 3–5 μm großen Tröpfchen vor und ist von einer Schicht aus Proteinen und Lipiden umgeben, welche die hydrophoben Kautschukmoleküle von der wässrigen Umgebung trennt. Die Latexmilch wird durch spiralförmiges Anritzen der Rinde, das sog. "Tapping", in Gefäßen gesammelt, die zur Verhinderung der Aggregation der Polymerstränge mit Ammonium oder anderen Antioxidantien versetzt sind. Latexmilch enthält neben Wasser etwa 25–35 % (w/w) Polyisopren, daneben zu geringerem Anteil auch Protein (1–1,8 %), Kohlenhydrate (1–2 %), neutrale und polare Lipide (0,4–1,1 % bzw. 0,5–0,6 %), anorganische Bestandteile (0,4–0,6 %) und Aminosäuren, Amide u. a. (ca. 0,4 %) (Subramaniam, 1995). Aufgrund des allergenen Potentials einiger dieser Proteine ist deren Entfernung durch Zentrifugation und Behandlung mit alkalischen Proteasen oder Natrium-/Kaliumhydroxid vor der Weiterverarbeitung notwendig (Rose & Steinbüchel 2005).

Die Entdeckung der Vulkanisation durch Charles Goodyear 1839 (Patent 1844, USA) revolutionierte die Möglichkeiten der Verwendung von Kautschuk (Hurley 1981). Bei diesem Vorgang wird Polyisopren unter Zusatz von Schwefel erhitzt, was zu einer Quervernetzung durch Schwefelbrücken an der Doppelbindung führt und dadurch dessen Haltbarkeit und physikalische Eigenschaften wie Hitzestabilität und Elastizität entschieden verbessert. Der praktische Nutzen wurde u. a. von Thomas Hancock (GB) vorangetrieben, die ersten luftgefüllten Gummireifen ließ sich R. W. Thomson 1945 patentieren (Greve & Threadingham, 2000). Heutzutage haben Produkte aus vulkanisiertem Kautschuk alle Lebensbereiche durchdrungen. Poly(*cis*-1,4-isopren) lässt sich auch chemisch auf der Basis von fossilen Rohstoffen wie Erdöl bzw. Kohle und daraus gewonnenen Gasen (z. B. 1,3 Butadien) herstellen (Whitby & Katz, 1933). Bouchardat erzielte 1879 erste Erfolge der Polymerisation von Isopren mit Hydrochlorsäure (Fisher, 1944; Schoenberg *et al.*, 1979), Fritz Hoffmann und Mitarbeiter stellten 1909 das erste nutzbare synthetische Polyisopren her, die Grundlage für den sog. "Buna"-Kautschuk. Bis heute sind unzählige Herstellungs- und

Verarbeitungsverfahren in Abhängigkeit der gewünschten Eigenschaften für tausende von Endprodukten entwickelt worden (Greve & Threadingham, 2000). Nach der Entwicklung stereospezifischer Katalysatoren war es möglich, synthetischen Kautschuk (SR = synthetic rubber) mit größtenteils *cis*-1,4-Bindungen herzustellen. Heute lässt sich eine Reinheit bis 98–99 % erreichen, SR weist aber stets auch einen variablen, geringen Anteil von *trans*-3,4-Bindungen auf. Er ist beständiger als Naturkautschuk gegenüber Licht- und Wärmeeinflüssen, dennoch sind die hochelastischen Eigenschaften des reinen, natürlichen Poly(*cis*-1,4-isoprens) unerreichbar (Tanaka *et al.*, 2001) und machen weiterhin eine Nutzung des Naturkautschuks, häufig in einem von den Anforderungen an das Produkt abhängigen Mischverhältnis, erforderlich. Der ANRPC ("Association of Natural Rubber Producing Countries") zufolge liegt die Nachfrage nach Naturkautschuk für den Weltmarkt im Jahr 2011 bei 11,2 Millionen Tonnen.

1.2 Der Abbau von Naturkautschuk

Schon frühzeitig nach Beginn der Nutzung von Kautschuk wurde die zerstörerische Wirkung von hohen Temperaturen und energiereichem, kurzwelligem Licht auf Naturkautschuk beobachtet (Grassie & Scott, 1988). Angesichts der Unmengen an Kautschuk, die seit Beginn der industriellen Nutzung hergestellt und verarbeitet wurden und werden, der aber fehlenden Akkumulation in der Umwelt müssen auch natürliche Abbaumechanismen für dieses Polymer existieren, da eine photochemische oder durch andere Witterungseinflüsse bedingte Zersetzung nur sehr langsam verläuft. Dennoch war bis vor wenigen Jahren kaum etwas über die biologischen Abbauprozesse bekannt und noch immer sind die biochemischen Mechanismen weitgehend unklar.

Erste Untersuchungen zum Kautschukabbau wurden 1914 von Söhngen und Fol durchgeführt, die mithilfe der sog. "solution cast"-Technik erste zum Kautschukabbau befähigte Aktinomyceten anhand des Wachstums auf einer dünnen Polyisoprenschicht als einziger C-Quelle und deren Zerstörung unter den Kolonien identifizierten (Söhngen & Fol, 1914). Spence und Van Niel entwickelten eine Methode, wonach bei Wachstum auf einem Latex-Overlay-Agar anhand von Aufklarungszonen um die Kolonien, Kautschuk abbauende Mikroorganismen erkannt werden konnten (Spence & van Niel, 1936). Mithilfe dieser bis heute gebräuchlichen Technik lassen sich jedoch nur solche Bakterien kultivieren und direkt identifizieren, die Kautschuk spaltende Enzyme sekretieren, nicht aber solche, die eine hohe lokale Latexkonzentration benötigen und direkt adhäsiv auf Polyisopren wachsen (Rose & Steinbüchel, 2005) (s. u.).

Die Untersuchung des biologischen Kautschukabbaus wird generell jedoch durch einige Faktoren erschwert. Eine knappe Übersicht darüber findet sich u. a. in einem Review von Rose & Steinbüchel (2005). Natürlicher und insbesondere synthetischer und quervernetzter Kautschuk sind recht stabil gegenüber mikrobieller Zersetzung, d. h. die

Abbauprozesse verlaufen nur sehr langsam. Dies zeigt sich an den langsamen Wachstumsraten von Mikroorganismen auf Kautschuk als einziger Energiequelle bzw. nur allmählichen Gewichtsverlusten von Gummimaterialien über Wochen und Monate. Zudem sind viele der neu identifizierten kautschukabbauenden Bakterien nur unzureichend charakterisiert und klassifiziert. Genetische Werkzeuge zur molekularbiologischen Analyse müssen daher oft erst entwickelt werden. Hinzu kommt, dass vor wenigen Jahren noch keine vollständige Genomsequenz eines zum Polyisoprenabbau befähigten Bakteriums vorlag. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich aus der Wasserunlöslichkeit des Polymers und der deutlich variierenden Kettenlängen innerhalb einer Emulsion, was die definierte Angabe molarer Mengen nicht erlaubt. Hinzu kommt, dass unterschiedliche Latexemulsionen je nach Ursprung und einer möglichen Weiterbehandlung zur verbesserten Haltbarkeit nicht direkt vergleichbar sind. Selbst bei gereinigter Latex haften den Polymermolekülen stets Proteine an, die mikrobielles Wachstum beeinflussen können. Als Modellsubstanzen zur Untersuchung des Kautschukabbaus können ähnliche Verbindungen mit kurzer Kettenlänge dienen, z. B. Squalen, Squalan, β -Carotin, Pristan, Citronellol und einige andere, doch unterscheiden sich diese in ihrer Konfiguration oder Methylverzweigungen. Natürliche oligomere Substanzen mit der gleichen chemischen Struktur wie in Poly(*cis*-1,4-isopren) sind leider nicht bekannt (Rose & Steinbüchel, 2005).

1.2.1 Kautschuk abbauende Organismen

Im Zuge des industriellen Fortschritts lag das Hauptaugenmerk in der Vergangenheit auf der Synthese des Polyisoprens und der Steigerung von Haltbarkeit und Stabilität, also der Verhinderung einer Zersetzung beispielsweise durch Einsatz von Antioxidantien und anderer Stabilisatoren (Grassie & Scott, 1988). Bis zu den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts dokumentierten nur wenige Untersuchungen den Abbau von Kautschuk. Bis dahin wurden bereits erste, zu den Aktinomyceten gehörende Bakterien als Kautschukabbauer beschrieben (Spence & van Niel 1936; Rook, 1955). Tsuchii und Mitarbeiter griffen diese Untersuchungen wieder auf (Tsuchii *et al.*, 1979) und fanden die Fähigkeit zur Spaltung von natürlichem und synthetischem Kautschuk bei *Nocardia* sp. (Tsuchii *et al.*, 1985) und *Xanthomonas* sp. (Tsuchii & Takeda, 1990). In dessen Kulturüberstand fanden sie entsprechende Enzymaktivität und konnten daraus erstmals niedermolekulare Abbauprodukte bestimmen (s. u.). Anhand dieser schlossen sie auf eine definierte Spaltung und vermuteten eine Oxygenase als initiales, Latex spaltendes Enzym in *Xanthomonas* sp.. Das kodierende Gen wurde identifiziert und das Genprodukt Rubber Oxygenase A (RoxA) genannt (Jendrossek & Reinhard, 2003). Die nähere Charakterisierung dieses extrazellulären Enzyms wurde von D. Jendrossek und Mitarbeitern weiter verfolgt (Kerkhoff, 2001; Braaz *et al.*, 2004; Braaz *et al.*, 2005 a; Braaz, 2005 b) und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Eine ganze Reihe weiterer Kautschuk verwertender Bakterien sind bis heute identifiziert worden, die fast ausschließlich zu den Gram-positiven Bakterien zählen (z. B. Heisey & Papadatos, 1995; Jendrossek *et al.*, 1997; Rose & Steinbüchel, 2005). Latex abbauende Mikroorganismen teilt man bezüglich ihrer Fähigkeit, auf Latex-Overlay-Agar Aufklarungszonen zu bilden, in zwei Gruppen ein. Aufklarungszonen-Bildende scheiden Latex-abbauende Enzyme ins extrazelluläre Medium aus, Nicht-Aufklarungszonen-Bildende können nur adhäsiv, in direktem Kontakt zum Substrat wachsen (Linos *et al.*, 2000 a). Erstere umfassen viele Kautschuk abbauende Aktinomyceten, beispielsweise *Streptomyces* sp. K30 (Rose *et al.*, 2005 b), *Streptomyces coelicolor* 1A (Bode *et al.*, 2001), *Thermomonospora curvata* E5 (Ibrahim *et al.*, 2006), *Micromonospora aurantiaca* (sp. W2b) (Linos *et al.*, 2000 a) und viele weitere Streptomyceten (z. B. Heisey & Papadatos, 1995; Jendrossek *et al.*, 1997). Als bisher einziger zu dieser Gruppe zählender Vertreter der Gram-negativen Bakterien wurde *Xanthomonas* sp. 35Y identifiziert (Tsuchii & Takeda, 1990).

Eine zweite Gruppe vereint Nicht-Aufklarungszonen bildende Organismen, die häufig der *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*-Gruppe angehören wie beispielsweise *Mycobacterium fortuitum* (sp. NF4) (Linos *et al.*, 2000 a) oder Stämme von *Nocardia farcinica* (Ibrahim *et al.*, 2006). Der starke Abbau von solidem Kautschuk und synthetischem Poly-*cis*-isopren und auch vulkanisiertem Kautschuk durch *Nocardia* sp. 835A (Tsuchii *et al.*, 1985), sowie die Zersetzung des Gummis in Kautschukprodukten wie Autoreifen durch diesen Stamm ist vielfach dokumentiert worden (Tsuchii *et al.*, 1997; Tsuchii & Tokiwa, 1999; Tsuchii & Tokiwa, 2001). Auch viele Spezies der Gattung *Gordonia* sind adhäsiv wachsende Kautschukverwerter (Arenskötter *et al.*, 2004). Dazu zählen z. B. *G. polyisoprenovorans* (Linos *et al.*, 1999) und *G. westfalica* (Linos *et al.*, 2002) (Linos *et al.*, 2000 a). Dieser verfügt über das Megaplasmid pKB1, das für ein Wachstum auf Kautschuk als alleiniger C-Quelle notwendig ist (Arenskötter *et al.*, 2004). Untersuchungen von mit pKB1 transformierten Stämmen belegten, dass dort v. a. Gene für den weiteren Katabolismus von Latex-Spaltprodukten, nicht aber das initiale Enzym für die Substratspaltung lokalisiert sind (Bröker *et al.*, 2008 a).

Auch einige thermophile Bakterien sind zum Kautschukabbau fähig. Zu ihnen zählen Vertreter beider oben genannter Gruppen (Ibrahim *et al.*, 2006). Es konnte nun auch die Nutzung von Poly(*trans*-1,4-isopren) (Gutta Percha) durch sechs Stämme der Gattung *Nocardia* nachgewiesen werden. Alle diese Bakterien sind ebenso zum Abbau von Poly(*cis*-1,4-isopren) in der Lage (Warneke *et al.*, 2007).

Trotz gezielter Suche nach Kautschuk spaltenden Gram-negativen Bakterien innerhalb der nahe verwandten Gattungen *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* und anderer (Jendrossek *et al.*, 1997) und intensiver Versuche der Isolierung aus weltweit gesammelten Proben verschiedener Ökosysteme ist der von Tsuchii & Takeda (1990) beschriebene Stamm *Xanthomonas* sp. 35Y der bisher einzige Gram-negative, Aufklarungszonen bildende Kautschukverwerter. Allerdings sind weitere Spezies mit einem gewissen Kautschuk-

abbauenden Potential anhand einer Molekulargewichtsabnahme von Poly(*cis*-1,4-isopren) bzw. dem adhäsivem Wachstum auf Kautschukmaterialien identifiziert, doch nicht näher untersucht worden: *Pseudomonas citronellolis* (Bode *et al.*, 2000) und *Acinetobacter calcoaceticus* (Bode *et al.*, 2001), die im Gegensatz zu *Xanthomonas* sp. keine Aufklarungszonen bilden, aber auch den γ -Proteobakterien angehören. Die Fähigkeit von *P. aeruginosa* AL98 (Linos *et al.*, 2000 b) zur Zersetzung von Kautschuk wurde als adaptiv und somit nicht stabil beschrieben, weshalb dieser nicht als echter Kautschukverwerter angesehen wird.

1.2.2 *Xanthomonas* sp. 35Y

Die Isolierung und grobe taxonomische Einordnung des Gram-negativen *Xanthomonas* sp. 35Y, welcher die Rubber Oxygenase RoxA produziert, erfolgte durch Tsuchii & Takeda (Tsuchii & Takeda, 1990). Es sind mesophile, strikt aerobe, bewegliche Stäbchen, die mit einer Größe von ca. 0,6 x 3–5 μm deutlich über der durchschnittlichen Länge von Xanthomonaden liegen. Im Rahmen der Dissertation von K. Kerkhoff wurde *Xanthomonas* sp. näher charakterisiert (Kerkhoff, 2001). Darin konnte gezeigt werden, dass der Stamm zur Untergruppe der γ -Proteobakterien gehört, nicht aber der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet werden kann. Basierend auf dem Vergleich von 16S-rDNA-Sequenzen wurde die höchste Identität mit 83,6 % zu *Pseudomonas amygdali* ermittelt. Demnach handelt es sich bei dem Kautschuk verwertenden Stamm um einen Vertreter einer bislang nicht beschriebenen Gattung und wurde daher auch als *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y vorgeschlagen (Kerkhoff, 2001). Da dessen Genom bislang nicht bekannt ist, lediglich eine etwa 7,6 kb umfassende Region um das *roxA*-Gen, soll daher im Rahmen dieser Arbeit der Begriff *Xanthomonas* sp. bis zur endgültigen taxonomischen Bestimmung für den beschriebenen Stamm verwendet werden.

1.3 Die Rubber Oxygenase A ist eine Di-Häm *c*-Typ-Cytochrom Dioxygenase

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des Kautschuk spaltenden Enzyms Rubber Oxygenase (RoxA) aus *Xanthomonas* sp. 35Y, dem bisher einzigen Aufklarungszonen bildenden Gram-negativen Kautschukabbauer. Dieses spaltet Poly(*cis*-1,4-Isopren) oxidativ mit hoher Spezifität, nicht jedoch *trans*-Isomere. RoxA ist das bislang einzige biochemisch grundlegend charakterisierte Latex spaltende Enzym und zugleich das einzige bekannte aus einem Gram-negativen Organismus.

Die Abbauprodukte enthalten zwei Sauerstoffatome wohingegen im Polymer kein Sauerstoff enthalten ist. Der Einbau mindestens eines Sauerstoffatoms aus Luftsauerstoff in die Spaltprodukte wurde 1990 von Tsuchii und Takeda gezeigt. Ebenso wurden bereits aus dem Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. als Hauptprodukt der Latexspaltung 12-Oxo-4,8-

dimethyl-trideca-4,8-dien-1-al (ODTD = Acetonyl-Diprenyl-Acetoaldehyd, ADA) und daneben das eine Isopren-Einheit kürzere 8-Oxo-4-methyl-4-nonen-1-al nachgewiesen (Tsuchii & Takeda, 1990). R. Braaz *et al.* konnten schließlich den Einbau beider Atome aus Luftsauerstoff durch $^{18}\text{O}_2$ -Markierungsexperimente zeigen und neben ODTD als Hauptprodukt der Latexspaltung (s. Abb. 1.2, $n=1$) weitere, um wenige Isopreneinheiten unterschiedliche Produkte ($n=0$ bis $n=4$) mit einem Keto- und einem Aldehydende identifizieren. Somit wurde gezeigt, dass RoxA als eine Dioxygenase einzustufen ist und sein Substrat Poly(*cis*-1,4-isopren) spezifisch alle drei Isopreneinheiten spaltet. Die spezifische Aktivität ist mit etwa 300 mU mg^{-1} [$\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$] relativ gering. Maximale Aktivität erreicht das Enzym bei 40°C , das pH-Optimum liegt bei pH 7,0 (Braaz *et al.*, 2004; Braaz *et al.*, 2005).

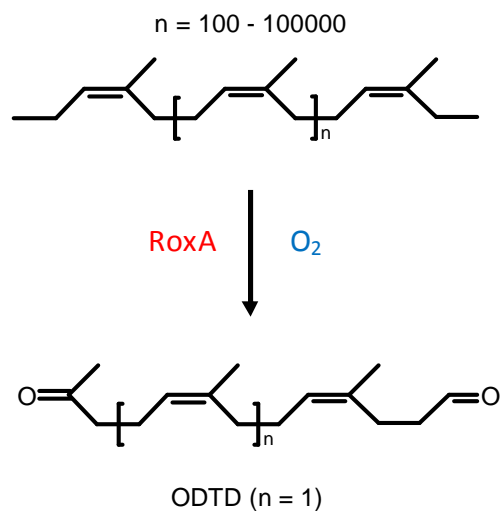


Abb. 1.2: Von RoxA katalysierter O_2 -abhängiger Einbau beider O-Atome in die Spaltprodukte von Poly(*cis*-1,4-isopren). Es wurden Verbindungen von $n=0$ bis $n=4$ nachgewiesen (Braaz *et al.* 2004). Für das Hauptabbauprodukt ODTD gilt $n=1$.

RoxA konnte in Zusammenarbeit mit der AG. O. Einsle (Freiburg) erfolgreich kristallisiert (Hoffmann *et al.*, 2008) und dessen 3-dimensionale Struktur mit einer Auflösung von $1,8 \text{ \AA}$ gelöst werden (unveröffentlicht). Das Enzym besitzt mit einer N-terminalen Signalsequenz eine Masse von $74,68 \text{ kDa}$ und wird ins extrazelluläre Medium sekretiert. Für das reife Enzym wurde nach Identifizierung der Sequenz zunächst eine Masse von $72,8 \text{ kDa}$ angenommen mit Beginn bei Aminosäure 17 (Jendrossek & Reinhard, 2003). Die Kristallstruktur von RoxA, sowie jüngere Kalkulationen mit dem SignalP 3.0 Server (s. Kap. 2.14) belegen nun ein 30 aa großes Signalpeptid (*MIARRLGLRR AWAALALTPILFIGQGAGGQ*), anhand dessen der Exportweg noch nicht zweifelsfrei erklärt werden kann. Für das reife RoxA muss nun eine Größe von $71,52 \text{ Da}$ mit Beginn bei Aminosäure 31 gelten. Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit zum besseren Vergleich mit früheren Angaben die ursprüngliche Annotierung nach Jendrossek und Reinhard (2003) beibehalten. Diese sollte jedoch nach Publikation der 3-D-Struktur angepasst werden.

Die RoxA-Aminosäuresequenz weist zwei *c*-Typ-Cytochrom Häm-Bindemotive (CXXCH) auf und einen bei Cytochrom *c* Peroxidasen konservierten Aminosäurebereich um His₅₁₇ ("MauG-Region") (Jendrossek & Reinhard, 2003). Es wurde die Präsenz von zwei Hämgruppen im Enzym gezeigt und der molare Extinktionskoeffizient von gereinigtem RoxA bei einer Häm-typischen maximalen Absorption von 406 nm auf ca. $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ experimentell, sowie den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm anhand der Aminosäurezusammensetzung auf $1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ rechnerisch bestimmt. Es handelt sich bei der Rubber Oxygenase somit um ein di-Häm *c*-Typ-Cytochrom, das entsprechende, für *c*-Typ-Cytochrome charakteristische Absorptionseigenschaften besitzt, ein Maximum bei 407 nm im oxidierten und bei 418 nm im reduzierten Zustand (Braaz *et al.*, 2004). Diese besonderen spektroskopischen Eigenschaften ermöglichen eine Untersuchung durch UV-Vis-Spektroskopie, das Vorhandensein zweier Eisen-Zentren eine Untersuchung mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR = EPR).

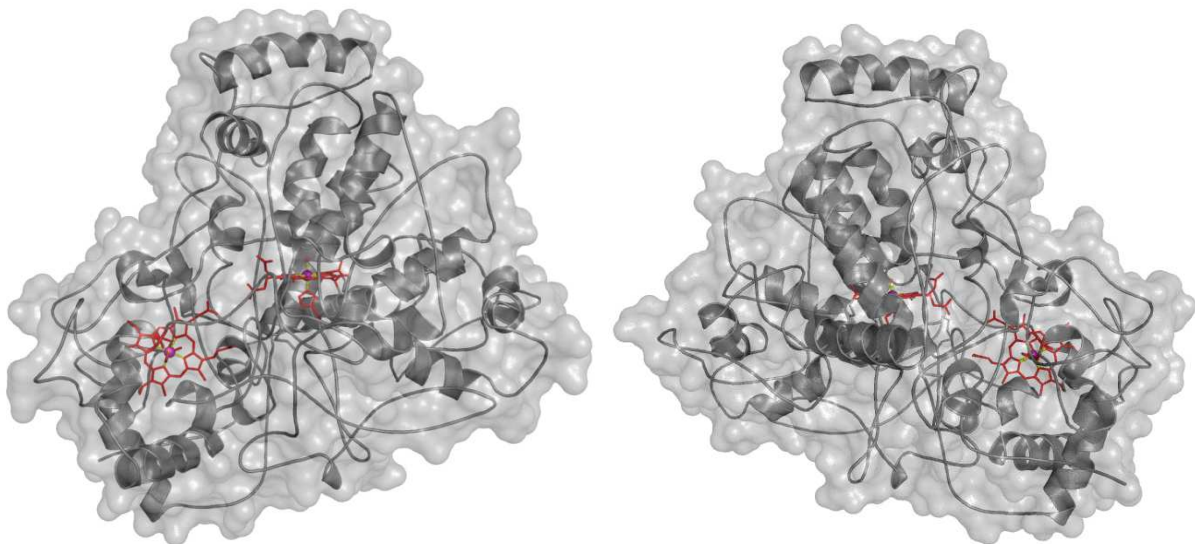


Abb. 1.3: Die Struktur von RoxA. Die Abbildungen (links) und (rechts) veranschaulichen eine Vorder- und Rückansicht. Dargestellt sind die Sekundärstrukturen und transparent die RoxA-Oberfläche (grau), sowie die Hämgruppen und die koordinierenden Liganden (rot) im Inneren des Enzyms.

Die ermittelte RoxA-Struktur zeigt RoxA als ein kompaktes Molekül mit den beiden Hämgruppen im Zentrum des Enzyms ohne Kontakt zur Oberfläche (s. Abb. 1.3). Das C-terminale Hämzentrum ist von zwei His-Resten (Abb. 1.4, rechts), das N-terminale Zentrum nur von einem Histidin koordiniert (Abb. 1.4, links), während die distale, sechste Bindestelle von einem "O"-Liganden, d. h. einem H₂O- oder O₂-Molekül besetzt ist. Eine freie Bindestelle stellt die Voraussetzung zur Bindung von O₂ oder eines Kautschukmoleküls für

dessen definierte Spaltung dar. Die Hämgruppen sind nahezu senkrecht zueinander orientiert (vgl. Abb. 4.2, Kap. 4.3.3) und besitzen einen Fe–Fe-Abstand von 21,5 Å (s. auch Abb. 1.6).

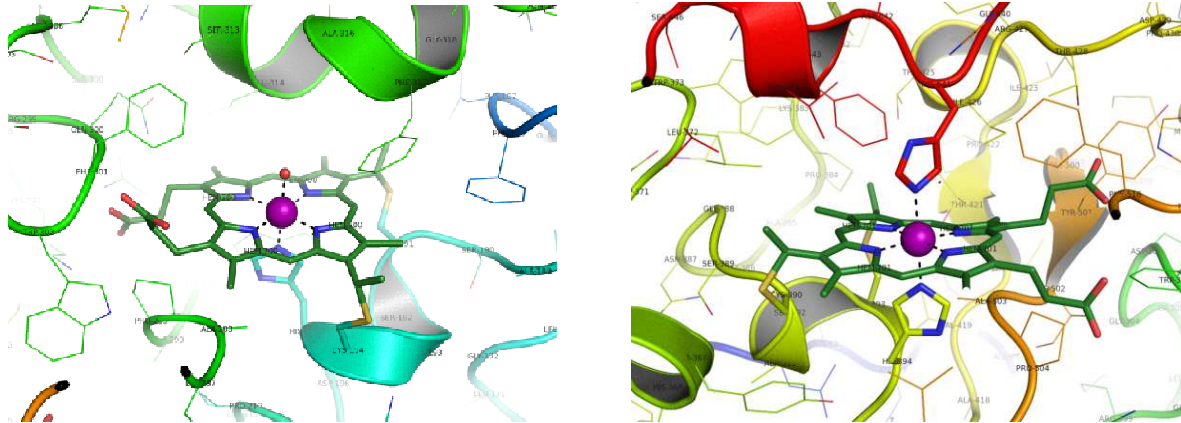


Abb. 1.4: Ausschnitt aus der RoxA-Struktur um die jeweilige Hämgruppe. Das N-terminale Hämzentrum mit dem koordinierenden His₁₉₅ und einer für Substrate zugänglichen Bindestelle ist links, das C-terminale Hämzentrum mit den Liganden His₃₉₄ und His₆₄₁ rechts dargestellt. (erstellt mit PyMol Version 1.1r1)

1.4 Die Spaltung und Verwertung von Kautschuk

Im Aufklarungszonen bildenden *Streptomyces* sp. K30 wurde das neben RoxA bisher einzige Latex spaltende Enzym, das etwa 40 kDa große "Latex Clearing Protein" (Lcp), gefunden (Rose *et al.*, 2005 b). Zwischen Lcp und RoxA existiert keine Sequenzhomologie, doch die Latex-Spaltprodukte weisen die gleichen Endgruppen (Aldehyd- und Ketogruppen) auf (s. Abb. 1.1), was auf einen ähnlichen Spaltungsmechanismus hinweist. Lcp wird wie auch RoxA sekretiert und besitzt ein N-terminales Signalpeptid (30 aa). Eine Reinigung von Lcp und die biochemische Aufklärung des Mechanismus ist bislang noch nicht gelungen. Das katalytische Zentrum in Lcp ist nicht bekannt, jedoch enthält das Enzym keine Hämgruppen. Das *lcp*-Gen befindet sich zusammen mit Genen für eine heterodimere Molybdän-Hydroxylase (OxiAB) in einem Operon, welche bei der Latexverwertung vermutlich durch Oxidation der Latex-Spaltprodukte zu Carbonsäuren eine Rolle spielt (Rose *et al.*, 2005 b; vgl. Fig. 5, Rose & Steinbüchel, 2005).

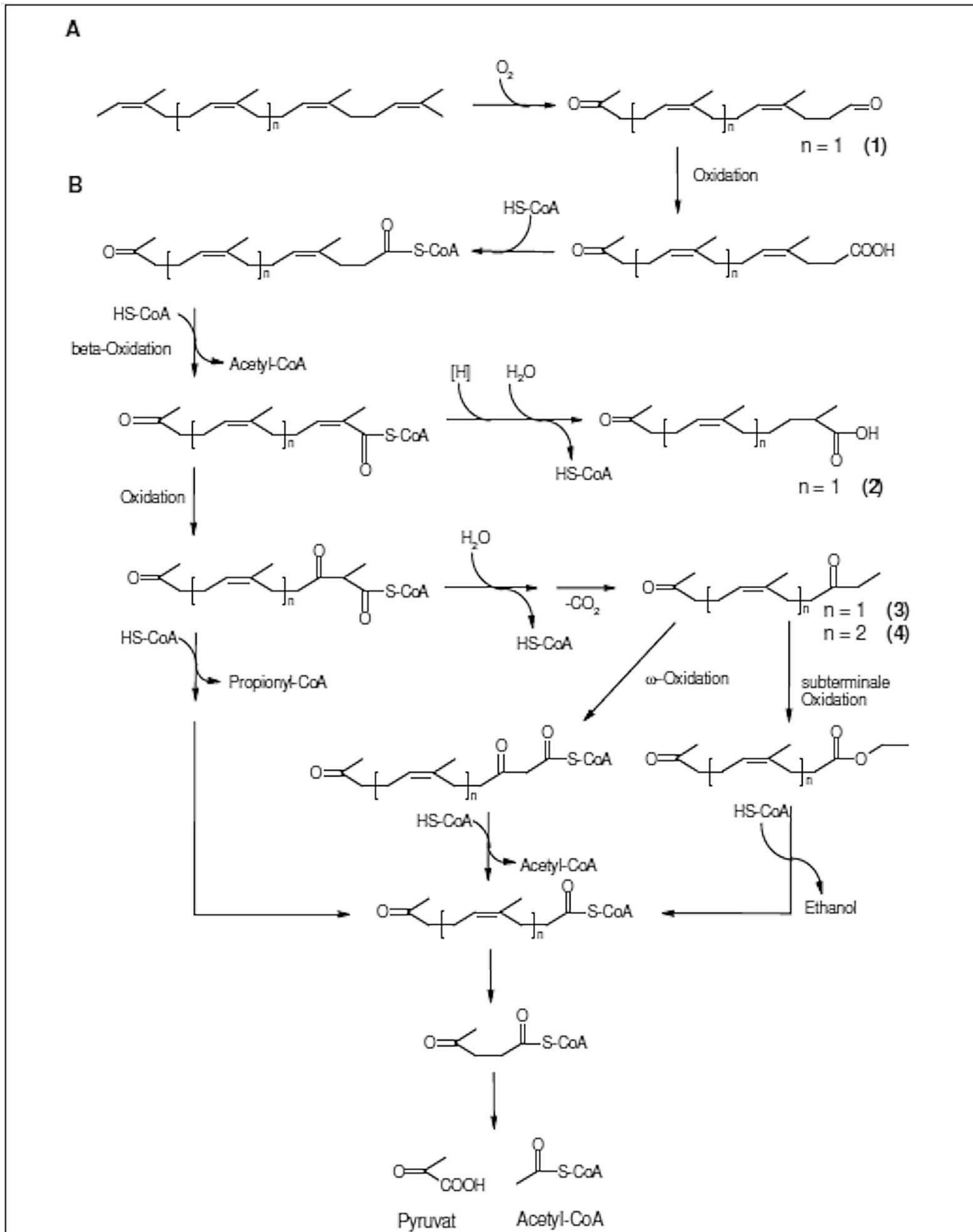


Abb. 1.5: Hypothetisches Abbauschema von Poly(*cis*-1,4-isopren) (aus Braaz *et al.*, 2005). A: Initiale oxidative Spaltung durch eine Oxygenase wie von Tsuchii & Takeda (1990) postuliert. B: Mögliche Abbauwege der Spaltungsprodukte von Naturkautschuk nach Bode *et al.*, (2001). Ziffern (1) – (4) bezeichnen nachgewiesene Abbauprodukte ((1) = ODTD). Dabei wird angenommen, dass zwei Isopreneinheiten des ODTD (unter der Annahme der β -Oxidation einer α -Methyl-Gruppe mit einer geringeren Rate) durch je zwei Zyklen der β -Oxidation unter Generierung von Acetyl-CoA und Propionyl-CoA, die letzte Einheit mit der Keto-Gruppe zu Acetyl-CoA und Pyruvat abgebaut werden kann oder aber zu einem der Nebenprodukte (2) – (4) oxidiert wird, von denen bisher nicht bekannt ist, ob und wie diese weiter abgebaut werden können (aus Bode *et al.*, 2001).

Seit Identifizierung des *lcp*-Gens wurden bei sämtlichen bisher daraufhin untersuchten Vertretern der Gram-positiven Kautschuk verwertenden Bakterien *lcp*-Homologe mit vermuteter Latex-spaltender Funktion gefunden. Dazu zählen auch adhäsiv wachsende Bakterien wie *Gordonia* sp. und thermophile Latex-Abbauer (Ibrahim *et al.*, 2006; Bröker *et al.*, 2008 b). *Lcp* wird somit eine Schlüsselfunktion bei Gram-Positiven zugeschrieben. Die Anwesenheit dieser Gene ist jedoch nicht in allen Fällen für die Kautschukspaltung gleichermaßen essentiell, z. B. beim Aufklarungszonen bildenden *G. polyisoprenivorans* VH2 (Bröker *et al.*, 2008 b).

Während des mikrobiellen Wachstums auf Kautschuk enthaltenden Medien zeigte die Untersuchung der Molekulargewichtsverteilung der Kautschuk-Polymere sowohl bei Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien eine wachstumsabhängige Verschiebung zu niedrigeren Werten. Dies legt eine initiale Endo-Typ-Spaltung nahe, wobei eine zusätzliche Exo-Typ-Spaltung nicht auszuschließen ist (Tsuchii *et al.*, 1990; Jendrossek *et al.*, 1997; Bode *et al.*, 2000; 2001). Sämtliche Untersuchungen belegen eine oxidative Spaltung des *cis*-1,4-Isopren-Rückgrats als generellen ersten Schritt der Kautschukspaltung. Bei Stämmen von *Gordonia* fand man die Beteiligung einer extrazellulären Superoxid-Dismutase (SodA) an optimalem Wachstum auf Polyisopren, die den Zellen indirekten Schutz vor oxidativem Schaden bietet (Schulte *et al.*, 2008). Neben der Sauerstoffabhängigkeit wurde die Akkumulierung von Aldehyd- oder Keton-enthaltenden Oligomeren vielfach nachgewiesen (z. B. Tsuchii & Takeda, 1990; Berekaa *et al.*, 2000; Braaz *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2005 b). Bei der weiteren Verstoffwechslung dieser primären Produkte spielt β -Oxidation eine wesentliche Rolle. Steinbüchel und Mitarbeiter fanden die Beteiligung einer α -Methylacyl-CoA-Racemase (Mcr) bei der Verwertung von Poly(*cis*-1,4-isopren)-Abbauprodukten sowie methylverzweigten Kohlenwasserstoffen durch *G. polyisoprenivorans* VH2 (Banh *et al.*, 2005; Arenskötter *et al.*, 2008). Anhand des Nachweises mehrerer Zwischenprodukte des Latexkatabolismus wurde von Bode *et al.* ein hypothetisches Abbauschema entworfen, das die Umsetzung einer Isopreneinheit durch β -Oxidation und weitere Schritte zu je einem Molekül Acetyl-CoA und Propionyl-CoA annimmt (Bode *et al.*, 2001; Rose & Steinbüchel, 2005) (Abb. 1.5).

1.5 Enzyme mit Ähnlichkeit zu RoxA

1.5.1 Häm-Oxygenasen

Neben der Hydrolyse ist die oxidative Spaltung ein wichtiges Mittel zum biologischen Abbau verschiedenster, auch polymerer Verbindungen. Oxygenasen spielen u. a. eine wichtige Rolle beim bakteriellen, oxidativen Abbau von natürlichen und xenobiotischen Verbindungen wie langkettigen Alkanen (z. B. Maeng *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002), Lignin und aromatischen Ringstrukturen (Fetzner, 2002). Die Funktion von RoxA ist die oxidative Spaltung von C=C-

(π)-Bindungen in Poly(*cis*-1,4-isopren) durch Einbau beider O₂-Atome in die Spaltprodukte (Braaz *et al.*, 2005). Eine ähnliche Reaktion bewirken β -Carotin-Oxygenasen, die eine Familie von mindestens 100 Retinal bildenden Enzymen umfassen. Die β - β -Carotin-15-15'-Monooxygenase besitzt ein Fe(II)-Zentrum, das durch vier konservierte His-Reste koordiniert ist und katalysiert die oxidative Spaltung von β -Carotin in zwei gleiche Aldehyd-Produkte (Retinal) (Bugg, 2003; Kloer *et al.*, 2005). Sie wurde ursprünglich als Dioxygenase beschrieben, jedoch wurde gezeigt, dass diese Schlüsselreaktion der Vitamin A-Bildung mittels eines Monooxygenase-Mechanismus abläuft (Leuenberger *et al.*, 2001; Woggon, 2002). Die β - β -Carotin-9-10'-Oxygenase (CCD-1), welche die exzentrische Spaltung von β -Carotin in β -Apo-10'-Carotinal und β -Ionon katalysiert (Kiefer *et al.*, 2001; Wyss, 2004) weist ein breites Substratspektrum auf und wurde als Dioxygenase identifiziert (Schmidt *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2008). Die Zuordnung der Carotinoid-spaltenden Oxygenasen (CCDs) zu den Mono- oder Dioxygenasen wird gegenwärtig noch diskutiert (Auldrige *et al.*, 2006; Alder *et al.*, 2008).

Einige Oxygenasen sind Hämproteine. Zu den Häm-Monooxygenasen zählt die große Gruppe der P450-Cytochrome. Sie besitzen eine Häm *b*-Gruppe mit Sulfhydryl-Koordination (Cys) und dienen der Hydroxylierung einer Vielzahl von Verbindungen (Omura & Sato, 1964; Sono *et al.*, 1996; de Montellano, 2010). Monooxygenasen katalysieren den Einbau eines O-Atoms aus O₂ in ein Substrat, während das zweite zu H₂O reduziert wird.

Dioxygenasen katalysieren den Einbau beider O-Atome aus molekularem Sauerstoff in Substrate. Dabei erhält meist ein einziges Substratmolekül beide O-Atome, in manchen Fällen aber zwei verschiedene Moleküle je eines (Nozaki, 1979). Zu den wenigen bisher bekannten Dioxygenasen, die Häm als prosthetische Gruppen enthalten, zählt RoxA. Neben dem Di-Häm-Protein MauG (s. u.) ist es das bisher einzige bekannte Enzym, welches eine Oxygenasereaktion katalysiert und *zwei* Hämgruppen besitzt, die darüber hinaus kovalent an das Polypeptid gebunden sind (*c*-Typ). Von den Häm-Dioxygenasen sind die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), die je eine nicht kovalent gebundene Hämgruppe (Häm *b*) besitzen, am besten untersucht. Sie erfüllen eine der Hauptfunktionen von Dioxygenasen, die Spaltung von aromatischen Ringstrukturen, des Pyrrolrings von L-Tryptophan bzw. Derivaten zu N-Formylkynurenin. Dies sind die bisher einzigen klassischen Dioxygenasen mit Häm als Kofaktor (z. B. Nozaki, 1979; Sono *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2008; Lewis-Ballester *et al.*, 2009; Efimov *et al.*, 2011), die eine zur Funktion von RoxA ähnliche Spaltungsreaktion durchführen.

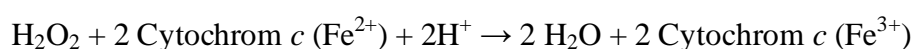
Daneben sind weitere (eukaryotische) Enzyme mit Dioxygenase-Aktivität und Häm-Kofaktoren bekannt. Diese katalysieren die Dioxygenierung (Hydroperoxidierung) von vielfach ungesättigten Fettsäuren und können trotz Anwesenheit einer Häm *b*-Gruppe nur bedingt zum Vergleich mit RoxA dienen. Die Prostaglandin H Synthase (PGHS) oder Cyclooxygenase (COX) aus Wirbeltieren ist ein bifunktionales Hämzym, welches die

Bildung von Prostaglandin-H₂ aus Arachidonsäure durch eine Alkyl-Peroxid-abhängige Cyclooxygenase-Aktivität (Doppel-Dioxygenierung) und eine Peroxidase-Aktivität bewirkt (Smith *et al.*, 1991; Sono *et al.*, 1996). Nur letztere findet am Häm *b*-Zentrum statt, ein zweites, Nicht-Fe-Zentrum spielt eine weitere katalytische Rolle (Smith, 2008). Homolog zu PGHS sind die bei Pilzen gefundenen Linoleat-Diol-Synthasen mit einem Häm *b*-Zentrum. Sie katalysieren ebenfalls zwei enzymatische Reaktionen, die Dioxygenierung von Linolensäure zu (8*R*)-Hydroperoxylinoleat und die Isomerisierung von (8*R*)-Hydroperoxylinoleat zu (7*S*,8*S*)-Dihydroxylinoleat (Hörnsten *et al.*, 1999). Auch die in Pflanzen gefundenen α -Dioxygenasen zeigen Homologie zu PGHS und besitzen Häm *b*. Sie katalysieren die Oxygenierung von Fettsäuren in 2-Hydroperoxide, den ersten Schritt der α -Oxidation (Hamberg *et al.*, 2005; Garscha & Oliw, 2008). Ebenso besitzt die Lipoxygenase aus dem Pilz *Fusarium oxysporum* ein Hämzentrum, zusätzlich Co²⁺ als stabilisierenden Kofaktor (Matsuda *et al.*, 1978; Nozaki, 1979). Im Gegensatz zu dieser Ausnahme enthalten die weit verbreiteten Lipoxygenasen wie z. B. das Enzym der Sojabohne meist ein Nicht-Häm-Fe-Zentrum.

Die große Mehrzahl der Dioxygenasen und auch viele Monooxygenasen enthalten Nicht-Häm-Fe-Zentren, entweder Fe(II) oder Fe(III) als alleinige Kofaktoren. Dioxygenase-Reaktionen werden auch von Nicht-Fe-Enzymen durchgeführt. Einen Einblick geben verschiedene Reviews und weitere Publikationen (z. B. Nozaki, 1979; Wallar & Lipscomb, 1996; Lange & Que, 1998; Solomon *et al.*, 2000; Ryle & Hausinger, 2002; Wackett 2002; Bugg, 2003). Die Häm-Oxygenase (HO), die den ersten Schritt der oxidativen Spaltung von Häm (Fe-Protoporphyrin IX) zu Biliverdin und CO katalysiert, ist ein O₂-aktivierendes Enzym, das selbst keine prosthetischen Gruppen enthält und ein Häm-Molekül in einer zu dessen Selbstoxidation geeigneten Umgebung bindet (z. B. Tenhunen *et al.*, 1969; Maines 1988; Sono *et al.*, 1996; Kikuchi *et al.*, 2005).

1.5.2 Bakterielle Cytochrom *c* -Peroxidasen (CCPs)

Beim Vergleich der Aminosäure-Sequenz von RoxA mit bekannten Enzymen fallen Ähnlichkeiten zu bakteriellen Peroxidasen und verwandten Proteinen auf. Peroxidasen katalysieren im Allgemeinen die Zwei-Elektronen-Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Cytochrom *c* Peroxidasen (CCPs) sind im Periplasma lokalisiert und nutzen häufig Cytochrom *c* -Varianten als Elektronendonoren. Sie katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser:



Bakterielle CCPs besitzen wie RoxA zwei kovalent verknüpfte Hämzentren. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen offenbarte Ähnlichkeiten kurzer Bereiche zu bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen (CCPs) wie einem konservierten Bereich um His₅₁₇ und weiterer

aromatischer Aminosäuren in der Umgebung der Hämzentren (QFW₃₀₂DG) (vgl. Abb. 4.6, Kap. 4.11.3) (Jendrossek & Reinhard, 2003). Auffällig ist insbesondere die homologe Orientierung der beiden Hämgruppen und deren Abstände in RoxA und CCPs (Hoffmann, 2007). Ein Alignment konservierter Bereiche um die beiden Hämzentren in RoxA und den CCPs aus *N. europaea* (Shimizu *et al.*, 2001) und *P. aeruginosa* (Fülöp, 1995) zeigt Abb. 1.6. Bakterielle CCPs besitzen mit ca. 35–45 kDa ein geringeres Molekulargewicht als RoxA und liegen als Dimere vor. Als Grundlage für den späteren Vergleich zu RoxA soll im Folgenden der Reaktionsmechanismus von Peroxidasen erläutert werden.

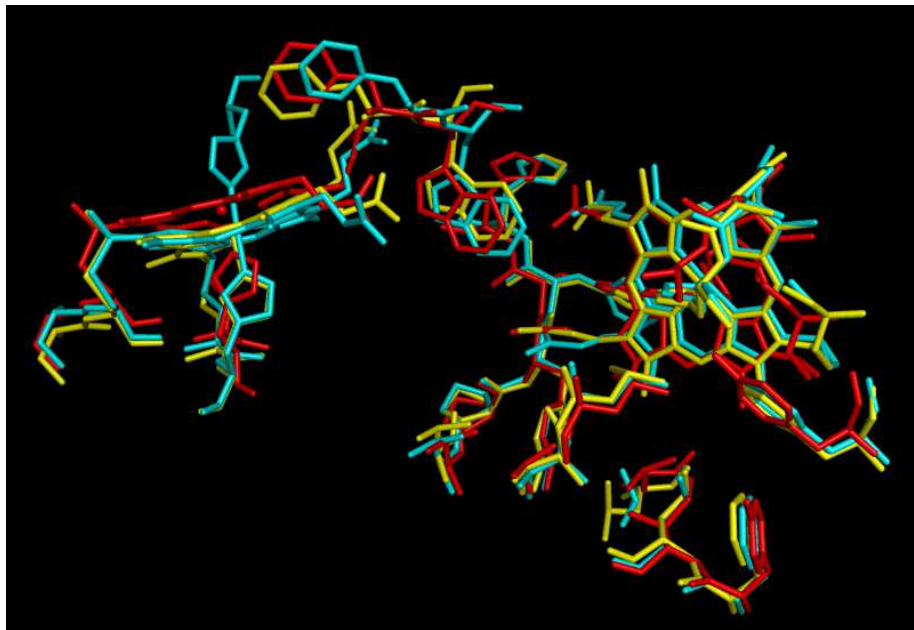


Abb. 1.6: Alignment übereinstimmender Strukturen im "as isolated"-Zustand von RoxA (rot) und den bakteriellen CCPs (EC 1.11.1.5) aus *P. aeruginosa* (blau) und *N. europaea* (gelb). Die Hämgruppen sind nahezu senkrecht zueinander und in einem Abstand von etwa 21,5 Å (RoxA) angeordnet. Das N-terminale Hämzentrum, das dem P-Häm von Peroxidasen entspricht, befindet sich links und ist bei RoxA und der *N. europaea* CCP nicht durch ein Histidin koordiniert.

Die axialen Hämliganden unterscheiden sich zu denjenigen in RoxA. Das Hämzentrum in der C-terminalen Domäne bei CCPs (*high potential heme*) ist His-Met-koordiniert und besitzt ein positives Redoxpotential um +320 mV (*P. aeruginosa* CCP) bis +450 mV (*N. europaea* CCP). Die initiale Reduktion dieses sog. E-Häms (*electron transferring*) bewirkt eine umfassende Konformationsänderung im halbreduzierten Zustand (*mixed valence state*), die von der Bindung von Ca²⁺ im Protein abhängt. Sie führt zur Öffnung des Enzyms (*open conformation*), die am zweiten Hämzentrum in der N-terminalen Domäne (*low potential heme*) die Reaktion mit dem Substrat Wasserstoffperoxid ermöglicht. Dieses heißt daher P-Häm (*peroxidatic heme*), an welchem die H₂O₂-Spaltung stattfindet. Es weist in der geschlossenen Konformation (*closed conformation*) im inaktiven, vollständig oxidierten Zustand ("as isolated") eine His-His-Koordination und ein negatives Redoxpotential bei –330

mV (*P. aeruginosa*) auf (Arciero & Hooper, 1994) und geht nach Reduktion des P-Häms in den *high-spin*-Zustand über. Ausnahmen bilden die *N. europaea* CCP (Arciero & Hooper, 1994) und *Methylococcus capsulatus* CCP (Zahn *et al.*, 1997). Diese sind auch im oxidierten Zustand aktiv, da sie bereits in der offenen Konformation vorliegen, wobei die P-Hämgruppe nur *einen* His-Liganden und ein Potential von -260 mV (*N. europaea*) (Ellfolk *et al.*, 1983) aufweist.

Das im *high-spin*-Fe(III)-Zustand vorliegende P-Häm reagiert mit H_2O_2 unter H_2O -Abspaltung und Ausbildung eines Fe(IV)=O-Intermediats, wobei das Fe(II)-E-Häm ein Elektron zum P-Häm transferiert. Aus dem aktiven P-/E-Häm-Zustand (Fe(III)/Fe(II)) entsteht ein "high-valent" Fe(IV)=O/Fe(III)-Zustand, das sog. "Compound I". Das "Compound II" entsteht nach Aufnahme eines zweiten Elektrons vom Elektronendonator Cytochrom *c*. Es kommt dabei zur Abspaltung eines zweiten H_2O -Moleküls und Übergang in den Fe(III)/Fe(III)-Zustand. Eukaryotische Peroxidasen besitzen dagegen nur eine, nicht kovalent gebundene Hämgruppe (*b*-Typ). Bei diesen ist das "Compound I" (formell Fe(V)) ein $^{+}\text{Fe(IV)=O}$ -Zustand mit einem Porphyrin- bzw. aromatischen Aminosäure-Radikal. Das zweite Oxidationsäquivalent wird dabei statt an einem zweiten Hämzentrum wie bei prokaryotischen CCPs meist als Tryptophan-Kation-Radikal ($\text{Trp}^{+\bullet}$) gespeichert. Dieses nimmt das zweite Elektron auf, wonach das "Compound II" (Fe(IV)=O/ Trp) entsteht. Diese Mechanismen sind beispielsweise in Shimizu *et al.* (2001) und Pettigrew *et al.* (2006) veranschaulicht.

1.5.3 MauG

Ein weiteres Protein mit einer vergleichbaren Aminosäure-Ähnlichkeit wie RoxA zu Cytochrom *c* Peroxidasen ist das 42 kDa-Protein MauG aus *Paracoccus denitrificans*. Dieses besitzt verglichen mit CCPs deutlich abweichende Redoxpotentiale (ca. -159 und -244 mV) und katalytische Eigenschaften. MauG ist eines von vier Proteinen, die für die Biosynthese der Methylamin-Dehydrogenase (MADH) benötigt werden (van der Palen *et al.*, 1995). Es ist an der posttranslationalen Modifizierung des katalytischen MADH-Kofaktors, der Sechselektronen-Oxidation zweier Protein-gebundener Trp-Reste zu Tryptophan-Tryptophylchinon (TTQ) beteiligt. Es katalysiert eine weitere Monooxygenierungsreaktion eines bereits hydroxylierten Tryptophans, die kovalente Verknüpfung der beiden Trp-Reste und die Oxidation dieses Chinols zum Chinon (Pearson *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006 b). Trotz des Vorhandenseins einiger in CCPs konservierter Bereiche ("MauG-Region") und zweier Hämbindemotive, weist das Protein nur eine minimale Peroxidaseaktivität auf (Wang *et al.*, 2003). Die Lage, sowie die Entfernung der beiden *c*-Typ-Hämgruppen stimmt mit derjenigen in CCPs und somit auch in RoxA überein.

1.6 Ziele der Arbeit

Das übergeordnete Ziel des Projektes ist die Aufklärung des biochemischen Mechanismus der Poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltung durch die Rubber Oxygenase RoxA. Die Funktion von RoxA als Dioxygenase, sowie einige wichtige grundlegende Eigenschaften des Enzyms wurden bereits von Braaz *et al.* (2004; 2005 a) beschrieben. Es stellte sich nun die noch weitgehend ungelöste Frage, in welcher Weise dieses neuartige Enzym die Spaltung von Naturkautschuk auf molekularem Niveau ausführt. Die vollständige Beantwortung dieser Frage im Rahmen einer Dissertation muss als ambitioniert betrachtet werden, doch sollten die durchgeführten Arbeiten einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise der Kautschukspaltung durch RoxA liefern.

Ein Ziel war es, den bis dahin unbekannt Ort der Substratbindung bzw. der Substratspaltung, d. h. das bzw. die katalytischen Zentren ausfindig zu machen. Es war davon auszugehen, dass die Hämgruppen dabei die Hauptrolle spielen, ob jedoch beide Zentren für die Spaltung essentiell sind bzw. welche Funktion welchem Zentrum zukommt, war bis dahin nicht bekannt. Aufgrund der besonderen spektroskopischen Eigenschaften sollte eine Untersuchung mit UV-Vis-, EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*)- und CD (*Circular Dichroism*)-Spektroskopie helfen, wobei verschiedene Versuchsansätze mit Liganden, Inhibitoren und Substraten, sowie das Redoxverhalten der beiden Hämzentren betrachtet wurden. Nachdem die RoxA-Struktur gelöst werden konnte, wurde von der Kooperationsgruppe O. Einsle (Freiburg) die Kokristallisation mit Substraten bzw. Liganden weiter verfolgt. Für diese Vorhaben waren große Mengen an gereinigtem Enzym erforderlich. Als Voraussetzung galt es daher zunächst, eine Reinigungsstrategie für RoxA zu etablieren.

Das vielleicht größte Potential, dem Spaltungsmechanismus näher zu kommen, bietet die Verwirklichung der Überexpression von RoxA als Basis für eine routinemäßige Isolierung und Charakterisierung punktuell veränderter RoxA-Varianten, um an der Latexspaltung beteiligte Aminosäuren und deren Aufgabe zu identifizieren. Vorarbeiten hatten bereits gezeigt, dass insbesondere die heterologe Expression des Di-Häm-Proteins, aber auch die homologe Expression aufgrund fehlenden Wissens zur molekularbiologischen Handhabung von *Xanthomonas* sp. mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden sein würde, weshalb nicht ausschließlich auf diese Strategie gesetzt werden konnte. Dieses Vorhaben wurde in erster Linie im Rahmen von Koarbeiten parallel weiter verfolgt. Für die vorliegende Arbeit stand daher die Isolierung und grundlegende Charakterisierung der Wildtyp- Rubber Oxygenase, insbesondere mithilfe spektroskopischer Techniken im Vordergrund.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Tab. 2.1: Verwendete und konstruierte Bakterienstämme

| Stamm | relevanter Genotyp bzw. Phänotyp | Stamm Nr.* | Referenz |
|--|---|------------|-------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> JM109 | <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi(lac proAB)F'[traD36,proAB+ lacIqZΔM15]</i> | 528 | Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>E. coli</i> JM109_pUC9:: <i>roxA</i> | s. JM109; Ap ^R , <i>roxA</i> | 3248 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_pUC9:: <i>roxA</i> clon | s. JM109; Ap ^R , <i>roxA</i> (<i>EcoRI/ApaI</i> -Fragment kloniert) | 3254 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_pET11a:: <i>roxA</i> | s. JM109; Km ^R , <i>roxA</i> | 3259 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_p4782.1:: <i>roxA</i> | s. JM109; Cm ^R , Km ^R , <i>roxA</i> | 3359 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_p4782.1:: <i>roxA</i> -ΔHäm1 | s. JM109; Cm ^R , Km ^R , <i>roxA</i> -C191S | 3614 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_p4782.1:: <i>roxA</i> -ΔHäm2 | s. JM109; Cm ^R , Km ^R , <i>roxA</i> -C390S | 3615 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_p4782.1:: <i>roxA</i> -W302L | s. JM109; Cm ^R , Km ^R , <i>roxA</i> -W302L | 3616 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_p4782.1:: <i>roxA</i> -H517L | s. JM109; Cm ^R , Km ^R , <i>roxA</i> -H517L | 3617 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> JM109_p4782.1::H.o.37340_pEC86 | s. JM109; Cm ^R , Km ^R , <i>Hoch_1661</i> ; <i>ccmABCDEFGH</i> | 3732 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET11a | s. BL21(DE3); pET11a; Ap ^R | 3500 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET11a:: <i>roxA</i> | s. BL21(DE3); pET11a:: <i>roxA</i> ; Ap ^R | 3262 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)_pEC86_pET11a:: <i>roxA</i> | s. BL21(DE3); pET11a:: <i>roxA</i> ; Ap ^R ; Cm ^R ; <i>ccmABCDEFGH</i> | 3264 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)_pEC86_pET22b:: <i>dhc2</i> | s. BL21(DE3); pET22b:: <i>dhc2</i> ; Ap ^R ; Cm ^R ; <i>ccmABCDEFGH</i> | 3283 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)_pEC86_pETSN22:: <i>macA</i> | s. BL21(DE3); pETSN22:: <i>macA</i> ; Ap ^R ; Cm ^R ; <i>ccmABCDEFGH</i> | 3282 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)_pEC86_pETSN22:: <i>GSU2813</i> ** | s. BL21(DE3); pETSN22:: <i>GSU2813</i> ; Ap ^R ; Cm ^R ; <i>ccmABCDEFGH</i> | 3281 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> S17-1 | <i>thi-1, pro hsdR recA tra+</i> chr::RP4-2, <i>hsdM+</i> ; TpR, SmR | 2024 | Simon <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>E. coli</i> S17-1_p4782.1:: <i>roxA</i> | s. S17-1; p4782.1:: <i>roxA</i> ; Km ^R | 3725 | diese Arbeit |

| Stamm | relevanter Genotyp bzw. Phänotyp | Stamm Nr.* | Referenz |
|--|--|--------------|------------------------------|
| <i>E. coli</i> S17-1_ _pEC86_p4782.1::H.o.37340 | s. S17-1; p4782.1::H.o.37340; Km ^R , Cm ^R ; <i>ccmABCDEFGH</i> | 3634 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> S17-1 _pET22b::dhc2 | s. S17-1; pET22b::dhc2 ; Km ^R | 3273 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> S17-1 _pETSN22::macA | s. S17-1; pETSN22::macA; Km ^R | 3272 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> S17-1_ pETSN22::GSU2813** | s. S17-1; pETSN22::GSU2813; Km ^R | 3271 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac-F'</i> [::Tn10 (Tc ^R), <i>proAB, lacIq, ΔlacZ&M15</i>]; NaI ^R | 1667 | Bullock <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue _ p4782.1::roxA-ΔHäm1 | s. XL1-Blue; p4782.1::roxA- ΔHäm1; Km ^R | 3594 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue _ p4782.1::roxA- ΔHäm2 | s. XL1-Blue; p4782.1::roxA- ΔHäm2; Km ^R | 3596 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue _ p4782.1::roxA-W302L | s. XL1-Blue; p4782.1::roxA- W302L; Km ^R | 3606 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue _ p4782.1::roxA-H517L | s. XL1-Blue; p4782.1::roxA- H517L; Km ^R | 3608 | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5 -T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i> | 2583 | NOVAGEN (Darmstadt) |
| <i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365 | Hoch_1661, Hoch1441; NR ⁺ , kultivierbar auf Festmedien | 3630 3643 | Fudou <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | <i>roxA</i> ; NR ⁺ | 3246 | Tsuchii and Takeda, 1990 |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y _p4782.1::roxA | <i>roxA</i> ; p4782.1::roxA (Km ^R); NR ⁺ | 3508 | Fahrbach, 2007 |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y _p4782.1::roxA-ΔHäm1 | <i>roxA</i> ; p4782.1::roxA-ΔHäm1 (Km ^R); NR ⁺ | 3618 | diese Arbeit |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y _p4782.1::roxA-ΔHäm2 | <i>roxA</i> ; p4782.1::roxA-ΔHäm2 (Km ^R); NR ⁺ | 3620 | diese Arbeit |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y _p4782.1::roxA-W302L | <i>roxA</i> ; p4782.1::roxA-W302L (Km ^R); NR ⁺ | 3622 | diese Arbeit |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y _p4782.1::roxA-H517L | <i>roxA</i> ; p4782.1::roxA-H517L (Km ^R); NR ⁺ | 3624 | diese Arbeit |
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CmR | <i>roxA</i> ; (spontan) Cm ^R ; NR ⁺ | 3629 | diese Arbeit |

NR⁺ : bildet Aufklarungszonen auf Latex-Overlay Agar

* : Stammsammlung Institut für Mikrobiologie (IMB) Universität Stuttgart (Labor 2)

** : GSU2813 bezeichnet *ccpA* aus *G. sulfurreducens* (Hoffmann *et al.*, 2009).

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

| Plasmid (Bezeichnung) | Beschreibung | Replikon | Größe [bp] | Referenz |
|------------------------------|---|------------------------|------------|---|
| pUC9 | Amp ^R <i>lacZ</i> α | pMB1 | 2665 | Vieira & Messing, 1982 |
| pUC9:: <i>roxA</i> | Amp ^R <i>roxA</i> | pMB1 | 4462 | diese Arbeit |
| pUC9:: <i>roxA</i> _ΔHäm1 | pUC9:: <i>roxA</i> mit Punktmutation C191S | pMB1 | 4462 | diese Arbeit |
| pUC9:: <i>roxA</i> _ΔHäm2 | pUC9:: <i>roxA</i> mit Punktmutation C390S | pMB1 | 4462 | diese Arbeit |
| pUC9:: <i>roxA</i> _W302L | pUC9:: <i>roxA</i> mit Punktmutation W302L | pMB1 | 4462 | diese Arbeit |
| pUC9:: <i>roxA</i> _H517L | pUC9:: <i>roxA</i> mit Punktmutation H517L | pMB1 | 4462 | diese Arbeit |
| pUC18-DioxPst4 | Amp ^R | pMB1 | 7368 | Jendrossek & Reinhard, 2003 |
| pET11a | Amp ^R , T7 <i>lac</i> | ColE1 | 5677 | NOVAGEN pET-Syst. Man. 11 th Ed. |
| pET11a:: <i>roxA</i> | Amp ^R , T7 <i>lac</i> , <i>roxA</i> | ColE1 | 7388 | diese Arbeit |
| pET22b:: <i>dhc2</i> | Amp ^R , T7 <i>lac</i> , His-Tag, <i>dhc2</i> | ColE1 | ≈5,7 kb | Heitmann & Einsle, 2005 |
| pETSN22:: <i>macA</i> | Amp ^R , T7 <i>lac</i> , | ColE1 | ≈6,5 kb | Hoffmann, 2007 |
| pETSN22::GSU2813 | Amp ^R , T7 <i>lac</i> , | ColE1 | ≈6,5 kb | Hoffmann, 2007 |
| pEC86 | <i>ccmABCDEFGHIH</i> in pACYC184; Cm ^R | p15A | 11753 | Arslan <i>et al.</i> , 1998 |
| p4782.1 | Km ^R <i>mob rhaR rhaS rhaP malE'eGFP</i> | RK2 (broad host range) | 8245 | J. Altenbuchner (pers. Ref.); pBBR1MCS-2 (Kovach, 1994) |
| p4782.1:: <i>roxA</i> | Km ^R <i>mob+ rhaR rhaS rhaP roxA</i> | RK2 | 8403 | Fahrbach, 2007 (Diplomarbeit) |
| p4782.1:: <i>roxA</i> _ΔHäm1 | p4782.1:: <i>roxA</i> mit Punktmutation C191S | RK2 | 8403 | diese Arbeit |
| p4782.1:: <i>roxA</i> _ΔHäm2 | p4782.1:: <i>roxA</i> mit Punktmutation C390S | RK2 | 8403 | diese Arbeit |
| p4782.1:: <i>roxA</i> _W302L | p4782.1:: <i>roxA</i> mit Punktmutation W302L | RK2 | 8403 | diese Arbeit |
| p4782.1:: <i>roxA</i> _H517L | p4782.1:: <i>roxA</i> mit Punktmutation H517L | RK2 | 8403 | diese Arbeit |
| p4782.1::H.o.37340* | p4782.1 mit Hoch_1661* | RK2 | 8397 | diese Arbeit |

* Das Gen 'Hoch_1661' war anfänglich als 'Hochdraft_37340' annotiert worden.

2.2 Nährmedien

Im Folgenden aufgeführte Flüssigmedien konnten nach Zugabe von 15 g Agar / L als Festmedien verwendet werden.

LB-Medium (Luria Bertani)

| | | |
|------------------------------------|-------------|--------|
| Trypton | 1 % (w/v) | 10 g |
| Hefeextrakt | 0,5 % (w/v) | 5 g |
| NaCl | 1 % (w/v) | 10 g |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 1 l |
| NaOH | | pH 7,5 |

NB-Medium (Nutrient-Broth)

| | | |
|------------------------------------|-------------|--------|
| Nutrient Broth | 0,8 % (w/v) | 8 g |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 1 L |

TSS-Medium

| | | |
|------------------------------------|--|-----------|
| PEG-6000 | | 10 g |
| DMSO | | 4,7 ml |
| MgSO ₄ [2 M] | | 2,5 ml |
| LB-Medium | | ad 100 ml |
| sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C | | |

Minimalmedium nach Schlegel

| | | |
|---|-----------------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | | 4,4 g |
| KH ₂ PO ₄ | | 1,5 g |
| NH ₄ Cl | | 1 g |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 1 L |
| autoklavieren | | |
| Fe(III)-Citrat | 1000x [1,2 g/l] | 1 ml |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 1000x [200 g/l] | 1 ml |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 1000x [20 g/l] | 1 ml |
| SL6 (10.000x) | | 100 µl |

Spurenelement-Lösung SL6 (Pfennig, 1974) (100x)

| | | |
|---|--|--------|
| ZnSO ₄ | | 1 g |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | | 0,3 g |
| H ₃ BO ₃ | | 3 g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | | 2 g |
| CuCl ₂ x 2H ₂ O | | 0,1 g |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | | 0,2 g |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | | 0,3 g |
| H ₂ O _{dest} | | ad 1 L |

Minimalmedium nach Tsuchii und Takeda**(T+T Medium)**

| | | |
|------------------------------------|--------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | | 8 g |
| KH ₂ PO ₄ | | 1 g |
| Tween 80 | 0,002 % | 20 µl |
| Hefeextrakt | 0,05 % (w/v) | 0,5 g |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 1 L |

autoklavieren

Nach dem Abkühlen Salze steril zugeben:

Salze (1000x)

| | | |
|---|---------|------|
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 20 g/l | 1 ml |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 18 g/l | 1 ml |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 200 g/l | 1 ml |
| MnSO ₄ | 0,5 g/l | 1 ml |
| NaCl | 100 g/l | 1 ml |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,5 g/l | 1 ml |
| Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O | 0,5 g/l | 1 ml |

Die Salzlösungen wurden getrennt autoklaviert.

Latex Overlay Agar**Underlay**Lösung I

| | |
|----------------------------------|-----------|
| K ₂ HPO ₄ | 4 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| Tween 80 | 10 µl |
| Hefeextrakt | 0,25 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 250 ml |

autoklavieren

Lösung II

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Agar | 7,5 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 250 ml |

autoklavieren

Lösung I und II nach dem getrennten Autoklavieren mischen und 0,5 ml jeder Salzlösung aus 1000x-Stammlösungen (siehe T+T-Minimalmedium) zugeben. Etwa 20 ml in Petrischalen füllen.

OverlayLösung III

| | |
|----------------------------------|----------|
| K ₂ HPO ₄ | 1,28 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16 g |
| Tween 80 | 3,2 µl |
| Hefeextrakt | 0,08 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 80 ml |
| autoklavieren | |

Lösung VI

| | |
|------------------------------------|----------|
| Agar | 2,4 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 80 ml |
| autoklavieren | |

Lösung III und IV getrennt autoklavieren, bei gleicher Temperatur (ca. 60°C) mischen und 160 µl der Salzlösungen (außer MgSO₄) zugeben. Danach sterile Latexmilch (Stammlösung von variabler Konzentration in 0,1 % Nonidet P40 bzw. 0,05 % Tween 80) zu einer Endkonzentration von 0,15 bis 0,2 % zugeben. Sofort ca. 8 ml auf den verfestigten und auf ca. 37°C vorgewärmten Underlay-Agar pipettieren.

VY/4-SWS-Agar (DSMZ Nr. 958)VY/4-Medium

| | |
|---|--------|
| NaCl | 20 g |
| Hefe (Bäckerhefe, frisch) | 2,5 g |
| Agar | 15 g |
| SWS-Lösung | ad 1 L |
| NaOH | pH 7,5 |
| autoklavieren | |
| Cyanocobalamin (Vit.B ₁₂) | 0,5 mg |
| steril filtrieren, nach dem Autoklavieren zugeben | |

SWS (Sea Water Salt Solution)

| | |
|--|--------|
| Fe(III)-Citrat | 0,01 g |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 8,0 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 1,0 g |
| KCl | 0,5 g |
| NaHCO ₃ | 0,16 g |
| H ₃ BO ₃ | 0,02 g |
| KBr | 0,08 g |
| SrCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,03 g |
| di- Na-β-Glycerophosphat | 0,01 g |
| SL4 (s. u.) | 1 ml |
| H ₂ O _{dest} | ad 1 L |

Spurenelement-Lösung SL4

| | |
|--|--------|
| EDTA | 0,5 g |
| auf pH 8 einstellen (NaOH) | |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 g |
| SL6 (s. MM nach Schlegel) | 100 ml |
| H ₂ O _{dest} | ad 1 L |

MgSO₄ wurde zusammen mit dem Nährmedium in H₂O_{dest} autoklaviert. Von allen übrigen Komponenten der SWS-Lösung wurde anschließend 1 ml/L aus getrennt autoklavierten 1000x- bzw. 100x-Stammlösungen steril zugegeben, ebenso das Cyanocobalamin. Statt frischer, ganzer Hefezellen wurde auch Hefeextrakt verwendet. Flüssigmedium wurde in entsprechender Weise ohne Agar hergestellt.

SWA (Sea Water)-Agar (DSMZ Nr. 246)

| | |
|----------------------------|--------|
| Fleischextrakt | 10 g |
| Pepton | 10 g |
| Leitungswasser | 250 ml |
| 10 min kochen (pH 7,8) | |
| Agar | 15 g |
| ASW (Artificial Sea Water) | 750 ml |
| auf pH 7,3 einstellen | |

ASW (Artificial Sea Water)

| | |
|--|---------|
| NaCl | 28,13 g |
| KCl | 0,77 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 1,6 g |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 4,8 g |
| NaHCO ₃ | 0,11 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 3,5 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1 L |

Fleischextrakt und Pepton wurden in Leitungswasser durch Erhitzen gelöst und der pH-Wert bei RT auf 7,8 eingestellt. Anschließend wurde die Mischung für 10 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die restlichen Komponenten zugegeben, auf pH 7,3 titriert und autoklaviert. Statt Fleischextrakt und Pepton konnte auch NB (Nutrient Broth) verwendet und auf ein Abkochen verzichtet werden.

Cy-SWS-Agar

| | |
|-------------------|--------|
| Bacto Casiton | 3 g |
| Bacto Hefeextrakt | 1 g |
| NaCl | 20 g |
| NaOH | pH 7,5 |
| Agar | 15 g |
| SWS* | ad 1 L |

* s. VY/4-SWS (s. o.), Fe(II)-Citrat statt Fe(III)-Citrat 0,1 g

Spurenelemente nach dem Autoklavieren aus konzentrierten Stammlösungen zugeben.

Cy-SWS/5-Agar

| | |
|-------------------|--------|
| Bacto Casiton | 0,6 g |
| Bacto Hefeextrakt | 0,2 g |
| NaCl | 20 g |
| NaOH | pH 7,5 |
| Agar | 15 g |
| SWS* | ad 1 L |

* s. VY/4-SWS (s.o.), Fe(II)-Citrat statt Fe(III)-Citrat 0,1 g

Spurenelemente nach dem Autoklavieren aus konzentrierten Stammlösungen zugeben.

Cy-SWS/5-Latex-Overlay-Agar**Underlay**

| | | |
|-----------------|---------------------------------------|-----------|
| <u>Lösung I</u> | Bacto Casiton | 0,3 g |
| | Bacto Hefeextrakt | 0,1 g |
| | NaCl | 10 g |
| | MgSO ₄ x 7H ₂ O | 4 g |
| | NaOH | pH 7,5 |
| | SWS* | ad 250 ml |

* s. VY/4-SWS (s.o.), Fe(II)-Citrat statt Fe(III)-Citrat 0,1 g

| | | |
|------------------|----------------------------------|-----------|
| <u>Lösung II</u> | Agar | 7,5 g |
| | H ₂ O _{dest} | ad 250 ml |

Lösung I und II getrennt autoklavieren, anschließend bei gleicher Temperatur (ca. 60°C) mischen und 0,5 ml jeder SWS-Einzelkomponente (außer MgSO₄) aus konzentrierter Stammlösung zugeben. Etwa 20 ml in Petrischalen füllen.

Overlay

| | | |
|-------------------|--|----------|
| <u>Lösung III</u> | Bacto Casiton | 0,1 g |
| | Bacto Hefeextrakt | 0,032 g |
| | NaCl | 0,64 g |
| | MgSO ₄ x 7H ₂ O | 1,28 g |
| | NaOH | pH 7,5 |
| | SWS* | ad 80 ml |
| | * siehe VY/4-SWS (s. o.), Fe(II)-Citrat statt Fe(III)-Citrat 0,1 g | |

| | | |
|------------------|----------------------------------|------------------------|
| <u>Lösung VI</u> | Agar | 2,4 g (1,5 % (w/v)) |
| | H ₂ O _{dest} | ad 80 ml |

Lösung III und IV getrennt autoklavieren, bei gleicher Temperatur (ca. 60°C) mischen und 160 µl der SWS-Salzlösungen (außer MgSO₄) zugeben. Danach sterile Latexmilch (Stammlösung von variabler Konzentration in 0,1 % Nonidet P40 bzw. 0,05 % Tween 80) zu einer Endkonzentration von 0,15 bis 0,2 % zugeben. Sofort ca. 8 ml auf den verfestigten und auf ca. 37°C vorgewärmten Underlay-Agar pipettieren. Im Overlay wurde die NaCl-Menge auf 20 % reduziert, um einer Aggregation der Kautschuklatex im Agar vorzubeugen.

Medienzusätze

Bei der Handhabung von *E. coli*-Stämmen und *Xanthomonas* sp. 35Y kamen die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol und Tetrazyklin zum Einsatz. Es wurden in der Regel eine 1000fache Stammlösung angelegt. Chloramphenicol und Tetrazyklin wurden zunächst in halbem Volumen Ethanol gelöst, dann mit gleichem Volumen H₂O_{bidest} aufgefüllt. Ampicillin- und Kanamycin-Stammlösungen wurden vor Verwendung steril filtriert. Die verwendeten Latices wurden mehrmals in H₂O_{dest} mit Zusatz eines Detergenz (Tab. 2.3), um die Aggregation der Polymerstränge zu mindern, gewaschen und bei RT zentrifugiert (8000 rpm, JA-10-Rotor, Beckman-Coulter, Krefeld). Die sich an der Oberfläche absetzende Latex wurde abgenommen, in der gewünschten Menge Detergenz-Lösung vollständig emulgiert und anschließend autoklaviert.

Tab. 2.3: Verwendete Medienzusätze

| Zusatz | Organismus | Konzentration | Stammlösung | Lösungsmittel |
|--|--|------------------------|------------------|--|
| Ampicillin | <i>E. coli</i> , <i>Xanthomonas</i> sp. | 100 µg / ml | 20 mg / ml | H ₂ O _{bidest} |
| Kanamycin | <i>E. coli</i> | 15 µg / ml | 30 mg / ml | H ₂ O _{bidest} |
| | <i>Xanthomonas</i> sp. | 30 µg / ml | | |
| Chloramphenicol | <i>E. coli</i> , <i>Xanthomonas</i> sp. | 10 µg / ml | 10 mg / ml | EtOH p.a. (50 %, v/v) |
| Tetrazyklin | <i>E. coli</i> , <i>Xanthomonas</i> sp. | 15 µg / ml | 15 mg / ml | |
| NR-Latex (Poly(<i>cis</i> -1,4- isopren)) | <i>Xanthomonas</i> sp., <i>Haliangium ochraceum</i> | 0,15 – 0,2 % (v/v)* | 5 – 50 % (w/v)** | 0,1 % Nonidet P40; ≤ 0,05 % Tween 80 |

* bezogen auf das Volumen der Latexsuspension

** bezogen auf das Trockengewicht des Polymers

2.3 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

2.3.1 *Escherichia coli*

Stämme von *E. coli* wurden in LB-Medium in Erlenmeyer-Kolben im Schüttelinkubator bei 150 rpm in der Regel bei 37°C kultiviert, sofern nicht anders angegeben. Das Kulturvolumen betrug maximal 20 % des Kolbenvolumens. Vorkulturen wurden von einer Agarplatte oder einer wachsenden Flüssigkultur meist in 10 ml LB-Medium in einem 100 ml-Kolben angeimpft und über Nacht angezogen. Ggf. wurde ein Selektionsdruck durch Zugabe von Antibiotika eingestellt, mit Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (10 µg/ml) oder Kanamycin (15 µg/ml). Versuche zur RoxA-Expression in *E. coli* BL21 (DE3) wurden in LB-Medium oder Minimalmedium nach Schlegel mit 0,4 % Gluconat in 100 ml- bzw. 500 ml-Erlenmeyerkolben bei Temperaturen zwischen 30°C und 16°C bei ca. 100 rpm vorgenommen. Für die kurzzeitige Lagerung wurden die Stämme auf LB-Agarplatten bei 4–8°C gelagert. Zur dauerhaften Konservierung wurden 900 µl einer Über-Nacht-Kultur in LB-Medium, ggf. mit Anwesenheit eines entsprechenden Antibiotikums, mit sterilem Glycerin (86 %, v/v) im gleichen Verhältnis in einem Stammhaltungsröhrchen vermischt, schockgefroren und bei –70°C gelagert.

2.3.2 *Xanthomonas* sp. 35Y

Xanthomonas sp. 35Y wurde in NB- oder LB-Medium in Erlenmeyer-Kolben, mit einem Kulturvolumen von maximal 20 % des Kolbenvolumens, im Schüttelinkubator bei 100 rpm und 30°C kultiviert, sofern nicht anders angegeben. Vorkulturen wurden mit reichlich Zellmasse von einer Agarplatte oder aus einer wachsenden Flüssigkultur 1:20 bis 1:5 in 10 ml Vollmedium in einem 100 ml-Kolben angeimpft und über Nacht oder mehrere Tage herangezogen. Die Inokulationsvolumina bei Großkulturen in 2-/3-/5- L-Kolben variierten je

nach vorgesehener Kultivierungsdauer zwischen 1:100 (65 h) und 1:20 – 1:40 (40 h). Für die Anzucht von *Xanthomonas* p4782.1::*roxA* wurden dem Medium 30 µg/ml Kanamycin, für *Xanthomonas* sp. 35Y-CmR 10 µg/ml Chloramphenicol zugefügt. Die höchsten Zelldichten wurden in LB-Medium erreicht ($OD_{600} = 5-7$). Zur Herstellung von elektrokompenten *Xanthomonas*-Zellen wurde jedoch stets NB-Medium aufgrund der geringeren Leitfähigkeit verwendet.

Die kurzzeitige Lagerung erfolgte auf Agarplatten bei 4–8°C bzw. bis zu zwei Wochen bei RT. Dauerkulturen wurden analog zu *E. coli* u. a. als Glycerinkulturen (43 % (v/v) Glycerin) angelegt. Als die verlässlichste Art der Konservierung für *Xanthomonas* sp. muss die Lyophilisierung gelten. Dazu wurden die Zellen von einer dicht bewachsenen NB- oder LB-Agarplatte höchstens zwei Tage nach Erscheinen der ersten Kolonien mit 2 ml Skim-Milk-Lösung abgeschwemmt und die Zellsuspension auf etwa 20–25 sterile Filterplättchen (Ø 6 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) gesogen. Die Plättchen wurden in einem sterilen Falcon-Röhrchen zunächst bei –20°C eingefroren, dann im Vakuumlyophilisator über Nacht gefriergetrocknet. Die Lagerung der Zellen erfolgte in sterilen Cryoröhrchen mit Kieselgel bei –70°C.

| | | | |
|-------------------------|------------------------------------|------------|----------|
| <u>Skim Milk-Lösung</u> | Magermilchpulver | 10 % (w/v) | 1 g |
| | Meso Inosit | 5 % (w/v) | 0,5 g |
| | H ₂ O _{bidest} | | ad 10 ml |
| | Lagerung bei 4°C | | |

2.3.3 *Haliangium ochraceum* DSM 14365

Bisher ist es noch nicht gelungen, den erst 2002 erstmals beschriebenen *H. ochraceum* (Fudou *et al.*, 2002) in Flüssigmedien zu kultivieren. Eine Anzucht erfolgte daher stets auf Festmedien bei 30°C. Da es sich bei diesem Stamm um ein moderat halophiles Myxobakterium handelt, enthielten diese in der Regel 2 % NaCl und zahlreiche Spurenelemente. Zur Kultivierung eigneten sich VY/4-SWS-Agar (DSMZ Nr. 958) mit ganzen Hefezellen oder ersatzweise Hefeextrakt, Cy-SWS-Agar, ferner ASW-Agar (DSMZ Nr. 246) (s. Kap. 2.2). Das Überimpfen erfolgte durch Transfer eines kleinen Agarblöckchens oder einer sichtbaren Menge Mycel vom Rand einer Kolonie auf die Mitte einer frischen Agarplatte. Bereits am darauf folgenden Tag war konzentrisches mycelartiges Wachstum zu erkennen, das etwa 5–10 Tage bis zum Abdecken der gesamten Plattenoberfläche anhielt.

Die Konservierung des Stammes erfolgte durch Abschwemmen von Mycel am Kolonienrand und Aufnahme in 43% Glycerin, anschließender Lagerung bei –70°C. Zudem war die Lagerung von *H. ochraceum* auf Agarplatten, die zuvor mit 20 % Glycerin überschichtet wurden, bei –70°C möglich.

2.4 Zellaufschluss

2.4.1 Ultraschall

Zum Zellaufschluss von *Xanthomonas* und auch *E. coli* mit Ultraschall wurden etwa 50 ml Kultur in 50 ml Falcontubes bei 4°C zentrifugiert (*E. coli*: 5000 g, 15 min; *Xanthomonas*: 5000 g, 25 min). Das Zellpellet wurde nach quantitativer Entfernung des Mediums in 0,5–1 ml HEPES-Puffer (100 mM, pH 7) resuspendiert und mit wenig DNase A versetzt. Der Ultraschallaufschluss erfolgte bei einer Beschallung von 3–4 mal 20 Sekunden mit einer Ultraschallsonde (Bandelin Sonoplus HD 200, 60% Cycle; Power KE 73/D). Die Proben wurden dabei auf Eis gehalten. Zwischen den Beschallungszyklen wurden etwa gleich lange Pausen eingehalten, um eine starke Erhitzung der Probe zu vermeiden. Zur Abtrennung unlöslicher Zelltrümmer wurde anschließend zwei Minuten bei 16.100 g zentrifugiert und der lösliche Überstand gesammelt.

2.4.2 French Press

Mit *E. coli*-Kulturen wurde der Zellaufschluss meist mit einer French-Press (Aminco, Maryland, USA) durchgeführt. Nach Zentrifugation der Kultur (5000 g, 15 min, 4°C) wurden Medienreste vollständig abgenommen und das Zellpellet auf Eis in einem entsprechend kleinen Volumen zum Erreichen einer dickflüssigen Konsistenz mit Bis-Tris oder HEPES (100 mM, pH 7) vollständig resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend in die vorgekühlte Zelle der French-Press gegeben und durch Druckdifferenz aufgeschlossen, dabei auf Eis gehalten. Die Prozedur wurde zur Vollständigkeit des Aufschlusses jeweils dreimal wiederholt. Nach dem ersten Durchgang wurden etwa 50 µl DNaseI (1 mg/ml) (Appllichem, Darmstadt) zugefügt.

2.5 Periplasmaaufschluss

Zum Aufschluss des Periplasmas bei *E. coli* und *Xanthomonas* sp. 35Y wurde eine Methode nach Neu & Heppel (1965) angewandt, die auf der osmotischen Lyse basiert. Es wurden 10 ml einer Kultur zentrifugiert (5000 g, 10 min, 4°C) und der Überstand quantitativ entfernt. Die Zellen wurden in 2 ml (1/5 Vol.) Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet gewogen. Die Zellen wurden in Tris-Saccharose-EDTA-Lösung resuspendiert (8 ml pro 0,1 g) und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 2 ml (1/50 Vol.) kalter MgSO₄-Lösung aufgenommen (5 mM) und für mindestens 10 Minuten im Eisbad geschwenkt, anschließend erneut zentrifugiert

(s. o.). Der Überstand, der die periplasmatischen Proteine enthalten sollte, wurde abgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gehalten.

| | | |
|------------------------------------|-------------------|------------|
| <u>Tris/HCl-Puffer</u> | Tris | 10 mM |
| | HCl | pH 8,0 |
| <u>Tris-Saccharose-EDTA-Lösung</u> | Tris | 30 mM |
| | Saccharose | 20 % (w/v) |
| | EDTA | 1 mM |
| | HCl | pH 8,0 |
| <u>MgSO₄-Lösung</u> | MgSO ₄ | 5 mM |

2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA

2.6.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte in der Regel aus 1,5–3 ml einer Über-Nacht-Kultur (37°C). Die Kultur wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) 30 Sekunden bei 20.000 g bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml SET-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (30 sec., 20.000 g, RT). Der Überstand wurde restlos abgenommen und die Zellen in 150 µl SET-Puffer vollständig resuspendiert.

Es wurden 5 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und gemischt (Vortex). Der Ansatz wurde mit 350 µl Lysepuffer versetzt, durch Invertieren vermischt und für 5 Minuten auf Eis gehalten. Das Ausfällen von Protein erfolgte nach Zugabe von 250 µl K-Acetat-Puffer und Invertieren für 20 Minuten auf Eis. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten (20.000 g, RT). Der Überstand wurde in ein frisches ERG überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und durch moderates Vortexen vermischt. Die Ansätze wurden zwei Minuten zentrifugiert, die wässrige Oberphase vorsichtig in ein neues ERG abgenommen und mit 1 Vol. eiskaltem Isopropanol durch Invertieren gründlich gemischt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde nun durch 5minütige Zentrifugation bei 20.000 g pelletiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen, anschließend erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde rückstandsfrei abgenommen und das Pellet bei ca. 60°C für 5–10 Minuten getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 20–50 µl H₂O_{bidest} gelöst und über Nacht bei 4°C gehalten bzw. zur Lagerung bei –20°C eingefroren. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde die Präparation mithilfe des PCR Purification Kit (Roche, Mannheim) nach Anleitung durchgeführt.

2.6.1.2 Plasmidisolierung aus *Xanthomonas* sp. 35Y

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *Xanthomonas* sp. 35Y wurden 3–6 ml einer noch nicht stationären Vorkultur (30°C) verwendet. Die Zellen wurden in 1,5 ml ERGs nacheinander je eine Minute zentrifugiert (20.000 g, RT) und der Überstand rückstandsfrei abgenommen. Da *Xanthomonas*-Zellen leicht lysierten, wurde auf den initialen Waschschrift mit 1 ml SET-Puffer verzichtet und das Zellpellet in 150 µl SET-Puffer resuspendiert.

Die weitere Vorgehensweise entsprach derjenigen zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (s. Kap. 2.6.1.1). Die Aufnahme der DNA erfolgte in der Regel in einem geringeren Volumen von 15–20 µl H₂O_{bidest}, die Lagerung über Nacht bei 4°C, längerfristig bei –20°C.

| | | |
|-------------------|------------------------------------|---------------|
| SET-Puffer | Tris | 1,81 g |
| | HCl | pH 7,6 |
| | EDTA | 5,58 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 100 ml |
| | | autoklavieren |
| | Saccharose | 60 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 200 ml |
| | sterilfiltrieren | |

Die Saccharose-Lösung wurde steril filtriert und nach dem Autoklavieren der restlichen Komponenten nach Abkühlung zugegeben.

| | | |
|--------------------|------------------------------------|-----------------|
| Lyse-Puffer | SDS | 0,5 g |
| | NaOH | 0,4 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 50 ml |
| | | Lagerung bei RT |

| | | |
|------------------------|------------------------------------|-----------------|
| K-Acetat-Puffer | K-Acetat | 41,9 g |
| | Essigsäure | pH 4,8 |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 300 ml |
| | | Lagerung bei RT |

| | | |
|---------------------|------------------------------------|-----------------|
| RNase-Puffer | Na-Acetat | 205,1 mg |
| | EDTA | 2,79 mg |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 25 ml |
| | Essigsäure | pH 4,8 |
| | | Lagerung bei RT |

| | | |
|---|----------------|------------------------------------|
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) | Phenol | 100 ml |
| | Chloroform | 96 ml |
| | Isoamylalkohol | 4 ml |
| | | mit 10x TE-Puffer (100 mM, pH 8,0) |

| | | |
|----------------------|------------------------------------|-----------|
| 10x TE-Puffer | überschichten; Lagerung bei 4°C | |
| | Tris | 181,7 mg |
| | EDTA | 55,8 mg |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 150 ml |
| | HCl | pH 8,0 |
| | Lagerung bei RT | |

2.6.2 Isolierung genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien

Die Extraktion chromosomaler DNA aus *Xanthomonas* sp. 35Y erfolgte aus einer gut gewachsenen NB- oder LB- Über-Nacht-Kultur ($OD_{600} \approx 3$). Die Zellen wurden 15 Minuten bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand restlos entfernt und das Zellpellet in 5 ml SET-Puffer (Kap. 2.6.1) resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. *Haliangium ochraceum* DSM 14365 dagegen wurde auf VY/4-SWS-Agarplatten bei 30°C angezogen. Da *H. ochraceum* nicht in Flüssigmedium kultivierbar ist, wurde eine ausreichende Zellmasse für die DNA-Isolierung nach Abschwemmen von drei voll bewachsenen Platten mit je 2 ml SET-Puffer erhalten. Diese wurden in einem 15 ml Falconröhrchen vereinigt und entsprechend der Vorgehensweise aus Neumann *et al.* (1992) fortgeföhren.

Nach Zugabe von 0,1 Vol. SDS (10 %, w/v) wurde die Zellsuspension durch Invertieren gemischt. Gleiches wurde nun nach Zugabe von 0,1 Vol. Proteinase K (1 mg/ml) durchgeführt. Der Ansatz wurde für mindestens zwei Stunden bei 55°C inkubiert und gelegentlich gemischt. Anschließend wurde 1/3 Vol. gesättigte NaCl-Lösung (≈ 6 M) zugefügt und vorsichtig gemischt. Es folgte das Ausfällen von Protein durch Zugabe von 1 Vol. Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) beim Schwenken des Röhrchens auf einem Vertikalrotor für 30 Minuten. Es wurde für 10 Minuten zentrifugiert (4000 g, RT) und die wässrige Oberphase mit abgeschittener blauer Spitze in ein frisches Röhrchen abgenommen. Die Extraktion wurde mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und die anschließende Zentrifugation wiederholt. Zur Oberphase wurden 20 μ l RNase-Lösung zugefügt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 1,3 Vol. eiskaltem Isopropanol (-20°C) durch Invertieren vollständig gemischt. Die ausgefallene DNA wurde mit einem Glasstab bzw. einer im Bunsenbrenner abgestumpften Pasteurpipette aufgewickelt und zum Reinigen mit Ethanol (70 %, v/v) gut abgespült. Die DNA wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit etwas Ethanol (70 %, v/v) vom Glasstab entfernt und in einer Speedvakuum-Zentrifuge für etwa 20 Minuten getrocknet und in 500 μ l TE-Puffer aufgenommen. Zum Lösen wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C gehalten.

Tab. 2.4: Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien

| | | |
|--|------------------------------------|--|
| <u>SET-Puffer</u> | s. Kap. 2.6.1 | |
| <u>Proteinase-Lösung</u> | Proteinase K | 1 mg/ml H ₂ O _{bidest} |
| <u>NaCl-Lösung</u> | NaCl | 6 M (gesättigt) |
| <u>SDS-Lösung</u> | SDS | 10 % (w/v) |
| <u>RNase-Lösung</u> | RNase A | 10 mg |
| | RNase-Puffer | 1 ml |
| | Lagerung bei 4°C | |
| <u>RNase-Puffer</u> | s. Kap. 2.6.1 | |
| <u>Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol</u> (25:24:1) | s. Kap. 2.6.1 | |
| <u>Chloroform/Isoamylalkohol</u> (24:1) | Chloroform | 48 ml |
| | Isoamylalkohol | 2 ml |
| | 10x TE-Puffer | Überschichten |
| | Lagerung bei 4°C | |
| <u>TE-Puffer</u> | Tris | 0,12 g |
| | EDTA | 0,29 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 100 ml |
| <u>10x TE-Puffer</u> | s. Kap. 2.6.1 | |

2.6.3 Übertragung von Nukleinsäuren

2.6.3.1 Übertragung von Plasmiden nach *E. coli*

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit CaCl₂

Chemisch kompetente *E. coli* zur dauerhaften Lagerung wurden mit unter Einsatz von Calcium-Chlorid hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden 1:100 aus einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3–0,4 (ca. 2 Stunden) geschüttelt. Die Kultur wurde auf Eis gekühlt und in sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen für 10 Minuten bei 3000 g und 4°C ohne Rotorbremse (Sigma 4K15C, Rotor 11140, Sigma Laborzentrifugen, Deisenhofen) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 15 ml kaltem CaCl₂ (100 mM) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gehalten. Es wurde erneut 10 Minuten ohne Rotorbremse zentrifugiert (3000 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Die

Pellets wurden in 2 ml kaltem CaCl₂ mit Glycerin (100 mM, 15% (v/v) Glycerin) vollständig resuspendiert, anschließend für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann in 200 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70°C gelagert.

| | | | |
|------------------------------------|--|------------|-----------|
| <u>CaCl₂</u> | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 100 mM | 2,2 g |
| | H ₂ O _{bidest} | | ad 150 ml |
| | Lagerung bei 4°C | | |
| <u>CaCl₂ + Glycerin</u> | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 100 mM | 2,2 g |
| | Glycerin | 15 % (v/v) | 22,5 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | | ad 150 ml |
| | Lagerung bei 4°C | | |

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* mit TSS-Medium

Chemisch kompetente *E. coli* zur sofortigen Verwendung wurden mit dem MgSO₄-Sulfat enthaltenden TSS-Medium (s. Kap. 2.2) hergestellt. Es wurden 20 ml LB-Medium 1:100 aus einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,3–0,4 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für 10 Minuten bei 4500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das Pellet in 1 ml kaltem TSS-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden eine Stunde auf Eis gehalten und anschließend in 200 µl-Portionen aufgeteilt und direkt zur Transformation eingesetzt.

Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 200 µl frisch präparierter Zellsuspension mit 5–10 µl Plasmid-DNA bzw. entsprechender Menge eines Ligationsansatzes vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde nun durch Hitzeschock angeregt, der für 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erfolgte. Im Anschluss wurden die Ansätze nochmals wenige Minuten auf Eis gehalten. Es wurden 800 µl LB- oder TSS-Medium zugegeben und der Ansatz zur Ausprägung der Resistenz in einem 2 ml ERG für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden pro Platte je 100–200 µl des Ansatzes bzw. in Saline (0,9 % NaCl) angelegte Verdünnungen auf einem entsprechenden Selektionsagar ausplattiert.

2.6.3.2 Übertragung von Plasmiden nach *Xanthomonas* sp.

Standard-Methoden zur chemischen Transformation von *Xanthomonas* sp. mit Plasmid-DNA konnten nicht erfolgreich angewandt werden, vermutlich aufgrund einer hohen Sterberate der Zellen während der Prozedur. Daher kamen Verfahren zur Elektroporation von *Xanthomonas* bzw. der konjugativen Übertragung von Plasmiden zur Anwendung.

Herstellung elektrokompeter *Xanthomonas* sp. 35Y Zellen

In einem 0,5 L -Erlenmeyerkolben wurden 100 ml NB-Medium mit 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4–0,6 bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde für 10 Minuten auf Eis gekühlt und in 50 ml Falcon-Röhrchen 15 Minuten bei 4°C und 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in etwa 300 µl des Überstandes durch Vortexen resuspendiert. Die Pellets wurden nicht länger als 20 sec. am Stück gevortext, währenddessen stets auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen in jedem Röhrchen mit 40 ml kalter HEPES-Tris-Lösung (pH 7) gewaschen und erneut 15 min zentrifugiert (5000 g, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in etwa 300 µl HEPES-Tris resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in jedem Röhrchen mit 40 ml Glycerin (10 % (v/v), pH 7) verdünnt und 20 Minuten zentrifugiert (5000 g, 4°C). Der Überstand wurde abgossen, die Zellen in 200–300 µl des zurückbleibenden Glycerins vollständig resuspendiert und direkt zur Elektroporation eingesetzt, dabei stets auf Eis gehalten.

| | | |
|---------------------------|----------------------------------|-----------|
| <u>HEPES-Tris</u> | HEPES | 23,75 g |
| | Tris (1 M) | pH 7,0 |
| | H ₂ O _{bide} | ad 1 L |
| | autoklavieren, Lagerung bei 4°C | |
| <u>Glycerin 10% (v/v)</u> | Glycerin (86% (v/v)) | 58,1 ml |
| | HEPES-Tris | pH 7,0 |
| | H ₂ O _{bide} | ad 500 ml |
| | autoklavieren, Lagerung bei 4°C | |

Elektroporation von *Xanthomonas* sp. 35Y

Die anschließende Elektroporation wurde nur mit frisch präparierten Zellen möglichst zeitnah durchgeführt. 75 µl der vorbereiteten Zellsuspension wurden mit bis zu 10 µl (50–500 ng) DNA in einem sterilen ERG vermischt und in auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm) pipettiert. Elektroporiert wurde bei 25 µF, 200 Ω und 1,5 kV. Im Anschluss wurden die Zellen in 600 µl NB-Medium aufgenommen und in 2 ml ERGs maximal 2–3 Stunden bei 30°C mit 100 rpm geschüttelt. Davon wurde der gesamte Ansatz in 200 µl-Portionen auf Selektivagar ausplattiert. Bei der Transformation mit p4782.1::*roxA* wurde NB mit 30 µg/ml verwendet. Als Positivkontrolle diente der Vektor pBBR1MCS-2.

Konjugation zwischen *E. coli* S17-1 und *Xanthomonas* sp. 35Y (CmR)

Zum Transfer von mobilisierbaren Plasmiden nach *Xanthomonas* sp. wurden Standard-Verfahren der Konjugation angepasst. Als Rezipient wurde ein *Xanthomonas*-Stamm mit einer spontanen Resistenz für Chloramphenicol (Cm) verwendet. Dieser entstammte einer

spontan aufgetretenen Einzelkolonie nach Ausplattieren von 100 μl einer unverdünnten *Xanthomonas*-Kultur ($10^8 - 10^9$ Zellen) auf NB-Agar mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Cm und erwies sich als stabil, d. h. besaß noch immer die uneingeschränkte Resistenz nach fünf Wachstumszyklen ohne Antibiotikum und anschließender Kultivierung mit Cm.

Das entsprechende *roxA*-Varianten tragende Plasmid p4782.1 mit einer *mob*-site wurde zunächst in *E. coli* S17-1 übertragen. Donor (*E. coli* S17-1 p4782.1::*roxA*) und Rezipient (*Xanthomonas* sp. 35Y-CM) wurden jeweils in 10 ml LB-/NB-Medium mit Kanamycin (15 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Chloramphenicol (10 $\mu\text{g/ml}$) bei 30°C in 100 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. *Xanthomonas* sp. wurde dazu bereits am Vorabend 1:5 aus einer wachsenden Vorkultur angeimpft. *E. coli* wurde aus seiner Vorkultur 1:50 angeimpft und für etwa drei Stunden geschüttelt. Die Kulturen wurden etwa bei einer OD_{600} von etwa 1,0 bei 4°C zentrifugiert (10 Minuten, 3000 g) und in 1 ml frischen NB-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert. Je 100 μl des Donors und 200–400 μl des Rezipienten wurden in einem sterilen ERG gemischt und auf die Mitte einer NB-Agarplatte pipettiert und aufrecht über Nacht (ca. 16 h) bei 30°C inkubiert. Der Zellrasen wurden mit 1,5 ml steriler Saline (0,9 % (w/v) NaCl) abgeschwemmt und je 100 μl aus Verdünnungsreihen bis zu 10^{-4} auf Selektionsagar, welcher zum Ausschluss des *E. coli*-Donors neben der plasmidcodierten Resistenz Kanamycin auch Chloramphenicol enthielt. Typischerweise konnten nach 6–8 Tagen Inkubation bei 30°C etwa $10^2 - 10^3$ Kolonien von potentiellen *Xanthomonas* sp. 35Y-CM-Transkonjuganten pro Platte der 10^{-3} -Verdünnung erhalten werden. Wurde auf eine anfängliche Konzentrierung der Zellen verzichtet, war die Ausbeute um etwa eine Größenordnung geringer. Ausgewählte Kolonien wurden nach Reinheitsausstrich auf Selektionsagar auf die Anwesenheit des Plasmids durch eine Plasmidisolation bzw. PCR überprüft.

2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die exakt definierte Vervielfältigung von DNA-Fragmenten einer als Matrize dienenden Template-DNA durch hitzestabile DNA-Polymerasen bei Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und die Reaktion definierenden Oligonukleotiden (*Primern*). Ein PCR-Zyklus umfasst eine initiale Hitzedenaturierung, welche die beiden DNA-Stränge voneinander trennt, ein Abkühlen auf eine vom Schmelzpunkt des Primers abhängige Temperatur (oft 55°C), das die Primerbindung an die Ziel-DNA ermöglicht (*Annealing*), und die Synthese der zwischen dem *forward*- und *reverse*-Primer liegenden DNA durch die Polymerase in 5'→3'-Richtung bei einer optimalen Temperatur von meist 72°C. Die Elongationszeit richtete sich nach der verwendeten Polymerase und der Länge des zu synthetisierenden DNA-Fragments. Es wurde Taq-DNA-Polymerase (Genaxxon, Biberach) oder PWO-Polymerase (Roche, Mannheim) bzw. PrimeSTAR-Polymerase (TAKARA Bio Inc., Saint-Germainen-Laye, Frankreich) mit einer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt. Bei Verwendung von Taq-Polymerase wurde eine

Elongationsphase von mindestens 30 Sekunden pro 1000 nt, von Proofreading-Polymerasen von mindestens 60 Sekunden pro 1000 nt eingestellt.

Tab. 2.5: PCR-Reaktionsansätze (pro 25 µl Reaktionsvolumen)

| | | Taq-Polymerase [5 U/µl] | PWO- [1 u/µl]/ PrimeStar-Polymerase [2,5 U/µl] |
|------------------------------------|-------------|-------------------------|--|
| Reaktionspuffer | (10x) | 2,5 µl | 2,5 µl* / 5 µl** |
| MgCl ₂ ^x | 25 mM | (1 µl) | – |
| Template-DNA | 1- 10 ng | 0,5 µl | 0,5 µl |
| Primer_f | 10 nM | 0,5 µl | 0,25 µl |
| Primer_r | 10 nM | 0,5 µl | 0,25 µl |
| dNTP-Mix | (je 2,5 mM) | 0,5 - 1 µl | 2µl |
| DMSO ^{***} | 1 % (w/v) | (1,25 µl) | (1,25 µl) |
| Polymerase | | 0,1 – 0,2 µl | 1 µl / 0,25 µl |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 25 µl | ad 25 µl |

^x nur bei Verwendung eines Puffers ohne Mg²⁺

* 10x PWO-Puffer (+ 20 mM MgSO₄)

** 5x Prime Star-Puffer

*** Bei PCR auf chromosomaler DNA wurde ggf. DMSO zugesetzt

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (TGRADIENT, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Ein typischer Ansatz umfasste ein Volumen von 25 µl, dessen Komponenten sind in Tab. 2.5 aufgeführt, die für die verschiedenen Polymerasen verwendeten PCR-Programme in Tab. 2.6. Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2.7) wurden mit dem Programm "PrimerSelect" (DNASTAR, Inc. Madison USA) erstellt und von der Fa. Operon (Köln) synthetisiert. Für mehrere PCR-Ansätze wurde zuvor ein Mastermix angelegt. Die amplifizierte DNA wurde ggf. zur weiteren Verwendung in Restriktionen mit dem PCR Purification Kit (Roche, Mannheim) nach Vorschrift aufgereinigt.

Tab. 2.6: PCR-Programme

| | | Taq-Polymerase | PWO-Polymerase | PrimeStar-Polymerase |
|---------------|--------------|------------------|------------------|----------------------|
| Denaturierung | 95°C*/98°C** | 2 min | 2 min | 2 min |
| | 95°C*/98°C** | 30 sec | 30 sec | 10-15 sec |
| Annealing | 55°C*** | 30 sec | 30 sec | 10 sec |
| Elongation | 72°C | 30 sec / 1000 bp | 60 sec / 1000 bp | 60 sec / 1000 bp |
| | 72°C | 10 min | 10 min | 5 min |
| Pause | 4°C | ∞ | | ∞ |

* Taq-/ PWO-Polymerase

** Prime Star-Polymerase

*** Die Annealingtemperatur wurde ggf. variiert abhängig vom T_m der Primer

Tab. 2.7: Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind rot markiert, die entsprechenden Enzyme angegeben. Die nach Restriktion im PCR-Produkt verbleibenden Sequenzen sind unterstrichen. Bei den Primern für die RoxA-Mutagenese sind die veränderten Codons unterstrichen, die mutierte Base ist blau markiert.

| Primer (Bezeichnung) | Nukleotidsequenz (5' → 3') |
|-----------------------------------|---|
| Diox-NdeI_f | TGCAGCCAC <u>CATATG</u> ATCGCAAGACGCCT NdeI |
| Hind-Diox_r | CAAAGCTT <u>CTATAACGTCTTGATTTC</u> HindIII |
| NdeI-roxA_f | GGAATTC <u>CATATG</u> ATCGCAAGACGCCTTGG NdeI |
| roxA-HindIII_r | CCCAAGCTT <u>CTATAACGTCTTGATGTATTTCG</u> HindIII |
| NdeI-37340_f | GGAATTC <u>CATATG</u> ACGACCCGAGCGAACTTAC NdeI |
| 37340-HindIII_r | CCCAAGCTT <u>CTACAGGGTCTTGAGGTACTC</u> HindIII |
| Primer für RoxA-Mutagenese | |
| roxHäm1-C1_f | GCGCGTCG <u>AGCT</u> CGGCCTGTC |
| roxHäm1-C1_r | GCCGAG <u>GCT</u> CGACGCGCCGATCAG |
| roxHäm2-C2_f | GCGCGAGC <u>AGTC</u> ATGGTGTCTATTC |
| roxHäm2-C2_r | GACACCATG <u>ACTG</u> CTCGCGCATGAG |
| roxW302L_f | GTCAGTTCT <u>TGG</u> ACGGCTC |
| roxW302L_r | GCGAGCCGTCC <u>AAGA</u> ACTGA |
| roxH517L_f | CCGTATTTCC <u>TCA</u> ATGGCAGCGTG |
| roxH517L_r | GCTGCCATTG <u>AGG</u> AAATACGGAG |
| Primer für Sequenzierung | |
| UpperroxAGS1 | GCGCTCGCACGAAACTGTC |
| UpperroxALS1 | CACCGCCAGCGAAGCATC |
| LowerroxAGS1 | TGAGATTGTTGTACGCCACCA |
| LowerroxALS1 | GCAAGAACGCGGGCTATGAC |
| pUC9-roxAup_f | TCGGTGATGACGGTGAAAAC |
| pUC9-roxAup_r | GCGCAGGATACAAACCATAACC |
| roxAend_f | TATCTTACCTCGCCGTTCTTG |
| roxAend_r | CGGTGATCTTCCAACAACCTCC |

2.6.5 Modifikation von DNA

2.6.5.1 Restriktion von DNA

Zur Klonierung von Vektoren wurden entsprechende Plasmide und PCR-Fragmente mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Ipswich, USA; Fermentas, St. Leon-Rot) an deren spezifischen Erkennungssequenzen geschnitten und anschließend zum neuen Vektor ligiert (Kap. 2.6.5.2).

Analytische Restriktionen wurden in einem Volumen von 10 μl (Tab. 2.8), präparative Ansätze abhängig von der zu verdauenden DNA-Menge bzw. Konzentration der DNA-Lösung in einem entsprechend größeren Volumen bei optimaler Reaktionstemperatur der Enzyme für 3 Stunden oder über Nacht (<16 h) durchgeführt. Es wurden die vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer verwendet. Doppelrestriktionen wurden mit Enzymen des gleichen Herstellers im empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Glycerinkonzentration im Ansatz wurde unter 10 % gehalten. Die zum Einsatz in präparativen Restriktionen notwendige Mindestmenge an Enzym wurde wie folgt errechnet und mindestens ein 10facher Überschuss eingesetzt:

$$\text{Menge Enzym [u/}\mu\text{g DNA]} = \frac{\text{MW}(\lambda)}{\text{MW}(\text{DNA})} \times \frac{\text{Schnitte in DNA}}{\text{Schnitte in } \lambda}$$

mit u = units; MW = Molekulargewicht [kDa]; λ = Phage λ_{DNA} (48,5 kDa) oder ggf. anderem Phagen als Referenz.

Die Vollständigkeit von Restriktionen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. DNA-Fragmente aus präparativen Ansätzen wurden zum Einsatz in Ligationen nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme mit dem PCR Purification Kit (Roche, Mannheim) gereinigt bzw. bestimmte benötigte Fragmente aus einem Agarose-Gel eluiert (Kap. 2.6.7.1).

Tab. 2.8: Analytischer Restriktionsansatz

| Komponente | Menge / Konzentration |
|---------------------------------------|---|
| Plasmid-DNA / PCR-Produkt (gereinigt) | 1 – 8 μl * [\approx 100 ng] |
| Restriktionspuffer (10x) | 1 μl |
| BSA** [1 mg/ml] | 1 μl (100 $\mu\text{g/ml}$) |
| Restriktionsenzym | < 1 μl |
| H ₂ O _{bidest} | ad 10 μl |

* abhängig von der Konzentration der DNA-Lösung

** Bei Enzymen der Fa. New England Biolabs wurde ggf. BSA zugesetzt.

2.6.5.2 Ligation von linearen DNA Fragmenten

Die Ligation von restriktionsverdauter Vektor-DNA und PCR-Produkten mit den gleichen Enden zu einem rekombinanten Plasmid erfolgte mit dem Enzym T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA), das kovalente Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen freier Enden katalysiert. Das kleinere DNA-Insert wurde in 3–5-fachem molarem Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt, wenn möglich wie in Tab. 2.9 angegeben in einem Volumen von 10 µl. Die Ligationen wurden über Nacht bei 16°C oder bei RT für zwei Stunden durchgeführt. Die für die Ligation benötigten DNA-Mengen errechneten sich jeweils nach:

$$m_{\text{DNA}} [\text{ng}] = \text{MW}_{\text{DNA}} [\text{kDa}] \times (\text{einzusetzende}) \text{ DNA-Menge} [\text{pmol}]$$

(mit $\text{MW}_{\text{DNA}} [\text{kDa}] = 660 \times \text{Länge}_{\text{DNA}} [\text{kb}]$).

Tab. 2.9: Standard-Ligationsansatz

| Komponente | Menge / Konzentration |
|------------------------------------|-----------------------|
| großes Fragment (Plasmid-DNA) | 0,07 pmol* |
| kleines Fragment | 0,21 - 0,35 pmol* |
| T4-Ligase-Puffer (+ 10 mM ATP) | 2 µl |
| T4-DNA-Ligase | 1 µl |
| H ₂ O _{bidest} | ad 10 µl |

* Die eingesetzten DNA-Volumina richteten sich nach der Fragmentgröße und Konzentration der DNA-Lösung

2.6.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach (Sanger *et al.* 1977). PCR-Fragmente bzw. Plasmide wurden von den Firmen MWG Biotech AG, (Ebersberg) und GATC (Konstanz) sequenziert. Verwendet wurden nur gereinigte PCR-Fragmente bzw. mithilfe eines Plasmidisolations-Kits (Roche, Mannheim) präparierte Plasmid-DNA. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm GENTle Vers. 1.9.4 bzw. unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

2.6.7 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden in Agarose-Gelen aufgetrennt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Routinemäßig wurde 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer verwendet, ggf. wurde die Agarosekonzentration zur verbesserten Trennung von kleinen Fragmenten erhöht (1,2 %) bzw. von großen Fragmenten erniedrigt (0,8 %).

Bis zu 9 μl der DNA-Lösung wurden mit 1 μl 10x Ladepuffer gemischt, ggf. wurde auf 10 μl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt. Die Proben wurden auf das Gel geladen und anschließend bei einer konstanten Spannung von bis zu 140 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten und Abschätzung der DNA-Menge wurde stets zusätzlich 0,3 μg des DNA-Größenstandards "GeneRuler™ DNA Ladder Mix" (Fermentas, St.Leon-Rot) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5–10 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt, kurz im Entfärbebad ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) gewaschen und die DNA unter UV-Licht bei 365 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

Agarosegel 1% (w/v)

| | | |
|--|--|--------|
| Agarose | | 1 g |
| TBE-Puffer | | 100 ml |
| Aufkochen bis zum vollständigen Auflösen, Lagerung bei 65°C | | |

TBE-Puffer (1x)

| | | |
|--------------------------------------|--------|--------|
| Tris | 50 mM | 6,05 g |
| Borsäure | 50 mM | 3,09 g |
| EDTA | 2,5 mM | 0,93 g |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ | | ad 1L |
| Lagerung bei RT | | |

10x Ladepuffer

| | | |
|--------------------------------------|------------|-------------------|
| Bromphenolblau | 0,25 % | 2,5 mg |
| Xylencyanol, pH 8 | 0,25 % | 2,5 mg |
| Glycerin 86% (v/v) | 50 % (v/v) | 580 μl |
| EDTA [50 mM], pH 8 | 0,25 mM | 5 μl |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ | | ad 1 ml |
| Lagerung bei 4°C | | |

Ethidiumbromidbad

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| EtBr [1,5 mg/ml] | 200 μl |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ | 200 ml |
| dunkel lagern bei RT | |

2.6.7.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde die Färbung im Ethidiumbromid-Bad auf zwei Minuten verkürzt. Die DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell bei unter UV-Licht von reduzierter Intensität ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Elution von den Minisäulen wurde meist mit 30 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ($\approx 70^\circ\text{C}$) nach einminütiger Einwirkzeit vorgenommen.

2.7 Arbeiten mit Proteinen

2.7.1 RoxA-Aktivitätstest

Tests auf Latex spaltende Aktivität basierten auf der Detektion des primären Abbauproduktes der RoxA vermittelten Latexspaltung (ODTD) mittels HPLC.

Sie wurden in der Regel in 100 mM Bis-Tris-Puffer (pH 7,0) bzw. auch 100 mM KP-Puffer (pH 7,0) und mit einer Endkonzentration von 0,2 % Latex (aus Stammsuspension ca. 5–20 %, abhängig von der Charge) mit einer Inkubationszeit von mindestens drei Stunden oder aber über Nacht (ca. 14 h) bei 40°C (bzw. 37°C) durchgeführt. Es wurden ca. 2–4 µg RoxA/ml eingesetzt, um im linearen Bereich der ODTD-Zunahme zu bleiben. Als Reaktionsgefäße wurden gewöhnlich mit Parafilm bzw. Alufolie verschlossene Reagenzgläser verwendet. Um eine mögliche Verdunstung auszuschließen, eigneten sich auch 15 ml-Falcon-Röhrchen mit Schraubdeckel-Verschluss.

Für Inhibitor-Testreihen wurde ein Mastermix (Puffer + Latex + RoxA) verwendet, der auf Eis gehalten wurde bis zur abschließenden Zugabe des entsprechenden Inhibitors in den jeweiligen Ansatz. Zum Feststellen der Aktivität des unkonzentrierten *Xanthomonas*-Kulturüberstandes wurden 100 µl des Überstandes eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym (H₂O + Latex), sowie eine hitzeinaktivierte RoxA-Probe (95°C, 10 min). Nach der Inkubation wurden die Testansätze mit 1,5 ml Ethylacetat versetzt und ausgeschüttelt. Von der Ethylacetatphase (Oberphase) wurde 1 ml in ein sauberes 2 ml Eppi überführt. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff abgedampft und der weißlich bis gelbliche Rückstand in 100 µl Methanol aufgenommen. Die Lösung wurde in HPLC-Inlets überführt und in der Regel 20 µl mit einer Lichrospher RP-8-Säule (Trentec Gerlingen, Partikelgröße 5 µm, Länge 12 cm, Ø 4 mm) durch HPLC (Agilent 1100-Series, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Dazu diente ein MeOH-Gradient von 50 % bis 100 % über 20 min bei einer Flussrate von 0,7 ml/min. Die Elution des Hauptspaltproduktes ODTD erfolgte um 15,3 min (Abb. 2.1). Verschiedene Aktivitätstests konnten bei gleicher Dauer der vorhergehenden Inkubation über die ODTD-Peakfläche verglichen werden.

| | | |
|----------------|----------------------------------|---------------|
| <u>Ansatz:</u> | RoxA | ca. 2–4 µg/ml |
| | Latex | 0,2 % (w/v) |
| | Bis-Tris-Puffer (100 mM, pH 7,0) | ad 1 ml |
| | → Inkubation bei 40°C, ≥3 h | |
| | → HPLC: Programm "ODTD kurz" | |

Zur Herstellung größerer ODTD-Mengen wurden 10–15 ml-Ansätze in 50 ml-Falcon-Röhrchen mit 0,5 % Latex und einer RoxA-Konzentration von 20 µg/ml für mehrere Tage meist bei 30°C durchgeführt. ODTD selbst besitzt eine gelbe Farbe und eine ölige Konsistenz. ODTD ließ sich in hohen Konzentrationen in Methanol nicht mehr vollständig lösen. Zur Aufnahme höherer ODTD-Konzentrationen eigneten sich länger-kettige Alkohole besser.

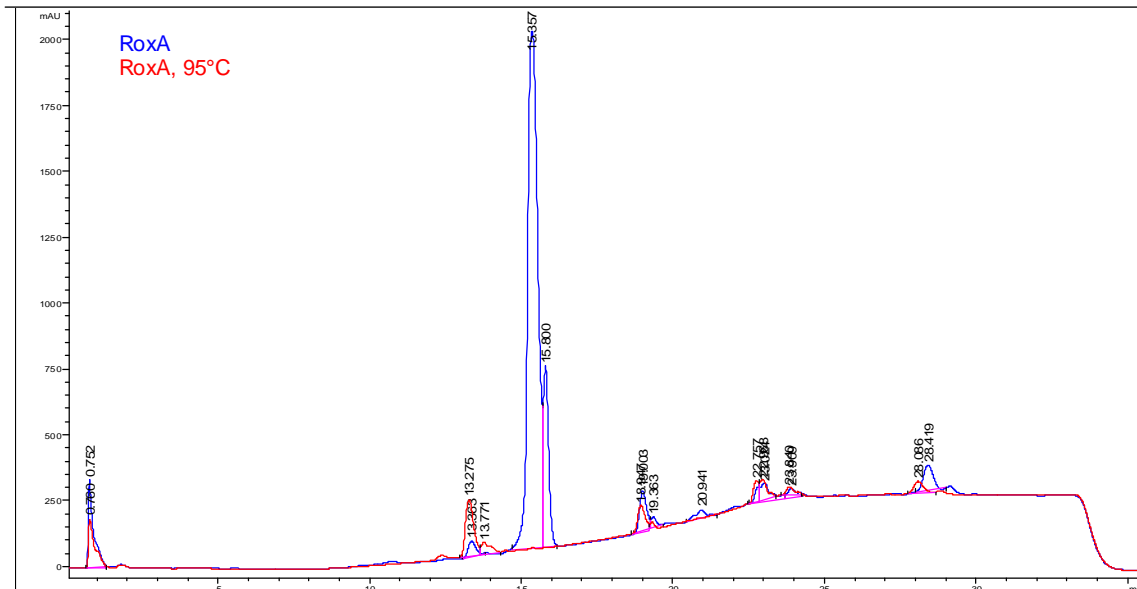


Abb. 2.1: HPLC-Chromatogramm mit einer RP-8-Säule (Gradient 50% - 100% Methanol; Flussrate 0,7 ml/min.) mit konzentriertem *Xanthomonas*-Kulturüberstand (blau) im Vergleich zur gleichen Probe hitzeinaktiviert (95°C, 10 min) (rot). Der deutliche Peak bei 15,3 min ist dem Latex-Spaltprodukt ODTD zuzuordnen und fehlt nach Hitzeinaktivierung. Der leichte Grundanstieg der Absorption ist auf die höhere Absorption von Methanol gegenüber Wasser mit steigendem Gradienten zurückzuführen. Ein Peak bei 15,8 min trat beim Auftragen hoher Spaltprodukt-Konzentrationen auf, könnte auf geringere Mengen des zu ODTD eine Isopreneinheit größeren Spaltproduktes hinweisen.

2.7.2 Peroxidase-Tests

Verschiedene Variationen von Peroxidase-Assays sind dokumentiert. Sie alle basieren auf der Bereitstellung von Wasserstoffperoxid und einem Elektronendonator als Substrat, dessen Oxidation durch die Peroxidase aufgrund der dadurch veränderten Absorptionseigenschaften photometrisch detektierbar ist. Die verschiedenen Tests unterscheiden sich im Wesentlichen in der Wahl des Substrates, welches für eine Peroxidase im Einzelfall sehr spezifisch sein kann. Gängige Testverfahren nutzen aromatische Phenole als Elektronendonoren wie Pyrogallol, Guaiacol (Bergmeyer, 1994), 4-Aminoantipyren/2,4-Dichlorphenol (Mason *et al.*, 2001) und ABTS. Dabei wird die Absorptionzunahme des Elektronendonors nach dessen Oxidation bei einer für das jeweilige Substrat spezifischen Wellenlänge gemessen. Ein Test mit reduziertem Cytochrom *c* als Elektronendonator beruht auf der Abnahme der α -Bande der

Hämgruppe bei 550 nm im Spektrum durch Oxidation von Ferrocyclochrom *c* (z. B. Gilmour *et al.*, 1994; McGinnity *et al.*, 1996). Als Kontrollen diente stets Meerrettich-Peroxidase (HRP).

Die Messungen wurden in 1 ml Plastik-Küvetten durchgeführt. Die Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt, die Peroxidase erst unmittelbar vor Beginn der Messung zugegeben. Waren keine Unit-Angaben der Enzyme bekannt, musste eine geeignete Konzentration ermittelt werden, ausgehend von derjenigen für die Positivkontrolle HRP. Die Enzymkonzentration im Test konnte in Abhängigkeit vom zu testenden Enzym um Größenordnungen höher liegen. Für die Negativkontrolle (blank) wurde die Peroxidaselösung durch Puffer ersetzt. Es wurden in der Regel auch Kontrollansätze mit Enzym, aber ohne H_2O_2 gemessen. Die Absorptionszu- bzw. -abnahme wurde für 5–10 Minuten bei der jeweils angegebenen Wellenlänge verfolgt.

2.7.2.1 Peroxidase-Assay mit Pyrogallol

Die Oxidation von Pyrogallol zu Purpurogallin (Abb. 2.2) wurde bei 420 nm verfolgt.

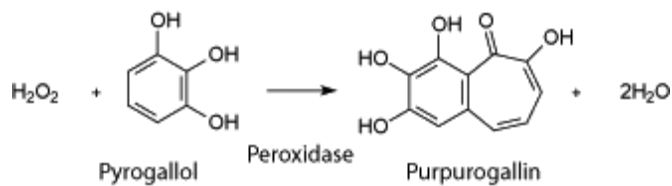


Abb. 2.2: Peroxidase-Reaktion mit Pyrogallol als Elektronendonator.

| | | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------|
| <u>Ansatz (1 ml):</u> | $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | 700 μl |
| | KP-Puffer | 107 μl |
| | Pyrogallol-Lösung | 107 μl |
| | H_2O_2 -Lösung | 53 μl |
| | Peroxidase-Lösung | 33 μl |

KP-Puffer 100 mM, pH 6,0 (mit KOH einstellen)

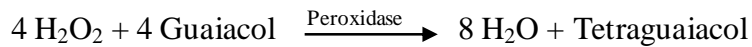
H_2O_2 -Lösung 0,5 % (w/w) [aus Stock 30 % (w/w)]

Pyrogallol 5 % (w/v), frisch ansetzen und vor Licht schützen

Peroxidase-Lösung ca. 0,5 U/ml in KP-Puffer (4°C), [HRP: ≥ 10 ng/ml]

2.7.2.2 Peroxidase-Assay mit Guaiacol

Die Messung der Umsetzung von Guaiacol zu Tetraguaiacol erfolgte bei 436 nm.



| | | |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------|
| <u>Ansatz (1 ml):</u> | KP-Puffer | 930 μl |
| | Guaiacol-Lösung | 19 μl |
| | H ₂ O ₂ -Lösung | 19 μl |
| | Peroxidase-Lösung | 33 μl |

K⁺-Phosphat-Puffer 100 mM, pH 7,0

H₂O₂-Lösung 0,33 % (w/w) (ca. 87 mM) [aus Stock 30 % (w/w)]

Guaiacol 18 mM (frisch ansetzen und kühl halten)

Peroxidase-Lösung ca. 0,2 U/ml in KP-Puffer (4°C)

2.7.2.3 Peroxidase-Assay mit 4-Aminoantipyren/2,4-Dichlorphenol

Es erfolgt die spektroskopisch detektierbare Bildung einer Schiff-Base aus der Reaktion von 4-Aminoantipyren mit oxidiertem 2,4-Dichlorphenol. Die Messung erfolgte bei 510 nm.

| | | |
|----------------------|--|-------------------|
| <u>Ansatz (1ml):</u> | KP-Puffer | 780 μl |
| | 4-Aminoantipyren (3,2 mM) | 100 μl |
| | 2,4-Dichlorphenol (5 mM) | 100 μl |
| | H ₂ O ₂ -Lösung (1 mM) | 10 μl |
| | Peroxidase-Lösung | 10 μl |

KP-Puffer 100 mM, pH 7,0

4-Aminoantipyren (10x) 32 mM

2,4-Dichlorphenol (10x) 50 mM

H₂O₂-Lösung 1 mM [aus Stock 30% (w/w)]

Peroxidase-Lösung ca. 0,2 U/ml in KP-Puffer (4°C)

2.7.2.4 Peroxidase-Assay mit Ferrocytochrom *c*

Gemessen wird die Abnahme der Absorption von reduziertem Cytochrom *c* (Ferrocytochrom *c*) bei 550 nm nach Oxidation über die Peroxidase-Reaktion. Dabei war die Abnahme stets mit der Negativkontrolle ohne Enzym abzugleichen, da durch die Eigenschaft des anwesenden H₂O₂ als starkes Oxidans alleine bereits eine Absorptionsabnahme eintrat, die jedoch deutlich schwächer sein sollte als diejenige mit Peroxidase. Bei höheren als der eingesetzten H₂O₂-Konzentration erfolgte die Oxidation bereits ohne Enzym sehr schnell und eine Peroxidase-Reaktion war im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr als solche zu erkennen. Cytochrom *c* liegt häufig zum großem Teil in seiner oxidierten Form vor und muss daher vor Einsatz im Assay reduziert werden. Es erwies sich als geeignet, die konzentrierte Cytochrom-Lösung kurz vor der Messung mit 1/10 Vol. Na⁺-Dithionit [1 M] zu versetzen. Dies störte den Assay nicht und die Rückoxidation erfolgte nur langsam.

| | | | |
|----------------------|---------------------------------------|---------|--------|
| <u>Ansatz (1ml):</u> | H ₂ O _{dest} | | 835 µl |
| | HEPES-Puffer | (5 mM) | 50 µl |
| | CaCl ₂ | (1 mM) | 10 µl |
| | NaCl (Saline) | (10 mM) | 67 µl |
| | Cytochrom <i>c</i> | (7 µM) | 10 µl |
| | H ₂ O ₂ -Lösung | (18 µM) | 18 µl |
| | Peroxidase-Lösung | | 10 µl |

HEPES-Puffer 50 mM

CaCl₂ 100 mM

NaCl (Saline) 150 mM

Cytochrom *c* 700 µM

H₂O₂-Lösung 1 mM [aus Stock 30 % (w/w)]

Peroxidase-Lösung ≥ 100 nM in KP-Puffer (4°C)

2.7.3 Proteinbestimmung

2.7.3.1 Bradford-Test (Bradford, 1976)

In eine 1 ml-Einweg-Küvette wurden zu 100 µl Probe 900 µl Bradford-Reagenz pipettiert. Als Kontrolle dienten 100 µl dest. Wasser (Nullwert). Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 10–15 Minuten inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gemessen. Für die Kalibriergerade (Abb. 2.10) wurde stets die gleiche Zeitspanne gewählt wie für die zu

messenden Proben. Die 100 µl Proben enthielten je nach Standard zwischen 0,5 und 20 µg Protein, wobei die Gerade bis ca. 8 µg Protein einen linearen Verlauf zeigte. Nach mindestens 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur, wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert (Reagenz + Wasser) gemessen. Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Bradford-Reagenz

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Coomassie Brilliant Blue G 250 | 100 mg |
| Ethanol (96 %) | 50 ml |
| H ₃ PO ₄ (85 %) | 100 ml |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000 ml |

Die Lösung wurde vor Gebrauch über Faltenfilter von Präzipitat getrennt und dunkel gelagert.

Stammlösung Rinderserumalbumin (BSA)

2 mg/ml (w/v) herstellen (in H₂O_{dest})

Lösung für den Testansatz mit H₂O_{dest} auf 200 µg/ml verdünnen

Testansatz: 900 µl Reagenz
 100 µl Probe

Tab. 2.10: Zusammensetzung der BSA-Proteinstandards pro 1 ml-Ansatz für die Kalibriergerade

| H ₂ O [µl] | BSA-Stammlösung [200 mg/ml] | µg Protein /ml Testansatz |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 0 | 100 | 20 |
| 50 | 50 | 10 |
| 60 | 40 | 8 |
| 70 | 30 | 6 |
| 80 | 20 | 4 |
| 90 | 10 | 2 |
| 95 | 5 | 1 |
| 97,5 | 2,5 | 0,5 |

2.7.3.2 Bicinchoninsäure-Test (BCA-Assay)

War eine exakte Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erforderlich, beispielsweise für CD-spektroskopische Messungen, wurde ein BCA-Assay mit dem "Pierce[®] BCA Protein Assay Kit" (Thermo Scientific, Schwerte) durchgeführt. Es wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen, jedoch wurden die Angabe auf einen halben Ansatz

(1 ml Endvolumen) umgerechnet. Die Kalibriergerade wurde mit BSA [Testampulle 2 mg/ml] aus Konzentrationen von 0–1,5 mg/ml wie folgt erstellt (Tab. 2.11):

Tab. 2.11: Zusammensetzung der BSA-Proteinstandard-Ausgangslösungen für die Kalibriergerade

| Nr. | H ₂ O [μl] | BSA-Stammlösung (2 mg/ml) [μl] | μg Protein/ml |
|-----|-----------------------|--------------------------------|---------------|
| A | 125 | 375 | 1500 |
| B | 325 | 325 | 1000 |
| C | 175 | 175 aus A | 750 |
| D | 325 | 325 aus B | 500 |
| E | 325 | 325 aus D | 250 |
| F | 325 | 325 aus E | 125 |
| G | 400 | 100 aus F | 25 |
| H | 400 | 0 | 0 |

Die BCA-Lösung wurde im Verhältnis 50 : 1 aus Reagenz A (enthält Na⁺-Carbonat, Na⁺-Bicarbonat, Bicinchoninsäure, Na⁺-Tartrat in 0,1 M NaOH) und Reagenz B (4 % (w/v) CuSO₄) frisch hergestellt. 50 μl der zu untersuchenden Probe bzw. des Standards wurden mit 950 μl BCA-Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt und 30–40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden in 1x-Küvetten überführt und die Absorption gegen einen Leerwert (50 μl H₂O_{dest} statt Probe) bei 562 nm bestimmt. Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Testansatz: 950 μl Reagenz
 50 μl Probe

2.7.3.3 Proteinbestimmung von RoxA

Die spezifische RoxA-Konzentration einer Probe ließ sich zusätzlich anhand des Lambert-Beer-Gesetzes mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bei 406 nm ($\epsilon_{406} = 1,8 \times 10^5 \text{ M}_{\text{RoxA}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Braaz *et al.*, 2004) durch Messung der Absorption gegen einen Leerwert in Quarzküvetten bestimmen:

$$E_{406} = c \cdot d \cdot \epsilon_{406} \quad \leftrightarrow \quad c = E_{406} / d \cdot \epsilon_{406} \quad \rightarrow \quad c [\text{mg/ml}] = E_{406} / 1[\text{cm}] \cdot 1,8 \times 10^5 \text{ M}_{\text{RoxA}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

mit E_{406} : Absorption bei 406 nm; c : Konzentration; d : Schichtdicke der Küvette = 1 cm.

Daraus ergibt sich für $M_{\text{RoxA}} = 71.500 \text{ g/L} = 71.500 \text{ mg/ml}$:

$$c [\text{mg/ml}] = E_{406} \cdot 71.500 [\text{mg/ml}] / 1,8 \times 10^5$$

Die erhaltenen Werte waren umso verlässlicher je weniger Verunreinigungen die Proben enthielten. Diese Methode wurde routinemäßig bei RoxA-Reinigungen zur Ermittlung der Gesamtausbeute und Konzentration des RoxA-Pools angewandt. Bereits eine Abschätzung aus dem Kulturüberstand war nach Abzug einer Baseline möglich.

Mit sehr sauberem RoxA nach Hydroxyapatit-Chromatographie konnte in entsprechender Weise zudem eine genaue Bestimmung der RoxA-Menge durch Kalkulation über den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ($\epsilon_{406} = 1,53 \times 10^5 \text{ M}_{\text{RoxA}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) erfolgen, welcher sich aus der Aminosäurezusammensetzung von RoxA ergibt. Die so erhaltenen Werte stimmten gut mit denen aus dem BCA-Assay überein. Analog zu ϵ_{406} wurde wie folgt berechnet:

$$c \text{ [mg/ml]} = E_{280} \cdot 71.500 \text{ [mg/ml]} / 1,53 \times 10^5.$$

2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach (Laemmli 1970) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Minigele wurden in Minigelkammern (Biorad, München) hergestellt. Es wurde ein 4,5 %iges Sammelgel und in der Regel ein 12 %iges Trenngel verwendet. X μl der zu aufzutragenden Probe wurden mit x/2 μl 3x-Ladepuffer versetzt und max. 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Da RoxA einen hitzeabhängiger Zerfall in definierte Fragmente zeigte, wurden RoxA enthaltende Proben max. 1 min bei 95°C gehalten.

Für ein Gel mit einem Durchmesser von 1 mm wurden für eine anschließende Coomassiefärbung ca. 20 μg Protein, für die sensitivere Silberfärbung ca. 2–5 μg aufgetragen. Von unkonzentrierten *Xanthomonas*-Kulturüberständen wurde meist das maximale Taschenvolumen (ca. 25 μl) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel. Als Größenmarker wurde der Precision Plus Proteinstandard All Blue (Biorad, München) verwendet.

| | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------|-----------|
| <u>3x Denaturierungspuffer</u> | SDS | [10 % (w/v)] | 30 ml |
| | Glycerin | [86 % (v/v)] | 15 ml |
| | 2-Mercaptoethanol | [10 % (v/v)] | 5 ml |
| | Bromphenolblau | | ca. 75 mg |
| | H ₂ O _{bidest} | | ad 50 ml |

Für die Hämefärbung wurde Denaturierungspuffer ohne 2-Mercaptoethanol verwendet.

Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

| | | |
|--|--|---|
| <u>SDS-Lösung</u> | 10 % (w/v) in H ₂ O | |
| <u>APS-Lösung</u> | 40 % (w/v) in H ₂ O | Lagerung bei 4°C oder aliquotiert bei -20°C |
| <u>Gel 30</u> | 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1 | |
| <u>Trenngel (12 % (w/v) (für ca. 2 Gele)</u> | Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid) | 3,4 ml |
| | Trenngelpuffer | 2,5 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | 4 ml |
| | SDS-Lösung [10 % (w/v)] | 100 µl |
| | APS-Lösung [40 % (w/v)] | 25 µl |
| | TEMED | 5 µl |
| <u>Sammelgel (für ca. 2 Gele)</u> | Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid) | 0,65 ml |
| | Sammelgelpuffer | 1,25 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | 3,05 ml |
| | SDS-Lösung [10 % (w/v)] | 50 µl |
| | APS-Lösung [40 % (w/v)] | 12,5 µl |
| | TEMED | 5 µl |
| <u>Laufpuffer</u> | Tris | 12,1 g |
| | Glycin | 7,5 g |
| | SDS | 1 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1 L |
| | Lagerung bei 4°C | |

2.7.4.1 Coomassie-Färbung

Zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen im SDS-Gel wurde u. a. die Coomassie-Färbung verwendet. Die Gele wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, anschließend für etwa 2 x 30 Minuten mit 20 % Essigsäure entfärbt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren und abschließend mit Wasser gewaschen.

| | | |
|-----------------------|--|-------------|
| <u>Färbelösung</u> | Isopropanol | 40 % (v/v) |
| | Essigsäure | 10 % (v/v) |
| | Coomassie R250 | 0,1 % (w/v) |
| | Lösung vor Gebrauch durch Faltenfilter geben | |
| <u>Entfärbelösung</u> | Essigsäure | 20 % (v/v) |

2.7.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist neben der Coomassie-Färbung eine weitere Methode zur unspezifischen Gesamtproteinfärbung, doch zeichnet sie sich durch ihre erhöhte Sensitivität aus. Es wurde ein nach (Blum *et al.*, 1987) modifiziertes, vereinfachtes Protokoll verwendet, welches innerhalb von 40 Minuten das Ergebnis liefern konnte. Mit Silberfärbung können Proteinmengen ab 1–10 ng nachgewiesen werden.

Durchführung:

1. Gel mit H₂O_{dest} waschen, für 10 min in Fixierlösung schwenken (auch über Nacht)
2. 2x Waschen in H₂O_{dest} (jeweils mind. 5 min)
3. Gel für 1 min in Na⁺-Thiosulfat-Lösung inkubieren
2x kurz mit H₂O_{dest} waschen (ca. 20 sec.)
4. Gel für 10 min in Silbernitratlösung inkubieren, zweimal kurz mit H₂O_{dest} spülen
5. Gel in Entwicklerlösung inkubieren solange bis zur gewünschten Intensität.
6. Entwickler abgießen und sofort mit einer kleinen Menge der Stopplösung waschen, dann für mind. 10 min in Stopplösung inkubieren.

| | | |
|-----------------------------|---|--------------|
| <u>Fixierlösung</u> | Methanol | 40 % (v/v) |
| | Formalin | 13,5 % (v/v) |
| | Filtration durch Faltenfilter (Abzug) | |
| <u>Na-Thiosulfat-Lösung</u> | Na ₂ S ₂ O ₄ | 0,02 % (w/v) |
| <u>Silbernitrat</u> | AgNO ₃ | 0,1 % (w/v) |
| <u>Entwicklerlösung</u> | Na-Carbonat | 3 % (w/v) |
| | Formalin | 0,05 % (v/v) |
| | Na ₂ S ₂ O ₄ [0,02%] | 0,000016 % |
| <u>Stopplösung</u> | Na ⁺ -EDTA | 50 mM |

2.7.4.3 Hämefärbung

Die Hämefärbung diente zur spezifischen Anfärbung von Proteinen mit Hämgruppen. Dazu wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer ohne β-Mercaptoethanol versetzt, um beim Denaturieren ein Herauslösen der Hämgruppen durch Lösen der Thioetherbindungen zu vermeiden. Zu langes Abkochen (95°C) der Proben konnte gelegentlich zu einem Auftreten zusätzlicher, kleinerer Hämbanden führen.

Die Gele wurden zunächst mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und anschließend mit Na-Acetat-Lösung und TMBZ-Lösung (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin) im Verhältnis von 70 : 30 versetzt und im Dunkeln für mindestens 30 Minuten inkubiert. Danach wurde H_2O_2 aus konzentrierter Stammlösung (30 % (v/v)) zugegeben und für bis zu 30 min weiter inkubiert. Nach wenigen Minuten, spätestens aber nach einer halben Stunde sollten die ersten Banden erscheinen. Längere Inkubation hatte keine nennenswerte Steigerung der Bandenintensität zur Folge.

TMBZ-Lösung : TMBZ (Tetramethylbenzidin) [1,25 mM] 30 % (v/v)

Das TMBZ wurde in wenigen Millilitern Methanol gelöst und auf 1,25 mM mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt. Da TMBZ stark lichtempfindlich ist, wurde die Lösung stets frisch angesetzt und nur für wenige Tage bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Natrium-Acetatlösung : Natrium-Acetat [250 mM, pH 5,0] 70 % (v/v)

H_2O_2 -Lösung : H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) [30 % (v/v) Stammlösung] 26 mM

2.7.5 Western-Blot und Immunfärbung

Der spezifische Nachweis von RoxA konnte nach SDS-PAGE mit Western Blot und anschließender Immunfärbung erfolgen. Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden auf einer Nitrocellulosemembran (PVDF) fixiert. Der Western Blot wurde in einer "Mini Trans-Blot®" Kammer (BioRad, München) durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde wenige Sekunden in Methanol, eine Minute in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 30 Minuten in Blotting-Puffer vorbehandelt.

Das SDS-Gel wurde für 15–30 Minuten in Blotting-Puffer inkubiert. Geblottet wurde 90 Minuten bei 100 Volt mit der Kammer in Eiswasser. Zur anschließenden Immunfärbung wurde die Membran zweimal 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen und für eine Stunde in Blocking-Puffer inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:5000) erfolgte über Nacht mit 3 μl polyklonalem RoxA-Antikörperserum. Viermal für je 15 Minuten wurde mit 20 ml TTBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 0,5 μl des Sekundärantikörpers (Anti-mouse, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) (1:50.000) für eine Stunde. Daraufhin wurde nochmals viermal mit TTBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde in 20 ml Detect-Puffer überführt und 40 μl NBT-Lösung, sowie 33 μl BCIP-Lösung zugegeben. BCIP dient der alkalischen Phosphatase als Substrat und reagiert mit NBT am gebundenen Antikörper sichtbar durch eine Farbveränderung. Nach bis zu 30 Minuten wurde die Membran zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet.

| | | | |
|------------------------|---|-----------|-----------------------------------|
| <u>Blotting-Puffer</u> | Tris | 3,03 g | |
| | Glycin | 14,4 g | |
| | MeOH | 200 ml | |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1 L | |
| <u>TBS-Puffer</u> | Tris | 12,1 g | |
| | NaCl | 8,8 g | |
| | HCl | pH 7,5 | |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1 L | |
| <u>TTBS-Puffer</u> | Tween 20 | 1 ml | |
| | TBS | ad 1 L | |
| <u>Blocking-Puffer</u> | TBS | 100 ml | |
| | Tween 20 | 0,5 ml | |
| | Magermilchpulver | 5 g | |
| | Lagerung bei 4°C, Magermilchpulver frisch zugeben | | |
| <u>Detect-Puffer</u> | Tris | 12,1 g | |
| | NaCl | 5,8 g | |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 1,02 g | |
| | HCl | pH 9,0 | |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1 L | |
| | Lagerung bei 4°C | | |
| <u>NBT-Lösung</u> | NBT | 100 mg/ml | in 70 % DMF (Dimethylformamid) |
| | Lagerung lichtgeschützt bei -20°C | | |
| <u>BCIP-Lösung</u> | BCIP | 50 mg/ml | in 70 % DMF |
| | Lagerung lichtgeschützt bei -20°C | | |

2.7.6 2-D-Gelelektrophorese

Diese Methode trennt Proteine anhand zweier verschiedener Eigenschaften in zwei Dimensionen auf. Im ersten Schritt werden durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF) Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI), im zweiten Schritt entsprechend ihres Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Eine 2-D-Gelelektrophorese wurde mit gereinigtem RoxA, sowie der löslichen Fraktion eines *Xanthomonas*-Zellaufschlusses durchgeführt. Dazu wurde ein eingefrorenes Zellpellet in HEPES (100 mM, pH 7,5) gewaschen und im gleichen Puffer mit Ultraschall (3

x 20 sec.) aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 min (4°C) in Eppendorf-Cups wurde der lösliche Überstand abgenommen. Zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes von RoxA wurde eine konzentrierte gereinigte RoxA-Präparation in Bis-Tris-Puffer (100 mM, pH 7) verwendet. Eine geeignete Menge der zu untersuchenden Proteinprobe, bei der Verwendung von 7 cm-IPG-Streifen etwa 50 µg auf 65 µl, wurden mit Lysepuffer für die IEF gemischt, wobei das Volumen der Probe max. 5 % des Gesamtvolumens ausmachte. Nun wurde gleiches Volumen an Rehydratisierungslösung zugegeben und der 130 µl-Ansatz für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 Minuten (RT). Die Probe wurde über die gesamte Länge der Vertiefung in der Mitte eines entsprechenden IPG-Streifen-Halters pipettiert und darauf ein Immobiline Dry Strip (pH 3–10 NL, 7 cm) nach Entfernung der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Dieser wurde mit 1 ml Mineralöl überschichtet und über Nacht (ca. 16 h) rehydratisiert.

| | | |
|--------------------------------|---|-------------|
| <u>Lysepuffer für IEF</u> | Tris | 40 mM |
| | Harnstoff | 8 M |
| | CHAPS | 4 % (w/v) |
| | (Lagerung bei 4°C) | |
| | DTT | 65 mM |
| | (frisch zugeben) | |
| <u>Rehydratisierungslösung</u> | Harnstoff | 7 M |
| | Thioharnstoff | 2 M |
| | CHAPS | 2 % (w/v) |
| | Bromphenolblau | ca. 0,002 % |
| | (Lagerung in 0,5 ml Aliquots bei -20°C) | |
| | DTT | 10 mM |
| | frisch zugeben | |
| Pharmalyte pH 3-10 | 2 % (v/v) | |

2.7.6.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF beruht auf der Einstellung eines von der Anode zur Kathode ansteigenden pH-Gradienten mithilfe eines Ampholyt-Gemisches. Die Proteine wandern im Gradienten bis zum Erreichen des ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH Wertes, bei welchem ihre Nettoladung Null beträgt.

Die vorbereiteten IPG-Streifen wurden nach Entfernung des Mineralöls mit der Gelseite nach oben in eine vorgekühlte Rotofor™ IEF Kammer (BioRad, München)

überführt. Elektroden-Streifen wurden passend zurecht geschnitten und auf einer sauberen Glasplatte mit 0,5 ml H₂O_{bidest} befeuchtet, anschließend auf Whatman-Papier von Flüssigkeit befreit. Sie wurden nun an den IPG-Streifen mit Kontakt zum Gel angelegt, anschließend die Elektroden auf der Oberseite der Elektroden-Streifen angebracht. Die Fokussierung im elektrischen Feld wurde mit folgendem Programm bei konstanter Leistung [W] durchgeführt (Gradient Modus):

| | | | |
|---------|--------|------|---------|
| 200 V | 10 mA | 5 W | 1 min |
| ≈3500 V | ≈30 mA | 25 W | 210 min |

2.7.6.2 SDS-Gelelektrophorese

Nach der IEF wurde der IPG-Streifen in 7 M SDS-Äquilibrationpuffer mit DTT (2 %) in einem 15 ml Falcon-Röhrchen für 15 Minuten inkubiert, für weitere 15 Minuten in Äquilibrationpuffer mit IAA (2,5 %). Ein SDS-Gel (12 %) wurde ohne Sammelgel vorbereitet und der äquilibrierte IPG-Streifen luftblasenfrei oben aufgesetzt und mit 0,5 % Agarose fixiert. Zusätzlich wurde eine Markertasche installiert. Die SDS-PAGE wurde anschließend wie unter 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Es wurden 6 µl Proteinstandard All Blue (Biorad, München) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für ca. 90 Minuten durchgeführt.

| | | |
|--------------------------------|--------------------|-------------|
| <u>SDS-Äquilibrationpuffer</u> | SDS | 4 % (w/v) |
| | Tris | 50 mM |
| | Harnstoff | 6 M |
| | Glycerin | 30 % (v/v) |
| | Bromphenolblau | ca. 0,002 % |
| | HCl | pH 8,8 |
| | Lagerung bei -20°C | |
| <u>DTT (Dithiothreitol)</u> | DTT | 2 % (v/v) |
| <u>IAA (Iodacetamid)</u> | IAA | 2,5 % (v/v) |

2.7.7 Konzentrierung von Proteinen mit Ultrafiltration

Größere Volumina von *Xanthomonas*-Kulturüberständen wurden mit einer KwickLab-Ultrafiltrationsanlage (Amersham Biosciences, Freiburg) durch Druckfiltration mit einer integrierten Peristaltikpumpe (505U; Watson Marlow, Rommerskirchen) über bis zu vier Filterkassetten mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa bis zum Totvolumen der Anlage von

ca. 250 ml aufkonzentriert. Eine Rückwärtsspülung mit 50–100 ml H₂O_{dest} oder Laufpuffer für eine anschließende Chromatographie minderte den Verlust durch Oberflächenadhäsion. Eine stärkere Konzentrierung von Kulturüberständen oder Fraktionen aus der chromatographischen Reinigung erfolgte mit Amicon[®]-Ultrafiltrationszellen (350 ml, 50 ml oder 10 ml, Fa. Millipore GmbH, Schwalbach) über Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa (YM30, Millipore) bei 1–2 bar N₂-Gas und langsamem Rühren auf Eis. Vor dem Einengen gereinigter RoxA-Fraktionen und höherer RoxA-Konzentrationen (>1 mg/ml) wurde ca. 300 mM NaCl zur Prävention einer Präzipitation zugegeben.

2.8 Kultivierung von *Xanthomonas* sp. 35 Y

2.8.1 Kultivierung von *Xanthomonas* sp. in Latexkultur

Die Kultivierung von *Xanthomonas* sp. 35Y erfolgte in 650 ml Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) in Mineralmedium nach Tsuchii & Takeda (1990) mit in der Regel 0,05 % Hefeextrakt und einer Latexkonzentrationen zwischen 0,02–0,1 %. Die Kultivierungsdauer betrug neun bis 14 Tage in Abhängigkeit von der verwendeten Latex und deren Konzentration. Zur Steigerung der RoxA-Ausbeute wurden weitere Kultivierungen in Minimalmedium mit zusätzlich 0,2 % Gluconat statt Hefeextrakt durchgeführt. Vorkulturen wurden in NB- oder LB-Medium angezogen und Expressionskulturen in Minimalmedium mit 1/10 – 1/20 der Vorkultur angeimpft. Zellkulturflaschen, welche jeweils 100 ml Kultur enthielten, wurden liegend bei 30°C gehalten und 1–2x täglich manuell geschüttelt. Dies sollte ein vorzeitige Verklumpen der Latex verhindern. Der Gasaustausch in Zellkulturflaschen wurde über gasdurchlässige Schraubdeckel ermöglicht.

2.8.2 Kultivierung von *Xanthomonas* sp. p4781.1::*roxA* in Vollmedium

Die Expression von RoxA erfolgte in 2 L, 3 L oder 5 L -Schüttelkolben mit je einem Fünftel Volumen NB- oder LB-Medium und 0,1 % Rhamnose bei 30 °C für ca. 40–65 Stunden. Zumeist wurde die Kultivierung in LB-Medium oder LB mit NB statt Hefeextrakt vorgenommen, da dort die höchsten Zelldichten von etwa OD₆₀₀=5, in 0,5 L- und 1 L-Kolben um OD₆₀₀=7 erreicht wurden. Weitere Kultivierungen erfolgten in modifizierten LB-Medien (LB_{mod}) mit reduziertem Anteil an Hefeextrakt (0,25 g/L). Expressionskulturen wurden mit 1/20 – 1/40 Volumen von Vorkulturen in gleichem Medium angeimpft. Die Zugabe von Rhamnose erfolgte entweder sofort beim Animpfen oder zu einem späteren Zeitpunkt bei höherer OD₆₀₀ (s. Kap. 3.2.3).

2.9 Reinigung von RoxA

2.9.1 Aufarbeitung des Kulturüberstandes

Xanthomonas-Kulturen bei 4°C für 30 Minuten bei Vollmedium und 45 Minuten bei Latexmedien zentrifugiert wurden (JA-10-Rotor, Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld). Der zellfreie Kulturüberstand aus Latexkulturen wurde anschließend zunächst durch Faltenfilter, dann durch Feinfiltrierung (0,45 µm) von Latex-Resten entfernt. Dazu wurde der Überstand über 0,45 µm-Filter (Millipore GmbH, Schwalbach) abgenutscht oder vorzugsweise mittels Druckfiltration durch Sartroban 300 Filterkassetten (Sartorius, Göttingen) mit doppelter Filtermembran (0,45 + 0,2 µm) mit einer Peristaltikpumpe gereinigt.

Der von Zellen bzw. Latexresten befreite *Xanthomonas*-Kulturüberstand wurde durch Ultrafiltration eingengt. Größere Volumina wurden mit einer KwickLab-Ultrafiltrationsanlage auf etwa 300–400 ml aufkonzentriert (Kap. 2.77). Insbesondere bei Kulturen aus Minimalmedium wurde eine weitere Konzentrierung mit Amicon-Ultrafiltrationszellen über Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa durchgeführt. Abschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation zur Abtrennung von ausgefallenem Protein (Beckmann, JA-10, 8000 rpm, 20–25 min) bei 4°C und ggf. eine Filtrierung durch 1x-Sterilfilter (0,45 µm, Millipore GmbH, Schwalbach).

2.9.2 FPLC (*Fast Performance Liquid Chromotography*)

Chromatographische RoxA-Reinigungen aus dem konzentrierten *Xanthomonas*-Kulturüberstand, sowie Umpufferungen durch Gelfiltration wurden mit einer FPLC (Fast Performance Liquid Chromotography)-Anlage ÄKTA Purifier (GE-Heathcare, Uppsala, Schweden) bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Bedienung des Gerätes erfolgte über die Software UNICORN 5.11. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Anwendung auf einer Säule mit einer Nutsche unter Verwendung von 0,45 µm-Filtern (Millipore GmbH, Schwalbach) entgast (Hausvakuum). Die Säulen wurden abhängig vom Säulenmaterial meist in 20 % Ethanol (tech.) gelagert, vor Verwendung zunächst mit Wasser, dann mit dem entsprechenden Laufpuffer für die Chromatographie (>2 cv) äquilibriert. Nach Umpufferung in den entsprechenden Laufpuffer (Kap. 2.9.2.1) wurde zunächst eine Anionenaustausch-Chromatographie über Q-Sepharose Fast Flow (Q-FF) (Kap. 2.9.2.3) in einer Kombination von meist zwei Schritten durchgeführt. Als Laufpuffer wurde Tris/HCl bei pH-Werten zwischen 7,7 und 8,6 verwendet. Für die Anionenaustausch-Chromatographie (AEX) und eine abschließende Hydroxyapatit-Chromatographie (Kap. 2.9.2.4) wurden Säulen mit geeignetem Säulenvolumen präpariert.

Zum Auftragen einer Probe wurde bei geringen Probenvolumen (< 2ml) in der Regel ein Schlauchloop verwendet. Mit einem Superloop aus Glas (GE-Healthcare), der zunächst mit dem für die anschließende Chromatographie verwendeten Laufpuffer gepackt wurde, wurden Volumina bis 50 ml fast verlustfrei aufgetragen. Dies gilt insbesondere für Kulturüberstände aus Minimalmedium, die für den ersten Chromatographie-Schritt entsprechend stark konzentriert wurden. Größere Probenvolumina, insbesondere Kulturüberstände von *Xanthomonas* p4782.1::roxA aus Vollmedien, bei denen zur Zeitersparnis eine Konzentrierung meist nur über die KwickLab-Ultrafiltrationsanlage erfolgte, wurden nach Filtration direkt über eine Pumpe auf Q-Sepharose-FF -Säulen mit entsprechend größerem Bettvolumen aufgetragen. Eine Umpufferung erfolgte in diesen Fällen nach Konzentrierung auf 250 ml durch Auffüllen mit 5 Liter FPLC-Laufpuffer und anschließender erneuter Konzentrierung.

RoxA enthaltende Fraktionen wurden zusammengeführt, durch Ultrafiltration (YM30) konzentriert und in KP-Puffer (pH 6,5) umpuffert für eine anschließende Hydroxyapatit-Chromatographie (Kap. 2.9.2.4). Diese gewährleistete besonders reines RoxA. Erneut wurden RoxA-Fraktionen zusammen geführt und durch Ultrafiltration (YM30) zur Verwendbarkeit für EPR- bzw. CD-Spektroskopie auf etwa 5–10 mg/ml unter Zusatz von ca. 300 mM NaCl auf Eis konzentriert (Kap. 2.77). Die Reinheit von RoxA wurde durch SDS-PAGE mit Gesamtproteinfärbung (Silberfärbung) und spezifischer Häm-Färbung kontrolliert und konnte durch Kalkulation des Quotienten von $\epsilon_{406}/\epsilon_{280}$ verglichen werden. Reines RoxA nach der Hydroxyapatit-Säule und Konzentrierung wies einen Wert von 1,35 auf. Gereinigte RoxA-Proben wurden aliquotiert, in flüssigen N₂ eingefroren und bei –70°C gelagert.

2.9.2.1 Gelfiltration zur Größentrennung von Proteinen und zur Entsalzung

Gelfiltration dient im Besonderen zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe, wozu sehr lange Säulen mit geringem Durchmesser dienen. Nach dem gleichen Prinzip lassen sich auch Gelfiltrationssäulen zur Entsalzung bzw. Überführung einer Probe in einen definierten Puffer verwenden. Diese besitzen demgegenüber einen deutlich größeren Durchmesser bei geringerer Höhe und insgesamt großem Säulenvolumen. Dadurch lassen sich deutlich höhere Flussraten anwenden. Es erfolgt eine schnelle und effektive Trennung der Pufferkomponenten von der Proteinfraktion, nicht aber der Proteine untereinander.

Zur Gelfiltration verwendete Säulenmaterialien basieren auf Agarose oder Dextran. Sie tragen die Bezeichnungen Superdex, Sephacryl oder Superose und variieren in Laufzeit, Auflösung und der größenbezogenen Auftrennung (kDa). Das Säulenmaterial ist von Poren unterschiedlicher Größe durchzogen und erlaubt kleinen Substanzen einzudiffundieren. Je größer die Moleküle, desto schlechter können sie eindringen und fließen umso schneller durch. Demnach eluieren zuerst große, dann kleine Proteine, anschließend die Salze. Nach etwa 1,3 Säulenvolumen ($cv = \underline{c}olumn \underline{v}olume$) befindet sich die Säule wieder vollständig im

Äquilibrierungspuffer (s. Abb. 2.3). Schnelligkeit und Genauigkeit sind Vorteile gegenüber anderen Methoden der Umpufferung wie der Diafiltration, welche auf Konzentrierung und Verdünnung beruht, wodurch eine Umpufferung nie rückstandslos erfolgt.

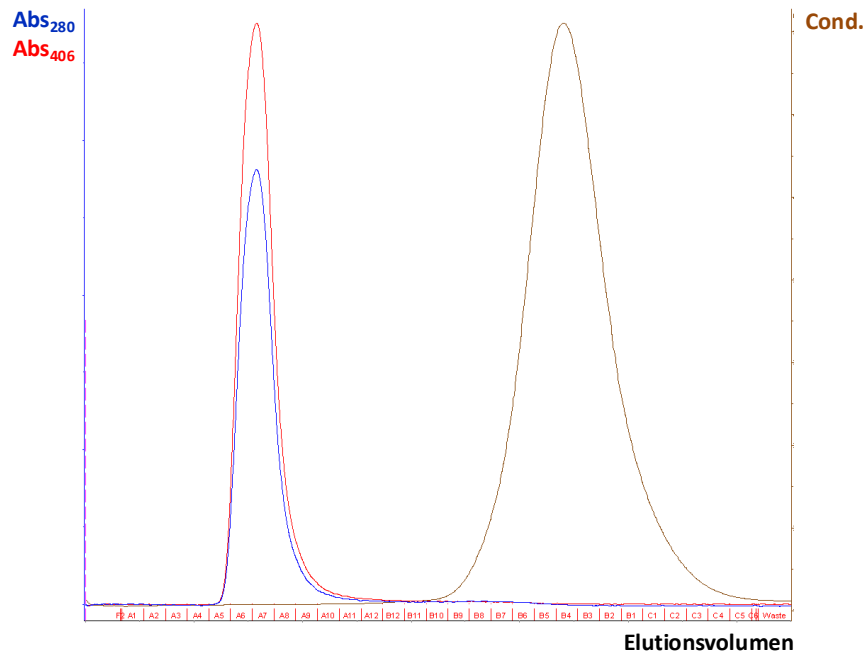


Abb. 2.3: Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufes mit einer HiPrep 26/10_Desalting-Säule. Aufgetragen eine über Hydroxyapatit gereinigte RoxA-Probe. Abs = Absorption, Cond. = Leitfähigkeit

Zur Umpufferung von Kulturüberständen bzw. gereinigten RoxA-Fractionen wurde in der Regel die Gelfiltrationssäule HiPrep 26/10_Desalting (GE-Healthcare, München) verwendet, mit welcher Probenvolumina zwischen 2 und 15 ml pro Lauf umgepuffert werden konnten (maximal 30 % des Säulenvolumens). Ein typisches Chromatogramm ist aus Abb. 2.3 ersichtlich.

2.9.2.2 Gelfiltration an Superdex G75

Eine Größentrennung einer RoxA-Probe wurde mit Superdex G75 mit optimaler Trennung im Bereich 3–75 kDa mit einer FPLC-Anlage (Pharmacia, Uppsala, Schweden), bestehend aus einem LCC 500 Controller, 500 Pumpe, UV-1 Monitor, Rec-482 Recorder und einem FRAC-Autosampler, ausnahmsweise bei 4°C durchgeführt. Es wurde eine Säule mit 25 ml Säulenvolumen (cv) verwendet, die zuvor mit 2 cv Puffer äquilibriert wurde (0,5 ml/min). Als Laufpuffer diente 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 150 mM NaCl, um unspezifische Interaktionen mit dem Säulenmaterial zu minimieren. Die verwendeten Puffer wurden vor Beginn auf 4°C gekühlt.

Die Kalibrierung der Säule wurde mit dem "Gel Filtration Calibration Kit" (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Als Kalibrierungsproteine wurden Blue Dextran 2000, Ovalbumin, Chymotrypsinogen und Trypsin in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Läufe wurden bei einer konstanten Flussrate von 0,25 ml/min durchgeführt. Aufgetragen wurden 200 µl konzentriertes, über Q-Sepharose FF gereinigtes RoxA aus Latexkultur (10 mg/ml).

2.9.2.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Anionenaustauscher-Materialien enthalten positiv geladene Substituenten, die eine Bindung von negativ geladenen Molekülen ermöglichen. Die Matrix-Partikel sind porös und weisen eine hohe interne Interaktionsoberfläche auf. Ein häufig verwendetes Material ist Q-Sepharose mit kovalent gebundenen quaternären Ammoniumgruppen ($Q = -O-CH_2N^+(CH_3)_3$) als Substituenten und zählt aufgrund der Verwendbarkeit in einem breitem pH-Bereich (pH 2 – pH 12) zu den starken Ionenaustauschern.

Das Auftragen einer Probe erfolgt häufig in einem organischen Puffer mit geeigneter Pufferkapazität im gewünschten pH-Bereich oder einem ionischen Puffer bei einer niedrigen Ionenstärke bzw. Leitfähigkeit, mit welchem das Säulenmaterial zuvor äquilibriert wurde. Der pH-Wert der Probe bestimmt maßgeblich die Oberflächenladung der Proteine und muss zur gewünschten Bindung an Anionenaustauschermaterialien häufig über pH 8 eingestellt werden. Negativ geladene Proteine interagieren mit dem Säulenmaterial, während positiv geladene oder neutrale Moleküle ungebunden durchlaufen. Die Elution gebundenen Proteins erfolgt durch Erhöhung der Ionenstärke (meist NaCl) durch Anlegen eines linearen oder Stufengradienten. Die Anionen konkurrieren mit den gebundenen Proteinen um eine Bindung und lösen diese schließlich in Abhängigkeit von deren Bindungsstärke früher oder später im Gradienten (Lottspeich & Engels, 2006). Die Auflösung der Proteinpeaks ist dabei abhängig von der spezifischen Selektivität und Effizienz des Materials, der aufgetragenen Probenmenge und der Flussrate.

Konzentrierte *Xanthomonas*-Kulturüberstände wurden nach Umpufferung auf eine Säule mit Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Zur Reinigung von RoxA aus Latexkultur, bei welcher das Probevolumen in der Regel unter 50 ml lag, diente meist eine Q-Sepharose 26/08-Säule (Flussrate 2–3 ml/min), bei Reinigungen aus Vollmedium mit größeren Probenvolumina eine Q-Sepharose 50/11-Säule (Flussrate 3–7 ml/min). Es wurde meist eine zweistufige Reinigung über Q-Sepharose FF angewendet. Im ersten Schritt wurde der konzentrierte Kulturüberstand mit 20 mM Tris/HCl [pH 7,7] aufgetragen. Bei diesem pH-Wert interagierte RoxA kaum mit dem Säulenmaterial und ist im Durchlauf zu finden, während eine Trennung von bei pH 7,7 bindenden Proteinen stattfand. Der RoxA enthaltende Durchlauf wurde für einen weiteren Lauf in 20 mM Tris/HCl [pH 8,5] umpuffert oder bei größeren Volumina mit Tris auf [pH 8,5] titriert.

In einem zweiten Schritt bei Tris/HCl [pH 8,5] über die gleiche Säule wurde RoxA an Q-Sepharose gebunden und im NaCl-Gradienten bis 300 mM bei ca. 50 mM NaCl bzw. auf einer breiten Stufe (>1 cv) bei 5 % des Elutionspuffers eluiert. Dieser entsprach dem Laufpuffer, enthielt aber zusätzlich 1 M NaCl. Der größte Anteil an Fremdproteinen band nicht an das Säulenmaterial und wurde mit dem Durchfluss abgetrennt. Nach Abschätzung über mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung wurde auf diese Weise bereits etwa 95 % reines RoxA erhalten. Nach Beendigung des Elutionsgradienten wurden die Säulen stets mit 100 % Elutionspuffer gewaschen und mit Laufpuffer reäquilibriert bzw. zur Lagerung mit H₂O gespült und in 20 % Ethanol gepackt.

Nach Optimierung dieser Vorgehensweise ließ sich eine ähnlich hohe Reinheit auch in nur einem Schritt über Q-Sepharose FF erreichen. Voraussetzung war, dass das Volumen der aufgetragenen Probe unter dem des Säulenmaterials blieb (s. Kap. 3.2.3). Ggf. waren somit mehrere gleiche Läufe notwendig, es entfiel jedoch eine Umpufferung zwischen den Läufen und eine Äquilibration der Säule auf einen neuen Puffer.

Bei der Reinigung von RoxA aus Latexkultur mit Q-Sepharose 26/08-Säule wurde dazu 20 mM Tris/HCl pH 8,2 als Laufpuffer verwendet. Bei rekombinantem RoxA aus LB/NB-Kultur wurden bei Verwendung der Q-Sepharose 50/11-Säule (cv ≈220 ml) beste Ergebnisse mit Probenvolumina unter 150 ml auch bei pH 8,5 erzielt. Dem Probenauftrag folgte die Auswaschung nicht bzw. schwach bindender Proteine mit Laufpuffer über 0,5 bis max. 1 cv als wichtiger Maßnahme, um solche Proteine nicht in den RoxA-Pool zu verschleppen. Die Elution von RoxA erfolgte in analoger Weise auf einer Stufe bei 5 % des Elutionspuffers über etwa 1 cv. Eine Verlängerung dieser Stufe war der Erhöhung der Ausbeute bzw. der Trennung von stärker gebundenem Protein förderlich, führte aber zur Verdünnung des RoxA-Pools.

2.9.2.4 Hydroxyapatit-Chromatographie

Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ ist eine kristalline Form von Calciumphosphat und besitzt einzigartige Eigenschaften zur Trennung von Proteinen aufgrund der Anwesenheit sowohl positiv (Ca^{2+}) als auch negativ (PO_4^{3-}) geladener funktioneller Gruppen. Die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen interagieren mit den Phosphatgruppen an der Kristalloberfläche. Die negativ geladenen Carboxygruppen dagegen werden von diesen abgestoßen und gleichermaßen von den Calciumionen komplexiert. Saure und basische Proteine verhalten sich somit unterschiedlich (Lottspeich & Engels, 2006). Daher findet diese Technik häufig Anwendung, wenn Proteine mit anderen chromatographischen Verfahren schlecht zu trennen sind.

Wurde besonders reines RoxA benötigt, wurde an die Anionenaustausch-Chromatographie eine Hydroxyapatit-Chromatographie angeschlossen. Nach Umpufferung des RoxA-Pools in KP-Puffer (5 mM, pH 6,5) wurden ggf. mehrere Läufe mit einer CHT5-I-

Säule (BioRad, München) oder CHT-I 16/09 durchgeführt. RoxA wurde über einen linearen Gradienten bis 200 mM K⁺-Phosphat (pH 6,5) bei ca. 40 mM eluiert. Das Auftragevolumen war weniger entscheidend, solange die Bindungskapazität der Säule nicht überschritten wurde. Die RoxA-Fractionen wurden während des Laufes auf Eis gesammelt, um eine rasche Präzipitation bei RT zu verhindern.

2.10 Redox titrationen

Versuchsansätze wurden in einer Thunberg-Zelle oder Küvette aus Quarzglas, die durch ein Doppel-Gummiseptum verschlossen wurde, in der Regel in 100 mM KP-Puffer (pH 7) unter einer N₂-Atmosphäre durchgeführt. Die Entfernung von Sauerstoff erfolgte dabei durch mehrere (8–10) Zyklen Vakuum und Begasung mit N₂-Gas (N₂ 4.6, 99.996 %; O₂ ≤ 5 ppm). Redoxprozesse wurden mit einem Cary 100 Bio Photometer (Varian, Darmstadt) durch Aufnahme von UV-Vis-Spektren, gewöhnlich im Bereich zwischen 300 und 700 nm verfolgt.

2.10.1 Xanthin/Xanthin-Oxidase-Methode

Mit dieser Methode lässt sich das Standard-Redoxpotential (*midpoint-potential*) E_0' von RoxA durch Verwendung von Redoxmediatoren mit bekanntem Potential mithilfe der Nernst-Gleichung berechnen. Die Reduktion wurde anaerob unter einer N₂-Atmosphäre nach mehreren Zyklen Vakuum und Begasung mit N₂ durchgeführt. Die Xanthin-Oxidase nutzt Xanthin als Elektronendonator (Hopkins & Williams, 1995) und reduziert allmählich den/die Mediator/en und RoxA. Die Xanthin-Oxidase besitzt den Vorteil, dass sie auch O₂ als Substrat nutzen kann und somit vorhandenen Restsauerstoff zuerst aus dem Ansatz entfernt.

Es wurde zu jedem Messzeitpunkt jeweils der Anteil an reduziertem bzw. oxidiertem Mediator bzw. RoxA optisch bestimmt und $\ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{Mediator}}$ gegen $\ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{RoxA}}$ aufgetragen. Es sollte sich eine Gerade ergeben, deren Steigung die vom Mediator bzw. RoxA aufgenommenen Elektronen angibt (z. B. 0,5 = Mediator 1 e⁻, RoxA 0,5 e⁻). Die Berechnung des Standardpotentials von RoxA erfolgte mithilfe der Nernst-Gleichungen:

$$E_{\text{RoxA}} = E_0'_{\text{RoxA}} + \frac{RT}{F} z_{\text{RoxA}} \times \ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{RoxA}} \quad \text{und} \quad E_{\text{Med}} = E_0'_{\text{Med}} + \frac{RT}{F} z_{\text{Med}} \times \ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{Med}}$$

Dabei sind: E_0' = Standardpotential bei pH 7, E = Potential zum jeweiligen Messzeitpunkt, R = allg. Gaskonstante, T = Temperatur [K], F = Faraday-Konstante, z = Anzahl aufgenommener Elektronen. Unter der Annahme eines Redoxgleichgewichtes zwischen Mediator und RoxA ist zum gleichen Messzeitpunkt $E_{\text{RoxA}} = E_{\text{Med}}$. Ist das Standardpotential des Mediators erreicht, so ist $\ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{Med}}$ gleich Null und $\ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{RoxA}}$ entspricht

folglich dem Wert des Geradenschnittpunkts mit der Y-Achse. Nach Umformung erhält man die Arbeitsgleichung

$$E_{0'}^{\text{RoxA}} = E_{0'}^{\text{Med}} - \frac{RT}{F} z_{\text{RoxA}} \times \ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{RoxA}}.$$

Da das Redoxpotential des Mediators bekannt ist, lässt sich das Standardpotential von RoxA berechnen, indem man die Anzahl der aufgenommenen Elektronen, sowie $\ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{RoxA}}$ einsetzt. Als Maß für die Reduktion von RoxA wurde routinemäßig die Zunahme bei 418 nm, für die Mediatoren die Abnahme bei der jeweiligen Wellenlänge der maximalen Absorption verwendet. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für $E_{0'}^{\text{RoxA}}$ wurden unter Verwendung der Redoxmediatoren Indigodisulfat (IDS) und 2-Hydroxy-Naphthochinon (HNC) erhalten. Weitere getestete Mediatoren sind in Tab. 2.12 aufgeführt. Sämtliche verwendeten Mediatoren akzeptieren zur Reduktion zwei Elektronen analog zu RoxA.

Tab. 2.12: Verwendete Redoxmediatoren. Angegeben sind die Wellenlänge des Absorptionsmaximums, bei der die Absorptionsänderung des Mediators verfolgt wurde (λ_{Mess}) und der entsprechende Extinktionskoeffizient ϵ .

| Redoxmediator | Redoxpotential $E_{0'}$ (pH 7,0) | λ_{Mess} | ϵ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---|
| Resorufin | -51 mV | 572 nm | 34.000 |
| Indigotrisulfate | -78 mV | 602 nm | 11.400 |
| Indigodisulfate | -125 mV | 608 nm | 11.474 |
| 2-Hydroxy-Naphthochinon | -152 mV | 455 nm | 3.040 |
| Safranin T | -289 mV | 518 nm | 16.716 |

Ein Versuchsansatz enthielt RoxA in Konzentrationen zwischen 3 und 6 μM in 100 mM KP-Puffer (pH 7). Die Redoxmediatoren wurden in Konzentrationen von 5–15 μM , Xanthin in 200–300 μM aus einer Stammlösung zugesetzt. Xanthin ist bei neutralem pH nur schlecht wasserlöslich, daher wurde die Stammlösung [5 mM] zuvor mit NaOH auf pH 12 titriert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Xanthin-Oxidase (XO, 5–10 mU) aus seiner Stammlösung in KP-Puffer (200x) zum Versuchsansatz gestartet.

Der Prozess der Reduktion wurde kontinuierlich im UV-Vis-Spektrum und Differenzspektrum [minus des Spektrums vor Zugabe von XO] bei einer Temperatur von 25°C bis zu mehreren Stunden verfolgt. Dabei mussten die eingesetzten Mengen an Xanthin und XO so gewählt werden, dass die Reduktion mit einer Geschwindigkeit verlief, welche die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen RoxA und Mediator erlaubte, und nicht aufgrund ausfallenden Xanthins in zu hoher Konzentration durch Trübung gestört wurde. Das Standardpotential von RoxA wurde wie oben beschrieben kalkuliert (Hopkins & Williams, 1995).

2.10.2 Photoreduktion mit Deazaflavin

Die photochemische Reduktion im System mit 5-Deazaflavin (Abb. 2.4) (Massey *et al.*, 1978 a) wurde für weitere Redox titrationen und die Ermittlung der von RoxA aufgenommenen Elektronen eingesetzt. 5-Deazaflavine (5-Deazaisoalloxazine), bei denen (N)-5 durch CH ersetzt ist, haben eine biologische Funktion bei der Reparatur von Pyrimidindimeren der DNA, wurden zudem als effiziente Katalysatoren bei Photoreduktionen gefunden. Nach Anregung durch Belichtung entsteht z. T. $^1dFl_{ox}^*$ im angeregten Singulett-Zustand, durch anschließendes sog. Intersystem Crossing (ISC) entsteht ein angeregter Triplett-Zustand $^3dFl_{ox}^*$ mit stark positivem Redoxpotential. Dieses kann daher in Anwesenheit von Elektronen-Donoren wie Tris oder EDTA (= Ein-Elektronen-Donoren) ein Elektron aufnehmen, wodurch das 5-Deazasemichinon-Radikal $^1HdFl^*$ entsteht. Diese Deazaflavin-Intermediate können zu diastereomeren 5-Deazaflavin-Radikal-Dimeren als eigentlichem Hauptprodukt der Photoreduktion mit dFl_{ox} reagieren (s. Massey & Hemmerich, 1978, Fig. 5), im Gegensatz zum Hauptprodukt der Photoreduktion von Flavinen, $1,5-H_2Fl_{Red}$. Die Reduktion von 5-Deazaflavin mit einem Elektron resultiert demnach im kurzlebigen $^1HdFl^*$ mit sehr starker reduzierender Wirkung (Duchstein *et al.*, 1979), welches für die erwünschte nachfolgende Reduktion von oxidierten Metallenzymen wie RoxA verantwortlich ist. Das Redoxpaar $dFl_{ox} / dFlH^*$ ist aufgrund seines sehr negativen Redoxpotentials von ca. -650 mV (pH 7) ein starker Ein-Elektronen-Reduktant (Blankenhorn, 1976) mit hoher Reaktivität und noch in katalytischen Mengen zur Reduktion von Redoxzentren in der Lage, die mit dem häufig verwendeten Na^+ -Dithionit ($E_0' = -450$ mV) kaum reduziert werden können. Neben der Reduktion von Flavoproteinen wurde der Nutzen dieser Methode bereits frühzeitig für einige Cytochrome gezeigt (Massey *et al.*, 1978 a; Peterson *et al.*, 1977).

Als Photoreduktionsmittel eignet sich EDTA, aber auch zahlreiche Aminosäuren Carbonsäuren und Amine (Massey *et al.*, 1978, Massey *et al.*, 1978 a). Versuchsansätze wurden mit in 100 mM KP-Puffer (pH 7) mit RoxA (3–6 μ M) mit Tris oder EDTA (5–10 mM) als Elektronendonoren und 5-Deazaflavin (1–2 μ M) (s. Abb. 2.4) als Katalysator bei Raumtemperatur unter N_2 -Atmosphäre durchgeführt. Die Versuche wurden wegen der hohen Lichtempfindlichkeit von Deazaflavin im Dunkeln, insbesondere unter Ausschluss von Tageslicht (blauem Licht) durchgeführt. Die Reduktion wurde initiiert durch stufenweise Belichtung in definiertem Abstand zu einer variablen Lichtquelle. Die Belichtungsintervalle lagen zwischen 5 und 60 Sekunden. in Abhängigkeit der verwendeten Lichtquelle zwischen einer und 5 Minuten Gesamtbelichtungsdauer. Nach jedem Intervall wurde unmittelbar das UV-Vis-Spektrum aufgenommen, danach erfolgte die Inkubation im Dunkeln bis zur Einstellung eines Redoxgleichgewichtes, angezeigt durch Beständigkeit des Spektrums (definitionsgemäß in einem Zeitraum von 5 min). Dieses wurde zum Ablesen der Messdaten herangezogen. Die Vollständigkeit der Reduktion am Endpunkt wurde durch Vergleich mit einer durch Na^+ -Dithionit reduzierten RoxA-Probe in gleicher Konzentration abgeschätzt.

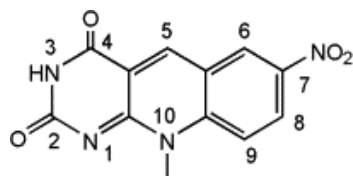


Abb. 2.4: Deazaflavin (5-deaza-10-methyl-3-sulfopropyl-isoalloxazine). Es wurde ein Derivat mit einer $-(\text{CH}_2)_3\text{-SO}_3^-\text{K}^+$ -Gruppe am N-Atom 3 eingesetzt (Synthese: K. Sulger, Konstanz).

Zur Ermittlung der Anzahl aufgenommener Elektronen wurde ein solcher Ansatz mit Kalium-Ferricyanid ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) schrittweise rüchtitriert. Dabei war zuvor auf die Vollständigkeit der Reduktion bei gleichzeitiger Vermeidung einer starken Überbelichtung, welche eine Rücktitration verfälschen würde, zu achten.

2.11 Zersetzung von Latex mit Enzym-Mediator-Systemen

Von Enoki *et al.* (2003) wurde eine Polyisopren spaltende Wirkung verschiedener Enzym-Mediator-Systeme nachgewiesen, mit deren Hilfe gleichermaßen *cis*- und *trans*-Polyisopren unspezifisch mithilfe von Mediator-Radikalen oxidativ gespalten wurde. Die Spaltung von Poly(*cis*-1,4-isopren) wurde im System mit Lipoxygenase/Linolsäure (Tab. 2.13 a) bzw. Meerrettich-Peroxidase (HRP)/1-Hydroxybenzotriazol (HBT) (Tab. 2.13 b) bzw. Fenton-Reagenz/Linolsäure (Tab. 2.13 c) in der beschriebenen Weise durchgeführt (Enoki *et al.*, 2003). Die Tests wurden im 10 ml-Maßstab in 50 ml-Greiner-Röhrchen angesetzt und über Nacht (20 h) bei 37°C geschüttelt (150 rpm). Im Anschluss erfolgte die Extraktion von Spaltprodukten mit gleichem Volumen Ethylacetat und eine kurze Zentrifugation (5000 rpm, 2 min, RT). Das Lösungsmittel wurde abgedampft (N_2) und der Rückstand in 0,5 ml Methanol aufgenommen. Die Detektion im Vergleich zu nicht degradierten, extrahierten Kautschuklatex bzw. RoxA-generierten Spaltprodukten erfolgte mit HPLC (vgl. Kap. 2.7.1).

Tab. 2.13 a: Ansatz mit Lipoxygenase / Linolsäure

| Komponente | Stammlösung | Vol./Ansatz | Konzentration |
|------------------------------------|------------------|---------------|---------------|
| Lipoxygenase | [10 mg/ml] | 0,1 ml (1 mg) | 0,01 % (w/v) |
| Linolsäure | [60 % (v/v)] | 23 µl | 5 mM |
| Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren) | [15 % (w/v)] | 67 µl | 0,1 % (w/v) |
| Borat-Puffer | [100 mM, pH 9,0] | 2 ml | 20 mM |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | | ad 10 ml | |

Tab. 2.13 b: Ansatz mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) / 1-Hydroxy-benzotriazol (1-HBT)

| Komponente | Stammlösung | Vol./Ansatz | Konzentration |
|----------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| HRP | [10 mg/ml] | 0,1 ml (1 mg) | 0,01 % (w/v) |
| 1-HBT | [100 µg/ml Methanol] | 340 µl (34µg) | 3 mM |
| Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren) | [15 % (w/v)] | 67 µl | 0,1 % (w/v) |
| H ₂ O ₂ | [100 mM], frisch ansetzen | 10 µl | 0,1 mM |
| K ⁺ Phosphat-Puffer | [100 mM, pH 7,0] | 0,8 ml | 20 mM |
| H ₂ O _{dest} | | ad 10 ml | |

Tab. 2.13 c: Ansatz mit Fenton-Reagenz/Linolsäure

| Komponente | Stammlösung | Vol./Ansatz | Konzentration |
|----------------------------------|---------------------------|-------------|---------------|
| FeSO ₄ | [18 g/L; 65 mM] | 31 µl | 0,2 mM |
| Linolsäure | [60 % (v/v)] | 23 µl | 5 mM |
| Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren) | [15 % (w/v)] | 67 µl | 0,1 % (w/v) |
| H ₂ O ₂ | [100 mM], frisch ansetzen | 10 µl | 0,1 mM |
| Na ⁺ Acetat-Puffer | [250 mM, pH 5,0] | 0,8 ml | 20 mM |
| H ₂ O _{dest} | | ad 10 ml | |

2.12 Spektroskopie

2.12.1 UV-Vis-Spektroskopie

Für die spektrale Analyse von RoxA ist neben der Absorption bei 280 nm, die im Wesentlichen von der hohen Absorption der relativ hohen Anzahl (20) an Tryptophan-Resten ($\epsilon_{280} \approx 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt wird (s. Kap. 4.4.1), vor allem die Absorption im sichtbaren Spektralbereich interessant. RoxA besitzt durch seine beiden Hämgruppen charakteristische Absorptionsmaxima im Vis-Bereich des optischen Spektrums (s. Kap. 3.9).

Ein Metalloporphyrin kann als ein System mit 16 Zentren und 18 π -Elektronen beschrieben werden. Charakteristisch ist das Auftreten einer starken Soret-Bande im Bereich um 400 nm und weniger intensiven Q-Banden meist zwischen 500 und 600 nm. Nach dem "Vier-Orbital-Modell" nach Gouterman (vgl. Fig. 5 in Gouterman, 1961) entstehen Absorptionsbanden bei D_{4h} -Symmetrie des Porphyrin-Rings durch erlaubte Elektronenübergänge zwischen den beiden HOMOs (*highest occupied molecular orbitals*) mit a_{1u} (π) bzw. a_{2u} (π)-Symmetrie, und den beiden LUMOs (*lowest unoccupied molecular orbitals*) mit e_g (π^*)-Symmetrie (Gouterman, 1979). Diese Banden gehen somit auf etwa äquivalente, senkrecht zueinander gerichtete $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge zurück und weisen X,Y-Polarisation in der Porphyrinebene auf (Gouterman, 1961; Eaton & Hochstrasser, 1968). Die e_g (π^*)-Orbitale im Metalloporphyrin sind annähernd doppelt entartet, d. h. die Komponenten B_x und B_y , bzw. Q_x und Q_y sind nahezu energiegleich, was zu starken elektronischen Wechselwirkungen führt. Es

resultiert eine Addition der Dipole des Übergangs in Phase, sichtbar als energiereiche Soret- oder B-Bande (γ -Bande), sowie eine weitgehende Auslöschung der Dipole in Gegenphase, sichtbar als schwache Q(0,0)-Bande oder α -Bande. Im Unterschied zum rein elektronischen Übergang der α -Bande geht eine weitere, energiereichere Bande auf die Summe von gekoppelten Vibrations-Übergängen zurück und wird als Q(0,1) oder β -Bande bezeichnet (z. B. Gouterman, 1961; Reddy *et al.*, 1996; Manas *et al.*, 1999). Die Intensität der Q-Banden liegt meist etwa eine Größenordnung unter denen der Soret-Banden. In den meisten Häm-Systemen werden durch die annähernde D_{4h} -Symmetrie des Porphyrins zwei Q-Banden beobachtet, in einigen Porphyrin-Systemen führt dagegen die Erniedrigung der Symmetrie zur Aufhebung der Entartung und es können ggf. vier Q-Banden (Q(0,0)_x, Q(0,0)_y, Q(0,1)_x, Q(0,1)_y) beobachtet werden (z. B. Nicola *et al.*, 1975).

Weitere Banden im UV-Bereich, die sog. N- und L-Banden, stammen ebenso von $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen des Porphyrins, sind aber bei in Proteinstrukturen integrierten Porphyringruppen von der hohen Absorption aromatischer Aminosäuren überdeckt und nicht sichtbar (Weiss *et al.*, 1965). Das optische Spektrum von Hämproteinen mit *high-spin*-Fe(III)-Zuständen zeigt in der Regel zwei zusätzliche Banden im Vis-Bereich, die einem Ladungstransfer vom Porphyrin zum Metall zugeschrieben werden (Brill & Williams, 1961) und durch Interaktion der π -(a_{1u} , a_{2u})-Orbitale des Porphyrin-Rings mit den d_{π} -Orbitalen des Metalls entstehen ($\pi \rightarrow d_{\pi}$) (Boucher, 1970). Sie treten zulasten der Intensität der Q-Banden bei längeren Wellenlängen (600–650 nm) und kürzeren Wellenlängen (450–500 nm) als diese auf (Brill & Williams, 1961; Boucher, 1970). Die Energie der Übergänge wird generell vom Metall und den Liganden mitbestimmt, aber auch durch Störung der π -Elektronenwolken, d. h. durch die strukturelle Umgebung innerhalb eines Proteins oder Abweichungen von der Planarität der Porphyrinebene beeinflusst. Diese Störung der Symmetrie des Porphyrins lässt sich durch UV-Vis-Spektroskopie indirekt beobachten (Manas *et al.*, 1999).

UV-Vis-Spektren (190–900 nm) wurden mit einem Cary 100 Bio Photometer (Varian, Darmstadt) aufgenommen. Dieses war über ein angeschlossenes Wasserbad temperierbar. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Cary WinUV (Vers. 3.00; Varian, Darmstadt). Zur Detektion in Kulturüberständen wurden 2 ml der Kultur für 2 Minuten bei 21.000 g (Tischzentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert und mit 1 ml des Überstandes zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums in 1x-Küvetten verwendet. Die Konzentrationsbestimmung von RoxA-Proben über molare Extinktionskoeffizienten erfolgte in 1 ml Küvetten aus Quarzglas. Von aufgenommenen Spektren wurde in der Regel eine Grundlinie (Puffer oder Medium) abgezogen.

2.12.2 CD-Spektroskopie (*Circular Dichroism*)

CD-Spektroskopie kann zur Bestimmung des Gehalts an Sekundärstrukturelementen (α -Helix, β -Faltblatt, "random coil") herangezogen werden und dazu dienen, Konformationsänderungen, z. B. bei Ligandenbindung oder Faltungsvorgängen zu erkennen, sowie zur Bestimmung der Stabilität eines Proteins unter verschiedenen Bedingungen, (z. B. Corrêa & Ramos, 2009). Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Möglichkeit, Proteine aus verschiedenen Quellen hinsichtlich ihrer Konformation zu vergleichen, nämlich Substrat-induziertes RoxA und Rhamnose-induziertes rekombinantes Enzym. CD-Spektroskopie liefert hinsichtlich der Strukturanalyse deutlich weniger Informationen als Röntgenstrukturanalyse, kommt jedoch mit geringeren Proteinmengen aus und stellt eine relativ einfache und schnelle Methode dar, um den Einfluss zahlreicher Bedingungen wie unterschiedliche Puffer, pH-Wert, Salzkonzentration und Temperatur auf die Struktur und Stabilität eines Proteins zu untersuchen. Die Temperaturstabilität bzw. der Schmelzpunkt eines Proteins, d. h. die Temperatur, bei der sich die Proteinstruktur entfaltet, kann durch die Aufnahme von CD-Schmelzkurven bestimmt werden. Auf diesem Wege können auch gezielt Pufferbedingungen gesucht werden, welche die Temperaturstabilität fördern. Die Aufnahme des gesamten Spektrums im fernen UV-Bereich bei verschiedenen Temperaturen kann klären, ob sich zunächst nur bestimmte Teile der Sekundärstruktur entfalten. Die Beobachtung des nahen UV-Bereichs hingegen gibt Hinweise auf Veränderungen der Tertiärstruktur, beispielsweise ob eine Proteindenaturierung bei gleichzeitigem Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur oder aber in zwei Schritten verläuft ([1]).

Zirkular polarisiertes Licht entsteht durch Überlagerung zweier linear polarisierter, senkrecht zueinander stehender Wellen gleicher Amplitude, die um 90° phasenverschoben sind. Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie misst die Differenz der Absorption von links- (LCP) zu rechts polarisiertem Licht (RCP) eines chiralen Moleküls bei einer gegebenen Wellenlänge, d. h. die Verbindung absorbiert links- bzw. rechts polarisiertes Licht gleicher Wellenlänge (λ) unterschiedlich stark.

$$\Delta A_{(\lambda)} = A_{\text{LCP}(\lambda)} - A_{\text{RCP}(\lambda)}$$

Diese Beziehung wird auch über das Lambert-Beer-Gesetz als molarer Zirkulardichroismus ($\Delta\varepsilon$) angegeben unter Berücksichtigung der Weglänge (l) [cm] und der molaren Probenkonzentration (C) [mg/ml]:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{LCP}} - \varepsilon_{\text{RCP}} = \Delta A / C \times l \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{]}$$

Dabei sind ε_{LCP} und ε_{RCP} die molaren Extinktionskoeffizienten von links- bzw. rechts-polarisiertem Licht ([2]; s. Woody in Fasman, 1996). Die Differenzen resultieren aus struktureller Asymmetrie. Geordnete Strukturen ergeben positive oder negative Signale im CD-Spektrum.

Elektromagnetische Strahlung besitzt einen elektrischen und einen magnetischen Feldvektor, die senkrecht zueinander gerichtet sind. Polarisiertes Licht entsteht, wenn der elektrische Feldvektor konstanter Größe in seiner Bewegungsrichtung rotiert. Dieser Umstand lässt sich im 3-dimensionalen Raum durch eine Helix beschreiben (Abb. 2.5 a). Elliptisch polarisiertes Licht entsteht nach Überlagerung von zwei zirkular polarisierten Wellen verschiedener Amplitude (Abb. 2.5 b). Der Drehwinkel der Ellipse hängt von der Weglänge durch die Probe, sowie von deren Konzentration ab ([3]).

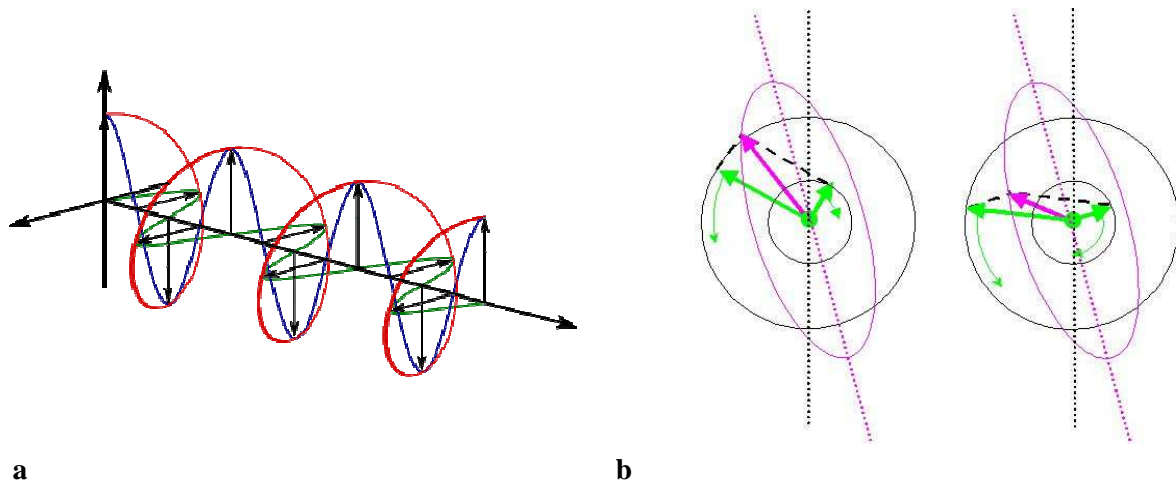


Abb. 2.5: (a) Schematische Darstellung von zirkular polarisiertem Licht (rot). Dieses entsteht durch Überlagerung von zwei linear polarisierten Wellen (blau, grün) von gleicher Amplitude (kleine schwarze Pfeile) und mit einer Phasendifferenz von 90° . Deren Polarisations Ebenen stehen senkrecht zueinander und sind in der entsprechenden Farbe dargestellt. Bei rechts polarisiertem Licht rotiert der elektrische Feldvektor im Uhrzeigersinn, bei links polarisiertem Licht in Gegenrichtung (aus: [4]). (b) Schematische Darstellung des Effektes der unterschiedlichen Absorption von links- (LCP) und rechts-polarisiertem Licht (RCP) durch ein chirales Molekül. Schwarze Kreise markieren die Intensität von RCP und LCP, kleine grüne Pfeile die Drehrichtung. Beide Schemata in (b) spiegeln das Verhältnis der Vektoren zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt im Verlauf der Rotationsbewegung wider. Die dicken grünen Pfeile geben die Ausrichtung des elektrischen Feld-Vektors zum jeweiligen Zeitpunkt an. Zusammen resultiert aus der unterschiedlichen Absorption von LCP und RCP durch Überlagerung polarisiertes Licht in Form einer Ellipse (magenta) (aus: [5]).

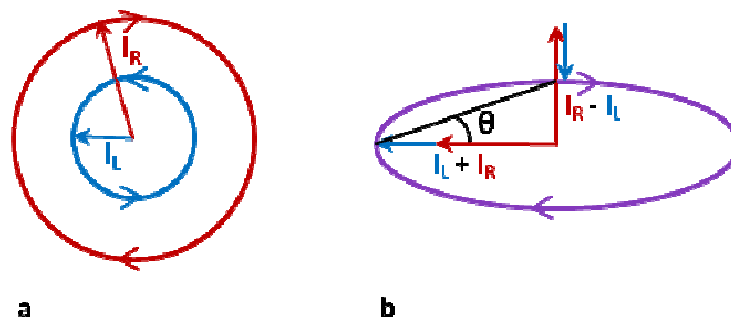


Abb. 2.6: (a) Schematische Darstellung (Querschnitt) von links- (L) und rechts (R) polarisiertem Licht von unterschiedlicher Intensität (I_R , I_L). (b) Die Addition/Subtraktion der Intensitäten der Vektoren I_R und I_L ergeben zusammen eine Ellipse. Der Grad der Elliptizität wird durch den Winkel θ beschrieben (nach: [2]).

CD-Signale können statt $\Delta\varepsilon$ als Einheit auch über die Elliptizität (θ) dargestellt werden. Dabei wird der Grad der Elliptizität θ als Winkel der Tangente zwischen der kleineren und größeren elliptischen Achse in Grad angegeben (Abb. 2.6). Linear polarisiertes Licht weist einen Winkel von 0° , LCP von $+45^\circ$ und RCP von -45° auf. Alle in dieser Arbeit gezeigten CD-Signale sind in "millidegrees" (mdeg) angegeben. θ und ΔA lassen sich leicht durch folgende Relation umrechnen: $\Delta A = \theta / 32982,2$. Analog zu $\Delta\varepsilon$ (s.o.) kann auch die molare Elliptizität ($[\theta]$) mithilfe des Lambert-Beer-Gesetzes über die Elliptizität θ [deg], die Probenkonzentration c [mg/ml], Molmasse M und die optische Weglänge l [cm] wie folgt angegeben werden (Correa & Ramos, 2009):

$$[\theta] = \theta \cdot 100 \cdot M / c \cdot l \text{ [deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}\text{]}$$

oder mit c [g/cm^3] (z. B. Rönnberg *et al.*, 1979 b; Ellfolk & Sievers, 1975):

$$[\theta] = \theta \cdot M / 10 \cdot c \cdot l \text{ [deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}\text{]}$$

oder mit der molaren Konzentration C [mol/l] und l [m] (s. [6]):

$$[\theta] = \theta / C \cdot l \text{ [deg M}^{-1} \text{ m}^{-1}\text{]}$$

Die Einheit $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ entspricht $\text{deg M}^{-1} \text{ m}^{-1}$. Für Proteine wird häufig die durchschnittliche (molare) Elliptizität pro Aminosäure angegeben, wobei $[\theta]$ durch die Anzahl der Aminosäuren n dividiert wird:

$$[\theta]/n = \theta / C \cdot l \cdot n \text{ [deg M}^{-1} \text{ m}^{-1}\text{]}$$

Meist wird zusätzlich zum CD-Signal die entstehende Spannung HT (*high tension voltage*) in [V] angegeben, welche die Absorption durch die Probe widerspiegelt. Nach Abzug des Spannungsverlaufs des reinen Probenpuffers entspricht diese der optischen Absorption (UV-Vis-Spektrum) der Probe (z. B. Miron *et al.*, 2005; Castiglioni *et al.*, 2010).

Man unterscheidet mehrere Spektralbereiche für CD-Spektren. Im fernen UV-Bereich von 180–250 nm (Amid-Region) fungieren Peptidbindungen als Chromophor, wobei nur gefaltete Proteinstrukturen Signale liefern. Die Intensität der Übergänge ist abhängig vom Winkel der C–N-Bindungen und damit von der Sekundärstruktur des Proteins (Correa & Ramos, 2009; [7]). Das CD-Spektrum eines Proteins im fernen UV-Bereich stellt die Summe der spektralen Beiträge der Proteinstrukturen α -Helix, β -Faltblatt und weiterer, ungeordneter Strukturen ("random coil") dar (s. Abb. 2.7).

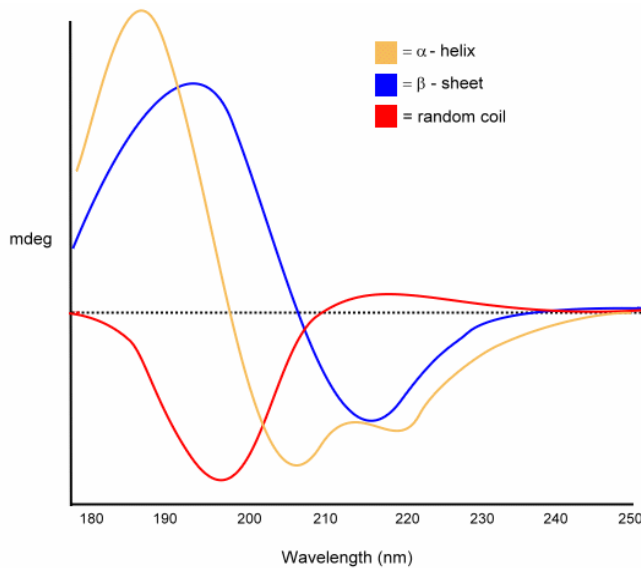


Abb. 2.7: Zusammensetzung des CD-Spektrums der Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Faltblatt und ungeordnete Strukturen ("random coil") am Beispiel von Poly-L-Lysin. Dieses ist pH- und temperaturabhängig in eine der drei Formen überführbar. (aus: [7])

Die Sekundärstruktur des Proteins kann demnach aus dem CD-UV-Spektrum nach Dekonvolution ermittelt werden, eine Bestimmung der an strukturellen Komponenten beteiligten Aminosäure-Reste ist aber nicht möglich. Nähere Informationen über die Art der Elektronenübergänge finden sich u. a. in Sutherland & Holmquist (1980).

Im Nah-UV-Bereich von 250–300 nm bilden aromatische Aminosäuren die Chromophoren. Deren Signale hängen stark von deren Umgebung ab, werden also von der Tertiärstruktur des Proteins beeinflusst. Zudem geben Disulfidbrücken schwache, breite Signale um 260 nm durch $n \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge (Rodger, 1997; Correa & Ramos 2009). Von Phenylalanin stammen Signale im Bereich 250–270 nm, von Tyrosin bei 270–290 nm und Tryptophan bei 280–300 nm. Eine detaillierte Beschreibung findet sich u. a. in Sutherland & Holmquist (1980) (s. auch Strickland *et al.*, 1969). Im Nah-UV-Spektrum können sich Änderungen der Tertiärstruktur, z. B. durch Protein-Protein-Wechselwirkungen widerspiegeln (Woody & Dunker in Fasman, 1996).

Bei Metalloproteinen, speziell Cytochromen wie RoxA, kann zusätzlich die Messung im Vis-Bereich oberhalb 300 nm aufgrund der spezifischen Absorptionseigenschaften interessant sein. So beeinflussen axiale Liganden, sowie die nahe Proteinumgebung und auch die Nähe weiterer Hämgruppen die Signale eines Hämzentrums (Sutherland & Holmquist, 1980). Während die Hämgruppe selbst kein CD-Signal ergibt, entstehen CD-Spektren im Vis-Bereich erst, wenn sich das Metallion in einer chiralen Umgebung befindet (z. B. Blauer *et al.*, 1993; Benson *et al.*, 1995), demnach nehmen freie Metallionen im Puffer keinen Einfluss auf das CD-Spektrum.

Chirale Verbindungen mit Chromophoren wie Hämgruppen ergeben im ORD (Optical Rotatory Dispersion) und CD-Spektrum sog. Cotton-Effekte, die die Form des CD-Spektrums

beschreiben. CD und ORD sind durch die Kronig-Kramers-Relation ineinander überführbar (s. Cantor & Schimmel, 1980). CD misst die Differenz der Absorption von links- und rechts polarisiertem Licht, wonach sich ein positives oder negatives, einer Gauß-Kurve entsprechendes Signal eines Chromophors ergibt. ORD dagegen misst die Differenz der Streuung und resultiert in einem sigmoidalen (S-förmigen) Signal. Dabei entspricht der Nulldurchgang dem optischen Absorptionsmaximum. Cotton-Effekte lassen sich anschaulich anhand des ORD-Spektrums erklären. Befindet sich im ORD das Maximum bei höherer Wellenlänge als das Minimum spricht man von einem positiven Cotton-Effekt, bei einem negativen Cotton-Effekt tritt bei höherer Wellenlänge zuerst das Minimum auf. Im CD-Spektrum äußert sich ein positiver Cotton-Effekt in einem CD-Signal positiver Elliptizität in der Nähe des Absorptionsmaximums und umgekehrt (Abb. 2.8).

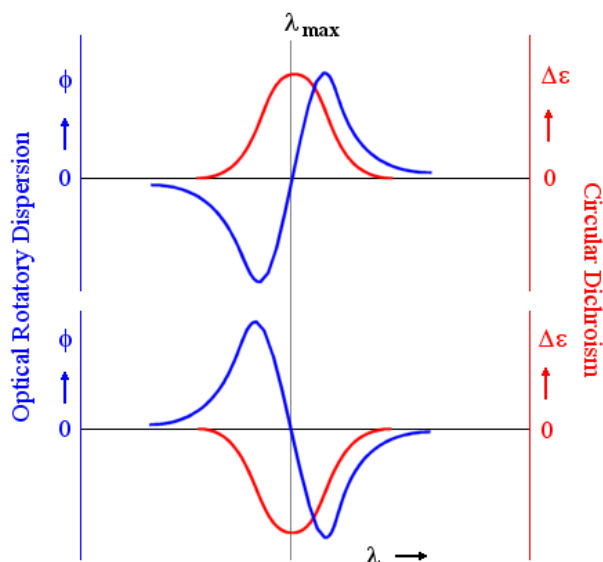
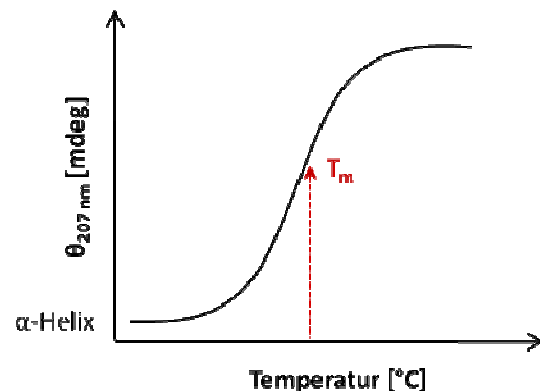


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des positiven (oben) und negativen Cotton-Effekts (unten) anhand des ORD- (blau) und CD-Spektrums (rot). λ_{\max} bezeichnet die Wellenlänge der maximalen Absorption im optischen Spektrum (nach: [8]).

Die Aufnahme von CD-Spektren wurde mit einem Spektrophotometer J-715 (Jasco Inc., Gross-Umstadt) an der Universität Hohenheim (AG Kuhn, Mikrobiologie) durchgeführt. CD-Messungen erfolgen unter konstanter Begasung mit N_2 -Gas, um die Bauelemente vor dem bei UV-Bestrahlung aus dem Luftsauerstoff entstehenden Ozon zu schützen und eine Störung der Eigenabsorption von O_2 im fernen UV-Bereich zu vermeiden. Als Pufferpuffer wurde aufgrund seiner geringen Eigenabsorption im UV-Bereich 10 mM KP-Puffer (pH 7) verwendet. Von den in dieser Arbeit gezeigten CD-Spektren wurde das Puffer-eigene Spektrum abgezogen, sofern nicht anders angegeben. CD-Messungen im UV-Bereich wurden mit 100–150 μ l der Probe in einer Küvette aus Quarzglas ($\varnothing = 1$ mm; Hellma, Müllheim) durchgeführt. Die Proteinproben wurden zuvor durch Gelfiltration (HiPrep 26/10-Desalting-

Säule) in den Probenpuffer überführt und die RoxA-Konzentration anschließend mithilfe der Absorptionskoeffizienten bei 406 bzw. 208 nm (s. Kap. 2.7.3.3) und einer Proteinbestimmung durch BCA-Assay möglichst exakt auf 200 µg/ml eingestellt. CD-Signale stellen das Durchschnitts-Spektrum der gesamten molekularen Population einer Proteinlösung dar. Somit konnten für CD-Messungen nur sehr reine Proteinlösungen verwendet werden, da jedes Fremdprotein gemäß seinem Anteil am Gesamtprotein das Spektrum verfälschen würde. Im langwelligen UV- und im Vis-Bereich (>250 nm) ist die CD-Signalintensität wesentlich geringer als im UV-Bereich, weshalb deutlich höhere Protein-Konzentrationen benötigt werden. In diesem Bereich wurden daher konzentrierte RoxA-Lösungen von 5–5,5 mg/ml in einer Quarzküvette ($\varnothing = 2$ mm; Hellma, Müllheim) verwendet. Gemessen wurde bei konstanter Temperatur von 20°C (RT) oder dem Temperaturoptimum von RoxA bei 40°C.

Abb. 2.9: Schematische Darstellung einer CD-Schmelzkurve, die das Auflösen der α -Helix-Struktur durch Anstieg des CD-Signals bei 207 nm, dem CD-Minimum von RoxA, zeigt. Der Schmelzpunkt wird am Umschlagpunkt abgelesen.



CD-Schmelzkurven wurden im Bereich 40–95°C mit einer Erhöhung der Temperatur von 1°C pro Minute aufgenommen. Gemessen wurde bei konstanter Wellenlänge des CD-Signal-Minimums (α -Helix-Signal) von RoxA, welches im UV-Bereich für RoxA auf 207 nm (tiefster Punkt im Spektrum) bestimmt wurde. Mit steigender Temperatur zeigt ein Anstieg der CD-Absorption die Entfaltung des Proteins an. Die Schmelztemperatur wird am Mittelpunkt des Übergangs abgelesen (Abb. 2.9). Die Form und Breite des Übergangs kann Hinweise zur Flexibilität des Proteins oder auch zur Heterogenität einer Protein-Population liefern.

2.12.3 Elektronen Paramagnetische Resonanz -Spektroskopie (EPR)

Elektronen Paramagnetische Resonanz -Spektroskopie (EPR) ist eine Technik zum Nachweis, zur Quantifizierung und zur Analyse von Atomen, Molekülen und Ionen mit einem oder mehreren nicht gepaarten Elektronen. Hier sollen aufgrund der Komplexität der Methode nur einige grundlegende Prinzipien erläutert werden. Ausführliche Beschreibungen der Theorie und Anwendungen bei Metallproteinen finden sich in entsprechender Literatur (Palmer, 1983; Walker, 1999; Palmer, 2000; Walker, 2004 u. a.). EPR ist der bekannteren NMR (Nukleare

Magnetische Resonanz) -Spektroskopie sehr ähnlich. Beiden liegt die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit den magnetischen Momenten von Teilchen zugrunde. Im Falle von NMR sind dies Teilchen mit einem Kernspin, z. B. H^+ oder ^{13}C , im Falle von EPR sind dies Teilchen mit nicht gepaarten Elektronen, d. h. paramagnetische Teilchen mit einem Gesamtspin $S \neq 0$. Im Gegensatz dazu haben diamagnetische Teilchen einen Gesamtspin $S = 0$ und können nicht durch die EPR Technik erfasst werden.

In der Biologie wird die EPR-Technik zur Untersuchung von Molekülen mit Übergangsmetallionen der 3d- und 4d-Reihe eingesetzt, z. B. V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu oder Mo in verschiedenen Oxidationszuständen. Ferner können organische Radikale studiert werden, z. B. das Semichinon des Flavins oder intermediär auftretende Aminosäure- und Substrat-Radikale. Das in dieser Arbeit untersuchte Enzym RoxA ist ein Dihäm-Protein, es besitzt somit zwei Eisen-Zentren, in denen das Metallion in der Regel jeweils eine Koordinationszahl von sechs aufweist (Abb. 2.10 a). Das Porphyringrundgerüst liefert vier Stickstoffliganden, senkrecht zur Porphyrinebene stellt das Protein zwei weitere Haftstellen dem Metallion zur Verfügung, z. B. einen Methionin-Schwefel und einen Histidin-Stickstoff (2.10 c).

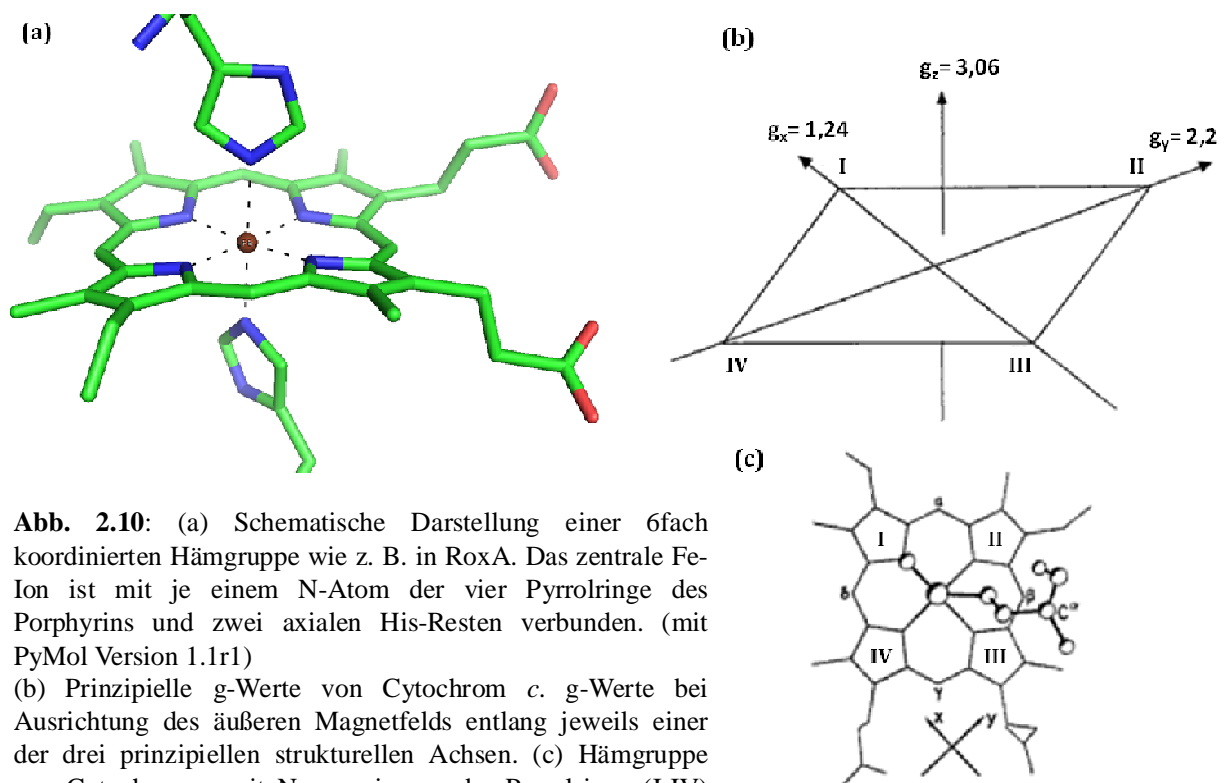


Abb. 2.10: (a) Schematische Darstellung einer 6fach koordinierten Hämgruppe wie z. B. in RoxA. Das zentrale Fe-Ion ist mit je einem N-Atom der vier Pyrrolringe des Porphyrins und zwei axialen His-Resten verbunden. (mit PyMol Version 1.1r1)

(b) Prinzipielle g-Werte von Cytochrom *c*. g-Werte bei Ausrichtung des äußeren Magnetfelds entlang jeweils einer der drei prinzipiellen strukturellen Achsen. (c) Hämgruppe von Cytochrom *c* mit Nummerierung der Pyrrolringe (I-IV) und Orientierung des axialen Methionins. ((b), (c) reproduced from: Palmer, G. (2000). Electron Paramagnetic Resonance of metalloproteins [p. 129, Fig. 2]: in Que. L. (Ed.): Physical methods in bioinorganic chemistry: spectroscopy and magnetism. with permission from University Science Books, Mill Valley, CA. All rights reserved).

Sind die Häm-Zentren wie im Falle von RoxA über Thioether-Brücken kovalent mit dem Protein verknüpft, spricht man auch von einem *c*-Typ Cytochrom. Das Eisen wechselt bevorzugt zwischen den Oxidationszuständen Fe(III) oder Fe(II). Letzterer Zustand ist in der Regel diamagnetisch, d. h. die sechs 3d-Elektronen sind allesamt gepaart. Im Fe(III) hingegen unterscheidet man ein *low-spin* Fe(III) mit $S = 1/2$ (ein ungepaartes Elektron) und ein *high-spin* Fe(III) mit $S = 5/2$ (fünf ungepaarte Elektronen) (Abb. 2.11). Beide Zustände zeigen charakteristische EPR Spektren.

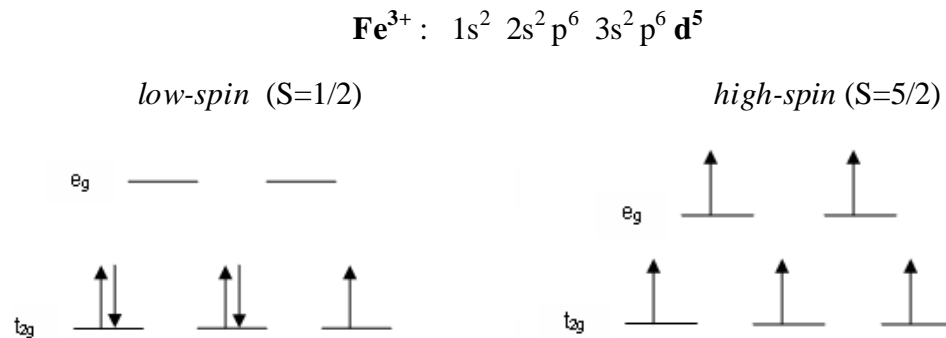


Abb. 2.11: Elektronenverteilung im äußeren d-Orbital des Fe^{3+} -Ions im *low-spin*- und *high-spin*-Zustand.

Jedes ungepaarte Elektron besitzt ein magnetisches Moment (μ), das mit seinem Elektronenspin ($s = \text{Eigendrehimpuls}$) verknüpft ist. Dieses lässt sich durch EPR bestimmen. Nach der Quantentheorie besitzt ein Elektron in einem äußeren Magnetfeld zwei mögliche Spinzustände, $m_s = +1/2$ (antiparallel) und $m_s = -1/2$ (parallel), die sich im Magnetfeld durch Resonanzabsorption eingestrahelter Mikrowellenenergie aufspalten (Zeeman-Effekt, Abb. 2.12).

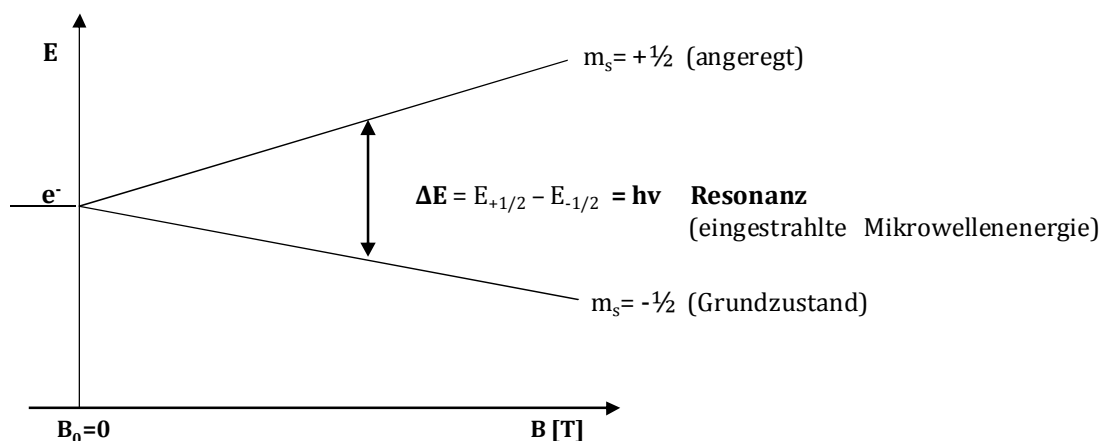


Abb. 2.12: Zeeman-Effekt: Einfaches Energie-Level-Schema für ein Elektron als Funktion des angelegten magnetischen Feldes B ; m_s : Spinzustand; e^- : Elektron.

Man hält in der Regel die Mikrowellenfrequenz ν konstant (X-Band = 9–10 GHz) und variiert die Magnetfeldstärke (z. B. zwischen 0 und 10.000 G = 1 T) zur Bestimmung der Resonanz-Bedingung. Wenn die Energiedifferenz zwischen angeregtem Zustand und Grundzustand ΔE der eingestrahlten Mikrowellenenergie $h\nu$ entspricht, kommt es zur Resonanz-Absorption. Diese wird in einen Strom übersetzt und am Monitor als 1. Ableitung der Absorption sichtbar (s. Abb. 2.13). Man unterscheidet verschiedene Frequenzbänder, je nach der Frequenz des Mikrowellenoszillators (W-Band, 95 GHz; Q-Band, 35 GHz; X-Band, 9–10 GHz; S-Band, 2–3 GHz; L-Band, 1–1,5 GHz). Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden im X-Band-Modus bei ca. 9,5 GHz durchgeführt.

EPR-Signale werden anhand des g-Faktors (g-Wert, Landé-Faktor) verglichen. Dieser ist ein Maß für das effektive magnetische Moment des Elektrons, das sich aus dem Eigendrehimpuls (Spin) und dem Bahndrehimpuls zusammensetzt. Der g-Wert ist dimensionslos und wird wie folgt angegeben:

$$h\nu = g \mu_B B \quad \leftrightarrow \quad g = h\nu / \mu_B B$$

h: Planck'sches Wirkungsquantum = $6,626 \times 10^{-34}$ Js

ν : Frequenz der Mikrowellenstrahlung [s^{-1}]

μ_B : Bohr-Magneton = $9,274 \times 10^{-24}$ JT $^{-1}$

B: magnetische Feldstärke [T]

g: effektiver g-Wert des Elektrons

Der Wert von g kann durch Kenntnis der eingestellten Frequenz ν und Messung der Magnetfeldstärke B, bei welcher das Signal auftritt, bestimmt werden und gibt direkten Aufschluss über den Zustand des Elektrons. Der g-Wert des freien Elektrons ist 2,0023.

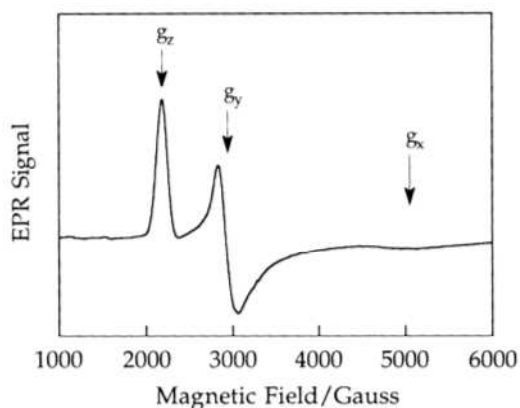


Abb. 2.13:

Das EPR-Spektrum von Cytochrom *c* im Fe(II)-*low-spin*-Zustand. Es liefert ein rhombisches Signal mit unterscheidbaren g_x , g_y - und g_z -Komponenten. (aus: [9])

Je nach Orientierung des magnetischen Moments eines Elektrons zum äußeren magnetischen Feld gibt es vier Grenzfälle (Abb. 2.14). Ist $g_x = g_y = g_z$ (Kugel) ist das magnetische Moment unabhängig von dessen Orientierung, es heißt *isotropisch* und liefert ein symmetrisches

Signal. Ist das magnetische Moment abhängig von dessen Orientierung im äußeren Magnetfeld, heißt es *anisotropisch*. In diesem Fall spaltet sich das Signal in bis zu drei g-Werte auf, entsprechend den Achsen eines kartesischen Koordinatensystems.

Wenn $g_x = g_y \neq g_z$ entstehen axiale Signale. Ist $g_x = g_y < g_z$ (Ellipse), ergibt sich ein kleineres Signal bei niedrigem Feld (von g_z) und ein größeres bei hohem Feld (von $g_x + g_y$). Bei axialen Signalen bezeichnet man diesen gemeinsamen g-Wert als g_{\perp} (g senkrecht), den einzelnen als g_{\parallel} (g parallel). Ist $g_x = g_y > g_z$ (Diskus), resultiert ein schwächeres Signal bei hohem Feld (von g_z), g_{\parallel} , und ein stärkeres bei niedrigem Feld (von $g_x + g_y$), g_{\perp} . Von einem rhombischen Signal spricht man, wenn $g_x \neq g_y \neq g_z$. In diesem Fall zeigt das Spektrum drei einzelne Signale, die den drei g-Wert-Komponenten zugewiesen werden: g_z bei niedrigem Feld, g_y bei mittlerem und g_x bei hohem Feld (Abb. 2.14; 2.13) (Palmer, 2000).

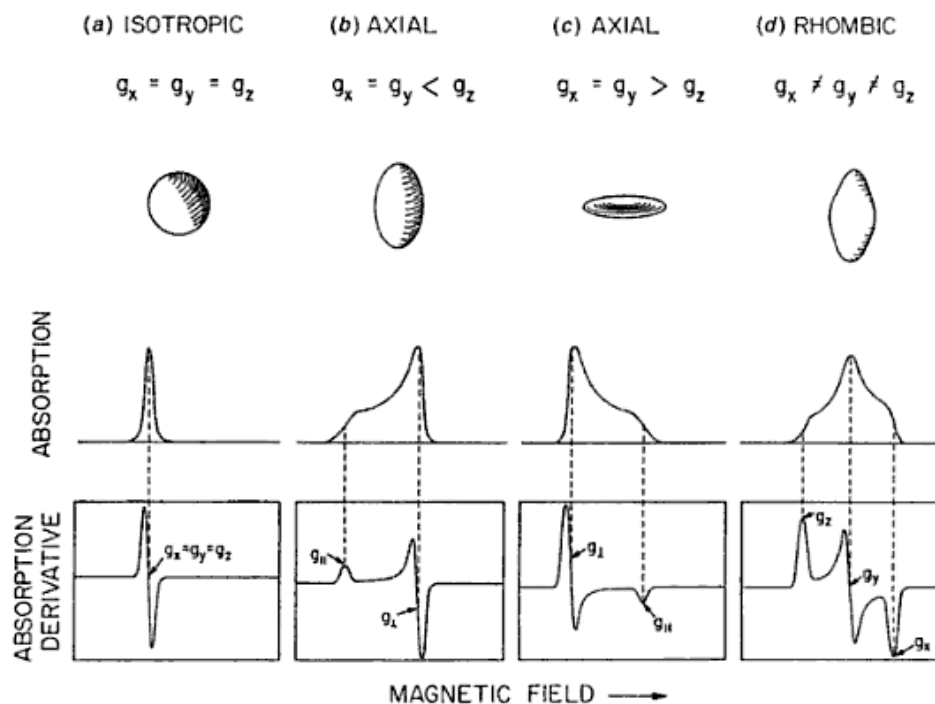


Abb. 2.14: Schematische Darstellung der möglichen Fälle der Zusammensetzung des g-Wertes, isotropisch, axial und rhombisch (reproduced from: Palmer, G. (2000). Electron Paramagnetic Resonance of metalloproteins [p. 132, Fig. 4]: in Que. L. (Ed.): Physical methods in bioinorganic chemistry: spectroscopy and magnetism. with permission from University Science Books, Mill Valley, CA. All rights reserved) und der jeweils zugehörigen EPR-Signale bezüglich Absorption (gemessen) und deren 1. Ableitung (EPR-Signal). Die "positiven" und "negativen" Peakflächen der EPR-Signale (in der Abb. unten) sollten in der Summe stets Null ergeben. Erläuterungen zu den einzelnen Fällen isotropisch, axial und rhombisch finden sich weiter oben im Text.

X-Band EPR-Spektren (*perpendicular mode*) wurden mit einem Bruker Elexsys E500 EPR-Spektrometer mit einer ER 049 X Mikrowellenbrücke aufgenommen. Das System war mit einem Oxford Instruments ESR 900 Helium Cryostaten unter Kontrolle eines ITC 503 Temperature Device ausgestattet (Uni Konstanz). Die Messungen wurden mit einer Bruker

4122 SHQE Cavity bei einer Mikrowellenfrequenz von ca. 9,38 GHz in 4 mm Quarzröhrchen (705-PQ-9.50, Wilmad) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 250–300 μl .

Desweiteren wurden Messungen mit einem EMX EPR Spektrometer (Bruker) mit einer Mikrowellenbrücke ER 041 XG (X-Band) und EMX 048 T Microwave Controller, EMX 032 T Field Controller und 033 M Field Frequency Lock und einem EMX 081 Elektromagneten durchgeführt (Physikalische Chemie, Uni Stuttgart). Die Proben wurden in 3 mm EPR-Quarzröhrchen (Rototech Spintech GmbH, Griesheim) gemessen. Die Modulationsfrequenz lag bei 100 kHz, die Modulationsamplitude in der Regel bei 1 mT (10 G). Es wurden Messungen zwischen 4 und 70 K vorgenommen, die Standard-Messtemperatur war 10 K. Häufig wurden die in Tab. 2.14 angegebenen Messparameter verwendet.

Tab. 2.14: Standard-Einstellungen für die EPR-Messung

| | |
|---------------------|--------------|
| Center [G] | 3250 |
| Width [G] | 5000 |
| Power [mW] | 10 |
| Modulation [G] | 10 |
| #Scans | 2 - 8 |
| Temperatur [K] | 10 |
| Gain | 10^5 |
| Frequenz [GHz] | 9,45 |
| Time Const. [msec.] | 81,9 - 163,8 |

2.13 Chemikalien

Tab. 2.15: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

| Firma (Sitz) | Chemikalien / Reagenzien |
|---------------------------------|--|
| Bergk GmbH (Frankfurt) | Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren)-Latex ["high-ammonia"] |
| BioRad (München) | Precision Plus Protein TM Standard All Blue, 10-250 kDa |
| Boehringer (Ingelheim) | Katalase |
| Fermentas (St. Leon-Rot) | Gene Ruler TM DNA Ladder -Mix; Restriktionsenzyme |
| Fluka (Taufkirchen) | Ammoniumchlorid, Calciumchlorid, Chloramphenicol, Kupferchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Na-Dithionit, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Xylencyanol, Zinksulfat, α -Tocopherol, Imidazol, 2,6-Di-O-Methyl- β -Cyclodextrin, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) |

| | |
|--|--|
| Genaxxon Bioscience (Biberach) | Taq-Polymerase, Polymerasepuffer, dNTPs |
| Invitrogen (Karlsruhe) | Agarose |
| Malaysian Rubber Board (Kuala Lumpur, Malaysia) | Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren)-Latex (NR) |
| Merck (Darmstadt) | Calciumchlorid, Eisen-Ammoniumcitrat, Ferricyanid (K-Hexacyanoferrat (III)), Hefeextrakt, Na-Azid, K-Permanganat, K-Fluorid, Pyrazin, Dimethylpyrazol, Pyrrol, Pyrrolidin, 1-Methylimidazol, 2-Methylimidazol, 1,2-Dimethylimidazol, 4-Methylpyrimidin, 2,5-Dimethylpyrazin, 2-Methylpyrazin, 2-Methylpyridin |
| PSS (Polymer Standards Service) (Mainz) | Oligo-/ Polyisoprenstandards |
| Roth (Karlsruhe) | Agar-Agar, Ampicillin, APS, Borsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Dimethylformamid, Dinatriumcarbonat, DMSO, EDTA, Essigsäure, Essigsäureethylester, Ethanol, Glycerin, HEPES, Hefeextrakt, Isopropanol, Kanamycinsulfat, Formaldehyd, NBT, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, Skim Milk (Magermilchpulver), Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natrium-Gluconat, Natriumhydroxid, Phenol, Rhamnose, Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid), Saccharose, Salzsäure (HCl), SDS, Tris, Trypton |
| Serva (Heidelberg) | BSA (Rinderserumalbumin), Ethidiumbromid, Horseradish Peroxidase (HRP); Cytochrom <i>c</i> (Pferdeherz) |
| Sigma / Aldrich (München) | APS (Ammoniumpersulfat), β -Mercaptoethanol, Cyanocobalamin, TMBZ, Linolsäure, Guaiacol, Pyrogallol, β -Carotin (type III), Squalen, Pristan, 1-Hydroxybenzotriazol, Hydrazin, Resorufin, Indigocarmin, Hämoglobin (bovine blood), Xanthin-Oxidase (buttermilk), Lipoxydase (type I B, soybean); Pyrazol, 2-Mercapto-1-Methylimidazol, 1-Methyl-2-Imidazol-Carboxaldehyd, 1,2,4-Triazol |
| TAKARA Bio inc (vertrieben durch Lonza Sales Office, Potsdam) | PrimeSTAR®-Polymerase, Polymerasepuffer, dNTPs |
| Weber & Schaer (Hamburg) | Poly(<i>cis</i> -1,4-isopren)-Latex ["high-ammonia"] |
| Riedel de Haen GmbH (Seelze) | Chinon |

2.14 Programme

Tab. 2.16: Verwendete Programme

| Anwendung | Programm / Website |
|-----------------------|--|
| DNA-Analyse | Clone Manager 7 |
| Oligonukleotid-Design | PrimerSelect (DNASTAR, Inc. Madison USA) |
| BLAST / Alignment | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST |
| Alignment | GENTle Vers. 1.9.4 (M. Manske, Universität Köln) |
| Signalsequenz-Suche | SignalP 3.0 Server: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ |
| Protein-Analyse | PyMol v0.99 (DeLano Scientific LLC, South San Francisco, CA, USA) |
| UV-Vis | Cary WinUV (Vers. 3.00; Varian, Darmstadt) |
| FPLC (ÄKTA-Purifier) | UNICORN 5.11 (GE-Healthcare) |
| HPLC | Chem Station for LC 3D systems Rev. B.01.03SR1 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) |
| CD-Spektroskopie | Spectra Manager (Jasco Inc., Gross-Umstadt) |

3 Ergebnisse

Teil I Überexpression und Reinigung von RoxA

3.1 Überexpression von RoxA

3.1.1 Heterologe Überexpression von RoxA in *E. coli*

Xanthomonas sp. 35Y zeigt insbesondere auf Latex-Mineralmedium ein langsames Wachstum, Kulturen auf Latex benötigen bis zu zwei Wochen bei 30°C bis zur Ernte des Kulturüberstandes. Hinzu kommt, das verbleibende Latex aus dem Kulturüberstand aufwändig entfernen zu müssen. Daher wurden Versuche unternommen, RoxA in einem schnell wachsenden, einfach zu handhabenden Organismus wie *E. coli* zu produzieren. Eine erfolgreiche Überexpression könnte zudem vergleichsweise einfach die Einbringung gezielter Mutationen in die DNA-Sequenz ermöglichen, um deren Auswirkung auf Aktivität bzw. Struktur zu untersuchen.

3.1.1.1 Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors

Zur Expression von *roxA* in *E. coli* wurde der Vektor pET11a::*roxA* konstruiert, der das *roxA*-Gen unter Kontrolle des T7-*lac*-Promotors trägt (Abb. 3.1). Zur Expression eines Zielproteins von pET11a wird ein *E. coli* (DE3)-Stamm benötigt, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase Gen enthält. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21(DE3) ausgewählt. In der Zelle initiiert die T7-RNA-Polymerase die Expression unter der Kontrolle des mit IPTG induzierbaren *lac*-Promotors. Zusätzlich wurde das Plasmid pEC86 mit einem zum pET-Vektor kompatiblen Replikon in BL21(DE3) transformiert. Das Plasmid pEC86 trägt die Cytochrom *c* Reifungsgene *ccmABCDEFGHIH* des Systems I aus *E. coli*. Die *ccm*-Gene sind zum Einbau der Hämgruppen in das Cytochrom-*c*-Apoenzym notwendig und werden in *E. coli* nur unter anaeroben Bedingungen abgelesen (Thöny-Meyer *et al.*, 1995; Tanapongpipat *et al.*, 1998). In pEC86 werden sie konstitutiv unter der Kontrolle des *tet*-Promotors exprimiert. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pACYC184 mit einem Chloramphenicol- und Tetrazyklin-Resistenzmarker zur Selektion (Arslan *et al.*, 1998). Vom Plasmid pUC18-DioxPst4, welches eine ca. 5,5 kb große, das *roxA*-Gen enthaltende, zusammenhängende DNA-Region aus dem *Xanthomonas* sp.-Genom trägt, wurde *roxA* durch PCR mit den Primern Diox-NdeI_f und Hind-Diox_r (Tab. 2.7) mit PWO-Polymerase amplifiziert. Nach Sequenzierung (MWG Biotech AG, Ebersberg) der entsprechenden Plasmid-Region wurde mit den Primern NdeI-roxA_f und roxA-HindIII_r (Tab. 2.7) das PCR-Produkt *NdeIroxAHindIII* (2056 bp) mit einer

*Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *Hind*III-Schnittstelle am 3'-Ende des Gens amplifiziert.

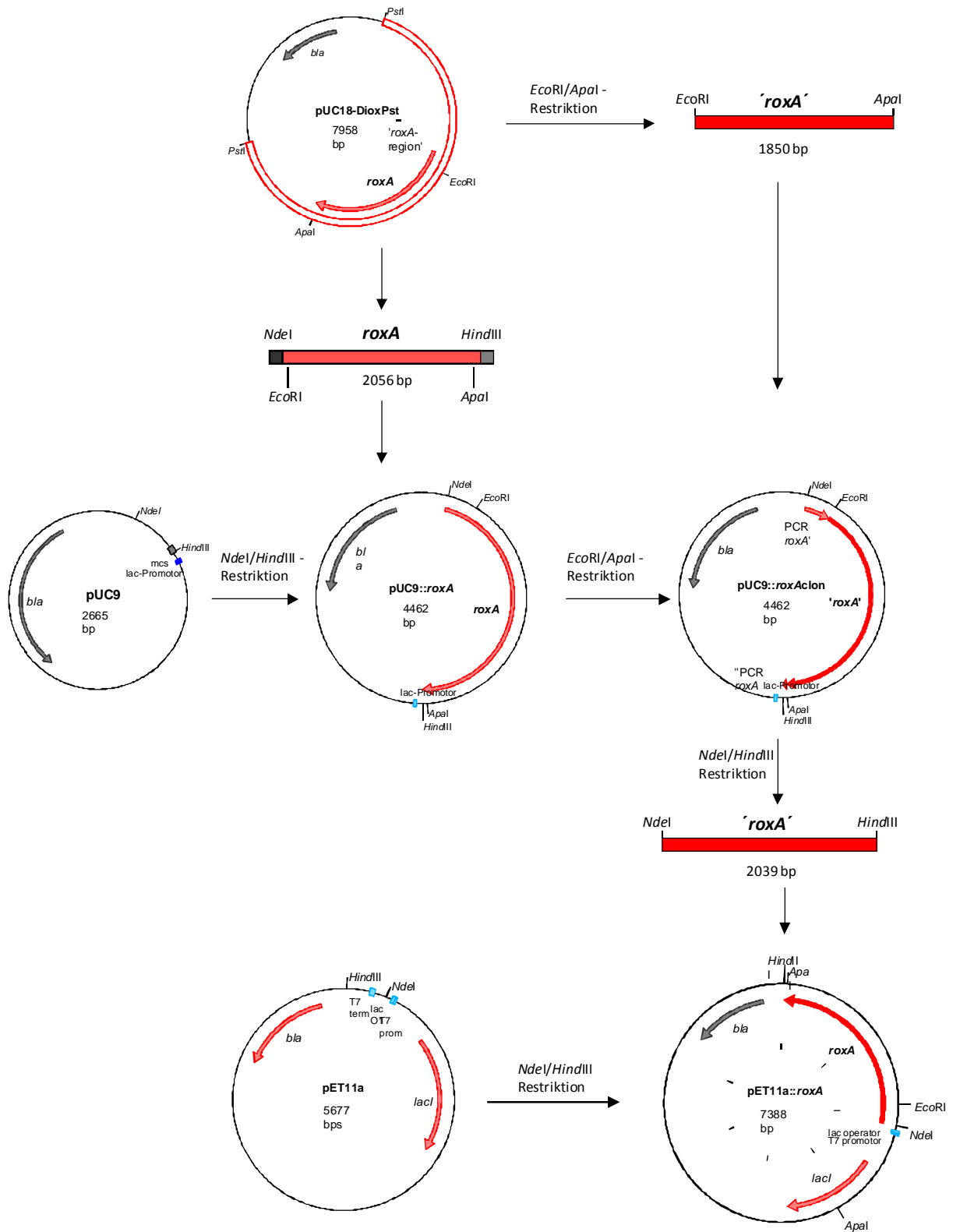


Abb. 3.1: Klonierungsstrategie zur Konstruktion des Plasmids pET11a::roxA (Erläuterungen s. Text)

Nach Restriktion wurde das PCR-Produkt mit dem entsprechenden *NdeI/HindIII*-Fragment des Plasmids pUC9 zum Vektor pUC9::*roxA* ligiert (Abb. 3.1). Als Selektionsstamm für die konstruierten Plasmide diente *E. coli* JM109.

Um das Risiko der Einführung von Mutationen durch die PCR-Reaktion zu minimieren, wurde ein möglichst großer Teil des *roxA*-Gens aus pUC9::*roxA* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ApaI* ausgeschnitten und gegen das entsprechende *roxA*-Fragment aus dem ebenfalls *EcoRI/ApaI*-verdauten pUC18-DioxPst4 ausgetauscht. Im nunmehr erhaltenen Plasmid pUC9::*roxA*clon wurde *roxA* durch Sequenzierung (MWG Biotech AG, Ebersberg) auf seine Richtigkeit überprüft. Es wurde außer einer stillen Mutation an Position 2025 der *roxA*-Sequenz (Konversion von ATC in ATT, beides Ile) keine Veränderung der *roxA*-Sequenz festgestellt. Es erfolgte die Klonierung des Gens in den Vektor pET11a. Nach *NdeI/HindIII*-Restriktion der Plasmide pUC9::*roxA*clon und pET11a und anschließender Ligation der entsprechenden Fragmente wurde der Expressionsvektor pET11a::*roxA* erhalten (Abb. 3.2), der das *RoxA*-Gen unter der Kontrolle des *T7lac* Promotors trägt. Das Plasmid wurde nach *E. coli* BL21(DE3) transformiert, bei welchem die Expression der T7-RNA-Polymerase, bei Anwesenheit des *lac*-Repressorgens *lacI* im Genom, der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lac*-Promotors unterliegt. Zudem fehlen dem Stamm BL21 die *lon*-Protease und die *ompT*-Protease der äußeren Membran, was die Stabilität einiger Zielproteine erhöhen kann (NOVAGEN pET-System Manual, 11th Edition). Die T7-Polymerase initiiert die Expression von *roxA* im Vektor pET11a::*roxA* bei gleichzeitiger Anwesenheit des Induktors IPTG.

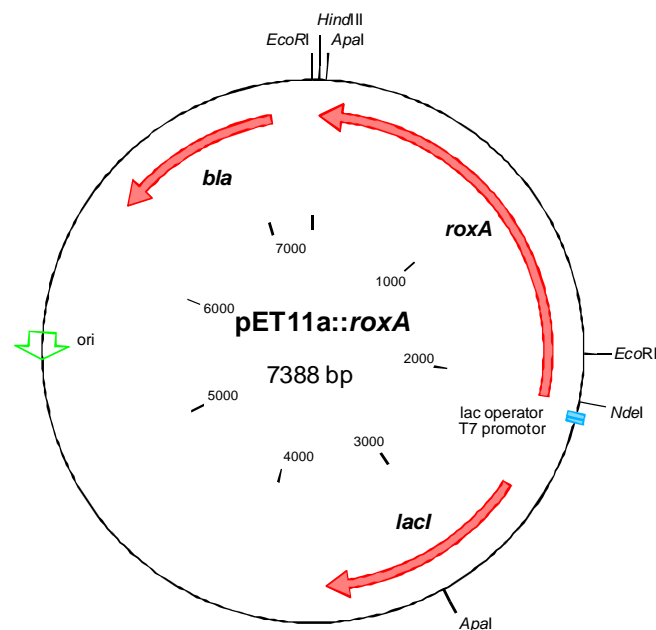


Abb. 3.2: Der Expressionsvektor pET11a::*roxA*: Gene sind durch rote Pfeile markiert, der T7 Promotor durch blaue Boxen, einige relevante Schnittstellen sind eingetragen.

3.1.1.2 Expression von RoxA in *E. coli* BL21(DE3)

Expressionsversuche wurden zunächst bei 37°C und 30°C in LB-Medium mit IPTG-Konzentrationen von 0,1 mM bis 1 mM unternommen. Nach Zugabe des Induktors wuchsen die Zellen nicht weiter, färbten sich im Vergleich zu den Kontrollstämmen BL21(DE3) und BL21(DE3)_pEC86 leicht rötlich. Bei keiner der Kulturen konnte im UV-Vis-Spektrum des Kulturüberstandes auch nach dessen Konzentrierung (Ultrafiltration) ein Absorptionsmaximum bei 406–418 nm registriert werden, wie es im *Xanthomonas*-Kulturüberstand nach RoxA-Expression zu finden ist. Auch durch SDS-PAGE (Silber- und Hämefärbung) wurde kein Hinweis auf eine RoxA-Expression gefunden.

Der Einbau der Hämgruppe erfolgt im Periplasma, so dass dort eine Lokalisierung des Proteins bei fehlender Sekretion in *E. coli* zu erwarten wäre. Daher wurde ein Periplasma-Aufschluss durch osmotische Lyse nach (Neu & Heppel, 1965) durchgeführt. Im optischen Spektrum waren nun klare Signale meist um 425 nm zu sehen. Dies deutete bereits darauf hin, dass es sich bei den entsprechenden Proteinen nicht um das gewünschte *c*-Typ-Cytochrom handelte. Beim Kontrollstamm BL21(DE3)_pEC86 ohne den *roxA*-Expressionsvektor zeigte sich ebenfalls ein solches Maximum in der gleichen Größenordnung. Zudem konnte bei den Konzentrierungsversuchen mit einer YM30-Membran mit Ausschluss unter 30 kDa keine Steigerung der Absorption im erwarteten Bereich beobachtet werden. Eine Konzentrierung des die *c*-Typ-Cytochrom typische Absorption bewirkenden Moleküls war allerdings mit einer YM10-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa möglich. Demnach stammte die Absorption offensichtlich von einem zwischen 10 und 30 kDa großen Protein und nicht von RoxA. Im Falle des RoxA-Expressionsstamms BL21(DE3)_pEC86_pET11a::*roxA* ließen sich jedoch teilweise die erhaltenen Absorptionsmaxima bei 425 nm durch YM30-Ultrafiltration geringfügig steigern. Dieser Effekt war umso deutlicher je geringer die eingesetzte IPTG-Konzentration war. Angesichts des zu erwartenden Absorptionsmaximums (ox.: 406nm, red.: 418nm) und ähnlichem Signal bei der Negativkontrolle kam es dabei zu einer Überlappung mit der Absorption weiterer Cytochrome.

Weitere Expressionsversuche von BL21(DE3)_pET11a::*roxA*_pEC86, und den Kontrollstämmen BL21(DE3)_pET11a::*roxA*, BL21(DE3)_pET11a und BL21(DE3)_pEC86 wurden in LB-Medium bei 30°C und Raumtemperatur mit 0,1 mM IPTG bzw. gänzlich ohne den Induktor über Nacht durchgeführt. Wiederum konnte im Kulturüberstand und im Periplasma kein RoxA nachgewiesen werden. Ein Zellaufschluss wurde mit einer French Press durchgeführt und zunächst ohne weitere Aufarbeitung mit SDS-PAGE analysiert. Dabei zeigte sich eine zusätzliche Bande in den Stämmen, die das *roxA*-Expressionsplasmid pET11a::*roxA* enthielten, sowohl mit als auch ohne den Induktor. Auch bei Abwesenheit von pEC86 war eine Bande zu beobachten, die aber weniger intensiv erschien (Abb. 3.3).

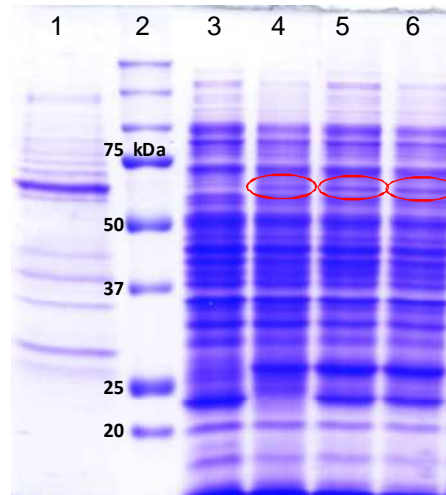


Abb. 3.3: Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE mit Zellaufschluss von *E. coli* BL21(DE3)_pEC86_pET11a::roxA und Kontrollstämmen: Spur 1: RoxA (angereinigt); 2: Marker; 3: BL21(DE3)_pEC86 (Kontrolle); 4: BL21(DE3)_pET11a::roxA; 5: BL21(DE3)_pEC86_pET11a::roxA -IPTG; 6: BL21(DE3)_pEC86_pET11a::roxA +IPTG. In Stämmen mit pET11a::roxA ist eine zusätzliche Bande auf Höhe von RoxA zu sehen (4, 5, 6). Die prominenten Banden um 23 kDa in Spur 3, 5 und 6 gehen wahrscheinlich auf die pEC86-codierte Chloramphenicol-Acetyltransferase zurück.

Dieser Befund zeigte die Produktion des RoxA-Polypeptids an. Um dessen Lokalisation in der *E. coli*-Zelle näher zu bestimmen, wurde der Zellaufschluss (French Press) aus weiteren Experimenten bei 30°C mittels zweier Ultrazentrifugationsschritten aufgetrennt, um zunächst die Zelltrümmer (15.000 g, 20 min) und anschließend Membranbestandteile vom löslichen Überstand (100.000 g, 60 min) zu scheiden. SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen machte deutlich, dass produziertes RoxA in der Membranfraktion vorlag, die sich im zweiten Zentrifugationsschritt absetzte, nicht jedoch im Pellet der unlöslichen Zellbestandteile oder im löslichen Überstand des Aufschlusses (Abb. 3.4 a). Offensichtlich war das Protein unter diesen Expressionsbedingungen nicht löslich. Banden auf Höhe von RoxA wurden wiederum bei allen Stämmen mit pET11a::roxA beobachtet. Die spezifische Hämfärbung lieferte schwache Signale in den Membranfraktionen des Stammes BL21(DE3)_pEC86_pET11a::roxA (Abb. 3.4 b), nicht aber in BL21(DE3)_pET11a::roxA ohne pEC86 mit den *ccm*-Genen. Da bei letzterem dennoch eine RoxA-typische Proteinbande zu sehen war, kann angenommen werden, dass die Produktion des RoxA-Polypeptids in *E. coli* von pET11a::roxA stattfand, der Hämeinbau aber nur bei Expression der *ccm*-Gene erfolgte. Im RoxA-Aktivitätstest ließ sich jedoch in keiner der Fraktionen Aktivität nachweisen.

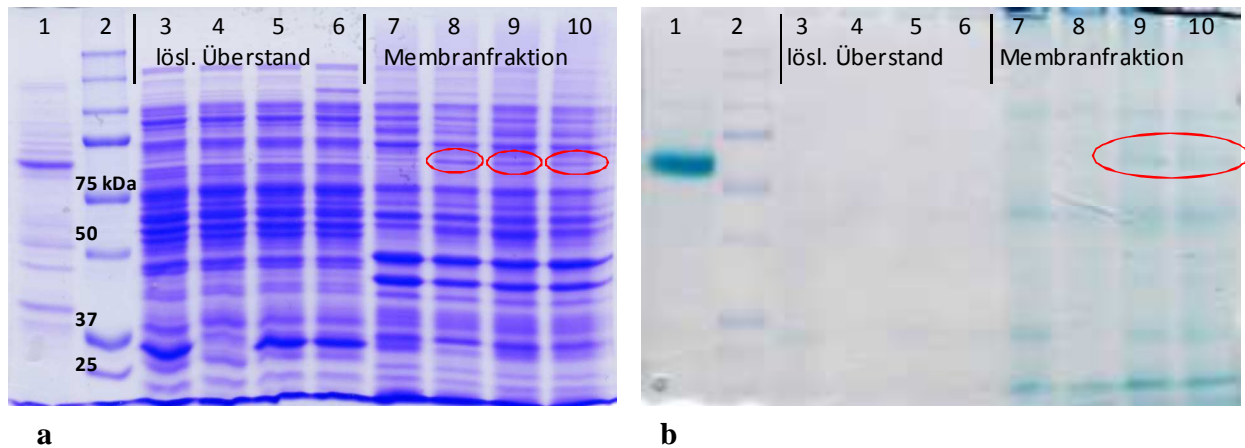


Abb. 3.4: SDS-PAGE mit Zellaufschluss-Fractionen der *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstämme: (a) Coomassie-Färbung, (b) Häm-Färbung. Spur 1: RoxA (angereinigt); 2: Marker; 3/7: BL21(DE3)-_pEC86; 4/8: BL21(DE3)-_pET11a::*roxA*; 5/9: BL21(DE3)-_pEC86_pET11a::*roxA* ohne IPTG; 6/10: BL21(DE3)-_pEC86_pET11a::*roxA* +IPTG. In Stämmen mit pET11a::*roxA* ist in der Membranfraktion eine zusätzliche Bande auf Höhe von RoxA zu sehen (a: 8, 9, 10), die im löslichen Überstand fehlt. Nach Häm-Färbung ist ein schwaches Häm-Signal RoxA zuzuordnen mit pET11a::*roxA* und pEC86 (b: 9,10). Die prominenten Banden um 23 kDa in Spur 3, 5 und 6 gehen wahrscheinlich auf die pEC86-codierte Chloramphenicol-Acetyltransferase zurück.

Weitere Versuche wurden bei niedrigerer Temperatur (16°C) und in Minimalmedium nach Schlegel mit Gluconat durchgeführt, erbrachten die gleichen Resultate. Das Protein war noch immer nicht löslich oder aktiv. Zudem waren die produzierten Mengen sehr gering, so dass vom Versuch, RoxA mithilfe von Detergenzien zu lösen, abgesehen wurde. Die *E. coli*-Stämme BL21(DE3)-_pET11a::*roxA* und BL21(DE3)-_pEC86_pET11a::*roxA* wuchsen auffallend langsamer als die Kontrollstämme BL21(DE3)-_pET11a und BL21(DE3)-_pEC86 und erreichten geringere Zelldichten. Die Hemmung des Wachstums war umso stärker, je höher die Konzentration des Induktors war bis hin zu einem vollständigen Wachstumsstopp (s. auch Birke, 2010). Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn auf die Zugabe von IPTG verzichtet wurde.

Trotz Anlehnung an bewährte Bedingungen zur Überexpression anderer di-Häm *c*-Typ Cytochrome, gelang es nicht, aktives RoxA zu exprimieren. Um Positivkontrollen für die Expressionsbedingungen zu erhalten, wurde der Stamm BL21(DE3)-_pEC86 zusätzlich mit jeweils einem von drei verschiedenen Plasmiden (AG Prof. O. Einsle, Freiburg) transformiert, die jeweils ein Gen für ein di-Häm *c*-Typ-Cytochrom aus *Geobacter sulfurreducens* tragen, *dhc2* (Heitmann & Einsle, 2005), *macA* (Butler *et al.*, 2004) und GSU2813 bzw. CcpA (Leang *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2009). Es wurden die drei Kontrollstämme *E. coli* BL21(DE3)-_pEC86_pET22b::*dhc2*, *E. coli* BL21(DE3)-_pEC86_pETSN22::*macA* und *E. coli* BL21(DE3)-_pEC86_pETSN22::*GSU2813* erhalten. Der Expressionsvektor pETSN22 basiert auf pET22b(+) und unterscheidet sich lediglich durch die Einführung einer Strep-Tag-Sequenz zusätzlich zur Sequenz für ein His-Tag. Um die Funktionalität der Vorgehensweise zu zeigen, wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)-_pEC86_pET22b::*dhc2* ausgewählt. Die

Expression des di-Häm *c*-Typ Cytochroms Dhc2 wurde im gleichen *E. coli* -Stamm und analog zur Vorgehensweise nach Heitmann & Einsle (2005) vorgenommen. Es wurde über Nacht bei 30°C in LB-Medium ohne die Zugabe des Induktors IPTG exprimiert. Die Überexpression von Dhc2 war unter den genannten Bedingungen möglich. Darauf wies bereits die rote Farbe des Zellaufschlusses im Vergleich zum Kontrollstamm BL21(DE3)_pEC86 hin. Das UV-Vis-Spektrum des löslichen Überstandes zeigte ein deutliches, *c*-Typ -Cytochrom ähnliches Spektrum. Da das Protein im Expressionsvektor pET22b::*dhc2* mit einem His-Tag versehen war, wurde die Reinigung des Proteins über eine Ni-Sepharose FF-Säule (HisTrap_1ml) durchgeführt. Dhc2 konnte erfolgreich gebunden und im Imidazol-Gradienten wieder eluiert werden.

Die oben genannten Befunde zeigten die Funktionalität des Verfahrens bei der Überexpression anderer Di-Häm-Cytochrome und gleichermaßen, angesichts der Schwierigkeiten der Expression von funktionellem RoxA, dass diese in *E. coli* nicht ohne Weiteres möglich ist. Weiter führende Versuche der heterologen Überexpression wurden im Rahmen von Diplomarbeiten mit *E. coli* Rosetta, JM109 und S17-1 (Birke, 2010) unternommen. Diese blieben, ebenso wie Versuche mit *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida* KT2440 (Fahrbach, 2007) und dem Gram-positiven *Bacillus subtilis* WB800 (Birke, 2010) weitgehend erfolglos. Auch eine Expression in *E. coli* JM109 von den Cosmiden Supercos1-a1 und -e-2 (Oiki, 2004), die eine etwa 20 kb große, *roxA* enthaltende Region aus dem *Xanthomonas*-Genom tragen und ein mögliches Operon enthalten könnten, gelang nicht (Hamsch, 2008).

3.1.2 Homologe Überexpression von RoxA in *Xanthomonas* sp. 35 Y

Die heterologe Überexpression von RoxA gelang trotz Verwendung in verschiedenen Expressionssystemen in verschiedenen Organismen nicht. Als problematisch dabei muss der Einbau der Hämgruppen und Export des extrazellulären Enzyms angesehen werden, aber auch eine notwendige Beteiligung von zusätzlichen, spezifischen Proteinen bei der Reifung von RoxA in *Xanthomonas* sp. 35Y und dem Transport zum Bestimmungsort musste bedacht werden. Daher wurden Versuche unternommen, das Kautschuk spaltende Cytochrom im eigentlichen Wirtstamm homolog zu exprimieren.

Bis zu diesem Zeitpunkt lagen nur wenige Erfahrungen im molekularbiologischen Arbeiten mit *Xanthomonas* sp. 35Y vor. Doch konnte bereits gezeigt werden, dass der "broad host-range"-Vektor pBBR1MCS-2 mit einer Kanamycin-Resistenz zur Selektion und einem RK2-Replikon (Kovach, 1995) in diesem Stamm erfolgreich replizieren konnte (Kerkhoff, 2001), was mit pMB1/ColE1 -Replika bei pUC- oder pET-Vektoren nicht möglich war. Es wurde für eine homologe Expression von RoxA das auf pBBR1MCS-2 basierende Plasmid p4782.1 (J. Altenbuchner, pers. Referenz) ausgewählt, welches zusätzlich ein Rhamnose-

Expressionssystem (*rhaR*, *rhaS*, *rhaP*) trägt. Das *roxA*-Gen wurde in diesen Vektor kloniert unter Kontrolle eines mit Rhamnose induzierbaren Promotors (Fahrbach, 2007). Nachdem zunächst nach Transformation des Expressionsplasmides p4782.1::*roxA* in *Xanthomonas* sp. keine RoxA-Expression nachgewiesen werden konnte, gelang dies schließlich nach erneuter Transformation und wiederholter Kultivierung des Expressionsstammes *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* in Tsuchii & Takeda -Minimalmedium (Hamsch, 2008). Entgegen der anfänglichen Vermutung, dass für eine erfolgreiche Expression weitere Proteine notwendig seien, welche ebenso wie RoxA nur bei Anwesenheit des polymeren Substrates bzw. als Induktor fungierender Spaltprodukte gebildet würden, ließ sich die Dioxygenase durch Rhamnose-Induktion ohne die Anwesenheit von Latex oder isoliertem ODTD funktionell exprimieren. Nachdem die bisherigen Expressionsversuche in Minimalmedium mit 0,4 % Gluconat und Induktion mit 0,2 % Rhamnose durchgeführt worden waren, gelang eine erfolgreiche Expression von RoxA aus *Xanthomonas* sp. p4782.1::*roxA* ebenso in Vollmedium (NB und LB) nach Induktion mit 0,1 % Rhamnose mit deutlich höheren Ausbeuten, die auch diejenigen aus Latexkultur von *Xanthomonas* sp. 35Y überstiegen (Kap. 3.2.3).

Der Expressionsstamm besitzt noch eine chromosomale *roxA*-Kopie. Eine Expression vom natürlichen Promotor kann in diesem System jedoch ausgeschlossen werden. Wie bereits mehrfach gezeigt wurde wird die Rubber Oxygenase bei Abwesenheit des eigentlichen Substrates nicht bzw. in nicht nachweisbarer Menge exprimiert (Kerkhoff, 2001; Braaz *et al.*, 2004). Die Möglichkeit der Expression von rekombinantem RoxA in NB- oder LB-Medium besitzt zudem den Vorteil, dass die Expression über den natürlichen Promotor in Vollmedium offenbar unterdrückt ist (s. Kap. 3.4.2). Zudem ließ sich eine nennenswerte Expression in *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* erst nach Induktion durch Rhamnose erkennen. Möglich ist jedoch die homologe Rekombination zwischen den *roxA*-Kopien im Genom und dem Plasmid bzw. eine Integration des Plasmids ins Chromosom. Bleibt eine Integration des Vektors mit dem unveränderten Wildtyp-Gen zwar ohne Auswirkung auf die Nukleotidsequenz von *roxA*, kann eine verlässliche Expression von mutierten Enzymvarianten nur dann erfolgen, wenn ein Austausch mit intakten Sequenzen der chromosomalen Wildtyp-Kopie auszuschließen ist. Zu diesem Zweck ist die Konstruktion einer *roxA*-Negativmutante durch das vollständige Entfernen von *roxA* aus dem Chromosom vorgesehen. Zwar gelang die Transformation von p4782.1::*roxA* in eine bereits vorhandene *roxA*-Negativmutante, doch da die Inaktivierung des Gens durch Insertion des Kanamycin-Resistenzgens *aph* erfolgte (Hamsch, 2008), stehen auch in diesem System homologe Sequenzen zur Integration des Vektors in den chromosomalen Genlokus zur Verfügung.

3.2 Expression und Reinigung von RoxA

3.2.1 Kultivierung von *Xanthomonas* sp. 35Y

Die Kultivierung des *Xanthomonas*-Wildstammes zur Expression der Rubber Oxygenase wurde bei Anwesenheit des Substrates Poly(*cis*-1,4-isopren) in Zellkulturflaschen vorgenommen (Abb. 3.5) wie im Methodenteil beschrieben (Kap. 2.8.1). Dies gewährleistete ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, da sich die Kultivierung in Schüttelkolben wegen der raschen Aggregation eines Großteils der vorhandenen Latex als nicht geeignet erwies. Aufgrund des hohen Aufwandes, nach der Kultivierung verbliebene Latex aus dem Kulturüberstand zu entfernen, wurde mit einer hinreichenden, doch möglichst niedrigen Latexmenge gearbeitet. Durch Erhöhung des Latexanteils im Medium im Bereich von 0,02 bis 0,12 % konnte keine proportionale Steigerung der Zellmasse oder des Absorptionsmaximums nach Filtration beobachtet werden. Mit SDS-PAGE zeigte sich eine erhöhte RoxA-Menge pro Kulturvolumen bei höheren Latexkonzentrationen. Dabei erhöhte sich aber auch die Gesamtproteinmenge, d. h. das Verhältnis der Proteine zueinander schien kaum verändert. *Xanthomonas*-Kultivierungen wurden in der Regel mit 0,03–0,04 % Latex vorgenommen. Nach einwöchiger Inkubation stellte RoxA im filtrierten Kulturüberstand stets das vorherrschende Protein dar.

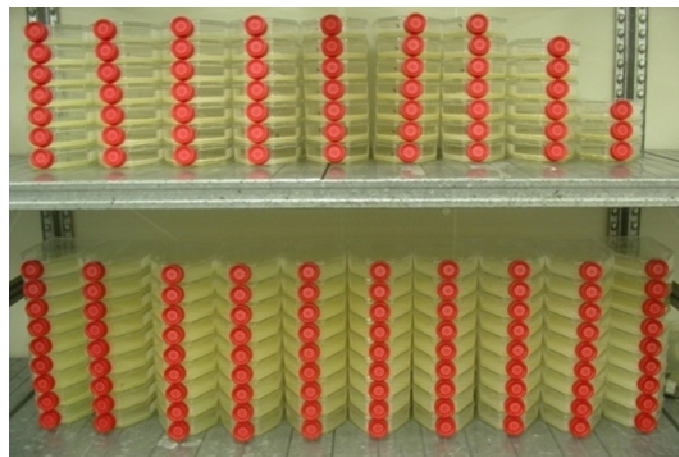


Abb. 3.5: Kultivierung von 14 L *Xanthomonas* sp. 35Y in Minimalmedium mit 0,05 % Latex in 650 ml -Zellkulturflaschen.

Die Kultivierung von *Xanthomonas* sp. 35Y auf verschiedenen C-Quellen (Citrat, Fructose, Glucose, Gluconat, Lactat, Sorbitol) bei gleichzeitiger Anwesenheit von Latex bewirkte keinerlei Hemmung der RoxA-Expression durch die Verfügbarkeit der besser verwertbaren C-Quellen. Eine Untersuchung der RoxA-Expression bei Anwesenheit dieser C-Quellen und Latex hatte eine vergleichbare RoxA-Produktion auf allen getesteten C-Quellen aufgezeigt.

Die Bildung von Aufklärungshöfen auf Latex-Agar mit zusätzlicher C-Quelle zeigte ebenso, dass für die RoxA-Expression mit den untersuchten C-Quellen offenbar keine Katabolitrepression existiert (Fahrbach, 2007).

Daher wurden Kultivierungsversuche von *Xanthomonas* in Minimalmedium (MM) mit Latex und Gluconat durchgeführt, die darauf abzielten, durch das Erreichen einer höheren Zelldichte die produzierte RoxA-Menge pro Kulturvolumen zu steigern. *Xanthomonas* wurde mit Minimalmedium ohne C-Quelle bzw. mit Zugabe von Gluconat-Konzentrationen bis 0,4 %, jeweils mit verschiedenen Latex-Konzentrationen und zur Kontrolle ohne Latex vorgenommen. In allen Ansätzen mit Latex war eine RoxA-Expression nachzuweisen im Gegensatz zu den Kontrollen ohne das RoxA-Substrat. Dies zeigte, dass RoxA nur bei Anwesenheit von Latex synthetisiert wird. In den Ansätzen mit Gluconat bei gleichzeitiger Anwesenheit von Latex wurde ein signifikant erhöhter ODTD-Peak erhalten im Vergleich zu den Kontrollen ohne Gluconat, am deutlichsten mit 0,2 % Gluconat (Abb. 3.6).

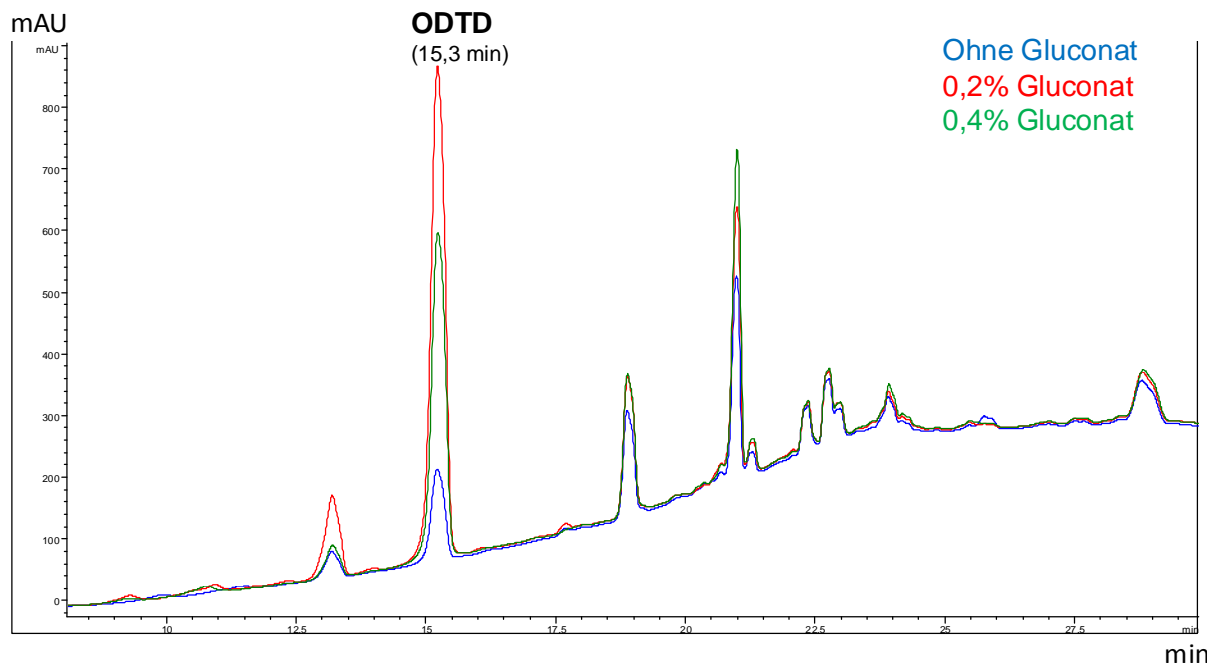


Abb. 3.6: HPLC-Chromatogramm mit RP-8-Säule (Gradient 50–100% Methanol, Flussrate 0,7 ml/min) von RoxA-Aktivitätstests: Eingesetzt wurden gleiche Volumina des unkonzentrierten Kulturüberstandes aus einer *Xanthomonas*-Kultur in Minimalmedium mit 0,1 % Latex ohne Gluconat und bei Anwesenheit von 0,2 % bzw. 0,4 % Gluconat. Die ODTD-Peakfläche bei 15,3 min entspricht der RoxA-Aktivität der Kulturüberstände nach ÜN-Inkubation. Es zeigt sich eine signifikant höhere ODTD-Menge in Ansätzen mit Latex und Gluconat.

Weniger deutlich waren die mittels SDS-PAGE oder bezüglich des Absorptionsmaximums bei 407 nm im UV-Vis-Spektrum beobachteten Unterschiede. Aus Latex-Kulturen mit Gluconat gelang die Reinigung einer mindestens zwei- bis dreifachen RoxA-Menge aus gleichem Kulturvolumen.

Diese Befunde offenbarten somit die Möglichkeit, die RoxA-Menge pro Kulturvolumen zu steigern, ohne zusätzliches Latex aufwenden zu müssen. Generell wirkte also die Zugabe einer zusätzlichen C-Quelle zu Poly(*cis*-1,4-isopren) auf die RoxA-Expression nicht hemmend, sondern sogar expressionssteigernd. Kultivierungen von *Xanthomonas* sp. 35Y zur Reinigung von RoxA wurden fortan mit in Tsuchii- & Takeda -Minimalmedium mit Zugabe von zunächst 0,2 % Gluconat statt 0,05 % Hefeextrakt durchgeführt.

3.2.2 Chromatographische Reinigung von RoxA aus dem Wildtyp

Die Reinigung der Rubber Oxygenase aus dem *Xanthomonas*-Kulturüberstand stellt eine unverzichtbare Voraussetzung dar für eine folgende biochemische bzw. spektroskopische Untersuchung dieses Kautschuk abbauenden Enzyms. Eine für die Reinigung bei 4°C verwendete Reinigungsvorschrift nach R. Braaz (2004, 2005a) ließ sich aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes bei Raumtemperatur (RT) nicht mit dem gewünschten Erfolg anwenden. Daher wurde ein neues Reinigungsprotokoll entwickelt unter Vermeidung extremer pH-Werte im Puffer wie Diaminopropan bei pH 10,5 (Schmitt *et al.*, 2010). Mit diesem hatte bei RT eine nahezu irreversible Bindung von RoxA an das Säulenmaterial stattgefunden.

Wie unter Material und Methoden beschrieben wurde eine meist zweistufige Reinigungsstrategie mit dem Anionenaustauscher Q-Sepharose FF angewandt unter Verwendung des gleichen Puffers (20 mM Tris/HCl) bei unterschiedlichem pH-Wert. Diese Vorgehensweise machte sich die von hohen pH-Werten bis zum isoelektrischen Punkt um pH 7,5 hin abnehmende Interaktionsstärke von RoxA mit dem Säulenmaterial zunutze. Bei einem pH-Wert von etwa 8,2–8,5 konnte RoxA schwach an Q-Sepharose gebunden werden. Viele nicht-bindende, sowie stark bindende Proteine wurden bei Verwendung dieses pH-Werts als erstem Schritt abgetrennt. Das mit SDS-PAGE dokumentierte Ergebnis eines ersten Reinigungsschrittes von RoxA aus Latexkultur über eine Q-Sepharose 26/08-Säule bei pH 8,2 zeigt Abb. 3.7 mit Silber- und spezifischer Hämfärbung. In dieser Abbildung unten sind einzelne der auf dem Gel aufgetragenen Fraktionen des konzentrierten und filtrierten Kulturüberstandes zu sehen. Dabei erscheinen die teilgereinigten RoxA-Fraktionen (Abb. 3.7.) und bereits das an das Säulenmaterial gebundene RoxA rötlich (Abb. 3.8).

Ein zweiter Reinigungsschritt bei pH 7,7 erbrachte weiteren Reinigungserfolg. Die meisten verbliebenen Proteine konnten noch an das Säulenmaterial binden, während RoxA nicht oder kaum noch interagiert und somit im Durchlauf vorlag. Der Übergang zwischen Bindung und fehlender Interaktion verlief aufgrund der Schwächung der Bindungseigenschaften mit sinkendem pH-Wert jedoch fließend. Zum Erreichen der vollständigen Bindung des in einer Probe befindlichen RoxA war es daher wichtig, das Auftragevolumen unter dem des Säulenvolumens zu halten, um eine langsame "Auswaschung" von schwach gebundenem RoxA zu vermeiden.

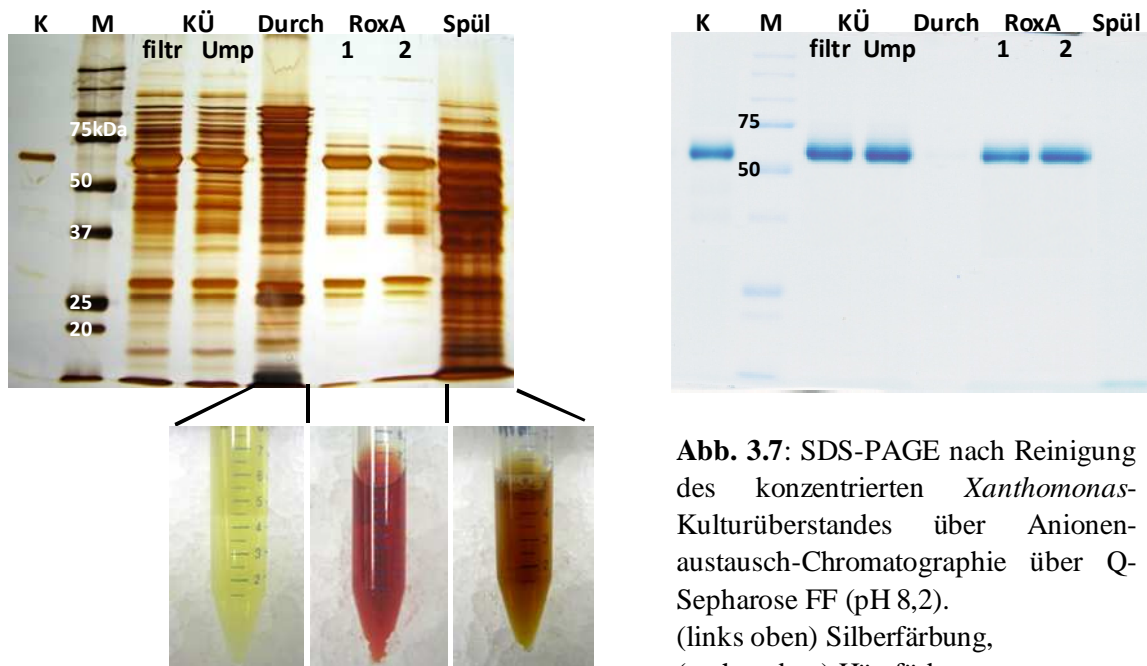


Abb. 3.7: SDS-PAGE nach Reinigung des konzentrierten *Xanthomonas*-Kulturüberstandes über Anionenaustausch-Chromatographie über Q-Sepharose FF (pH 8,2). (links oben) Silberfärbung, (rechts oben) Hämefärbung,

(unten) entsprechende auf dem Gel zugewiesene Fraktionen in Falcon-Röhrchen; RoxA-Fractionen nach Konzentrierung. K: Kontrolle (RoxA), M: Marker, KÜ: Kulturüberstand, filtr: 0,45 μm filtriert, Ump: Umpufferung (Gelfiltration), Durch: Säulendurchlauf, Spül: Waschschrift bei 1 M NaCl

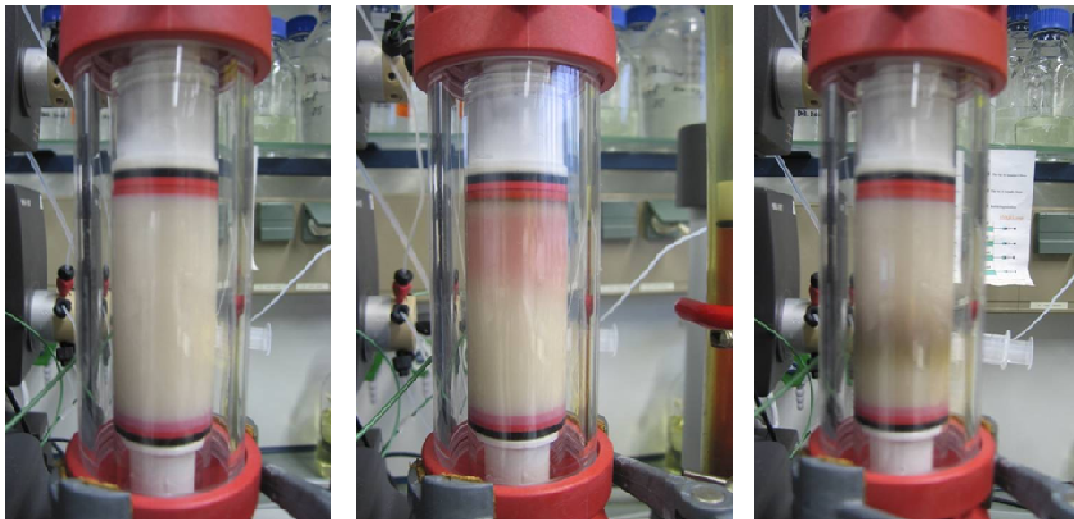


Abb. 3.8: Anionenaustausch-Chromatographie von konzentriertem *Xanthomonas*-Kulturüberstand aus Latexkultur: (links) Q-Sepharose_{26/08}-Säule vor dem Auftragen; (mitte) während des Auftragens, die rötliche Farbe stammt von gebundenem RoxA; (rechts) nach Elution von RoxA eluieren stark gebundene Substanzen mit 1 M NaCl.

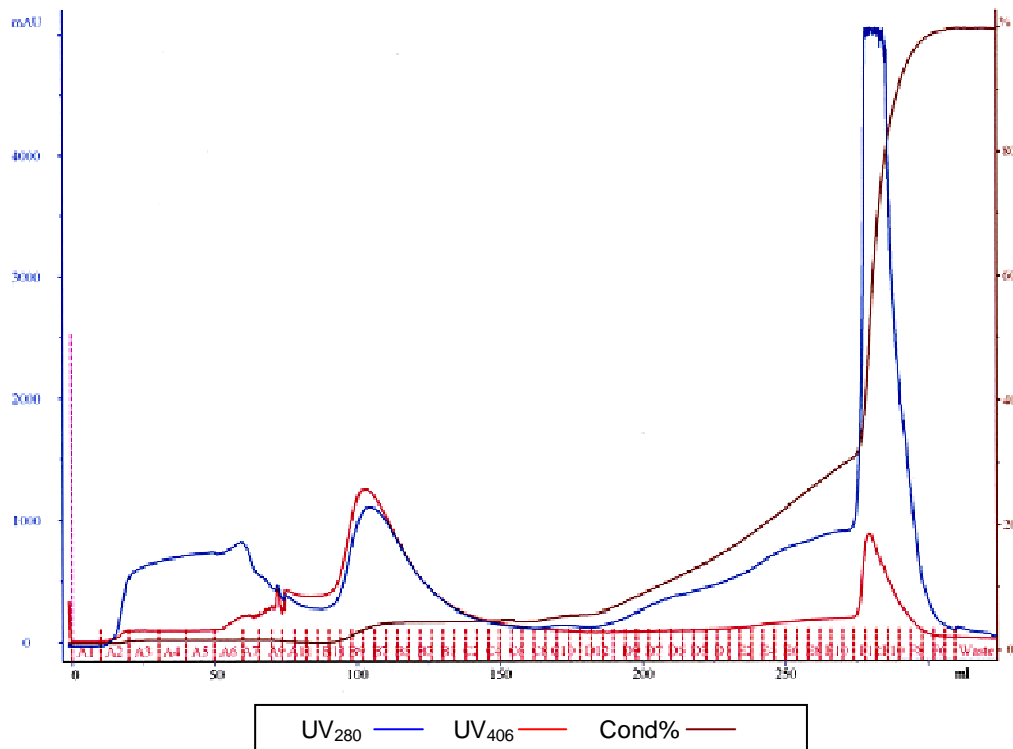


Abb. 3.9: Chromatogramm eines Anionenaustausch-Chromatographie-Laufes mit einer Q-Sepharose-FF_26/06 -Säule: Laufpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0. Stufenelution bei 50 mM NaCl, Gradient bis 300 mM und Waschschrift mit 1 M NaCl. RoxA eluiert früh im Gradient auf einer Stufe bei ca. 50 mM NaCl und enthält wenige Verunreinigungen, erkennbar am hohen Verhältnis von UV_{406}/UV_{280} .

Unter optimalen Bedingungen ließ sich häufig bereits in einem Schritt ein ähnlich hoher Reinheitsgrad erzielen. Dabei war insbesondere das Verhältnis vom Volumen des Säulenmaterials zum Volumen der aufzutragenden Probe bzw. der RoxA-Gesamtmenge, ferner auch die Säulendimension zu beachten. Denn die Abtrennung eines hohen Anteils an Fremdproteinen ließ sich umso eher erreichen je näher man an einer Sättigung des Säulenmaterials arbeitete. Die besten Resultate wurden erreicht, wenn das Auftragevolumen unter dem Säulenvolumen lag, also der Kulturüberstand stark konzentriert eingesetzt wurde. Bei einem pH-Wert um 8,0 eluierte der größte Teil des vorhandenen RoxA mit wenigen Verunreinigungen auf einer Stufe im Gradienten bei etwa 40–50 mM NaCl (Abb. 3.9). Die erzielte Reinheit der Enzym-Präparation konnte bereits nach einem Schritt bei etwa 90 % liegen oder bei einem Verhältnis der Absorption bei 406 nm zur Absorption bei 280 nm von 1,1. Die Bestimmung der RoxA-Menge nach Kalkulation über den molaren Extinktionskoeffizienten bei 406 nm lieferte Werte von bis zu 60 mg gereinigtem Enzym nach Chromatographie und anschließender Konzentrierung durch Ultrafiltration, was einer Ausbeute bis zu 4 mg/L entsprach. Anhand des typischen Absorptionsmaximums bei 406 nm ließ sich das Bindungsverhalten des Hämproteins verfolgen. Zu bedenken sei dabei aber, dass in ungereinigtem Kulturüberstand nicht die gesamte sichtbare Absorption bei dieser Wellenlänge auf RoxA zurück geht.

Eine Gelfiltration über Superdex G75 (cv =25 ml) mit zuvor über Q-Sepharose FF gereinigtem, konzentriertem RoxA lieferte keinen merklichen Zugewinn an Reinheit, zeigte aber, dass das aufgetragene RoxA in einem einzigen symmetrischen Peak eluierte (ohne Abb.). Die Säule war wie unter Kap. 2.9.2.2 beschrieben mit Protein-Größenstandards kalibriert worden. Dies bestätigte die Annahme, dass RoxA physiologisch als Monomer vorliegt.

Die notwendige Verwendung unterschiedlicher Latexlieferungen erwies sich als kritischer Faktor für eine gute RoxA-Ausbeute. Mit einigen Latices schien die Expression deutlich beeinträchtigt. Da aber keine Wachstumsminde rung festzustellen war, begünstigten wahrscheinlicher erhöhte Emulsationseigenschaften der Latices den Verlust von substratgebundenem RoxA. Insbesondere die Verwendung von Industrielatices (z. B. *high-ammonia*-Latex) resultierte trotz der Aufarbeitung über zahlreiche Waschschr itte und anschließendes Autoklavieren der Latex in deutlich geringeren RoxA-Ausbeuten. Sämtliche Latices eigneten sich jedoch als Substrat im RoxA-Aktivitätstest. Insbesondere Industrielatices begannen auch nach einer Woche der Kultivierung einer *Xanthomonas*-Latex-Kultur kaum zu klumpen. Dies erhöhte zwar die zur Bindung von RoxA zur Verfügung stehende Oberfläche, aber aufgrund der hohen Affinität des Enzyms zum Substrat führte dies vermutlich zu einer verstärkten Abtrennung von an Latexpartikel gebundenem RoxA im Zuge der Entfernung des Polymers durch Feinfiltrierung. Das Problem war jedoch nicht nur auf die Verwendung von Industrielatices beschränkt, sondern bestand auch teilweise bei Naturlatices ohne Zusätze. Eine gewisse Aggregation des polymeren Substrates vor Ernte einer Kultur erschien demnach der Ausbeute von RoxA förderlich zu sein. Daher war es erforderlich, nach alternativen Möglichkeiten der RoxA-Expression zu suchen.

3.2.3 Homologe Überexpression in *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::roxA

Die Realisierung einer Überexpression von Wildtyp-*roxA* in *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* ohne Anwesenheit des natürlichen Substrates brachte zahlreiche Vorteile für die Reinigung des Kautschuk spaltenden Enzyms mit sich. Die erhebliche Verkürzung der Kultivierungsdauer von etwa zwei Tagen gegenüber 10 bis 14 Tagen in Latexkultur schloss eine mögliche Inhomogenität einer RoxA-Präparation durch Alterung des Enzyms weitgehend aus. Durch die Möglichkeit der Kultivierung in Schüttelkolben konnte die zeit- und kostenaufwändige Anzucht in Zellkulturflaschen vermieden werden. Hinzu kam die fehlende Notwendigkeit einer mühsamen Entfernung von Latexresten aus dem Kulturüberstand und die damit verbundene Vermeidung eines zusätzlichen Verlustes durch Abtrennung von substratgebundenem RoxA. Zudem ließ sich in Vollmedium (LB oder NB) eine deutlich höhere Zellmasse und somit eine höhere RoxA-Produktion in kürzerer Zeit erreichen. Gemessen am Absorptionsmaximum bei 407 nm sowie der Aktivität des

unkonzentrierten Überstandes glichen sich die RoxA-Mengen nach Rhamnose-Induktion in einer frühen Wachstumsphase und Expression für 60 h bzw. nach Induktion in der spätexponentiellen Phase und Expression für 12 h. Ebenso gibt es Hinweise, dass eine längere Kultivierung in der stationären Wachstumsphase (>15 h) wieder zu einer Abnahme der RoxA-Aktivität im Kulturüberstand führen kann, möglicherweise durch Zellyse ins Medium freigesetzte Proteasen. Daher muss im Hinblick auf die Homogenität einer RoxA-Präparation die Induktion einer gut gewachsenen, noch nicht stationären Kultur, sowie die gleichzeitige Vermeidung längerer Expression in der stationären Phase als optimal erachtet werden. Eine geringe RoxA-Expression vom Rhamnose-Promotor konnte auch ohne Anwesenheit des Induktors nachgewiesen werden, welche im Bereich von 5 % derjenigen nach Induktion lag.

Die chromatographische Reinigung von rekombinantem RoxA wurde wie gewohnt mit Q-Sepharose FF, aber in der Regel mit neuen Säulen von größerer Dimension (z. B. Q-Sepharose_50/11) durchgeführt. Da eine Konzentrierung von *Xanthomonas*-Kulturüberständen aus Vollmedium mit Ultrafiltration in Amicon-Ultrafiltrations-Kammern sich als sehr zeitaufwändig erwies, wurde davon abgesehen und mehrere Läufe mit größerem Auftragevolumen durchgeführt, wobei dieses stets unter dem Säulenvolumen lag. Prinzipiell war eine für die Reinigung aus Latexkultur beschriebene zweistufige Reinigung über Q-Sepharose bei pH 8,5 und pH 7,7 anwendbar (s. Abb. 3.10 a, b). Doch zeigte sich, dass die für Reinigung aus Latex-Minimalmedium optimierte Strategie bei LB/NB-Vollmedium-Kulturen nicht exakt übertragbar war. Durch die notwendige Verwendung großer Säulenvolumina fand bei pH 7,7, bei welchem RoxA im Durchlauf zu erwarten wäre, dennoch eine schwache Interaktion mit dem Säulenmaterial statt, woraus eine verzögerte Auswaschung resultierte, die den Reinigungserfolg beeinträchtigte. Beste Ergebnisse wurden bei Aufteilung des Kulturüberstandes auf mehrere Läufe allein bei pH 8,5 erzielt. Dabei gewährleisteten ein Auftragevolumen von maximal $\frac{2}{3}$ des Säulenvolumens und die anschließende Auswaschung unspezifisch gebundener Proteine mit ca. einem Säulenvolumen (cv) Auftragepuffer die Elution von bereits relativ reinem RoxA auf einer breiten Stufe bei ca. 50 mM NaCl.

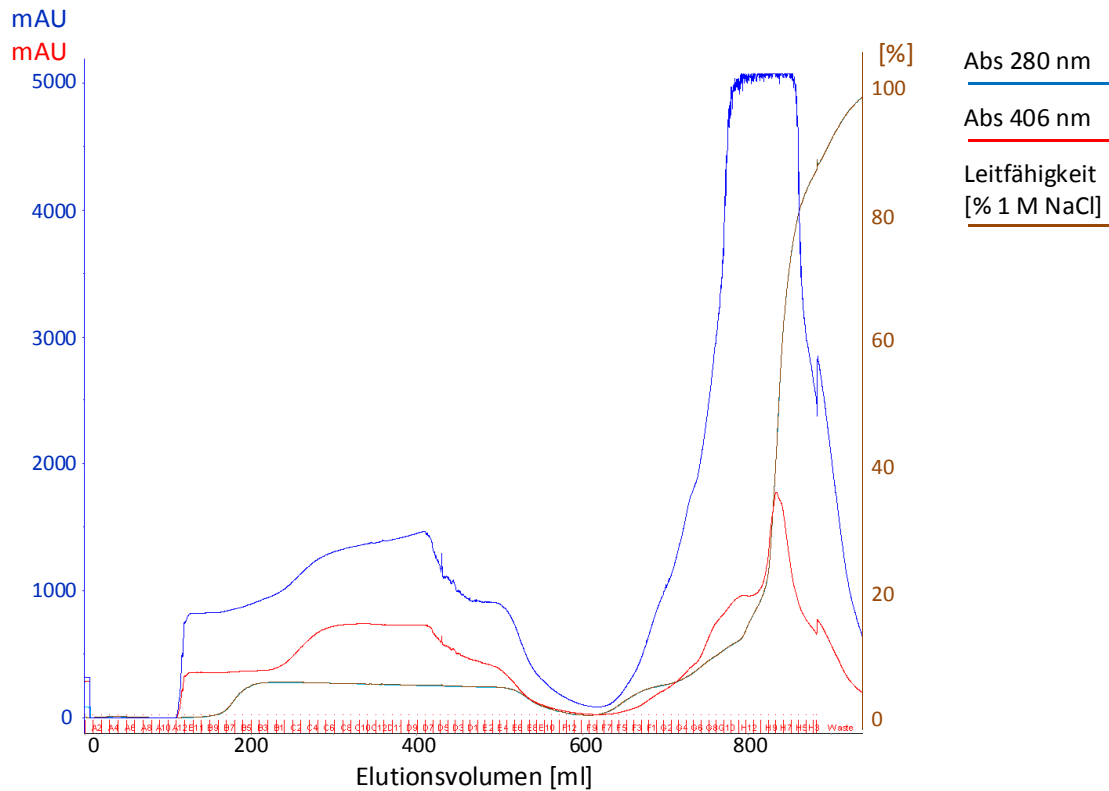


Abb. 3.10 a: Chromatogramm der Auftrennung des konz. *Xanthomonas* p4782.1::*roxA* - Kulturüberstands aus LB-Medium über Q-Sepharose FF 50/11 bei pH 7,7. RoxA befindet sich im Durchlauf (\approx B1 - F12).

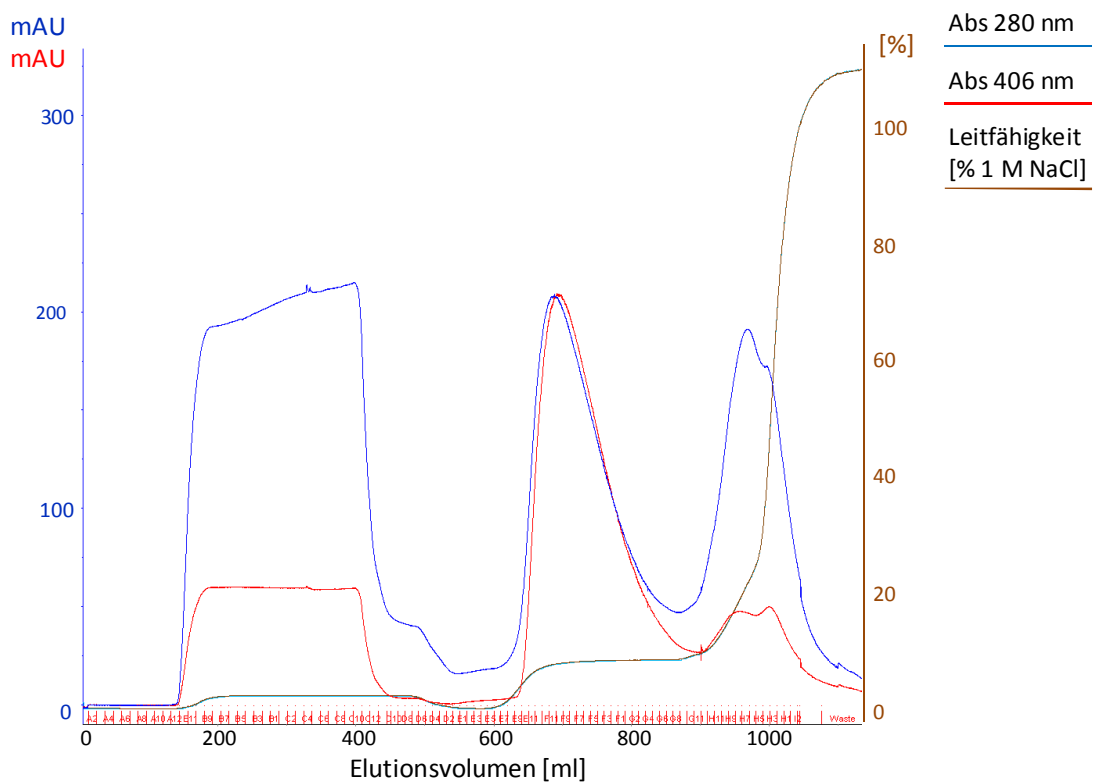


Abb. 3.10 b: Chromatogramm der Auftrennung des RoxA-Pools aus erstem Lauf bei pH 7,7 über Q-Sepharose FF 50/11 bei pH 8,5. RoxA eluiert auf einer Stufe im frühen Gradienten (\approx E9 - G3).

Vollständige Reinheit des Enzyms ließ sich mit dem Anionenaustauscher alleine allerdings nicht erreichen. Für höchste Reinheit einer Enzympräparation, beispielsweise für die Anwendung bei CD-Spektroskopie, wurde eine Hydroxyapatit-Chromatographie angeschlossen. Zuvor mussten die zusammengeführten RoxA-Fractionen aus der Anionenaustausch-Chromatographie mit Ultrafiltration eingeengt und umgepuffert werden. Die Abtrennung von noch vorhandenen Verunreinigungen erfolgte durch Bindung von RoxA bei pH 6,5 in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer (KPP) bis zur Sättigung des Säulenmaterials, wobei Fremdproteine größtenteils im Durchlauf vorlagen (vgl. Abb. 3.14). Abb. 3.11 veranschaulicht die Zunahme der Reinheit einer RoxA-Präparation im Verlauf einer Reinigung über drei Stufen anhand des optischen Spektrums. Die Reinheit wurde im SDS-Gel durch Silberfärbung kontrolliert (Abb. 3.12). Für sehr sauberes RoxA ergab sich stets ein Verhältnis der Abs_{406}/Abs_{280} von 1,35 (Abb. 3.13).

Auf diesem Wege konnte schließlich eine Ausbeute von bis zu 10 mg gereinigtem RoxA pro Liter LB-Kultur nach Chromatographie erreicht werden. Dies entsprach etwa dem 4-5fachen aus entsprechenden Expressionsversuchen in Minimalmedium mit Gluconat in Schüttelkolben und mehr als das Doppelte verglichen mit der Expression von RoxA vom natürlichen Promotor unter optimalen Bedingungen in Latex-Minimalmedium in Zellkulturflaschen. Ein in Tab. 3.1 dargestelltes Reinigungsprotokoll gibt einen Überblick über die Enzymmengen nach den jeweiligen Reinigungsschritten und den zugehörigen Reinheitsgrad, gemessen am Absorptionsquotienten von Abs_{406}/Abs_{280} .

Es konnte beobachtet werden, dass sich eine konzentrierte RoxA-Präparation bereits nach wenigen Minuten durch Aggregation der RoxA-Moleküle stark eintrübte. Durch Senkung der Temperatur durch Inkubation auf Eis trat in ebenso kurzem Zeitraum wieder vollständige Aufklärung ein. Dieser Vorgang ließ sich mehrmals mit gleichem Ergebnis wiederholen. Dabei war der Verlust der Aktivität gering, etwa 10 % nach drei Zyklen. Je höher die Reinheit einer Präparation umso schneller trat dieser Effekt ein. Präzipitierte RoxA bei Abwesenheit von NaCl oder auch beispielsweise auf einer Ultrafiltrationsmembran durch Druckfiltration (2 bar) konnte die Resolubilisierung eines Großteils durch Addition von hohen Salzkonzentrationen ($> 0,5$ M) auf Eis gelingen, sie trat jedoch deutlich langsamer ein. Im Laufe einer Reinigung ausgefallenes RoxA wurde getrennt behandelt.

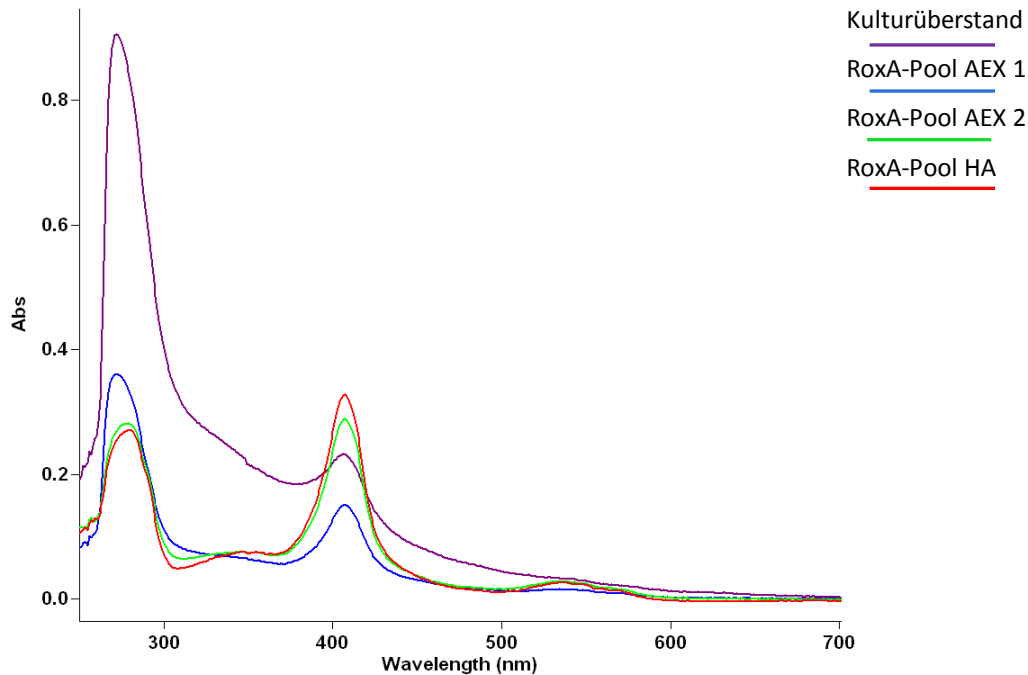


Abb. 3.11: UV-Vis-Spektren im Verlauf der Reinigung von (rek.) RoxA aus 20fach konzentriertem *Xanthomonas*-LB-Kulturüberstand (1:20 in KPP) [violett] über Anionenaustausch (AEX) mit Q-Sepharose pH 8,5 (1) [blau] und pH 7,7 (2) [grün], sowie Hydroxyapatit (HA) [rot]. Man beachte die zunehmende Reinheit an der steigenden Relation von Abs_{406}/Abs_{280} .

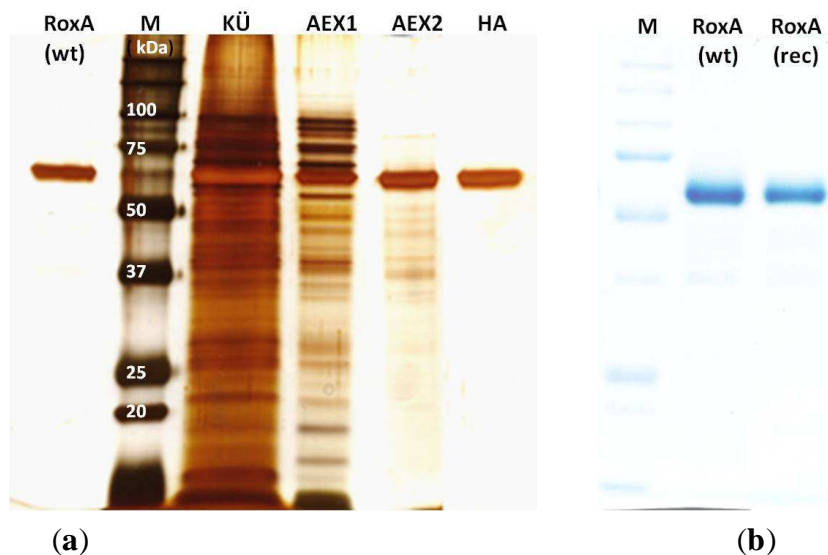


Abb. 3.12: Reinigung von rekombinantem RoxA aus Rhamnose-induzierter LB-Kultur von *Xanthomonas* p4782::*roxA* : SDS-PAGE (a) Silberfärbung: (wt): aus Latexkultur in Minimalmedium; M: Marker (kDa); KÜ: Kulturüberstand; AEX1: RoxA-Pool Q-Sepharose pH 8,5; AEX2: RoxA-Pool Q-Sepharose pH 7,7; HA: RoxA nach Reinigung über Hydroxyapatit und Konzentrierung. (b) Häm-Färbung von RoxA nach Reinigung: (wt): RoxA (Latexkultur); rec: RoxA (rekombinant)

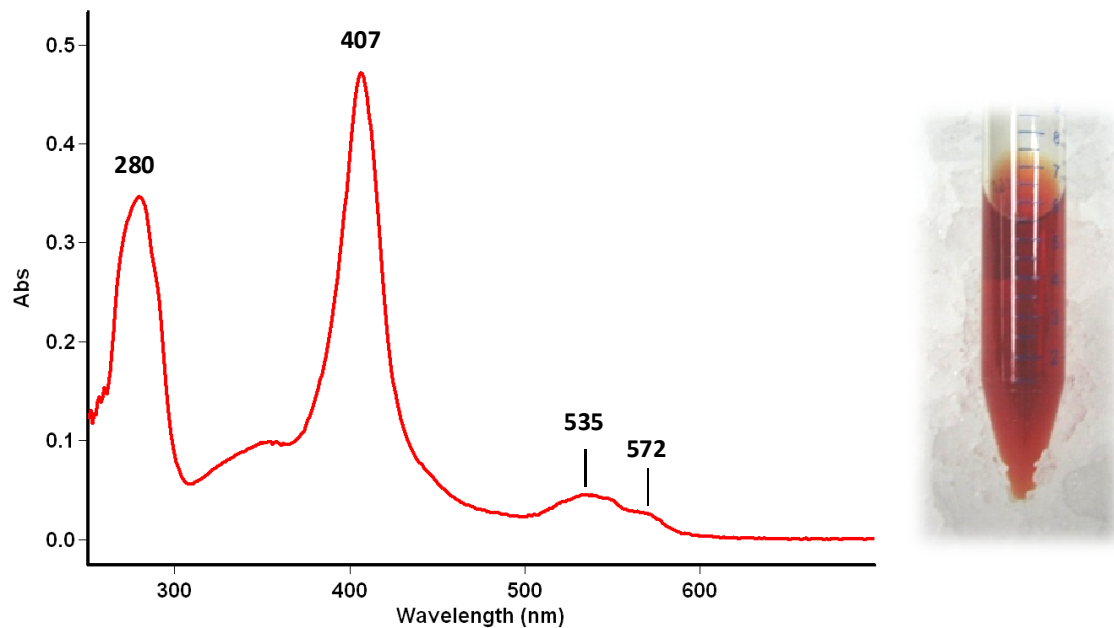


Abb. 3.13: (links) UV-Vis-Spektrum von (rekombinantem) RoxA nach Reinigung über Hydroxyapatit und anschließender Konzentrierung (Ultrafiltration). Neben den für den oxidierten Zustand charakteristischen Signalen bei 407, 535 und 572 nm, zeigt sich die hohe Reinheit am Verhältnis der Absorption bei 407 zu 280 nm von ca. 1,35. (rechts) Eine konzentrierte, gereinigte RoxA-Probe zeigt eine intensive Rotfärbung.

Tab. 3.1: Beispiel einer Reinigung von RoxA aus *Xanthomonas* sp. p4782.1::*roxA*. Nach Anionenaustausch-Chromatographie wurden hier etwa 60 mg (7 mg/L) relativ sauberes RoxA erhalten. Es wurde nur ein Drittel dieser Menge für eine abschließende Hydroxyapatit-Chromatographie eingesetzt. Der Gesamtertrag bezieht sich nur auf fett markierte RoxA-Mengen, die für spektroskopische Untersuchungen eingesetzt wurden.

| | RoxA-Menge pro: | | Reinheit (Abs ₄₀₆ /Abs ₂₈₀) | (Protein) bzw. RoxA |
|--|-----------------|-----------------|---|------------------------|
| | 8 L | L | | |
| Kulturüberstand | > 80 mg | > 10 | ≈ 0,1 | (≥ 50 µg/ml) |
| Q-Sepharose 1 (pH 7.7) | ≈70 mg | 8,7 mg | 0,45 | n.d.* |
| Q-Sepharose 2 (pH 8.5) | 60 mg | 7,4 mg | 0,95 | n.d. |
| Pool 2 (für Hydroxyapatit konz.) | 58 mg | 7,2 mg | 1,10 | 1,1 mg/ml |
| 2/3 von Pool 2 (nach Konzentrierung) | 33 mg | 4,1 mg | 1,12 | 5,5 mg/ml |
| 1/3 von Pool 2 eingesetzt für Hydroxyapatit | 18 mg | 2,1 mg | 1,35 | 0,47 mg/ml |
| Hydroxyapatit-Pool (nach Konzentrierung) | 16,7 mg | 2,1 mg | 1,35 | 4,6 mg/ml |
| Nach Präzipitation gelöstes RoxA | 3,5 mg | | 1,33 | 0,8 mg/ml |
| Gesamtertrag | ≈ 50 mg | ≈ 6,3 mg | s.o. | |

* nicht bestimmt

Bei der Hydroxyapatit-Chromatographie eluierte RoxA häufig in einem Doppelpeak (Abb. 3.14 a). Um eine mögliche Inhomogenität innerhalb der Gesamtheit der RoxA-Moleküle bzw. die denkbare Anwesenheit zweier Isoformen zu untersuchen, wurden diese Peaks getrennt gesammelt und die Hydroxyapatit-Chromatographie anschließend für jeden Pool getrennt wiederholt. Dabei wurde in beiden Fällen wiederum eine Aufspaltung in zwei Peaks festgestellt, was leicht als Beleg für eine solche Annahme angesehen werden könnte, indem sich eine Art Gleichgewicht einstellt. Dennoch erwiesen sich bei genauerer Betrachtung einfachere Erklärungen als plausibler.

Zwei Effekte könnten als Ursache in Frage kommen. Zum einen sind dies geringe Unterschiede im pH-Wert des Auftrage- und Elutionspuffers, welche sich insbesondere in ersterem aufgrund der niedrigen Molarität (5 mM) durch Verdünnung aus dem Elutionspuffer (200–400 mM) einstellen und bei niedriger Molarität ohnehin mit größerem Fehler behaftet sind. Tendenziell vergleichbare Abweichungen wurden durch anschließende Messung der pH-Werte beider Puffer, sowie auch in den beiden RoxA-Pools registriert. Ein möglichst genaues Nachtitrieren der Laufpuffer konnte die Aufspaltung der Peaks vermindern (Abb. 3.14 b). Die Beobachtung des Laufes mit bloßem Auge wies auf ein weiteres Phänomen hin, welches je nach Säulenmaterial eine generelle Rolle spielt. Demnach verläuft der Fluss in Abhängigkeit der Flussrate über den Querschnitt einer Säule betrachtet ungleichmäßig kegelförmig, in der Mitte etwas schneller als am Säulenrand. Dies hatte zur Folge, dass am Rand bindendes RoxA zeitlich verzögert eluierte, also nur scheinbar später im Gradienten. mag im Einzelfall. Dies ließ sich daran erkennen, dass der mit bloßem Auge sichtbare rote RoxA-Ring auf der Säule zeitgleich mit dem zweiten, schwächeren Peak eluierte, während der größere im Zentrum gebundene Teil bereits zuvor die Säule verließ.

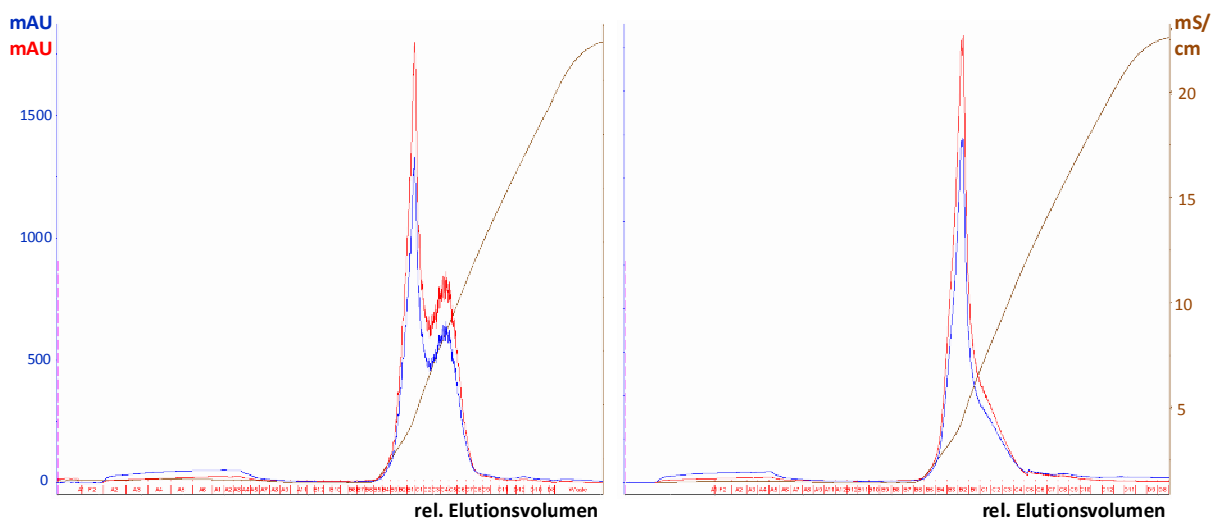


Abb. 3.14: Chromatogramm einer Hydroxyapatit-Chromatographie mit über Q-Sepharose gereinigtem rekombinantem RoxA (Säule: CHT_16/09) bei pH 6,5; (links) bei Verdünnung des Laufpuffers (5 mM) aus dem Elutionspuffer (200 mM), (rechts) nach möglichst exaktem Nachtitrieren des Laufpuffers. Absorption in [mAU = milli Absorption Units], Leitfähigkeit in [mS/cm].

Das durch Rhamnose-Induktion überexprimierte RoxA verhielt sich gleich dem Enzym aus Latexkultur bezüglich der Latex spaltenden Aktivität, sowie dem Verhalten gegenüber Inhibitoren. Auch die CD-Spektren zeigten keinen signifikanten Unterschied (s. Kap.3.10). Doch trat reproduzierbar ein geringer Unterschied im optischen Spektrum auf. Aus Latexkultur (Minimalmedium) isoliertes RoxA wies ein vollständig oxidiertes Spektrum auf. Demgegenüber zeigte rekombinantes RoxA, das aus LB- oder NB-Medium isoliert wurde, stets ein schwaches Signal bei 549 nm (Abb. 3.15). Dieses könnte durch eine Reduktion des Enzyms zu geringem Anteil oder durch einen ähnlichen Effekt wie nach Bindung von Häm-Liganden (s. Kap. 3.9.6) zustande kommen. Um einen Zusammenhang zwischen der stark unterschiedlichen Kultivierungsdauer zwischen Latexkultur und rekombinanter Rhamnose-Kultur, der An- bzw. Abwesenheit des Substrates und der Wahl des Mediums zu untersuchen, wurde rekombinantes Enzym unter entsprechend gegensätzlichen Bedingungen exprimiert bzw. inkubiert. In LB/NB-Medium exprimiertes rekombinantes RoxA wurde in Konzentrationen von 2, 4 und 10 μM für 10 Tage in KPP inkubiert (RT), zeigte dennoch ein unverändertes Spektrum gegenüber dem frisch isolierten Enzym. Auch nach einer entsprechenden Inkubation mit Latex (0,01–0,1 %) für 24 Stunden bzw. 10 Tage und nach anschließender Entfernung des Polymers durch Feinfiltration blieb das schwache 549 nm - Signal aus der Präparation von RoxA "as isolated" erhalten.

Um einen Beitrag des Kulturmediums zu untersuchen, wurde *Xanthomonas* p4782.1::*roxA* in entsprechender Weise in Minimalmedium mit Gluconat bzw. in modifiziertem LB-Medium mit nur 5 % der Menge an Hefeextrakt kultiviert. Tatsächlich wies das Spektrum des gereinigten RoxA aus diesen Kulturen ein deutlich vermindertes 549 nm-Signal auf bis hin zur völligen Übereinstimmung mit dem optischen Spektrum von RoxA aus Latexkultur. Folglich kann auf einen Ursprung dieses α -Signals aus dem Medium geschlossen werden. Denkbar ist die Bindung von Aminosäurebestandteilen aus Hefeextrakt oder NB an eines der Hämzentren, was angesichts beobachteter spektraler Veränderungen mit Imidazol-Analoga (Kap. 3.9.6) plausibel erscheint. Gelegentlich zeigte der Vergleich des Spektren gleicher Enzymkonzentration zwischen rekombinantem RoxA und solchem aus Latexkultur auch geringe Abweichungen hinsichtlich der Ausprägung der Q-Banden bei 535 nm und 572 nm (s. Abb. 3.16). Diese erschienen bei RoxA aus Latexkultur präparationsabhängig etwas vermindert. Ein ähnlicher, doch stärker ausgeprägter Effekt wurde in Gegenwart von Oxidationsmitteln oder bisweilen unter anoxischen Bedingungen festgestellt (s. Kap. 3.9.2; 3.9.3).

Die erhaltenen Enzymausbeuten aus Kultivierung in Minimalmedium lagen weit unter denen aus Vollmedium (ca. 10 %), rechtfertigten den Aufwand einer Reinigung nicht. Aus modifiziertem LB-Medium (mit 0,025 % Hefeextrakt) dagegen ließ sich fast die gleiche Ausbeute erzielen. Dies unterstreicht die Korrelation zwischen der erreichten OD bzw. der Zellmasse und der produzierten RoxA-Menge in Rhamnose-Kultur.

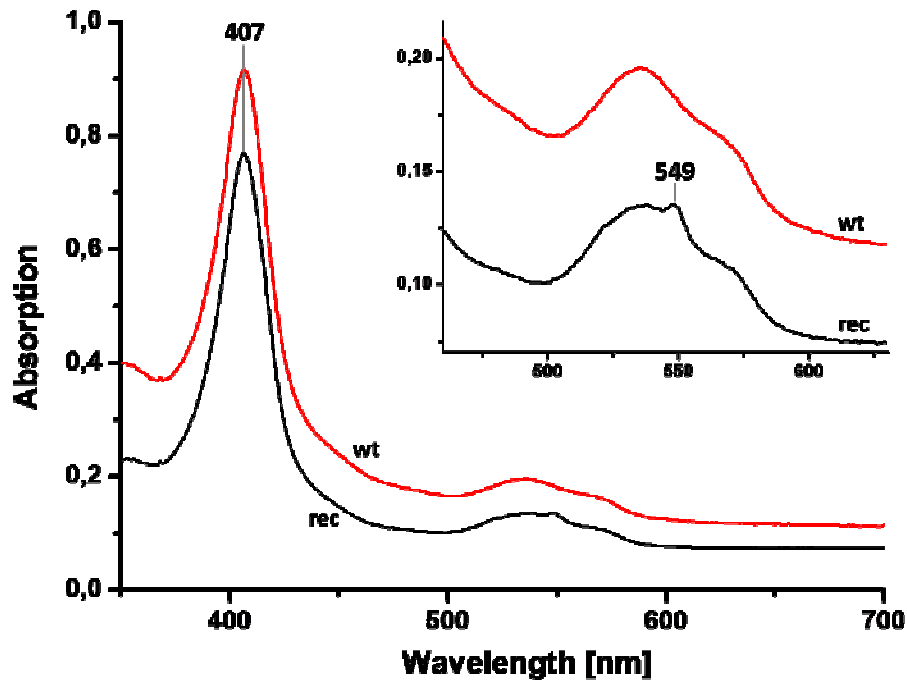


Abb. 3.15: (a) Vergleich der "as isolated"- UV-Vis-Spektren von überexprimiertem Enzym (60 h Expression in LB/NB-Medium, 30°C) und solchem aus Latexkultur (12 d in Minimalmedium, 30°C). Die Graphen sind zur besseren Übersicht entlang der Y-Achse verschoben. Ein schwaches Signal 549 nm war nur bei rekombinatem RoxA zu erkennen (aus: Hamsch *et al.*, 2010).

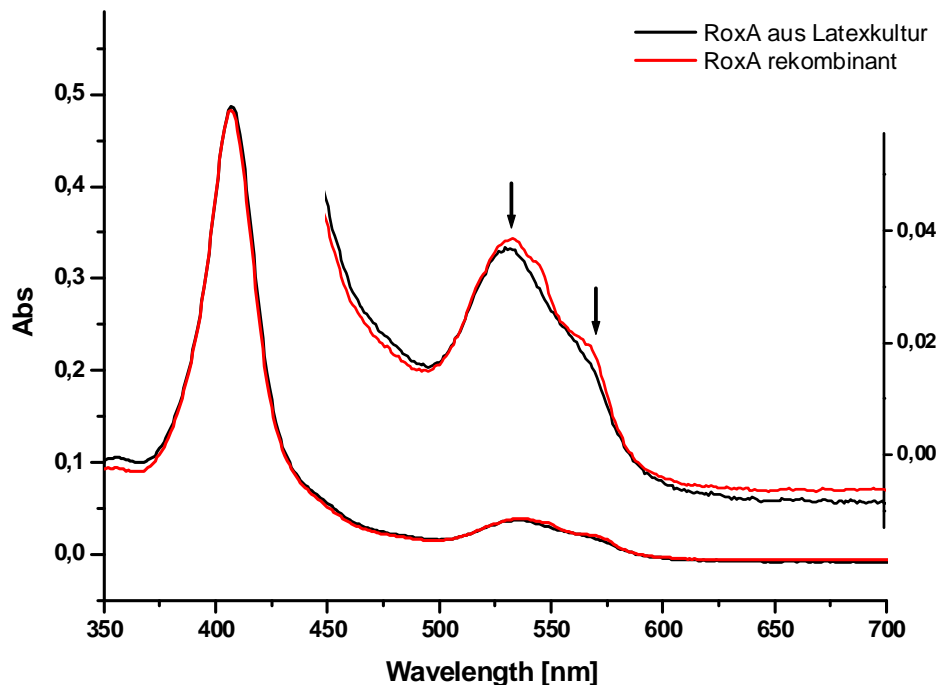


Abb. 3.16: Vergleich des optischen Spektrums einer Präparation von rekombinantem RoxA (LB-Medium) und RoxA aus Latexkultur. Der Bereich der Q-Banden ist im Insert entsprechend der Y-Achse vergrößert dargestellt. Die Pfeile markieren eine etwas geringere Absorption bei den typischen Wellenlängen für RoxA "as isolated" aus Latexkultur.

Teil II Allgemeine Untersuchungen

3.3 Ermittlung des isoelektrischen Punktes

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von RoxA wurde eine isoelektrische Fokussierung und anschließende Größentrennung der Proteine durch SDS-PAGE mit 11 cm-Gelen durchgeführt (2-D-Gelelektrophorese, Kap. 2.7.6). Dazu wurde eine konzentrierte gereinigte RoxA-Präparation aus Latexkultur verwendet. Der isoelektrische Punkt (pI) wird von der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins bestimmt. Für RoxA ergibt sich ein theoretischer Wert von 8,4 für reifes Enzym nach Abspaltung der Signalsequenz (30 aa) ein theoretischer pI von 7,3–7,5. Je nachdem welche Aminosäure-Reste an der Proteinoberfläche exponiert sind, kann der tatsächliche pI in der Praxis davon abweichen.

Die Abschätzung durch 2-dimensionale SDS-Gelelektrophorese im pH-Bereich von pH 3–10 lieferte einen pI-Wert von etwa 7,2 für RoxA aus dem *Xanthomonas* sp. 35Y - Kulturüberstand (Abb. 3.17 a), welches zuvor über Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt worden war. Die Anwesenheit nur weniger Fremdproteine in geringer Menge bestätigte die Reinheit der Probe. Dass mit Hydroxyapatit-Chromatographie noch höhere Reinheit zu erreichen war (Kap. 3.2.3), könnte anhand der hier ersichtlichen Verteilung der Banden auf die Entfernung der entsprechenden Proteinspots im sauren Bereich zurückgehen. Eine Auftrennung der löslichen Fraktion des *Xanthomonas*-Zellaufschlusses mit Zellen aus Latexkultur lieferte keine Hinweise auf nennenswerte Mengen von RoxA im Zellinneren (Abb. 3.17 b), was die Einstufung des Kautschuk spaltenden Enzyms als extrazelluläres Enzym bestätigt.

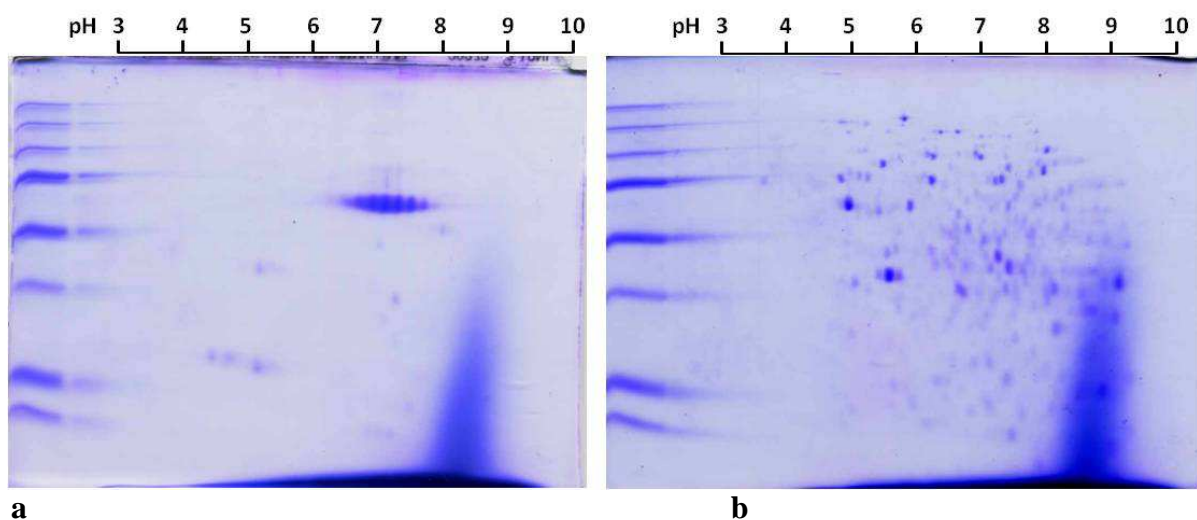


Abb. 3.17: 2-D-Gelelektrophorese (Coomassie-Färbung) von (a) gereinigtem RoxA aus Latexkultur und (b) der löslichen Fraktion aus einem *Xanthomonas*-Zellaufschluss. Der pI-Wert von RoxA wurde in der Mitte der sich nach außen verzweigenden Bande abgelesen.

3.4 Induktion der RoxA-Expression

3.4.1 RoxA-Expressionsversuche mit *Xanthomonas* sp. 35Y ohne Latex

Da über die Regulation der RoxA-Expression bisher wenig bekannt ist, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die RoxA-Expression nicht nur bei Anwesenheit des Substrates im Medium, sondern auch möglicherweise bei Verschlechterung der Wachstumsbedingungen wie Nährstoffknappheit angeschaltet wurde. Nach längerer Kultivierung von *Xanthomonas* sp. in Minimalmedium mit 0,05 % Hefeextrakt oder insbesondere in Vollmedien trat ab Ende der exponentiellen Wachstumsphase ebenfalls ein Absorptionsmaximum um 406 nm heraus, das jedoch nachweislich nicht von RoxA stammte. Es wurden keine typischen RoxA-Banden mit Silber- und spezifischer Hämfärbung nach SDS-PAGE und keine Latex spaltende Aktivität in konzentriertem Kulturüberstand gefunden. Auch in Minimalmedium mit jeweils verschiedenen C-Quellen (Acetat, Citrat, Fructose, Glucose, Gluconat, Lactat, Sorbitol) war in keinem Falle eine RoxA-Expression festgestellt worden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Latex aber konnte mit jeder der getesteten C-Quellen eine Expression nachgewiesen werden, mit Ausnahme von Acetat, welches jedoch das Wachstum von *Xanthomonas* sp. 35Y insgesamt hemmte (Fahrbach, 2007). Demgegenüber konnte bei der Kultivierung in Vollmedien wie LB- oder NB auch bei Anwesenheit von Latex keine RoxA-Expression nachgewiesen werden. Offenbar ist die Expression über den natürlichen Promotor in Medien mit komplexer Nährstoffzusammensetzung unterdrückt, nicht jedoch bei alleiniger Anwesenheit einer bestimmten C-Quelle.

Diese Ergebnisse widerlegten die Vermutung einer Anschaltung der RoxA-Expression unter ungünstigen Wachstumsbedingungen. Gleichmaßen aber bestätigten sie frühere Beobachtungen, wonach die Anwesenheit des Substrates Poly(*cis*-1,4-isopren) zur Expression des Latex spaltenden Enzyms erforderlich ist (Kerkhoff, 2001). Die in der stationären Wachstumsphase beobachtete Häm-typische Absorption stammte vermutlich von weiteren im Zuge einer Zellyse freigesetzten intrazellulären Cytochromen.

3.4.2 Induktion von RoxA mit Polyisopren-Spaltprodukten

Häufig wird der Abbau von extrazellulären Substraten durch spezielle Spaltprodukte initiiert, die als Induktor fungieren. Um Hinweise auf eine Beteiligung von durch RoxA produzierten Kautschuk-Abbauprodukten oder möglicherweise eine Beteiligung des Polymers selbst zu erhalten, wurden entsprechend der Vorgehensweise im RoxA-Aktivitätstest extrahierte Latex-Spaltprodukte als Induktor getestet. Diese wurden in geringer Konzentration (200 µM) zu Latex-freiem Minimalmedium mit 0,2 % Gluconat gegeben und *Xanthomonas*-Kulturen auf eine mögliche RoxA-Expression im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Spaltprodukte über

mehrere Tage untersucht. Tatsächlich wurde im Kulturüberstand von Kulturen nach Zugabe der Latex-Spaltprodukte nach 24 Stunden ein schwaches Signal bei 407 nm im UV-Vis-Spektrum im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar, welches jedoch nach längerer Inkubation nicht weiter zunahm. Nach SDS-PAGE war mit Silberfärbung eine zusätzliche Bande auf Höhe von RoxA zu sehen, der zudem ein Häm-Signal zuzuordnen war (Abb. 3.18). Auch der Aktivitätstest zeigte eine Latex spaltende Wirkung an. In Übereinstimmung mit der Hemmung der RoxA-Expression in Vollmedien trotz Anwesenheit von Latex, wurde auch eine Induktion durch isoliertes ODTD nur in Minimalmedien, nicht in LB-oder NB gefunden.

Somit lieferten diese Versuche Hinweise auf eine Induktion der RoxA-Expression durch Latex-Spaltprodukte, wahrscheinlich in erster Linie durch ODTD, das darunter den Hauptanteil ausmacht. Dass dieses als Latex-Abbauprodukt *Xanthomonas* als C-Quelle dient, also zur Energiegewinnung weiter verstoffwechselt wird, könnte die fehlende Zunahme der RoxA-Produktion bei längerer Inkubation aufgrund schnellen Verbrauchs erklären. Befindet sich dagegen Latex im Kulturmedium kann ODTD durch RoxA vermittelte Spaltung nachgeliefert werden. Die Anwesenheit von Latex alleine liefert erst nach etwa 4–5 Tagen eine sichtbare RoxA-Expression. Wurde ODTD allerdings in einer hohen Konzentration (z. B. 5 mM) eingesetzt, so führte dies zu einem Wachstumsstopp bzw. einem Absterben der *Xanthomonas*-Zellen vermutlich durch toxische Wirkung der Aldehydgruppen.

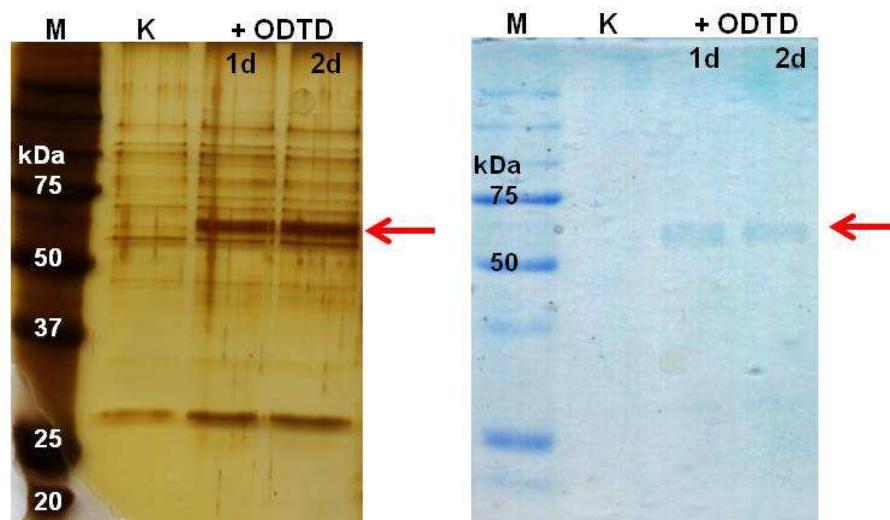


Abb. 3.18: SDS-Gel: (links) Silberfärbung, (rechts) spezifische Hämefärbung: Unkonzentrierter *Xanthomonas*-Kulturüberstand nach Zugabe mit durch RoxA generierten Latex-Spaltprodukten: M: Marker; K: Kontrolle nicht induzierter Kulturüberstand; + ODTD: nach Zusatz von extrahierten Latex-Spaltprodukten nach einem (1 d) und 2 Tagen (2 d). Die ODTD-induzierten Kulturen zeigen eine RoxA-Bande im Kulturüberstand, sowohl im Silbergel als auch mit Hämefärbung (Pfeil).

Nachdem diese Beobachtungen gezeigt hatten, dass RoxA-Spaltungsprodukte bei der Induktion des Enzyms eine Rolle spielten, wurden weitere Substanzen mit gewisser Ähnlichkeit zum Hauptspaltprodukt ODTD, beispielsweise in Form von Aldehyd-, Ketogruppen oder Methylresten aufwiesen, getestet. Mit keiner dieser Verbindungen, u. a. β -Carotin, Squalen, Pristan (Tetramethylpentadecan), Citronellal, Geraniol, Glutaraldehyd, Hexaldehyd, Butanon, Isobutanal, Propanal, Isobutylmethylketon und 6-Methyl-5-Hepten-2-on (100 μ M – 1 mM), wurde weder im UV-Vis-Spektrum, noch nach SDS-PAGE ein Hinweis auf eine Induktion der RoxA-Expression gefunden. Die Interpretation dieser negativen Befunde wird jedoch erschwert durch die Verwendung einiger flüchtiger Verbindungen bzw. der schlechten Löslichkeit von Substratanaloga. Insbesondere Aldehyde führten aufgrund ihrer toxischen Wirkung zu vermindertem Wachstum von *Xanthomonas* sp.. Das Testen geringerer Konzentrationen sollte diese Unsicherheit ausräumen können.

Weitere Versuchsreihen befassten sich mit der Induktion durch unspezifisch gespaltene Polyisopren-Bruchstücke. Von Enoki *et al.*, wurde eine oxidative Spaltung von *cis*- und *trans*-1,4-Polyisoprenen durch verschiedene Systeme beschrieben, in denen Metall-Enzyme aus bestimmten Mediatoren Radikale generieren, welche bei Anwesenheit von O₂ die Polymerspaltung herbei führen (Enoki *et al.*, 2003). Die so entstehenden Spaltprodukte ähnelten, abgesehen von ihrer variablen Größe, dem Hauptprodukt der RoxA-generierten Latexspaltung ODTD, mit Aldehyd- bzw. Ketogruppen. Die Wirksamkeit solcher unspezifischen Latex-Zerfallsprodukte aus drei Enzym-Mediator-Systemen auf eine Induktion von RoxA wurde untersucht. Kautschuk-Latex wurde mit Lipoxygenase/Linolsäure bzw. Fenton-Reagenz/Linolsäure bzw. Meerrettich-Peroxidase (HRP)/1-Hydroxybenzotriazol (HBT) in der von Enoki *et al.*, dokumentierten Weise inkubiert und nach Ethylacetat-Extraktion mit HPLC analysiert. In allen drei Systemen konnte man im Vergleich mit Negativkontrollen starke Veränderungen erkennen, die auf eine Zersetzung des Polymers hinwiesen. Daraufhin wurden Induktionsversuche in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt. Doch aus keinem der drei Systeme extrahierte Spaltprodukte konnten eine RoxA-Expression induzieren. Gleichzeitig schließen diese Befunde aus, dass die festgestellte Induktion durch auf dem gleichen Wege wie RoxA-generierte Latex-Spaltprodukte extrahierte mögliche Reste des Polymers zurückgehen könnte. Die RoxA-Expression schien spezifisch auf ODTD bzw. geringfügig unterschiedliche Spaltprodukte anzusprechen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass ein Polymerstrang eine bestimmte Mindestzahl an Isopreneinheiten aufweisen muss, um von RoxA gespalten zu werden. Gereinigtes ODTD mit zwei vollständigen Einheiten ließ sich durch RoxA nicht weiter spalten. Da Spaltprodukte mit bis zu fünf vollständigen Isopreneinheiten nachgewiesen werden konnten (Braaz *et al.*, 2004), müsste diese Länge mindestens sieben Einheiten betragen.

3.5 Korrelation zwischen Enzym- und Substratkonzentration

Nachdem die spezifische Induktion von RoxA durch Latex-Spaltprodukte wie ODTD gezeigt werden konnte, bot sich auch die Perspektive, dieses statt Latexmilch zur RoxA-Produktion bei Kultivierungen einzusetzen. Zur Abhängigkeit der Produktion an Latex-Spaltprodukten von der Konzentration an Enzym bzw. Substrat, sowie der Inkubationszeit wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Diese sollen anhand der über die Zeit untersuchten ODTD-Produktion bei konstanter Latexkonzentration von 0,5 % bzw. 5 % und variierenden RoxA-Konzentrationen veranschaulicht werden. Ziel dieser Versuche war neben der Gewinnung weiterer Informationen zur Enzymkinetik der Latexspaltung durch RoxA auch die Ergründung optimaler Bedingungen zur Herstellung des Hauptspaltproduktes ODTD bezüglich einzusetzender Substrat- und Enzymmenge.

Die Inkubation von RoxA mit Kautschuklatex und die anschließende Extraktion und Detektion des Spaltproduktes ODTD erfolgte in analoger Weise zum RoxA-Aktivitätstest (Kap. 2.7.1). Es wurden Batch-Ansätze mit definierter Latex-Konzentration und jeweils unterschiedlichen Mengen an gereinigtem RoxA zwischen 0,4 µg/ml und 200 µg/ml bei 0,5 % Latex bzw. 1 mg/ml bei 5 % Latex für drei Tage bei 40°C inkubiert und die Generierung des Spaltproduktes ODTD mittels HPLC über die zugehörigen Peakflächen zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen.

In Abb. 3.19 ist die ODTD-Produktion in Abhängigkeit der eingesetzten RoxA-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Graphen, die sich nach 24, 48 bzw. 72 Stunden ergaben, entsprachen sich in ihrem Verlauf. Ein Großteil des insgesamt produzierten ODTD lag bereits nach 24 Stunden bei 40°C vor, steigerte sich noch bis 48 Stunden, danach nicht mehr nennenswert. Betrachtet man nur die absoluten Werte ab 24 Stunden, ergaben sich mit höherer Substrat-Konzentration auch insgesamt höhere ODTD-Mengen. Dies gilt jedoch nur für RoxA-Konzentrationen im Sättigungsbereich, der sich mit 0,5 % Latex bei 40–100 µg RoxA/ml, mit 5 % Latex bei 200–400 µg RoxA/ml einstellte (Abb. 3.19, 24 h, 48 h). Mit geringeren Enzymkonzentrationen wurde mit niedrigerer Latexkonzentration stets auffallend mehr Spaltprodukt erhalten. Dies gilt insbesondere für die Menge an ODTD nach drei Stunden, die bei allen getesteten Enzymkonzentrationen deutlich höher lag als bei vergleichbaren RoxA-Konzentrationen mit 5 % Latex (Abb. 3.19, 3 h). Es zeigte sich zudem, dass die ODTD-Menge bei 0,5 % Latex nach drei Stunden bereits einen erheblichen Anteil der Menge nach 24 bzw. 48 Stunden ausmachte, die Zunahme sich also nicht bzw. ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr zeitlich linear verhielt, sondern die geringere Substratmenge verhältnismäßig schneller umgesetzt wurde als eine hohe Substratmenge. Dagegen stiegen mit hoher Latex-Konzentration (5 %) die ODTD-Ausbeuten bei einer Inkubation von 24 Stunden und länger im Vergleich zu 3 Stunden deutlich an, was sich mit der fehlenden Limitierung durch das ausreichend vorhandene Substrat begründen

lässt. Dies erklärt jedoch nicht, warum die ODTD-Menge bei sehr niedrigen RoxA-Konzentrationen noch weit unter denen der entsprechenden Ansätze mit niedriger Latexmenge lag. Erst ab einer RoxA-Menge von ca. 100 $\mu\text{g/ml}$ wurde mit 5 % Substrat auch mehr Spaltprodukt erhalten als mit 0,5 %. Demnach kommt offensichtlich dem relativen Verhältnis der eingesetzten Enzymmenge zur Substratmenge eine entscheidende Bedeutung zu. Betrachtet man die ODTD-Ausbeuten in Bezug zu diesem Verhältnis, sind die Unterschiede zwischen den Versuchsreihen bei 0,5 % und der zehnfachen Latexkonzentration nicht mehr ganz so deutlich.

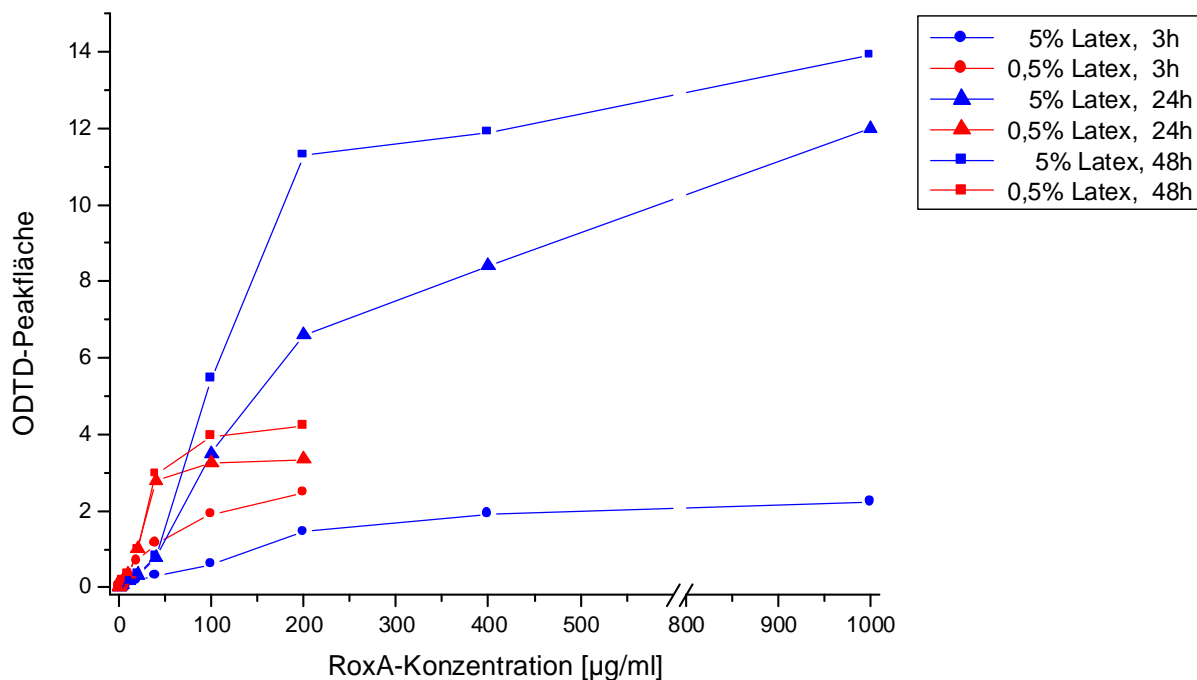


Abb. 3.19: ODTD-Produktion (relative Peakflächen) in Abhängigkeit der RoxA-Konzentration bei 0,5 % (rot) und 5 % Latex (blau) im Vergleich nach 3 h, 24 h und 48 h. Die ODTD-Menge nach 3 h war mit 0,5 % Latex mit jeder Enzymkonzentration deutlich höher als mit 5 % Latex. Bei längerer Inkubation überstieg die absolute ODTD-Menge bei 5 % Latex erst ab einer RoxA-Konzentration von ca. 100 $\mu\text{g/ml}$ diejenige bei 0,5 % Latex. Bei beiden Latexkonzentrationen war oberhalb einer jeweils unterschiedlichen Enzymkonzentration eine deutlich verminderter Produktzuwachs zu erkennen (s. Text).

In Ansätzen mit 5 % Latex stieg bis ca. 200 μg RoxA/ml die generierte ODTD-Menge stark an, mit größeren Enzymmengen war der Zugewinn nur noch unverhältnismäßig gering. Demnach wurde mit 5 % Latex beginnend ab ca. 200 $\mu\text{g/ml}$ annähernd ein Plateau erreicht, bei 0,5 % Latex bereits ab 40 $\mu\text{g/ml}$ auf etwa einem Drittel des Wertes. Mit Blick auf die Ausbildung dieses Endpunktes der ODTD-Produktion, ließ sich feststellen, dass dieser Wert mit 5 % Latex bei etwa der Hälfte der RoxA-Menge im Verhältnis zur Latexmenge erreicht wurde als bei 0,5 % Latex. Daraus lässt sich auf eine Substratsättigung bei 5 % Latex schließen, die aber wahrscheinlich schon bei niedrigerer Konzentration (1–2 %) eintritt. Betrachtet man aber die absoluten Werte, war zum Erreichen der somit etwa dreifachen

Produktmenge bei 5 % gegenüber 0,5 % Latex die fünffache RoxA-Menge bei zehnfacher Latexmenge notwendig. Somit war der relative ODTD-Ertrag pro Enzymkonzentration bei der Substratkonzentration von 0,5 % am größten. Besonders deutlich wird ein der Reaktionsgeschwindigkeit entgegen wirkender Einfluss einer sehr hohen Substratdichte bei Betrachtung des nach drei Stunden gebildeten Produktes (Abb. 3.19) bei gleichem RoxA-/Latex-Verhältnis, beispielsweise 40 μg RoxA/ml auf 0,5 % Latex gegenüber 400 μg RoxA/ml auf 5 % Latex. Die absolute ODTD-Menge sollte bei gleicher Umsatzrate in letzterem Fall den etwa 10fachen Wert einnehmen als in ersterem Fall, betrug aber weniger als das Doppelte.

Um eine umfassende Betrachtung der Enzym-Substrat-Korrelation vorzunehmen, wären weitere Versuche notwendig. Eine Versuchsreihe mit 3 % Latex lieferte ein ähnliches Resultat wie die Versuche mit 5 %, zeigte aber demgegenüber bereits eine Tendenz, mit geringen Enzym-Konzentrationen höhere ODTD-Mengen im gleichen Zeitraum zu produzieren, wie es deutlich bei 0,5 % beobachtet wurde. Abb. 3.20 veranschaulicht, dass bei hoher Latexkonzentration (3 %) sehr geringe Enzymkonzentrationen ($<10 \mu\text{g/ml}$) kaum eine ODTD-Produktion liefern bzw. diese mit steigender Enzymmenge scheinbar überproportional zunimmt. Offenbar spielt das Verhältnis von Latex- zur RoxA-Konzentration eine Rolle, d. h. mit 200 μg RoxA/ml ist dieses im Hinblick auf die Produktbildung bei 3 % Latex günstiger als mit 20 $\mu\text{g/ml}$. Möglicherweise wirkt sich das geringe Verhältnis von RoxA zu Latex im hohen Überschuss an Substrat durch Aggregationseffekte der Polymerstränge untereinander in Kombination mit einer Enzymbindung behindernd auf die Umsatzrate aus. Um die Lücke zwischen niedriger und hoher Latexkonzentration zu schließen, böte sich in diesem Zusammenhang eine entsprechende Versuchsreihe bei etwa 1,5 % Latex an, bei der möglicherweise eine noch höhere Umsatzrate zu erwarten wäre.

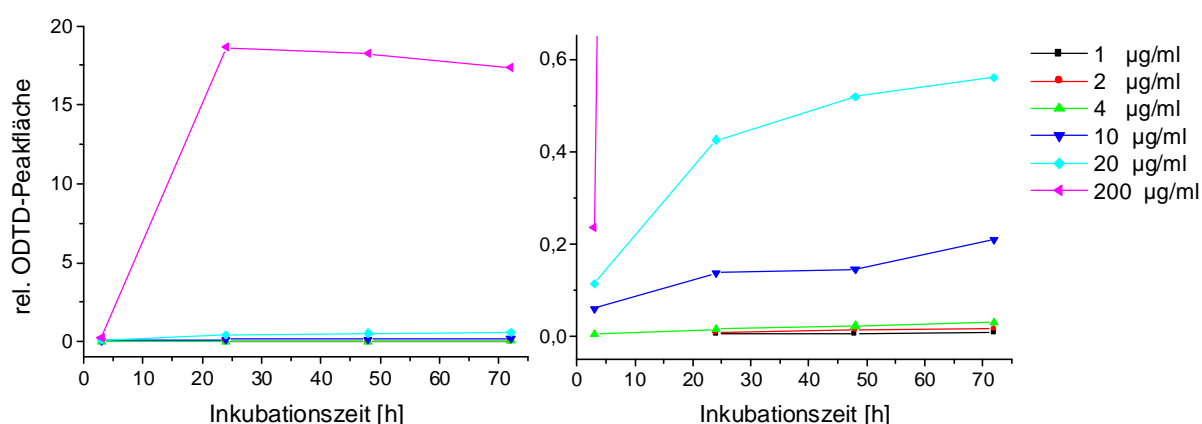


Abb. 3.20: (links) ODTD-Produktion bei 3 % Latex und unterschiedlichen RoxA-Konzentrationen in Bezug zur Inkubationszeit; (rechts) vergrößerter Ausschnitt aus (links). Der größte Teil des bis zu einer Testdauer von 72 h produzierten ODTD lag bereits nach 24 h vor. Betrachtet man die Situation zu diesem Zeitpunkt, fällt eine überproportionale Zunahme mit höheren Enzymkonzentrationen auf.

Es wurde beobachtet, dass die ODTD-Produktion bei 30°C verglichen mit derjenigen am Reaktionsoptimum bei 40°C zwar langsamer, doch über einen längeren Zeitraum betrachtet (5 d) bis zu doppelt so hoch lag, etwa bei 10 % der eingesetzten Latexmasse gegenüber 5 %. Da anzunehmen ist, dass das Enzym bei 30°C zwar eine geringere Umsatzrate aufweist als beim Temperaturoptimum von 40°C, aber stabiler ist, erscheint dieses Ergebnis nachvollziehbar. Bei kurzen Inkubationszeiten würden demnach 40°C-Ansätze höhere ODTD-Erträge liefern, längere Inkubation bei 30°C könnte aber insgesamt zu höheren Ausbeuten führen.

Die Darstellung der Enzym-Substrat-Beziehungen über eine Michaelis-Menten-Kinetik und somit die Angabe eines K_m -Wertes ist im Falle von RoxA schwierig, da die Latexspaltung durch RoxA vermutlich nicht dem klassischen Schema der Formierung und Auflösung eines Enzym-Substrat-Komplexes entspricht, das der Kinetik zugrunde liegt. Aufgrund der hohen Affinität zum Substrat bzw. der Substratmoleküle untereinander ergeben sich weitere Schwierigkeiten, zudem solche aus Art des Aktivitätstests im Hinblick auf die Feststellung von Geschwindigkeiten einer Reaktion (s. Kap. 4.2.3).

Am ehesten eignet sich der Vergleich mit der Testreihe nach drei Stunden, da die Michaelis-Menten-Kinetik Anfangsgeschwindigkeiten betrachtet, und sich der ODTD-Zuwachs mit zunehmender Inkubationszeit verlangsamt. Im Falle einer solchen Enzym-Substrat-Beziehung wäre die Reaktionsgeschwindigkeit (Produktmenge/Zeit) bei hohen Substratkonzentrationen maximal und unabhängig von der Substratkonzentration. Bei einer konstanten Enzymkonzentration von beispielsweise 100 µg/ml müsste zum gleichen Zeitpunkt mit einer hohen Substratkonzentration (5 %) also mindestens genauso viel Produkt vorliegen als mit einer niedrigeren (0,5 %). Dass bei allen vergleichbaren Enzymkonzentrationen nach drei Stunden aber mit 5 % Latex deutlich weniger Produkt gebildet wurde als mit 0,5 % (s. Abb. 3.19), lässt auf komplexere Enzym-Substrat-Wechselwirkungen schließen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird hier nicht asymptotisch erreicht, sondern ist vermutlich im Bereich eines gewissen Enzym-/Substrat-Verhältnisses maximal. Liegt Latex in zu hoher absoluter Konzentration vor, ergeben sich möglicherweise durch Aggregationseffekte wieder verminderte Umsatzraten. Die in Kap. 3.6 dargestellten Versuchsergebnisse verdeutlichen, dass nicht nur das Verhältnis der RoxA- zur Latexkonzentration, sondern auch die absolute Konzentration von Substrat- und Enzym Auswirkungen auf die ODTD-Produktion haben.

3.6 Aktivität von RoxA in Gegenwart von Inhibitoren

Die Kenntnis von Substanzen, die in der Lage sind, die Kautschukspaltung durch RoxA zu hemmen, kann prinzipiell wertvolle Informationen zum Mechanismus der Spaltungsreaktion liefern. Eine Auswahl an inhibierenden Substanzen wurde bereits von Braaz *et al.*, (2004) gefunden. Diese Untersuchungen wurden im Zuge des Vergleichs zu anderen Hämproteinen wie Peroxidasen vertieft.

3.6.1 Inhibierende Substanzen

Eine Übersicht über getestete Substanzen und die erhaltenen Restaktivitäten gibt Tab. 3.2. Eine Vielzahl untersuchter Hämliganden wie Imidazol-ähnliche Verbindungen werden gesondert in Kapitel 3.9.6 behandelt. Eine Übersicht über deren inhibierende Wirkung und spektroskopische Veränderungen gibt Tab. 5.1. Alle im Folgenden besprochenen Aktivitäten beziehen sich auf die Durchführung der Versuche in KP-Puffer (KPP), in welchem bei pH 7,0 die höchste RoxA-Aktivität gemessen wurde. In Bis-Tris-Puffer (pH 7) ergab sich eine Aktivität von 52 ± 9 % derjenigen in KPP bei gleichem pH-Wert und gleicher Molarität. Bei pH 8,0 waren es in KPP noch 81 ± 8 % verglichen mit pH 7, in Tris-Puffer (pH 8) lediglich noch 21 ± 2 %. Im Vergleich zur ODTD-Menge nach drei Stunden in KPP (pH 7) steigerte sich diese nach ÜN-Inkubation (ca. 15 h) nur geringfügig auf etwa 120 % (vgl. auch Abb. 3.27).

Die hemmende Wirkung von substratähnlichen Verbindungen wie β -Carotin und α -Tocopherol war bereits festgestellt worden (Braaz, 2005 b). Zudem hemmten Squalen, δ -Tocotrienol und Pristan teilweise. Die deutlichsten Effekte wurden mit β -Carotin beobachtet, das wie auch α -Tocopherol zudem Eigenschaften als Radikalfänger besitzt. Die in Tab. 3.2 genannten Werte entsprechen der Menge an gebildetem Spaltprodukt (ODTD) nach ÜN-Inkubation (ca. 15 h) des Testansatzes in 100 mM KPP (pH 7,0) bezogen auf mitgeführte Kontroll-Ansätze mit RoxA "as isolated" ohne Zusätze und sind somit untereinander vergleichbar. Es zeigte sich dennoch, dass die Dauer der Inkubationszeit mitunter starken Einfluss auf die sich ergebende Restaktivität hatte. So ergab sich beispielsweise in Testansätzen mit Imidazol (1 mM) nach ÜN-Inkubation eine Aktivität von ca. 50 % der RoxA-Positivkontrolle, nach 3–4stündiger Inkubation dagegen von nur von 15 % (s. Tab. 5.1). Die gemessenen ODTD-Mengen in den Kontrollansätzen unterschieden sich dagegen kaum, waren nur geringfügig höher nach ÜN-Inkubation als nach drei Stunden. Vermutlich je nach Art der Inhibierung, beispielsweise eine Konkurrenz mit dem Substrat um eine Bindung am Enzym, konnte die Produktion von Spaltprodukten in einigen Fällen bei verlängerter Inkubation langsam fortschreiten. So war bei der Durchführung der Tests mit α -Tocopherol und Squalen über drei Stunden in Bis-Tris-Puffer eine stärkere Hemmung registriert worden

(Braaz, 2005 b). Beim Vergleich von Aktivitäten musste deshalb stets auf die Dauer des Testansatzes geachtet werden (s. Kap. 4.2.3).

Tab. 3.2: Einfluss niedermolekularer Substanzen auf die RoxA-Aktivität. Angegeben sind die Restaktivitäten in KPP im Aktivitätstest nach ÜN-Inkubation (abgeleitet aus der Menge an gebildetem Spaltprodukt) verglichen mit parallelen RoxA "as isolated"-Kontrollansätzen (=100 %).

| Substanz | 50 mM | 20 mM | 10 mM | 5 mM | 2 mM | 1 mM | 100 µM | 10 µM | 1 µM | 100 nM | 10 nM | 1 nM |
|---|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-----------|----------|---------|-----------|----------|---------|
| Oxidationsmittel | | | | | | | | | | | | |
| H ₂ O ₂ | | | | | | ≤ 5 | ≤ 5 | 17 | 70 | 90 | | |
| Ferricyanid | | | | | | 25 | 66 | 83 | | | | |
| K-Permanganat | | | ≤ 5 | ≤ 5 | | 21 | 98 | 100 | | | | |
| Pyrogallol | | | 36 | | | 43 | 59 | 80 | | | | |
| DMSO | | | 87 | | | 80 | 105 | | | | | |
| Na-Hypochlorit | | | ≤ 5 | | | 85 | 102 | 108 | 105 | | | |
| Ameisensäure | | | 83 | | | 99 | 103 | 97 | | | | |
| Oxalsäure | | | 82 | | | 86 | 106 | | | | | |
| Reduktionsmittel | | | | | | | | | | | | |
| Na-Dithionit | | | | | | 26 | 73 | 100 | | | | |
| NADH/PMS | | | | | | 10 | | | 86 | | | |
| Chinon | | | | 8 | | 11 | 42 | 80 | 98 | | | |
| NADH/PMS + H ₂ O ₂ | | | | | | ≤ 5 | | | | | | |
| FeCy+Dith. | | | | | | | 74 | | | | | |
| FeCy (100µM) + Dith.(1mM) | | | | | | 41 | | | | | | |
| H ₂ O ₂ + Dithionit | | | | | | | ≤ 5 | | | | | |
| Perox./Katalase- Hemmer | | | | | | | | | | | | |
| Hydroxylamin | | | ≤ 5 | | | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | | | | |
| Hydrazin | | | ≤ 5 | | | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | 48 | | | |
| Phenylhydrazin | | | ≤ 5 | | | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | 33 | | | |
| Diphenylamin | | | | 6 | | 7 | 50 | 93 | | | | |
| Na-Azid | | 46 | 69 | | | 86 | | | | | | |
| 3-Amino-1,2,4- triazol | | 14 | 31 | 49 | | 87 | 100 | | | | | |
| Ammoniak (NH ₃) | | | | | 90 | 95 | | | | | | |
| Peroxide | | | | | | | | | | | | |
| Na-Perchlorat | | | | | | 96 | | | | | | |
| K-Peroxodisulfat | | | | | | 55 | | | | | | |
| Metalloproteine | | | | | | | | | | | | |
| Katalase | | | | | | | | | 5 | 9 | 15 | 56 |
| HRP | | | | | | | | 10 | 35 | 63 | 82 | 103 |
| Lipoxygenase | | | | | | | | | 46 | 59 | | |
| Cytochrom <i>c</i> | | | | | | | | 25 | 98 | 91 | | |
| Superox.-Dismutase | | | | | | | | 110 | | | | |
| Hämoglobin | | | | | | | | 11 | 43 | 90 | 107 | |

| Substanz | 50 mM | 20 mM | 10 mM | 5 mM | 2 mM | 1 mM | 100 μM | 10 μM | 1 μM | 100 nM | 10 nM | 1 nM |
|-------------------------------|----------|----------|----------|---------|---------|------------------------|-----------|----------|---------|-----------|----------|---------|
| Substratanaloga | | | | | | | | | | | | |
| β-Carotin** | | | | | | ≤ 5 | | | | | | |
| α-Tocopherol** | | | | | | < 5 ^x 30 | | | | | | |
| δ-Tocotrienol* | | | | | | 62 | 75 | 105 | | | | |
| Squalen** | | | | | | < 5 ^x 60 | | | | | | |
| Pristan | | | 85* | | | 91* | 112* | | | | | |
| Sonstige | | | | | | | | | | | | |
| Ascorbat | | | 9 | | | 16 | 14 | 19 | 69 | | | |
| CaCl ₂ | | | | | | 100 | | | | | | |
| Fluorid (KF) | 88 | | 94 | | | 92 | | | | | | |
| Imidazol | | | 22 | | | 50 | | | | | | |
| Imidazol (2h inkubiert)*** | | | 19 | | | | | | | | | |
| Histidin | | | | | | 80 | | | | | | |
| NaCl (bis 2M) | 100 | | | | | | | | | | | |
| FeSO ₄ | | | | | | 91 | 90 | 96 | | | | |
| FeCl ₂ | | | 58 | | | 89 | 99 | 92 | 110 | | | |

* Stammlösung in Propanol: 1 % Propanol im Testansatz

** Stammlösung in Ethanol: 1 % Ethanol im Testansatz

*** RoxA wurde vor Beginn des Tests (Latexzugabe) 2 h mit Imidazol inkubiert.

^x in Bis-Tris (s. Braaz, 2005 b)

Eine deutliche aktivitätshemmende Wirkung zeigten Reduktionsmittel wie Na⁺-Dithionit und NADH/PMS. Da die Aktivitätstests aufgrund der Sauerstoffabhängigkeit von RoxA an Luft durchgeführt wurden, muss bei der Betrachtung der Restaktivitäten mit Dithionit die Umsetzung durch die Reaktion mit O₂, die es dem Enzym bei nur noch niedrigen Dithionitmengen wieder ermöglicht zu arbeiten und somit die Dauer des Testes bedacht werden. Wie optische Spektren zeigten, trug auch Ascorbinsäure (E₀' = -66 mV) zu einer partiellen Reduktion des Enzyms bei, insbesondere unter Sauerstoffausschluss, konnte jedoch nicht zu einer halbreduzierten Form von RoxA, wie es bei bakteriellen Peroxidasen möglich ist, verhelfen. Dies erscheint angesichts der für RoxA gefundenen Redoxpotentiale der Hämzentren nachvollziehbar (s. Kap. 3.9.4). Gleichmaßen hemmten auch Oxidationsmittel wie K⁺-Ferricyanid, K⁺-Permanganat und andere die RoxA-Aktivität. Dies deutet auf eine Änderung des Redoxzustandes während des Spaltungsmechanismus hin. Die gleichzeitige Anwesenheit von Reduktions- und Oxidationsmitteln schien die jeweiligen Effekte teilweise aufzuheben und resultierte in einer etwas höheren RoxA-Aktivität.

Eine starke Hemmung bei Verwendung geringer Konzentrationen der Testsubstanz, konnte mit dem Oxidationsmittel und dem Substrat für Peroxidasen, Wasserstoffperoxid (H₂O₂), verzeichnet werden. Mit einer Präparation von RoxA aus Latexkultur wurde untersucht, ob bereits eine Inkubation mit H₂O₂ Zugabe der Latex, d. h. vor Beginn des

Aktivitätstests eine Auswirkung auf die Latexspaltung hat. Dabei zeigte sich die Endkonzentration im Ansatz als entscheidend für die festgestellte Aktivität, weitgehend unabhängig, ob das im Test eingesetzte RoxA zuvor mit einer höheren H_2O_2 -Konzentration (≤ 1 mM) inkubiert wurde (Tab. 3.3). Diese steht jedoch im Widerspruch zu Beobachtungen der UV-Vis- und EPR-Spektroskopie mit rekombinatem RoxA, die auf eine Häm-Schädigung hinwiesen, und könnte auf präparationsbedingte Unterschiede (s. Kap. 4.5) zwischen RoxA aus Latexkultur und rekombinatem RoxA zurückgehen (s. dazu Kap. 4.7).

Tab. 3.3: Restaktivitäten [%] von RoxA mit H_2O_2 nach Inkubation für 2 h bzw. 15 h vor Beginn des Aktivitätstests (3 h). Diese waren unabhängig von einer Inkubation mit H_2O_2 vor Testbeginn.

| Endkonzentration H_2O_2 | | 10 μM | 1 μM | 0,1 μM |
|---|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| ohne vorherige Ink. | | 11 % | 57 % | 91 % |
| 2 h mit 1 mM | | 13 % | - | - |
| 15 h mit | 1 mM | 16 % | 61 % | 84 % |
| | 100 μM | | | |
| | 10 μM | | | |

Zu Wasserstoffperoxid strukturell ähnliche Substanzen wie Hydroxylamin (NH_2OH) und Hydrazin (N_2H_4) stellen wie auch Phenylhydrazin typische Peroxidase-Inhibitoren dar und hemmten die Latexspaltung durch RoxA ebenfalls stark. Bei anderen wie Na^+ -Azid, 3-Amino-1,2,4-triazol und Ammoniak war die Hemmwirkung jedoch deutlich geringer. Mit gealtertem RoxA, bei welchem die spezifische Aktivität pro μg Protein gegenüber frischem vermindert war, trat selbst bei hohen Konzentrationen von Azid (10–50 mM) keine Hemmung mehr ein. Auch die Anwesenheit von Metalloproteinen verminderte die RoxA-Aktivität. Solche sind Katalase [Häm *b*], Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) [Häm *b*], Lipoxygenase [Fe] und Hämoglobin [Häm *b*], ferner Cytochrom *c* [Häm *c*]. Keinerlei Hemmung zeigten Ansätze mit Superoxid-Dismutase, welche die Dismutation von Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) in O_2 und H_2O_2 katalysiert. Demnach scheinen keine freien $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Ionen bei der Latexspaltung durch RoxA zu entstehen bzw. eine Rolle zu spielen.

Ein aufschlussreiches Experiment war das Testen von Katalase zusammen mit H_2O_2 im selben Versuchsansatz. Dabei zeigte sich im Vergleich zu Kontrollen, dass die durch H_2O_2 hervorgerufene Hemmung durch die Anwesenheit bereits geringer Katalase-Konzentrationen vollständig aufgehoben wurde und die insgesamt registrierte Aktivitätsminderung dem Niveau der Ansätze mit den entsprechenden Katalase-Konzentrationen entsprach. Die festgestellte Hemmung wurde demnach alleine durch die vorhandene Menge an Katalase bestimmt. Um die beiden Effekte voneinander unterscheiden zu können, musste die H_2O_2 -Konzentration so gewählt werden, dass sie gerade eine möglichst vollständige Hemmung bewirkte (100 μM), die Katalase-Konzentration so, dass sie eine deutlich sichtbare, doch

keine vollständige Hemmung hervorrief (Tab. 3.4). Ein Kontrollansatz mit Katalase alleine belegte, dass ohne die Anwesenheit von RoxA keinerlei Latex-Spaltprodukte produziert wurden.

Tab. 3.4: Auswirkung der gleichzeitigen Anwesenheit von H₂O₂ und Katalase im Aktivitätstest nach 15 h. Gleiche Farben entsprechen einer gleichen Katalase-Konzentration im Testansatz. Der Effekt von H₂O₂ wurde durch Katalase aufgehoben, die Restaktivität in Ansätzen mit Katalase und H₂O₂ entsprach derjenigen mit Katalase alleine.

| Ansatz mit RoxA (ca. 50 nM) | | Restaktivität [%] |
|--|-------------------------------------|----------------------|
| + Katalase | 1 μM * | 7 |
| | 100 nM | 17 |
| | 10 nM | 28 |
| | 1 nM | 45 |
| | 0,1 nM | 76 |
| + H ₂ O ₂ | 100 μM | 1 |
| | 1 μM | 75 |
| + H ₂ O ₂ (100 μM) | +Katalase (100 nM) | 20 |
| | +Katalase (10 nM) | 31 |
| | +Katalase (1 nM) | 40 |
| Kontrolle | | 100 \pm 6% |

* Katalase: [240 $\mu\text{g/ml}$ = 1 μM]

Ein Vergleich der Aktivitäten bei gleichen Katalasemengen und gleicher Latexkonzentration (0,2 %), aber verschiedenen RoxA-Konzentrationen im Test ergab im Wesentlichen die gleichen Werte (Tab. 3.5). Bei einer RoxA-Konzentration von 400 nM wurde zwar etwa viermal mehr Spaltprodukt produziert, die relative Hemmung durch Katalase war jedoch gleich derjenigen in vergleichbaren Ansätzen mit einem Zehntel der RoxA-Menge. Zudem waren bei diesem Experiment die Unterschiede zwischen (sub-)stöchiometrischen Katalasemengen und dem 10fachen Überschuss nicht signifikant. Unterschiede in der absoluten registrierten Aktivität in vergleichbaren Ansätzen mit Katalase bei unterschiedlichen Versuchsreihen (vgl. Tab. 3.2) ist neben der Inkubationsdauer vermutlich auch auf die Verwendung verschiedener Latex-Lieferungen zurückzuführen (s. u.).

Tab. 3.5: Abhängigkeit der RoxA-Aktivität von der RoxA- und Katalase-Konzentration im Aktivitätstest nach 3 h. Die durch Katalase bewirkte Aktivitätsminderung war weitgehend unabhängig von der Katalasekonzentration und dem Verhältnis der RoxA- zur Katalase-Menge.

| RoxA \ Katalase | 40 nM (3 µg/ml) | 400 nM (30 µg/ml) |
|-----------------|--------------------|----------------------|
| | 100 % | 100 % [402]* |
| 1 nM | 74 % | 73 % |
| 40 nM | 68 % | 65 % |
| 400 nM | 76 % | 67 % |

* [] gibt Prozent der Aktivität in Bezug zum Ansatz mit 40 nM RoxA an

Die in Tab. 3.5 dargestellten Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass Katalase ihre hemmende Wirkung durch Bindung an RoxA ("Wegtitrieren") entfalten könnte, andernfalls sollte die Hemmung deutlich konzentrationsabhängiger sein. Eine mögliche Erklärung dafür ergab sich durch Beobachtung der Versuchsansätze mit bloßem Auge. In Ansätzen mit höherer RoxA-Konzentration war der Auftrieb des Substrates erhöht, Latex konzentrierte sich schneller an der Oberfläche. Da RoxA am Substrat bindet und eine vermutlich wesentlich höhere Affinität zu Latex besitzt als Katalase, wäre die effektive Substrat- und RoxA-Konzentration im Vergleich zur Katalase-Konzentration an der Pufferoberfläche im Teströhrchen deutlich erhöht. Bei ruhender Inkubation konzentrierte sich dort durch den Substratauftrieb allmählich die größte Latex- und RoxA-Menge, während die Katalase-Konzentration im gesamten Ansatz eher gleich bliebe unter der Annahme, dass Katalase nicht durch Bindung hemmt. Dies wäre ein Grund für die kaum feststellbaren Unterschiede zwischen den o. g. Ansätzen.

Offenbar musste es sich auf die gemessene Aktivität auswirken, ob Versuchsansätze während des Inkubationszeitraums bewegt wurden oder nicht. Daraus leitet sich eine grundlegende Problematik bei der Durchführung bzw. Interpretation des Aktivitätstests ab, die im Folgenden näher betrachtet werden soll.

3.6.2 Auswirkung von Puffer und Versuchsdurchführung auf die Aktivität

Aufgrund der geringeren Dichte im Vergleich zu Wasser ist es nicht zu vermeiden, dass Kautschuklatex in einer wässrigen Suspension allmählich an die Oberfläche steigt. Es war zu beobachten, dass Latex im organischen Bis-Tris-Puffer langsamer aufstieg als im ionischen KPP. In Tris-Puffer war der Effekt eher noch deutlicher, das RoxA-Substrat blieb länger emulgiert. Die unterschiedliche Verteilung der Latex im Testansatz und damit die von der ursprünglich eingestellten Konzentration von 0,2 % stark abweichenden lokalen Konzentrationen könnten die Ursache für die Unterschiede zwischen den Puffern sein. Die

genaue Ursache bleibt dabei unklar. Möglicherweise verstärkt ein ionischer Puffer die Affinität der Substratmoleküle zueinander, was deren Auftrieb steigern würde im Gegensatz zu einem organischen Puffer. Dafür spräche, dass die Anwesenheit von Salzen das Verklumpen von Latex nachweislich fördert.

Um den Zusammenhang zwischen der Latex-Verteilung und den scheinbaren Aktivitätsunterschieden nachzuweisen, wurde eine Versuchsreihe mit KPP und Bis-Tris über drei Stunden (Doppelbestimmung) durchgeführt, wobei jeweils ein Parallelansatz regelmäßig (alle 15 min) manuell gemischt wurde, ein weiterer ruhend inkubierte. In KPP wurde folgerichtig den oben dargestellten Beobachtungen nach regelmäßigem Mischen eine scheinbare Aktivitätsminderung auf ca. zwei Drittel derjenigen des ruhenden Ansatzes registriert. Damit unterschied sie sich kaum mehr von derjenigen in Bis-Tris. Dort blieb die Aktivität nach Suspendieren praktisch unverändert (Tab. 3.6). Bestand der Testpuffer sowohl aus KPP als auch Bis-Tris lag die Aktivität ebenfalls auf dem Niveau wie mit Bis-Tris bzw. dem suspendierten Ansatz in KPP. Dies könnte auch eine direkte Wirkung der organischen Pufferkomponente auf die Suspensionseigenschaften von Latex bedeuten, indem es für geringeren Auftrieb sorgte. Unterstützt würde diese Annahme durch die Feststellung einer deutlich höheren Aktivität in nur 10 mM Bis-Tris als in 100 mM, welche derjenigen in 100 mM KPP bzw. auch der unverminderten Aktivität in 10 mM KPP glich. Mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8) war jedoch auch verglichen mit 10 mM KPP (pH 8) nur geringe Aktivität (ca. $\frac{1}{3}$) zu verzeichnen. So könnte Tris zumindest ergänzend auch als Inhibitor wirken.

Tab. 3.6: Vergleich der Aktivitäten in verschiedenen Puffern bei pH 7 in ruhenden und geschüttelten Ansätzen nach 3 h. Vergleichbar sind die in einer Zeile angegebenen Aktivitäten, die entsprechenden Referenzwerte sind fett gedruckt. Hohe Molarität einer organischen Pufferkomponente mindert die RoxA-Aktivität offenbar durch die bessere Erhaltung einer gleichen Latex-Suspension. Dies wird an der Aktivitätsminderung durch regelmäßige Mischung (emulg.) des Ansatzes deutlich, die praktisch nur im ionischen KPP auftritt.

| KPP 100mM pH7 [%] | KPP 100mM pH7 emulg. | KPP 10mM pH 7 | Bis-Tris 100mM pH7 | Bis-Tris 100mM pH7 emulg. | Bis-Tris 10mM pH 7 | KPP+Bis- Tris 100mM pH7 |
|-------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 100 | 67 | 93 | 58 | 64 | 92 | 65 |
| | 100 | | | 96 | | 97 |
| | | 100 | | | 100 | |
| | | | 100 | 110 | 160 | 111 |

3.6.3 Katalase-Hemmung in verschiedenen Puffern

Bei der Betrachtung von Eisen-Enzymen war insbesondere die deutliche Hemmung durch Katalase in KP-Puffer (100 mM, pH 7) aufgefallen (Tab. 3.2). In Bis-Tris-Puffer (100 mM, pH 7) dagegen konnte keinerlei Abnahme der Aktivität festgestellt werden. Wie bereits erwähnt überstieg die RoxA-Aktivität in KPP diejenige in Bis-Tris um etwa das Doppelte. Dieser Umstand wurde in einer gesonderten Versuchsreihe näher betrachtet.

Getestet wurden zwei verschiedene Präparationen von RoxA aus Latexkultur (zuvor eingefroren bei -70°C) und eine frische Präparation von rekombinantem RoxA (Tab. 3.7). Die registrierten Aktivitäten zeigten in allen Präparationen die gleiche Tendenz, stimmten bei denjenigen aus Latexkultur sehr gut überein. Mit steigender Konzentration von Katalase war in KPP eine nicht-lineare Abnahme zu beobachten. Im gleichen Experiment in Bis-Tris-Puffer dagegen stieg die Aktivität sogar im Vergleich zur Kontrolle ohne Katalase um das Zwei- bis Dreifache an – jedoch mit fallender Katalase-Konzentration (von 1 μM bis 1 nM). Zu bedenken sei dabei aber, dass die Aktivitäten die entsprechenden in in KPP in keinem Fall überstiegen, meist noch immer niedriger waren (vgl. eckige Klammern in Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Vergleich der RoxA-Aktivitäten in KPP und Bis-Tris-Puffer ohne und mit Katalase. Es wurden zwei Präparationen von RoxA aus Latexkultur (1) und (2), sowie eine frische Präparation von rekombinantem RoxA untersucht.

| Puffer | Ansatz | RoxA (1) | RoxA (2) | RoxA (rek.) | |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|-----------|-------------|----------|
| KPP (100 mM, pH 7) | RoxA "as isolated" | 100 | 100 | 100 | |
| | + Katalase | 1 nM | 78 | 76 | 41 |
| | | 10 nM | 67 | 65 | 23 |
| | | 100 nM | 58 | 53 | 26 |
| | | 1 μM | 54 | 49 | 21 |
| Bis-Tris (100 mM, pH 7) | RoxA "as isolated" | 100 [40]* | 100 [39] | 100 [26] | |
| | + Katalase | 1 nM | 290 [107] | 229 [89] | 180 [47] |
| | | 10 nM | 225 [82] | 210 [82] | 140 [37] |
| | | 100 nM | 201 [74] | 154 [60] | 122 [32] |
| | | 1 μM | 116 [46] | 120 [47] | – |

* In [] Klammern steht der prozentuale Anteil zu RoxA "as isolated" in KPP

Der Vergleich zwischen KPP und organischen Puffern hatte einen Zusammenhang zwischen der Verteilung des polymeren Substrats im Volumen des Testansatzes und der resultierenden Aktivität aufgezeigt (Kap. 3.6.2). Dieser Umstand könnte auch die aus Tab. 3.6 hervorgehenden Ergebnisse begründen. Denn in Kontrollansätzen mit Katalase und Latex, in denen RoxA fehlte, wurde beobachtet, dass Katalase mit steigender Konzentration die Aggregation des Substrates förderte. In KP-Puffer würde sich somit zwar das Substrat

schneller an der Oberfläche konzentrieren, aber möglicherweise durch Aggregation RoxA eine geringere Angriffsfläche bieten und auf diese Weise hemmen. Die negativen Auswirkungen der Katalase und des manuellen Mischens sollten sich in diesem Fall aufaddieren.

In einer weiteren Testreihe wurde die RoxA-Aktivität zusammen mit Katalase-Konzentrationen vom 0,1 – 50fachen der RoxA-Konzentration jeweils in einem ruhenden und bewegten Ansatz, jeweils in KPP und Bis-Tris-Puffer über drei Stunden bestimmt (Tab. 3.8). Die jeweils registrierte relative Hemmung durch Katalase in KPP war in ruhenden und regelmäßig gemischten Ansätzen gleich. Der Aktivitätsverlust durch Emulgieren im Vergleich zum entsprechenden ruhenden Ansatz in KPP betrug stets ca. 25 %, unabhängig ob Katalase anwesend war oder in welcher Konzentration. Es fand demnach tatsächlich eine Art Addition der Effekte statt. In Bis-Tris dagegen könnte mit geringen (\approx stöchiometrischen) Katalasemengen die Aggregation in einem Maße erfolgen, welches den Substratauftrieb förderte, aber die Wirkungsoberfläche zu RoxA kaum beeinträchtigte und somit in scheinbar höherer RoxA-Aktivität resultierte als ohne die Anwesenheit der Katalase. Dass mit höheren Katalase-Konzentrationen in Bis-Tris wieder eine geringere Aktivität zu verzeichnen war, ließe sich mit einer zunehmenden Dominanz des ungünstigen Klumpungseffektes erklären, der die positiven Effekte eines schnelleren Auftriebs wieder wettmachte. In Bis-Tris-Puffer sollte folglich das regelmäßige Mischen des Ansatzes bei geringen Katalase-Konzentrationen deren positiven Effekt auf die Aktivität teilweise beheben, diese bei hohen dagegen kaum beeinflussen können. Tatsächlich wurde im Versuch durch Mischen bei (sub-) stöchiometrischen Katalasemengen eine Minderung der Aktivität zum komplementären ruhenden Ansatz wiederum um etwa 25 % beobachtet, während mit einem Überschuss an Katalase kaum ein Unterschied festzustellen war (s. Tab. 3.8).

Tab. 3.8: RoxA-Aktivitäten [%] mit Katalase in Bis-Tris- und KPP im Vergleich jeweils im ruhenden und regelmäßig bewegten Ansatz; 55 nM RoxA (4 μ g/ml) und 0,2 % Latex im Test für 3 h.

| | Bis-Tris | | KPP | |
|----------------------------------|----------|----------------|--------|--------------|
| | ruhend | bewegt | ruhend | bewegt |
| 4 μ g/ml rek. RoxA (55 nM) | 100 % | 95* (100) | 100 % | 75 (100) |
| _ <u>+</u> Katalase 5 nM | 223 | 76 [170] (347) | 93 | 76 [71] (96) |
| _ <u>+</u> Katalase 55 nM | 170 | 71 [134] (377) | 90 | 77 [70] (94) |
| _ <u>+</u> Katalase 550 nM | 163 | 93 [152] (429) | 80 | 81 [64] (85) |
| _ <u>+</u> Katalase 2,75 μ M | 126 | 95 [120] (339) | 74 | 78 [58] (77) |

* Prozent zu jeweiligem Ansatz (ruhend)

[] Prozent zu Ansatz (ruhend) ohne Katalase (100%)

() Prozent zu Ansatz (bewegt) ohne Katalase

3.6.4 Untersuchung der Peroxidase-Aktivität von RoxA

Zum Nachweis einer möglichen Peroxidase-Aktivität von RoxA dienten gängige optische Testverfahren mit H_2O_2 als Substrat und aromatischen Elektronendonoren wie Pyrogallol, Guaiacol oder 4-Aminoantipyren/2,4-Dichlorphenol (Mason *et al.*, 2001) bzw. Ferrocycyochrom *c* (s. Methoden). Sämtliche Assays lieferten die gleichen Resultate. Es konnte keine signifikante Peroxidase-Aktivität festgestellt werden. Minimale, über das Maß von Negativkontrollen hinaus gehende Absorptionsänderungen wurden mit höheren RoxA-Konzentrationen, etwa der 10^3 fachen Menge als der Meerrettich-Peroxidase (HRP), festgestellt (Abb. 3.21) (s. Schmitt *et al.*, 2010). HRP als Positivkontrolle zeigte erwartungsgemäß eine starke Peroxidase-Aktivität. Bei Abwesenheit von Wasserstoffperoxid unterblieben die Reaktionen vollständig. Ein geringer, aber erkennbarer Effekt war aber auch bei allen anderen getesteten Metalloenzymen zu beobachten, doch waren dazu höhere molare Mengen als bei HRP notwendig. Am deutlichsten mit Katalase, welche H_2O_2 zu Wasser reduziert, in geringerer Intensität mit Lipoxygenase, welche die Dioxygenierung von ungesättigten Fettsäuren ohne H_2O_2 katalysiert. Vergleichsweise am schwächsten war der Effekt mit RoxA (Abb. 3.21). Ohne Enzyme oder mit BSA als Negativkontrolle erfolgten keine oder nur sehr geringe unspezifische Absorptionsveränderungen. Parallele Ansätze ohne Anwesenheit von H_2O_2 entsprachen im Ergebnis dem Ansatz ohne Enzyme, was die observierten schwachen Effekte als Reaktion mit dem Peroxidase-Substrat belegte. Es muss daher angenommen werden, dass es sich hierbei um eine unspezifische Hintergrundaktivität handelte, welche durch eine Reaktion der Metallionen im aktiven Zentrum der Enzyme verursacht wurde.

In Parallelansätzen bei Anwesenheit des Reduktionsmittels Ascorbinsäure (10 mM) unterblieb die Reaktion von HRP oder Katalase vollständig. Ascorbinsäure kann HRP als Substrat dienen (Mehlhorn *et al.*, 1996) und wirkt im Assay der Oxidation der aromatischen Elektronendonoren konkurrierend. Mit RoxA lag der Absorptionsanstieg aber noch im Bereich der Reaktion ohne Ascorbinsäure (Abb. 3.22). Nach (Castillo *et al.*, 1984) kann Ascorbinsäure im Peroxidase-Test mit Guaiacol die ermittelte Peroxidase-Aktivität beeinträchtigen, indem es aufgrund seines niedrigeren Redoxpotentials ein Zwischenprodukt Oxidation von Guaiacol durch H_2O_2 abfängt. Dass mit HRP und Ascorbinsäure bzw. Katalase und Ascorbinsäure keinerlei Anstieg der Absorption und damit eine noch geringere Reaktion als bei RoxA mit Ascorbinsäure zu verzeichnen war, könnte bedeuten, dass der registrierte geringe Absorptionsanstieg mit RoxA nicht auf eine Peroxidaseaktivität zurückgeht und mit der um ein Vielfaches höheren RoxA- bzw. Häm-Konzentration im Assay zusammen hängt.

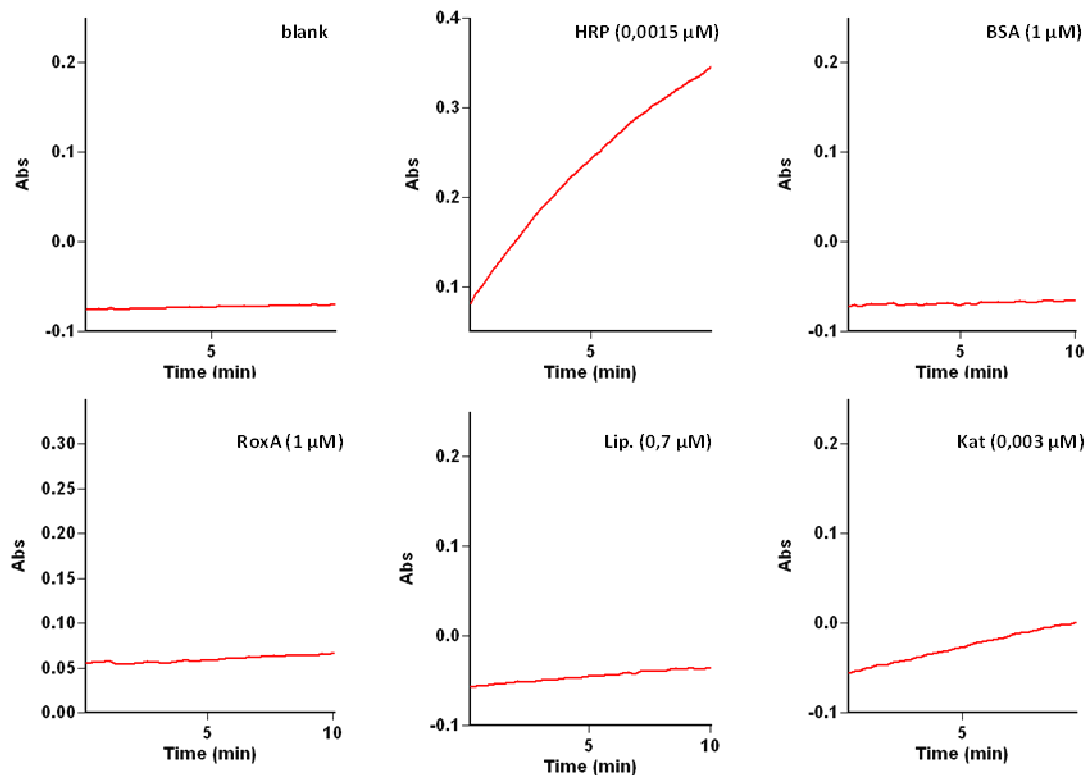


Abb. 3.21: Peroxidase-Assay (Elektronendonor Pyrogallol) mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) (0,0015 µM) als Positivkontrolle, Katalase (Kat) (0,003 µM), Lipoxygenase (Lip) (0,7 µM), RoxA (1 µM), sowie BSA (1 µM) als Negativkontrolle und ein Blank-Ansatz ohne Enzym.

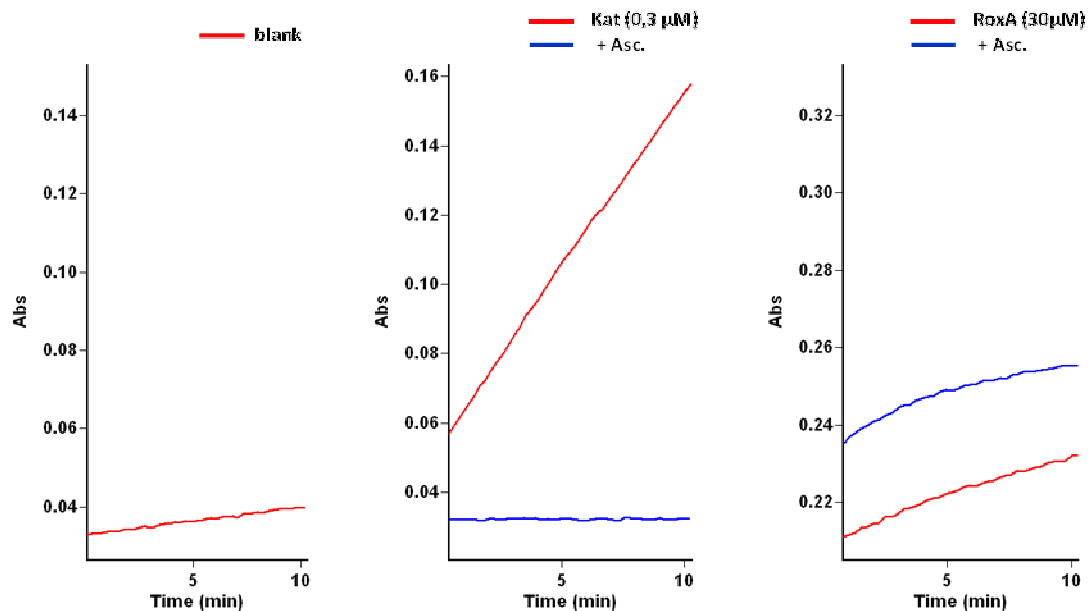


Abb. 3.22: Peroxidase-Assay (Elektronendonor Pyrogallol) mit RoxA bzw. Katalase, jeweils mit (blau) und ohne Ascorbinsäure (10 mM) (rot): (links) Negativkontrolle (ohne Enzyme), (mitte) Katalase [0,3 µM], (rechts) RoxA (30 µM). Ein geringfügig stärkerer Anstieg der Absorption als in der Negativkontrolle zeigte sich mit RoxA, deutlicher mit Katalase, mit welcher bei Anwesenheit von Ascorbinsäure keinerlei Reaktion mehr festgestellt wurde. Kaum ein Unterschied zwischen beiden Ansätzen zeigte sich mit RoxA. Aus versuchstechnischen Gründen musste in diesem Experiment auf eine Positivkontrolle mit HRP verzichtet werden. Die Negativkontrolle mit HRP + Ascorbinsäure lieferte gleiches Ergebnis wie der Parallelansatz mit Katalase + Ascorbinsäure.

3.7 Konstruktion und Expression von RoxA-Mutanten

Nachdem die homologe Expression von RoxA im *Xanthomonas* sp. 35Y -Wildstamm vom Plasmid p4782.1::*roxA* (Kap. 3.1.2) und dessen chromatographische Reinigung gelang (Kap. 3.2), wird nun zur Expression genetisch veränderter RoxA-Varianten ein Stamm benötigt, dessen genomische *roxA*-Kopie vollständig deletiert ist, um einen Austausch der mutierten *roxA*-Variante mit der chromosomalen *roxA*-Sequenz durch homologe Rekombination zu vermeiden. Entsprechende Bemühungen waren zum Ende des Versuchszeitraums noch nicht abgeschlossen. Dennoch schien bis auf Weiteres eine Expression von Mutanten durch p4782.1::*roxA* in einer kontrollierten Weise bei Persistenz des Plasmids möglich. Daher wurden verschiedene *roxA*-Varianten mit jeweils dem Austausch einer Aminosäure konstruiert, von welcher man eine Beteiligung an der Funktionsweise der Latexspaltung durch die Rubber Oxygenase vermuten konnte. Das Fernziel dabei ist, diese RoxA-Varianten zu isolieren und gegenüber dem unveränderten Enzym in ihrer Aktivität zu vergleichen und durch UV-Vis- und EPR-Spektroskopie, sowie Strukturanalyse nach Kristallisation näher zu charakterisieren.

Zunächst sollten die beiden Hämbindemotive im Mittelpunkt einer Mutagenese stehen. Der Einbau je einer der beiden Hämgruppen sollte durch den Austausch eines der Cysteine im Hämbindemotiv CXXCH verhindert werden, um zu klären, ob und in welchem Maße beide Zentren für die Latexspaltung notwendig sind. Desweiteren sollte zunächst die Mutation zweier in Cytochrom *c* Peroxidasen konservierter aromatischer Aminosäuren erfolgen, die in RoxA in entsprechender Weise lokalisiert sind. Zwei aromatische Aminosäuren, die beim Vergleich mit Peroxidasen aufgefallen waren, wurden ausgewählt, um die Elektronenübertragung durch das Enzym und im weiteren Sinne die Funktion der Häm besser zu untersuchen. Tryptophan 302, welches direkt zwischen den beiden Hämzentren in gleicher Weise wie bei den *P. aeruginosa*- und *N. europaea* -Peroxidasen lokalisiert ist (Shimizu *et al.*, 2001), und Histidin 517, das sich innerhalb der bei Peroxidasen konservierten und in RoxA enthaltenen "MauG"-Region befindet, wird bei bakteriellen Peroxidasen eine essentielle Beteiligung am Elektronentransport zwischen den Hämzentren zugeschrieben (de Smet *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

3.7.1 Konstruktion von *roxA*-Mutanten

Die ersten beiden Mutationen sollten einen Einbau je eines der beiden Hämzentren in RoxA unterbinden. Da beide Cysteine im Hämbindemotiv für ein *c*-Typ-Cytochrom (CXXCH) für einen Hämeinbau erforderlich sind, wurde jeweils eines durch Serin ersetzt. Im Falle des N-terminalen Häms geschah dies durch Konversion von CASCH in CASSH (C194S), im Falle des C-terminalen durch CSACH in SSACH (C393S). Die Mutationen wurden zunächst mittels PCR in pUC9::*roxA* mit TAKARA-Polymerase und den Primerpaaren roxHäm1-C1_f

und roxHäm1-C1_r bzw. roxHäm2-C2_f und roxHäm2-C2_r eingeführt. In entsprechender Weise wurden die Mutationen W302L mit den Primern roxW302L_f und roxW302L_r bzw. roxH517L_f und roxH517L_r konstruiert. Anschließend folgte eine Restriktion mit *DpnI*, um die methylierten, nicht mutierten Stränge zu entfernen. Auf eine anschließende Ligation wurde verzichtet und die geschnittenen PCR-Ansätze direkt zur Transformation von *E. coli* XL1 Blue eingesetzt. Nach Isolation der entsprechenden Plasmide pUC9::*roxA*- Δ Häm1, pUC9::*roxA*- Δ Häm2, pUC9::*roxA*-W302L und pUC9::*roxA*-H517L wurden diese mit *HindIII/NdeI* geschnitten und anstelle des unveränderten *roxA* in den Expressionsvektor p4782.1::*roxA* ligiert, anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die erhaltenen Plasmide wurden auf Einführung der Punktmutation durch Sequenzierung [GATC, Konstanz] des gesamten Gens überprüft und zur dauerhaften Lagerung zusätzlich in *E. coli* JM109 transformiert. Die Expressionsplasmide p4782.1::*roxA*- Δ Häm1, p4782.1::*roxA*- Δ Häm2, p4782.1::*roxA*-W302L und p4782.1::*roxA*-H517L wurden nach *Xanthomonas* sp. 35Y durch Elektroporation übertragen. Da wohl aufgrund der Größe des Vektors nur wenige potentielle Transformanten erhalten wurden, wurden die Plasmide in den zur Konjugation fähigen *E. coli* S17-1 übertragen. Der konjugative Transfer nach *Xanthomonas* sp. 35Y (Kap. 2.6.3.2) erfolgte mit deutlich besseren Ausbeuten an Transkonjuganten (\approx 500/Ansatz).

3.7.2 Expression von RoxA-Varianten in *Xanthomonas* sp. 35Y

Die Expression von RoxA-Varianten in den konstruierten Stämmen *Xanthomonas* sp. 35Y-Stämmen mit p4782.1::*roxA*- Δ Häm1, p4782.1::*roxA*- Δ Häm2, p4782.1::*roxAW*-302L bzw. p4782.1::*roxA*-H517L wurde analog zur Expression von RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* durchgeführt. Doch konnte in keinem Falle die Expression auch nur geringer RoxA-Mengen nachgewiesen werden. Auch die mehrmalige Wiederholung der Experimente nach Neutransformation der Plasmide führte nicht zum Erfolg, weder in Tsuchii & Takeda-Minimalmedium mit Gluconat noch in LB-Medium. Die Aufnahme der Plasmide in die jeweiligen *Xanthomonas* sp.-Stämme konnte durch Isolierung der Plasmid-DNA und anschließende Transformation in *E. coli* JM109 gezeigt werden. Der Nachweis gelang durch Reisolierung aus den *E. coli*-Transformanten und *HindIII/NdeI*-Restriktion der Vektoren. Trotz Anwesenheit der Plasmide in den *Xanthomonas* sp.-Expressionsstämmen wurden weder im Aktivitätstest noch nach SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit RoxA-spezifischer Immunfärbung Hinweise auf eine Expression der RoxA-Mutanten gefunden. Untersucht wurden Kulturüberstand, sowie Zellaufschluss (Ultraschall) von Rhamnose-induzierten (0,1 %) und nicht induzierten Kulturen. Im Blot entsprach das Bandenmuster der Transformanten dem des Wildtyps. Doch im Vergleich zu diesem traten im SDS-Gel sowohl im Kulturüberstand als auch insbesondere in Zellaufschluss-Fractionen Banden bei etwa 30 kDa auf, die wahrscheinlich von der plasmidcodierten Aminoglycosid-Phosphotransferase

(*aphIII*: 29,2 kDa) für die Kanamycin-Resistenz stammten und die Anwesenheit der RoxA-Plasmide belegten (ohne Abb.).

Interessanterweise gelang ebenso die Expression des unveränderten *roxA* nach Neutransformation von p4782.1::*roxA* in *Xanthomonas* sp. 35Y nicht mehr. Das Plasmid konnte jedoch im neu transformierten Stamm nachgewiesen werden. Dagegen war eine Reisolierung des Expressionsvektors aus *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA*, bei welchem eine stabile RoxA-Expression von bis zu 10 mg/L erreicht wurde, im Gegensatz zu den Mutanten nicht mehr möglich. Zudem führte eine Umklonierung der entsprechenden mutierten *roxA*-Gene nach *HindIII/NdeI*-Restriktion der Fragmente in den Vektor p4782.1::*roxA*, mit welchem der funktionelle *Xanthomonas* sp.-Expressionsstamm transformiert worden war, zu den gleichen Resultaten. Diese Beobachtungen lieferten Grund zu der Annahme, dass für eine erfolgreiche homologe Überexpression die Integration des Plasmids in das Chromosom notwendig war. Diese Vermutungen wurden in weiter führenden Arbeiten vertieft (Birke, 2010; pers. Information N. Hamsch).

Durch PCR-Reaktionen mit Primerpaaren, von denen ein Primer der *roxA*-Sequenz, ein weiterer der genomischen Umgebung außerhalb von *roxA* komplementär ist, konnten im funktionellen Expressionsstamm *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* auf Gesamt-DNA spezifische PCR-Produkte erhalten werden, die nur durch homologe Rekombination der plasmidcodierten *roxA*-Kopie mit der chromosomalen *roxA*-Sequenz zustande kommen konnten. Bei neu transformierten Stämmen oder dem Wildtyp wurden die bei unverändertem Genlokus zu erwartenden Produkte erhalten (unveröffentlichte Beobachtung, N. Hamsch). Den Beweis für eine nur im funktionellen Expressionsstamm eingetretene Integration des Expressionsplasmids in das Chromosom lieferte ein Southern-Blot mit einer spezifischen DIG-*roxA*-Sonde (Birke, 2010).

3.7.3 RoxA-Mutante W302L

Die im Zusammenhang mit Überexpressionsversuchen von RoxA-Varianten und weiter führender Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse bewiesen letztendlich, dass bei allen p4782.1::*roxA* tragenden und zur Rhamnose-induzierten RoxA-Expression fähigen *Xanthomonas*-Stämmen eine Integration des Plasmids in den chromosomalen Genlokus von *roxA* vorlag. Diese ging auf ein zufällig eingetretenes Ereignis zurück, vermutlich durch langdauernde und wiederholte Kultivierung des Stammes auf Festmedien. Vermutlich auf einem analogen Weg wie bei der Integration des Plasmids p4782.1::*roxA* ins *Xanthomonas*-Chromosom durch ein zufälliges Rekombinationsereignis gelang auch die Integration von p4782.1::*roxA*-W302L ins Chromosom von einem über mehrere Monate auf Selektionsagar mit Kanamycin kontinuierlich überimpften Stamm *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA*-W302L, in welchem anfänglich keine RoxA-Expression hatte nachgewiesen werden können. Bei der Integration des Plasmids durch Rekombination mit der genomischen *roxA*-Sequenz

lägen zwei *roxA*-Hybridgene vor, die sich jeweils aus einem Teil des chromosomalen *roxA* und einem des plasmidcodierten *roxA*-W302L zusammensetzten. Eines wäre durch den natürlichen Promotor, eines durch den Rhamnose-Promotor kontrolliert. Um diesen Stamm zur Expression von RoxA-W302L verwenden zu können, musste die Rekombination in einer Weise erfolgt sein, welche die gewünschte Mutation unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors stellte. Eine vollständige Sequenzierung [GATC, Konstanz] beider *roxA*-Hybridsequenzen belegte, dass der Austausch der Aminosäure Trp₃₀₂ gegen Leucin innerhalb der Hybridsequenz stattgefunden hatte, die der Rhamnose-Induktion unterlag, und keine zusätzlichen Veränderungen vorlagen (unveröffentlichte Ergebnisse, N. Hamsch).

Die Expression von p4782.1::*roxA*-W302L wurde beim Vergleich der Absorptionsspektren der Kulturüberstände offensichtlich. Nunmehr war nach Induktion mit 0,1 % Rhamnose ein deutliches Maximum bei 407 nm im unkonzentrierten Kulturüberstand einer LB-Kultur von *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA*-W302L zu beobachten, das bei der anfänglichen Kultivierung nicht zu sehen war und nun demjenigen des funktionellen Wt-RoxA-Expressionsstammes *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* zu jedem Zeitpunkt des Wachstums bzw. nach Induktion entsprach (Abb. 3.23). Es wurde das Wachstum beider Kulturen in LB-Medium (Abb. 3.24) und die optischen Spektren der zellfreien Kulturüberstände (Abb. 3.23), sowie deren Latex spaltende Aktivität (Abb. 3.25) zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt.

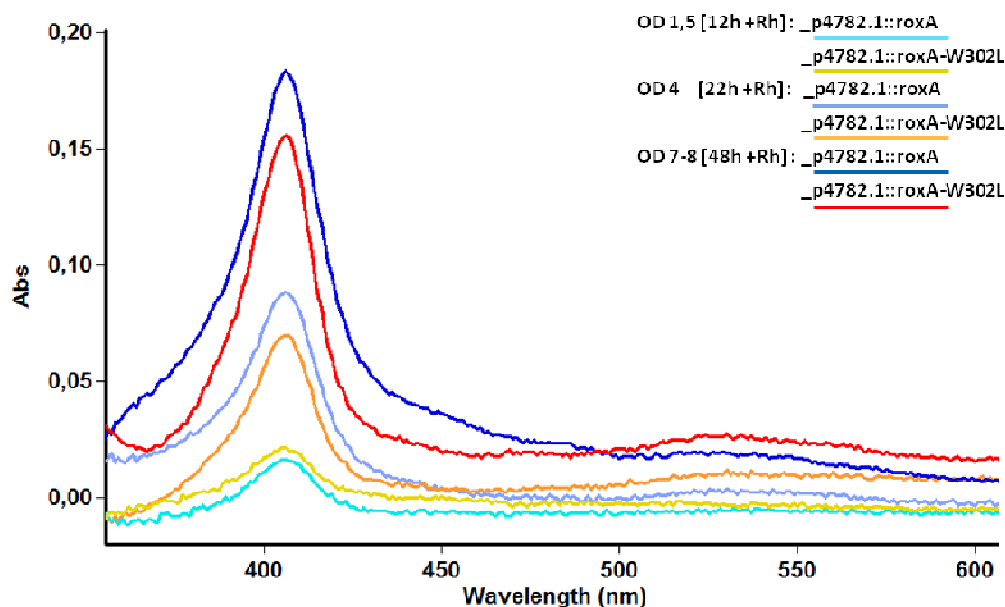


Abb. 3.23: UV-Vis-Differenzspektren des unkonzentrierten LB-Kulturüberstands von *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* und *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA*-W302L [minus des Kulturüberstands je einer mitgeführten, nicht induzierten Kultur gleicher OD] zu verschiedenen Wachstumsstadien (OD₆₀₀ = 1,5; 4; 7–8) (vgl. Abb. 3.25). Dargestellt ist die absolute Veränderung des optischen Spektrums nach Rhamnose-Zugabe [+Rh] bei 12 h, 22 h und 34 h nach Induktion. Es ist bereits bei geringer OD₆₀₀ bei beiden Kulturen eine auf die Rhamnose-Induktion zurückgehende vergleichbare Zunahme der Absorption bei 407 nm, die bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase weiter zunahm, anschließend stagnierte.

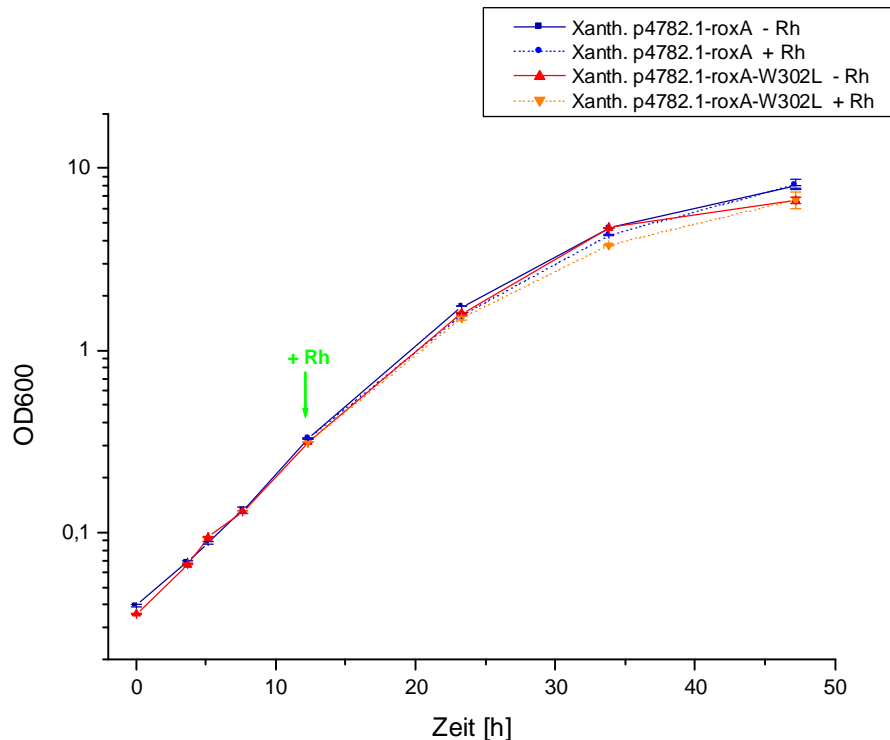


Abb. 3.24: Wachstum von *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::roxA und *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::roxA-W302L in LB-Medium (+Km) in 500 ml-Erlenmeyerkolben, in welchem sich höhere Zelldichten erreichen ließen als bei Großkulturen verwendeten 2 L-Kolben. Den Zeitpunkt der Induktion mit 0,1 % Rhamnose ist markiert der grüne Pfeil. Es sind nur geringe Unterschiede im Wachstumsgeschwindigkeit zwischen rekombinantem Wildstamm und dem die Trp-Mutante exprimierenden Stamm zu erkennen.

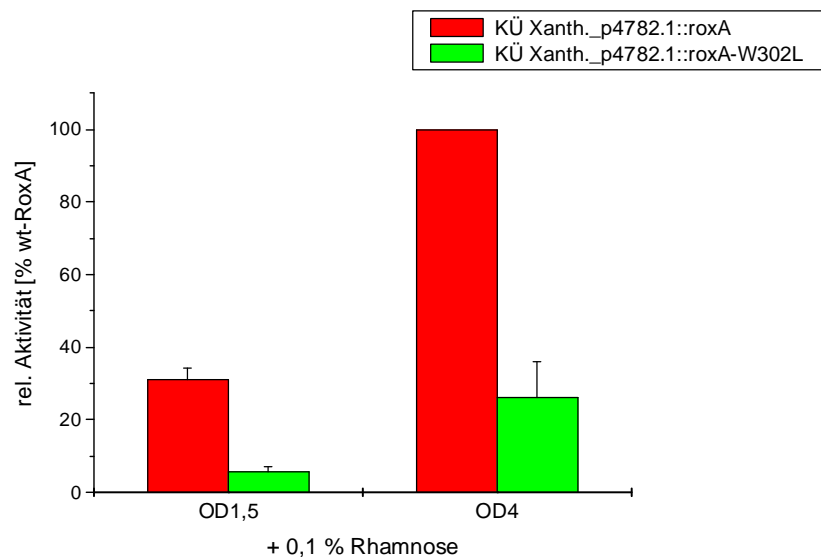


Abb. 3.25: Relative RoxA-Aktivität des unkonzentrierten Kulturüberstandes der beiden RoxA bzw. RoxA-W302L rekombinant exprimierenden *Xanthomonas*-Stämme im Vergleich bei verschiedenen Wachstumsstadien, bei OD₆₀₀ 1,5 [12 h nach Rhamnose-Induktion] und OD₆₀₀ 4 [22 h nach Induktion] (vgl. Abb. 3.24 und Abb. 3.23). Die Latex spaltende Aktivität im Überstand von *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::roxA-W302L ist trotz vergleichbarer Cytochrom-typischer Absorption gegenüber mit *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::roxA deutlich vermindert.

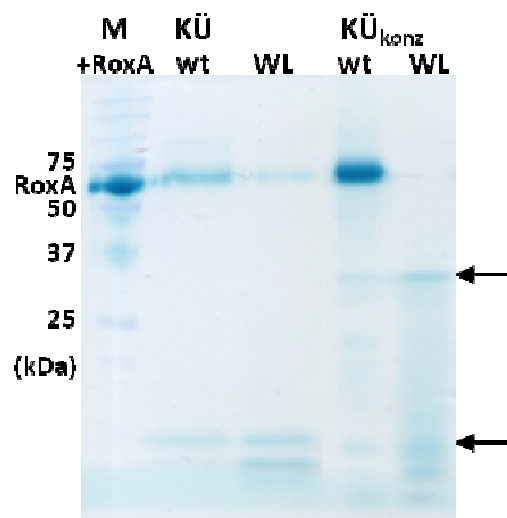
Bei einem Wachstumsvergleich der beiden *Xanthomonas*-Stämme wurde keine signifikante Verlangsamung der Wachstumsrate festgestellt und gleiche Zelldichten erreicht. Allenfalls eine minimal verminderte Wachstumsrate wurde nach Rhamnose-Induktion bei der Mutante beobachtet (Abb. 3.24). Für die Latex spaltende Aktivität im LB-Kulturüberstand der Mutante wurden Werte zwischen 15 und 30 % (21 ± 6 %) verglichen mit der Aktivität von *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* bestimmt (Abb. 3.25).

Um sicher zu stellen, dass die verminderte Aktivität nicht auf eine verminderte RoxA-Expression zurückzuführen war, wurde von Wt-RoxA und der W302L-Mutante die sekretierte RoxA-Menge jeweils einer induzierten und nicht induzierten Kultur im UV-Vis-Spektrum und durch SDS-PAGE verglichen. Die Absorptionsmaxima bei 406 nm zeigten sich bei der Mutante ebenso stark wie beim Wildtyp und waren bei Anwesenheit von Rhamnose deutlich größer als ohne den Induktor (Abb. 3.23), wodurch sich die Absorption auf sekretiertes RoxA zurückführen lässt. Im SDS-Gel (Silberfärbung) waren bei der Mutante jedoch nur vergleichsweise wenig intensive Banden auf Höhe von RoxA zu sehen. Eine Hämfärbung offenbarte aber Häm-Banden von geringerer Größe, im konzentrierten Kulturüberstand auch zusammenfließende Häm-Signale mit längerer Laufstrecke als RoxA (Abb. 3.26). Diese Häm enthaltenden RoxA-Fragmente könnten zusammen mit einer gegenüber Wt-RoxA geringen Menge an korrekt gefaltetem RoxA-W302L die beobachtete hohe Absorption bei 406 nm ergeben.

Diese Befunde belegen eine unverminderte Expression und weisen auf einen Zerfall des Enzyms hin. Insbesondere das Auftreten zusätzlicher unspezifischer kleinerer Häm-Signale im Zuge der Konzentrierung des Überstandes könnte auf eine erhöhte Instabilität der Enzymvariante hindeuten.

Abb. 3.26: Hämfärbung nach SDS-PAGE des Kulturüberstandes von *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA* und *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::*roxA*-W302L nach Induktion mit 0,1 % (w/v) Rhamnose. Vom unkonzentrierten bzw. eingeeengten Kulturüberstand ($\approx 20x$) wurden jeweils gleiche Volumina aus beiden Kulturen aufgetragen. M: Marker; KÜ: Kulturüberstand; wt: Wildtyp, unverändertes RoxA; WL: RoxA-W302L.

Trotz annähernd gleicher Absorption im UV-Vis-Spektrum ist bei der Trp-Mutante im unkonzentrierten Kulturüberstand (KÜ WL) ein Zerfall des gebildeten RoxA in kleinere Fragmente zu sehen. Dieser zeigt sich deutlicher nach Konzentrierung durch Ultrafiltration (KÜ_{konz} WL). Das Gel zeigt nur noch wenig intaktes RoxA nach Konzentrierung. Dass Häm-Banden mit längerer Laufstrecke von RoxA stammen, zeigt sich am Auftreten von Banden bestimmter Größe, die auch im KÜ des Wildtyps (wt) zu geringerem Anteil zu sehen sind (Pfeile) und wie bereits mehrfach beobachtet durch Abkochen der Proteinproben entstehen.



Trotz dieser Ergebnisse wurden Versuche unternommen, RoxA-W302L auf konventionellem Wege chromatographisch zu reinigen. Dies erwies sich jedoch als schwierig, da die zu erwartenden kleineren Fragmente durch einen Zerfall des Enzyms ein verändertes Bindungsverhalten aufwiesen. Für eine Interaktion mit dem Säulenmaterial ist die Protein- bzw. Peptidoberfläche entscheidend. Doch nur eine sehr geringe Menge eluierte über Q-Sepharose FF in der erwarteten Weise in relativ sauberer Form, was eine auf die Proteinmenge bezogene relativ hohe Aktivität anzeigte. Der größte Teil der RoxA-Fragmente befand sich im Durchlauf und ließ sich mit dem gleichen Material mit variiertem pH-Wert des Laufpuffers und auch mit Hydroxyapatit-Chromatographie nicht nennenswert von Verunreinigungen trennen. Trotz hoher Häm-Absorption waren dort die auf die Proteinmenge bezogenen Aktivitäten sehr gering. Dennoch gelang es, eine geringe Menge des Enzyms in einer ausreichenden Reinheit ($\text{Abs}_{406}/\text{Abs}_{280} = 0,8$) zu isolieren, mit welcher Aktivitätsbestimmungen durchgeführt werden konnten. Dieses wurde durch Ultrafiltration angereichert und die RoxA-Konzentration über die Häm-Absorption bei 406 nm abgeschätzt. Mit rekombinantem, unverändertem RoxA wurden gleiche Konzentrationen im Aktivitätstest verglichen. Die Aktivität der mutierten RoxA-Variante wurde insgesamt auf 58 ± 7 % bestimmt (vgl. Abb. 3.27 a). Dieser Wert ist deutlich höher als derjenige bei gleichen Mengen des ungereinigten Kulturüberstandes (s. o.) und könnte angesichts des hohen Anteils an fragmentiertem Enzym darauf hinweisen, dass ein geringer Anteil des exprimierten RoxA-W302L, welcher sich isolieren ließ und sich in der Chromatographie gleich dem unveränderten Enzym verhielt, korrekt gefaltet und somit stabiler war.

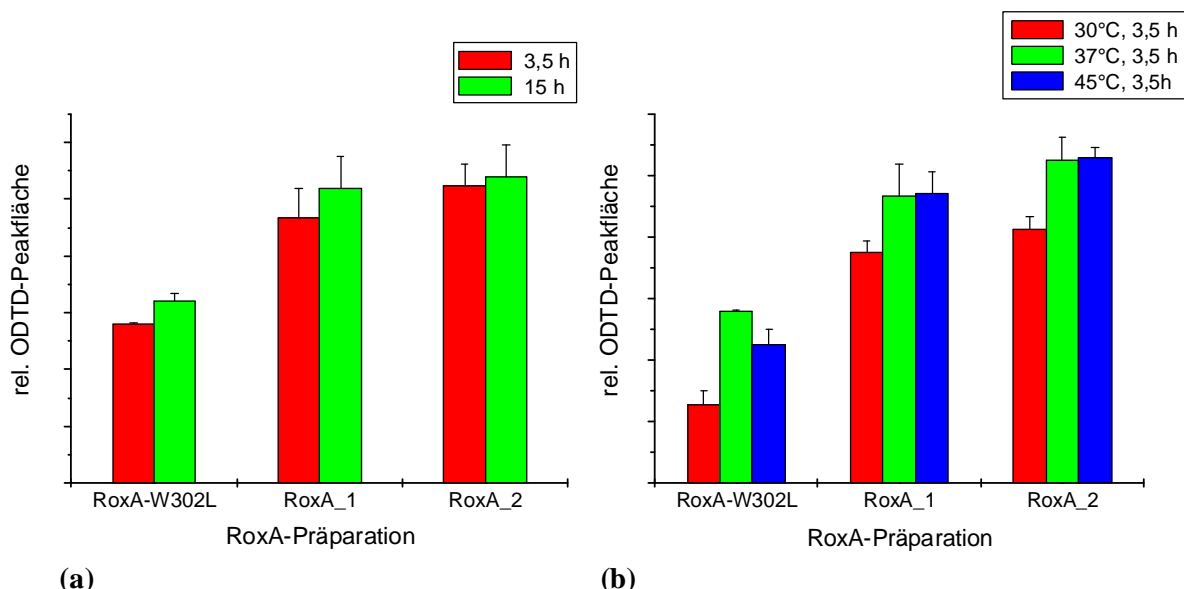


Abb. 3.27: Relative RoxA-Aktivitäten (=ODTD-Peakflächen im HPLC-Chromatogramm) von gereinigtem rekombinantem RoxA-W302L und Wt-RoxA aus zwei verschiedenen Präparationen (RoxA_1, RoxA_2). **(a)** Ermittelte Aktivität nach 3,5 bzw. 15 h Inkubation im Testansatz bei 37°C. Die Aktivität der RoxA-Mutante lag bei ca. 60 % derjenigen von Wt-RoxA. **(b)** Aktivität nach 3,5 h im Vergleich bei 30°C, 37°C und 45°C. Die Aktivität, bei 37°C und 45°C verhielt bei Wt-RoxA in etwa gleich (Optimum 40°C nach Braaz *et al.*, 2004), war bei RoxA-W302L nur leicht vermindert.

Eine anfänglich vermutete Hitzeinstabilität des mutierten RoxA scheint auf die Gesamtheit zuzutreffen, weniger jedoch auf das gewünschte, korrekt gefaltete W302L-Protein, das sich isolieren ließ. Ein geringer, kaum signifikanter Aktivitätsverlust wurde bei der Mutante im Aktivitätstest bei 45°C festgestellt, der bei den Wt-Präparationen nicht zu sehen war (Abb. 3.27 b).

Jüngst konnte nach erneuter Isolierung von RoxA-W302L gezeigt werden, dass bei schrittweiser anaerober Reduktion (Na^+ -Dithionit) dieser mutierten Enzymvariante, deren zwischen den Häm-Propionatgruppen lokalisierte aromatische Aminosäure Trp₃₀₂ ausgetauscht worden war, die Zunahme des zweiten Maximums der α -Bande bei 553 nm erst mit deutlicher Verzögerung im Vergleich zu Wt-RoxA zunahm. Umgekehrt blieben im Zuge der Reoxidation mit Ferricyanid die beiden Signale bei 549 nm und 553 nm in etwa gleicher Ausprägung bis fast zur vollständigen Oxidation bestehen (unveröffentlichte Beobachtung N. Hamsch), wobei Reduktion und Reoxidation bei Wt-RoxA etwa in gleicher Weise verlaufen (s. Kap. 3.9.1). Dies kann als Hinweis auf eine direkte Beteiligung von Trp₃₀₂ an der Elektronenverschiebung zwischen den Hämzentren verstanden werden, wie es in analoger Weise für Tryptophane an gleicher Position in bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen vermutet wurde (de Smet *et al.*, 2006). Wie an diesem Beispiel offensichtlich wird, kann der Vergleich zu Proteinen mit gewisser Ähnlichkeit in Sequenz bzw. Struktur eine wertvolle Hilfestellung zur Entschlüsselung des Wirkungsmechanismus von RoxA leisten. Es wurde daher die Proteindatenbank regelmäßig auf Einträge von Proteinen mit Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu RoxA untersucht.

3.8 Untersuchungen zu sequenzähnlichen Proteinen

3.8.1 Protein-Blast mit RoxA

Auf der Suche nach Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz von RoxA zu anderen Proteinen wurde eine hohe Übereinstimmung zu zwei hypothetischen Proteinen aus dem moderat halophilen Myxobakterium *Haliangium ochraceum* (DSM 14365) gefunden, nachdem die Ergebnisse einer Genomsequenzierung (Ivanova *et al.*, 2010; NC_013440.1) in Teilen bereits im Frühjahr 2009 online veröffentlicht worden waren. Dieses Gram-negative Bakterium zählt zu den δ -Proteobakterien, zur Ordnung der Myxococcales und Familie der *Haliangiaceae*.

Der Protein-Blast (Stand: 04. 11; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) zeigte eine Ähnlichkeit von 78 % (63 % Identität) zum Datenbankeintrag für *Hoch_1661* (ursprünglich: *Hochdraft_37340*; Gene-ID: 8544043) und eine Ähnlichkeit von 51 % (36 % Identität) zu *Hoch_1446* (urspr.: *Hochdraft_53060*; Gene-ID: 8543828). Bei ersterem wurde 126 Basenpaare upstream zum anfänglich in der Datenbank annotierten Start (Stand: 07. 2009) ein

alternatives Startcodon im gleichen Leseraster gefunden. Das sich daraus ergebende, 42 Aminosäuren größere Protein unterscheidet sich von RoxA in der Länge nur durch zwei Aminosäuren und weist nun tatsächlich eine Signalsequenz am N-Terminus auf (SignalP 3.0 Server). Diese besitzt ähnlich wie diejenige von RoxA eine Länge von 29 Aminosäuren, unterscheidet sich aber in der Aminosäure-Zusammensetzung deutlich. Damit sind auch die reifen Proteine in etwa gleich lang. Gleiches gilt auch für Hoch_1441, welches ebenso eine N-terminale Signalsequenz besitzt (Tab. 3.9). In beiden Fällen scheint es sich um saure Proteine zu handeln mit theoretischen pI-Werten für die reifen Proteine von 4,9 und 4,65 im Gegensatz zu RoxA, das einen neutralen physiologischen pI-Wert besitzt (s. Kap. 3.3). Möglicherweise stellt dieser Unterschied eine Anpassung an die jeweiligen unterschiedlichen Lebensbedingungen von *Haliangium ochraceum* und *Xanthomonas* sp. 35Y dar.

Tab. 3.9: Gegenüberstellung von RoxA und den beiden in *H. ochraceum* gefundenen Homologen. Dieser liegen die *Haliangium*-Gene unter Einschluss einer Signalsequenz zugrunde, wie sie auch nach Überarbeitung der Datenbankeinträge annotiert wurden, *Hoch_1661* und *Hoch_1441*; aa : Aminosäuren

| | RoxA | Hoch_1661 | Hoch_1441 |
|----------------|-------------|------------------|------------------|
| aa-Identität | 100 % | 63 % | 36 % |
| aa-Ähnlichkeit | 100 % | 78 % | 51 % |
| Länge [aa] | 678 | 676 | 678 |
| sigPep [aa] | 30 | 29 | 25 |
| [aa] (mature) | 648 | 647 | 653 |
| Größe [kDa]* | 71,52 | 72,17 | 71,31 |
| pI (theoret.)* | 7,3 | 4,9 | 4,65 |

* Kalkulation mit http://expasy.org/tools/pi_tool.html

Abb. 3.28 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Proteine mit RoxA. Dabei wird neben einer insgesamt hohen Übereinstimmung von Hoch_1661 mit RoxA eine hohe Homologie zwischen allen drei Proteinen in bestimmten Regionen offensichtlich. Dies sind zum einen die beiden Hämbindemotive, insbesondere die des C-terminalen Häms, zum anderen die ebenso bei bakteriellen Peroxidasen und MauG-Proteinen konservierte Region um His₅₁₇. Auch aromatische Aminosäuren erscheinen häufig konserviert, beispielsweise zwei aufeinander folgende Trp-Reste an Position 291 und um Trp₃₀₂ (s. Abb. 3.28), welchem eine Beteiligung am Elektronentransport zwischen den Hämentren zugeschrieben wird (s. Kap. 4.2.5). Im Zuge der Ähnlichkeit zu RoxA überrascht es nicht, dass beide reifen Proteine einen ebenso relativ hohen Anteil an Aromaten aufweisen, 12,6 % in Hoch_1661 (35 Phe: 5,4 %, 17 Trp: 2,6 %, 30 Tyr: 4,6 %) und 10,7 % in Hoch_1446 (29 Phe: 4,6 %, 21 Trp: 3,2 %, 19 Tyr: 2,9 %) verglichen mit 11,4 % in reifem RoxA (24 Phe: 3,7 %, 21 Trp: 3,1 %, 30 Tyr: 4,6 %) (vgl. Tab. 4.2, Kap. 4.1.1.1). Zudem findet sich hohe Übereinstimmung an Positionen

zahlreicher Aminosäuren mit positiver Ladung (Arg, Lys), sowie bei Prolin-Resten. Wenig Übereinstimmung weist der N-Terminus und damit die Signalsequenzen auf, dagegen ist der C-Terminus konserviert.

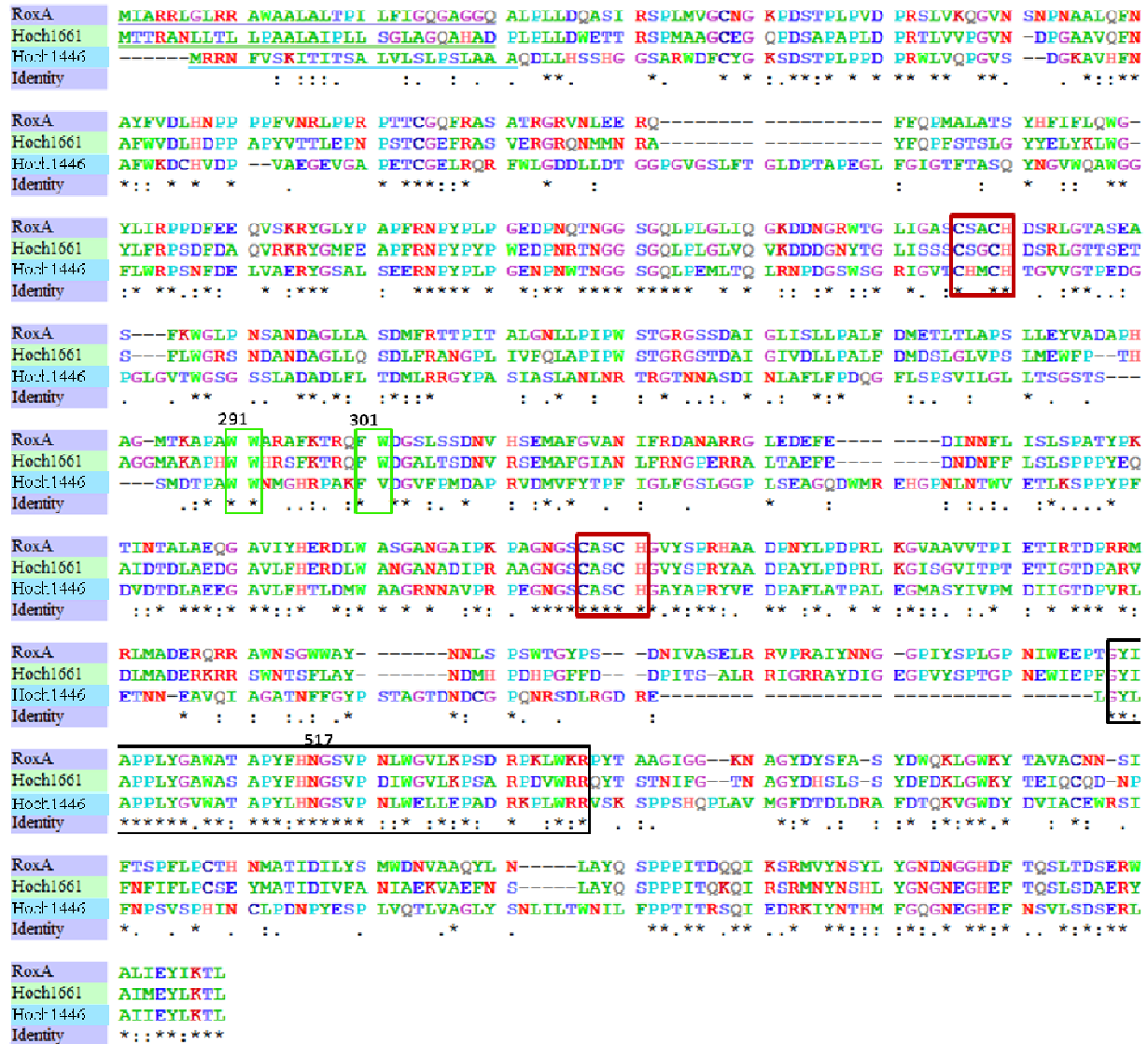


Abb. 3.28: Alignment der Aminosäuresequenzen von RoxA, Hoch_1661 und Hoch_1446. Die vorgeschlagenen N-terminalen Signalsequenzen sind unterstrichen, die Hämbindemotive rot umrandet, die konservierte Region um H517 schwarz umrandet, konservierte aromatische Aminosäuren um Position 291 und 301 grün umrandet. * = hohe, : = mittlere, . = geringe, ohne = keine Übereinstimmung. Das Alignment wurde erstellt mit GENTle Vers. 1.9.4.

Betrachtet man die sequenzierte Region um *Hoch_1661*, findet man weitere Ähnlichkeiten zur Region um RoxA in *Xanthomonas*, von welcher jedoch bislang lediglich 7,6 kb bekannt sind (vgl. Braaz, 2005 b, Abb. 2.5.1). Es findet sich weiter upstream das Gen für eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase, wie auch in der RoxA-Region, doch weisen beide Gene keine

Sequenzähnlichkeit auf. Desweiteren wurden in Übereinstimmung zur RoxA-Region Gene für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase (55 % Identität zu *Xanthomonas* sp. 35Y) und eine Enoyl-CoA-Hydratase/Carnithin-Racemase (56 % Identität zu *Xanthomonas* sp. 35Y) gefunden. Diese beiden besitzen dagegen hohe Übereinstimmung zu den um RoxA kodierten Proteinen, in diesem Fall sogar eine höhere als mit allen anderen Datenbankeinträgen (Stand 07. 2011). Die Anordnung der Gene ist allerdings sehr unterschiedlich (Abb. 3.29, vgl. Abb. 2.5.1 in Braaz, 2005 b). Darüber hinaus sind in diesem Bereich des *Haliangium*-Genoms weitere, an der β -Oxidation beteiligte Gene lokalisiert (s. Abb. 3.29).

Sehr unterschiedlich ist die Region um das zweite potentielle RoxA-Homolog *Hoch_1446* organisiert. Es finden sich keine Gene für Enzyme der β -Oxidation oder ähnlicher Abbauewege – mit einer Ausnahme: Direkt im Anschluss an *Hoch_1446* befindet sich in gleicher Leserichtung das Gen für eine Aldo-/Keto-Reduktase (*Hoch_1447*), die eine ähnliche Funktion wie das im Anschluss an *lcp* in *Streptomyces* sp. K30 entsprechend lokalisierte Gen der *oxiAB*-Oxidoreduktase (Rose *et al.*, 2005 b) erfüllen könnte (s. Kap. 4.13).

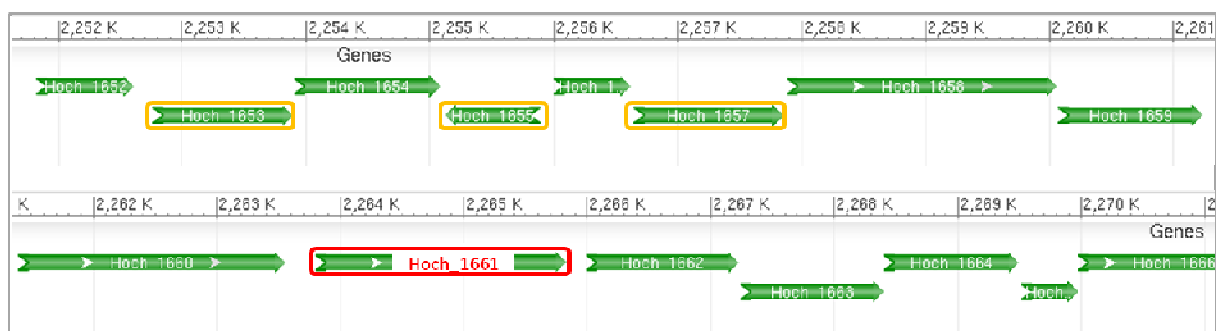


Abb. 3.29: DNA-Region im Genom von *Haliangium ochraceum* um das kodierende Gen Hoch_1661 des zu RoxA ähnlichen Proteins. Hoch_1661 ist rot umrandet, orange umrandet sind drei Gene mit den gleichen Funktionen der jeweiligen Proteine wie sie downstream von *roxA* im *Xanthomonas*-Genom in entgegengesetzter Leserichtung gefunden wurden (vgl. Braaz, 2005 b, Abb. 2.5.1).

Es wurden bisher folgende Proteinfunktion zugewiesen:

- Hoch_1652: Short-Chain Dehydrogenase/Reduktase
- Hoch_1653:** **Aminoglycosid-Phosphotransferase**
- Hoch_1654: Acyl-CoA-Dehydrogenase-Domäne-Protein
- Hoch_1655:** **Enoyl-CoA Hydratase/ Isomerase**
- Hoch_1656: TetR-family Transkriptions-Regulator
- Hoch_1657:** **Acetyl-CoA Acetyltransferase**
- Hoch_1658: 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase NAD-Bindeprotein
- Hoch_1659: Acyl-CoA-Dehydrogenase -Domäne-Protein
- Hoch_1660: 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase NAD-Bindeprotein
- Hoch_1661:** **Hypothetisches Protein**
- Hoch_1662: Acyl-CoA-Dehydrogenase -Domäne-Protein
- Hoch_1663: Acyl-CoA-Dehydrogenase -Domäne-Protein
- Hoch_1664: Alkohol-Dehydrogenase Zink-Bindedomäne-Protein
- Hoch_1665: Hypothetisches Protein
- Hoch_1666: AMP-abhängige Synthetase und Ligase

Jüngst (Juli 2011) wurde in einem weiteren marinen Myxobakterium, dem halotoleranten *Myxococcus fulvus* HW-1 (Li *et al.*, 2011) ebenfalls ein Gen mit einer vergleichbar hohen Übereinstimmung zu RoxA wie *Hoch_1661* aus *H. ochraceum* gefunden, das für das hypothetische Protein *LILAB_11505* (Gene-ID: 10876757) mit etwa 78 % Ähnlichkeit zu RoxA kodiert, dem in der vorläufigen Annotierung aber keine Signalsequenz zugewiesen wurde. Es findet sich jedoch weiter upstream im gleichen Leseraster ein alternatives Startcodon unter dessen Annahme sich für das Protein eine Länge von 2025 bp ergibt und mit höchster Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid von 26 aa findet, nach dessen Abspaltung sich für das reife Protein wie RoxA 648 aa ergeben (vgl. Tab. 3.9). Auch dieses besitzt mit 11,6 % einen hohen Anteil an aromatischen Resten (32 Phe: 4,9 %, Trp: 2,5 %, 24 Tyr: 4,2 %). Downstream von *LILAB_11505* befinden sich im *M. fulvus* -Chromosom in gleicher Leserichtung ebenfalls alle wichtigen, an der β -Oxidation beteiligten Gene.

Ferner zeigten sich auch auffallende Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz bis zu einem E-Wert von 10^{-39} mit Proteinen unbekannter Funktion aus weiteren Bakterien unterschiedlicher Gattungen. Die besten Treffer wurden bei einigen Planktomyceten gefunden, einer einzigartigen Gruppe unter den Bakterien, welche von zellinternen Membranen umschlossene kernähnliche Strukturen besitzen, sowie eine ausschließlich aus Proteinen bestehende Zellwand. Mit abnehmender Ähnlichkeit sind dabei hypothetische Proteine aus *Isosphaera pallida* sp. IS1B^T (Göker *et al.*, 2011), *Planctomyces brasiliensis* DSM 5305, *Gemmata obscuriglobus* UQM 2246, *Planctomyces limnophilus* DSM 3776, *Pirellula staleyi* DSM 6068, *Planctomyces maris* DSM 8797, *Rhodospirellula baltica* WH47, *Nitrosococcus oceani* AFC27 und ATCC 19707, *Blastospirellula marina* DSM 3645, *Rhodospirellula baltica* SH 1, und andere zu nennen, von welchen einige ebenfalls ein N-terminales Signalpeptid aufweisen. Es offenbarte sich bei diesen eine Ähnlichkeit von maximal etwa 39 %. Auffallend waren Ähnlichkeiten im Bereich der in Cytochrom *c* Peroxidasen konservierten "MauG"-Region um einen Histidin-Rest (His₅₁₇ in RoxA), sowie das Vorhandensein zweier Häm-Bindemotive und das gleiche C-terminale Ende.

3.8.2 Kultivierung des Myxobakteriums *Haliangium ochraceum* DSM 14365

Als Konsequenz auf die positiven Befunde aus der Blast-Suche wurde das halophile Myxobakterium *Haliangium ochraceum*, das aus einer Bodenprobe eines Strandes in Japan isoliert worden war (Fudou *et al.*, 2002), kultiviert mit dem Ziel, die entsprechenden Gene isolieren und klonieren zu können.

H. ochraceum zeigte Wachstum auf speziellen Meersalz-Festmedien. Bestes Wachstum wurde auf VY/4-SWS-Agar (DSMZ Nr. 958) mit ganzen Hefezellen beobachtet. Es zeigte sich eine Aufklärung des durch die Hefezellen eingetrübten Agars und schnelles Wachstum. Bei Verwendung von Hefeextrakt statt ganzen Zellen wurde dichteres Wachstum, d. h. mehr

Zellmasse pro Fläche, aber deutlich weniger flächiges Wachstum beobachtet. Auf Cy-SWS-Agar war das Wachstum ähnlich dem auf VY/4-SWS-Agar mit Hefeextrakt, dichteres Wachstum mit Cy-SWS, flächenbezogen schneller mit Cy/5-SWS. Auf ASW-Agar (DSMZ Nr. 246) war verglichen mit den vorherigen Medien nur schwaches Wachstum zu sehen. In Festmedium schienen hohe Nährstoff-Konzentrationen für ein schnelles Wachstum in Bezug auf die Fläche eher hinderlich zu sein. Auf LB- oder NB oder Tsuchii/Takeda-Minimal-Agar wuchs der Stamm nicht an. Nur minimales Wachstum war auf VY/4-SWS-Agar mit den Antibiotika Chloramphenicol (10 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) zu erkennen. Generell unterblieb ein Wachstum auf sämtlichen entsprechenden Flüssigmedien vollständig.

Eine Konservierung des Stammes per Gefriertrocknung ist nicht möglich, doch eignet sich die Glycerinkultur, wobei Mycel vom Kolonienrand mit 43 % Glycerin gemischt wurde. Auch *Haliangium*-Kolonien auf mit 20 % Glycerin überschichteten Agarplatten, die bei -70°C eingefroren wurden, wuchsen problemlos wieder an. Auf Cy/5-SWS-Agar mit Latex-Overlay konnte parallel zum Wachstum des Stammes schwache Aufklärung um das Mycel beobachtet werden. Da Cy-SWS im Gegensatz zu VY/4-SWS mit Hefe kaum Eigentrübung aufweist, eignet er sich wohl am besten zur Herstellung von Latex-Overlay-Platten. Diese Beobachtung, sowie der Besitz von zu *roxA* homologen Genen sind Hinweise darauf, dass *H. ochraceum* ein weiteres Poly(*cis*-1,4-isopren) verwertendes Gram-negatives Bakterium darstellen könnte.

3.8.3 Klonierung des *Hoch_1661* -Gens und Expressionsversuche

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus dem Myxobakterium *H. ochraceum* gelang aus von Agarplatten abgeschwemmter Zellmasse mit der im Methodenteil beschriebenen Weise (Kap. 2.33). Die so gewonnene DNA wurde nun als Template eingesetzt zur Amplifikation des zu *RoxA* homologen Gens *Hoch_1661* mit der größten Aminosäure-Ähnlichkeit zu *RoxA* (78 %). Ein DNA-Fragment von entsprechender Größe (2 kb) wurde nach Durchführung einer PCR-Reaktion mit TAKARA-Polymerase mit den Primern *NdeI*-37340_f und 37340-*HindIII*_r (Tab. 2.7) erhalten. Über die Oligonukleotide waren Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *HindIII* zur Integration des Gens in p4782.1 eingeführt worden. Der so erhaltene Expressionsvektor p4782.1::H.o.37340 wurde zunächst nach *E. coli* S17-1 transformiert und durch Konjugation nach *Xanthomonas* sp. übertragen.

Auf dem gleichen Wege wie im Falle der *roxA*-Varianten (s. Kap. 3.7.1) wurde versucht, das zu *RoxA* homologe Genprodukt von *Hoch_1661* in *Xanthomonas* sp. 35Y zu produzieren. Doch analog zu den Ergebnissen der *RoxA*-Mutanten gelang es nicht, dieses in *Xanthomonas* sp. 35Y_p4782.1::H.o.37340 nach Induktion mit 0,1 % Rhamnose zu exprimieren (vgl. Kap. 3.7.2). Durch Aktivitätstests und Silberfärbung sowie spezifischer Hämefärbung nach SDS-Page von Kulturüberständen wurden keine Hinweise auf eine

Expression erhalten. Ob eine Überexpression in *Xanthomonas* sp. grundsätzlich möglich ist bzw. für eine erfolgreiche Expression die Integration des Vektors ins Chromosom vonnöten ist, wie es im Falle von *roxA* gezeigt wurde (Birke, 2010), konnte bislang nicht geklärt werden. Eine Ursache für die fehlgeschlagenen Versuche, RoxA heterolog in *E. coli* überzuexprimieren, wurde im Zusammenhang mit dem Export des Enzyms vermutet. Da *Hoch_1661* eine von RoxA verschiedene N-terminale Signalsequenz besitzt, wurde ebenso eine Expression in *E. coli* zusammen mit dem zusätzlichen, die *ccm*-Gene tragenden Plasmid pEC86 unternommen. Dazu wurden die Plasmide pEC86 und p4782.1::H.o.37340 jeweils nach *E. coli* JM109 und S17-1 transformiert und beide Stämme in LB-Medium bei 30°C (100 rpm) nach Induktion mit 0,1 % Rhamnose bei einer $OD_{600}=1$ für 5 Stunden kultiviert. Doch auch auf diesem Wege war kein Nachweis des erwarteten Genproduktes möglich. Die Zellen wuchsen nur noch langsam und zeigten eine verstärkte Lyse.

Teil III Spektroskopische Charakterisierung von RoxA

3.9 Untersuchung von RoxA mit UV-Vis-Spektroskopie

Wie alle *c*-Typ Cytochrome besitzt auch RoxA als ein Metalloprotein mit zwei Hämgruppen charakteristische Absorptionseigenschaften. Dies macht eine Untersuchung mit verschiedenen spektroskopischen Techniken, in erster Linie der UV-Vis-Spektroskopie als Routinemethode interessant. Derartige Messungen wurden bereits standardmäßig zur Kontrolle des Kulturüberstandes, sowie des gereinigten Enzyms und Fraktionen der Chromatographie verwendet. Weitere spektrophotometrische Untersuchungen dienen dazu, das Verhalten des Enzyms unter variierenden Bedingungen mit Substraten und Inhibitoren näher zu beschreiben und mit anderen Cytochromen wie Peroxidasen zu vergleichen.

3.9.1 RoxA "as isolated" mit Reduktionsmitteln

Aus dem *Xanthomonas*-Kulturüberstand isoliertes RoxA besitzt ein typisches Spektrum für den oxidierten Zustand und weist ein Absorptionsmaximum bei 406–407 nm (Soret-Bande), Nebenmaxima bei 535 nm (β -Bande) und um 570 nm (α -Bande) auf (Abb. 3.30). Nach vollständiger Reduktion mit Na^+ -Dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) kommt es zu einer Signalverschiebung nach 417–418 nm (Soret-Bande), sowie nach 521 nm (β -Bande) und einem Doppelmaximum bei 549/553 nm (α -Bande), verbunden mit einer Intensitätszunahme (Abb. 3.30). Dass Dithionit in der Lage ist, die Hämzentren von RoxA vollständig zu reduzieren, wurde durch die Eliminierung sämtlicher Fe^{3+} -Signale mit EPR-Spektroskopie bestätigt (Kap. 3.11.2). Abb. 3.31 veranschaulicht die schrittweise Reduktion mit Na^+ -Dithionit im Differenzspektrum gegen RoxA "as isolated". Zu sehen sind die für den reduzierten Zustand typischen absoluten Signalveränderungen. Auffällig ist ein doppeltes Maximum der α -Bande bei 549 und 553 nm, zu welchem wahrscheinlich beide Hämzentren unterschiedlich beitragen. Zunächst war alleine eine Zunahme des Signals bei 549 nm zu beobachten, mit zeitlicher Verzögerung auch die Zunahme des zweiten Signals bei 553 nm (Abb. 3.31 b).

Im Verlauf der RoxA-Reduktion entstehen isosbestische Punkte bei etwa 352,5, 410,5, 430, 502, 530, 540 und 560 nm. Die Hauptmaxima liegen nach Reduktion bei 418, 521, 549 und 553 nm. Nach kompletter Reduktion mit Na^+ -Dithionit konnte das Enzym durch Addition von K^+ -Ferricyanid (K_4FeCN_6) wieder (nahezu) vollständig reoxidiert werden. Die Zugabe von Ferricyanid zu RoxA "as isolated" hatte keinen Effekt auf das UV-Vis-Spektrum.

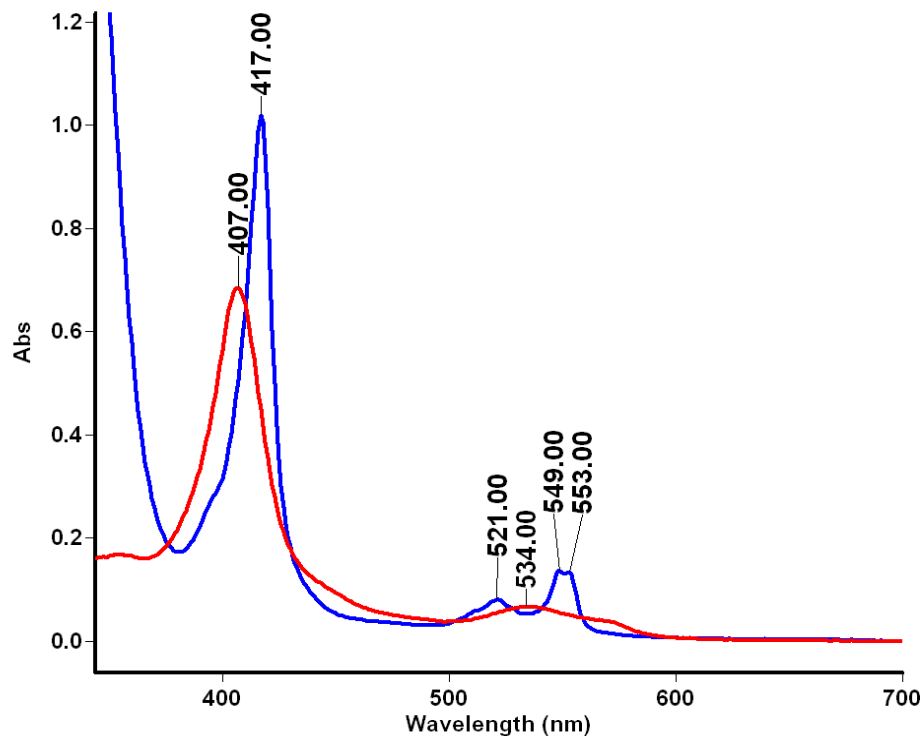


Abb. 3.30: UV-Vis-Spektren von RoxA "as isolated" (oxidiert, rot) und mit Na^+ -Dithionit (im Überschuss, aerob) reduziert (blau). Die typischen Maxima im oxidierten Spektrum liegen bei 407 und um 535 nm, im reduzierten Spektrum bei 417-418 nm, 521 nm und 549/553 nm.

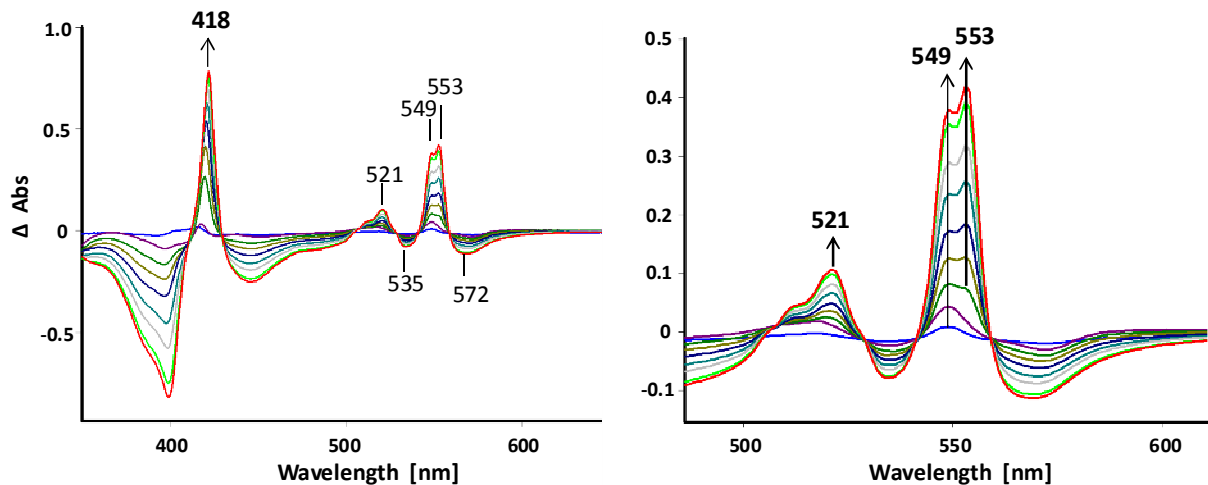


Abb. 3.31: Titration von RoxA mit Na^+ -Dithionit (anaerob, N_2): (links) Differenzspektrum [– RoxA "as isolated", anaerob (N_2), $t=0$], (rechts) Ausschnitt aus (links). Dargestellt sind die absoluten Signaländerungen durch Reduktion von RoxA, eine Zunahme bei 418 nm (Soret- Maximum), bei 521 nm (β -Bande) und 549 / 553 nm (α -Bande), sowie die Abnahme bei den für oxidiertes RoxA typischen Wellenlängen. Die Pfeile geben die Richtung der Veränderungen an. Es wurde eine zeitlich leicht versetzte Zunahme beider α -Signale festgestellt, zunächst die der 549 nm-Bande. Das Signal bei 553 nm ist hier nur scheinbar intensiver, da das Spektrum von RoxA "as isolated" nach Anaerobisierung abgezogen wurde, welches bereits zum Zeitpunkt Null eine mit der Entfernung von O_2 verbundene leichte Zunahme bei 549 nm aufwies (s. Abb. 3.15, Kap. 3.2.3).

Zudem wurden Reduktionsversuche mit NADH und dem Mediator PMS (Phenazinmethosulfat) durchgeführt, der gewöhnlich nach NADH-Zugabe im Verhältnis 1/100 – 1/1000 zugesetzt wurde. NADH/PMS findet unter anderem zur Herstellung einer halbreduzierten Form bei Peroxidasen Verwendung, wobei sich anaerob eine Reduktion eines der Hämzentren bereits in stöchiometrischen Mengen erreichen lässt (Ellfolk *et al.*, 1983). Mit stöchiometrischen Mengen war unter Sauerstoff-Ausschluss eine Teil-Reduktion von RoxA möglich, sie schritt aber nur langsam. Eine vollständige, zeitabhängige Reduktion von RoxA konnte experimentell unter N₂-Atmosphäre mit etwa 100fachem Überschuss an NADH zu RoxA (2–5 µM) und anschließender PMS-Zugabe gezeigt werden (Schmitt *et al.*, 2010). Ohne PMS-Zugabe waren nur geringe Änderungen in vergleichbaren Zeitabständen zu sehen. Während anaerob eine RoxA-Reduktion mit NADH/PMS erreicht werden konnte (Abb. 3.32), traten auch mit NAD⁺ ohne Mediator spektrale Verschiebungen ein. Diese nahmen nur langsam zu und erreichten nach ÜN-Inkubation eine ähnliche Intensität (ca. 90 mAU bei 5 mM), sowie ähnelten qualitativ solchen Effekten wie sie auch mit anderen N-enthaltenden Hämliganden wie Imidazol gefunden wurden (s. u.). Analog betrafen sie nur die Zunahme der α -Bande bei 549 nm im Gegensatz zu einer tatsächlichen Reduktion, die sich mit NADH/PMS erreichen lässt. Unter aeroben Bedingungen konnte mit einem hohen NADH-Überschuss (10 mM) zu RoxA mit PMS eine Reduktion beider Hämzentren erreicht werden, die aber nie vollständig verlief, was durch Vergleich der Intensitäten mit Dithionit-reduzierten Proben deutlich wurde. Die Exposition von mit geringem Überschuss an Reduktans reduzierten RoxA-Proben an Luft stellte in der Regel innerhalb weniger Minuten das oxidierte Spektrum von RoxA "as isolated" wieder her.

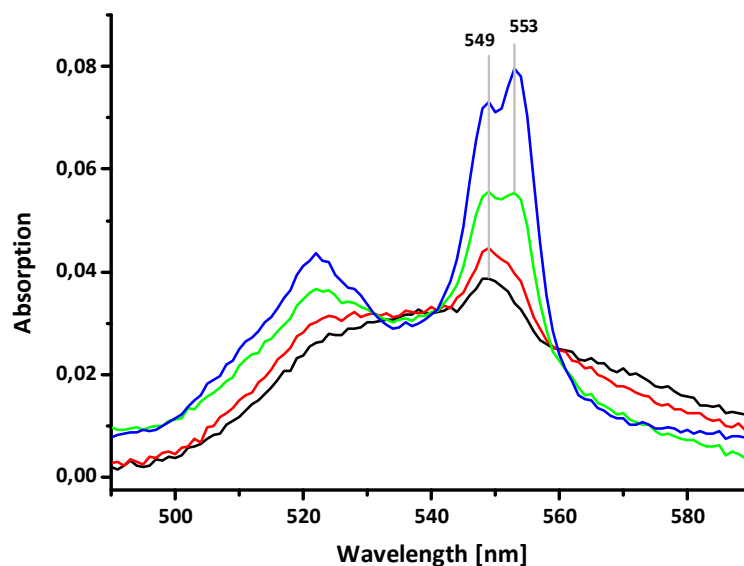


Abb. 3.32: UV-Vis-Spektrum im Bereich der α -Banden nach schrittweiser Reduktion mit NADH/PMS unter Sauerstoffausschluss (N₂). Es konnte eine vollständige Reduktion erreicht werden. Zunächst war eine Zunahme bei 549 nm zu sehen, gefolgt von derjenigen bei 553 nm (vgl. Abb. 3.31) (aus: Schmitt *et al.*, 2010).

Wie auch mit Dithionit führte die Zugabe von NADH/PMS zunächst zur (Teil-)Reduktion eines Hämzentrums, sichtbar an einem zuerst bzw. mit geringeren NADH-Konzentrationen eintretenden Maximum bei 549 nm im Differenzspektrum. Mit der Zeit konnte auch das zweite Häm reduziert werden, sichtbar am zusätzlichen Maximum bei 553 nm (Abb. 3.32). Dies belegte wiederum, dass beide Hämzentren in RoxA vermutlich unterschiedliche Redoxpotentiale besitzen. Eine auch nur annähernd komplette Trennung der beiden Hämsignale, wie sie sich bei bakteriellen Peroxidasen im halbreduzierten Zustand erreichen lässt (s. Kap. 1.5.2) war unter keinen Bedingungen möglich. Das Signal bei 553 nm entstand, gemessen an der Signalintensität im vollständig reduzierten Zustand, recht bald nach Entstehung des 549 nm -Signals. Dies wiederum lässt sich als klaren Hinweis auf unterschiedliche, doch nahe beieinander liegende Redoxpotentiale der beiden Hämgruppen deuten.

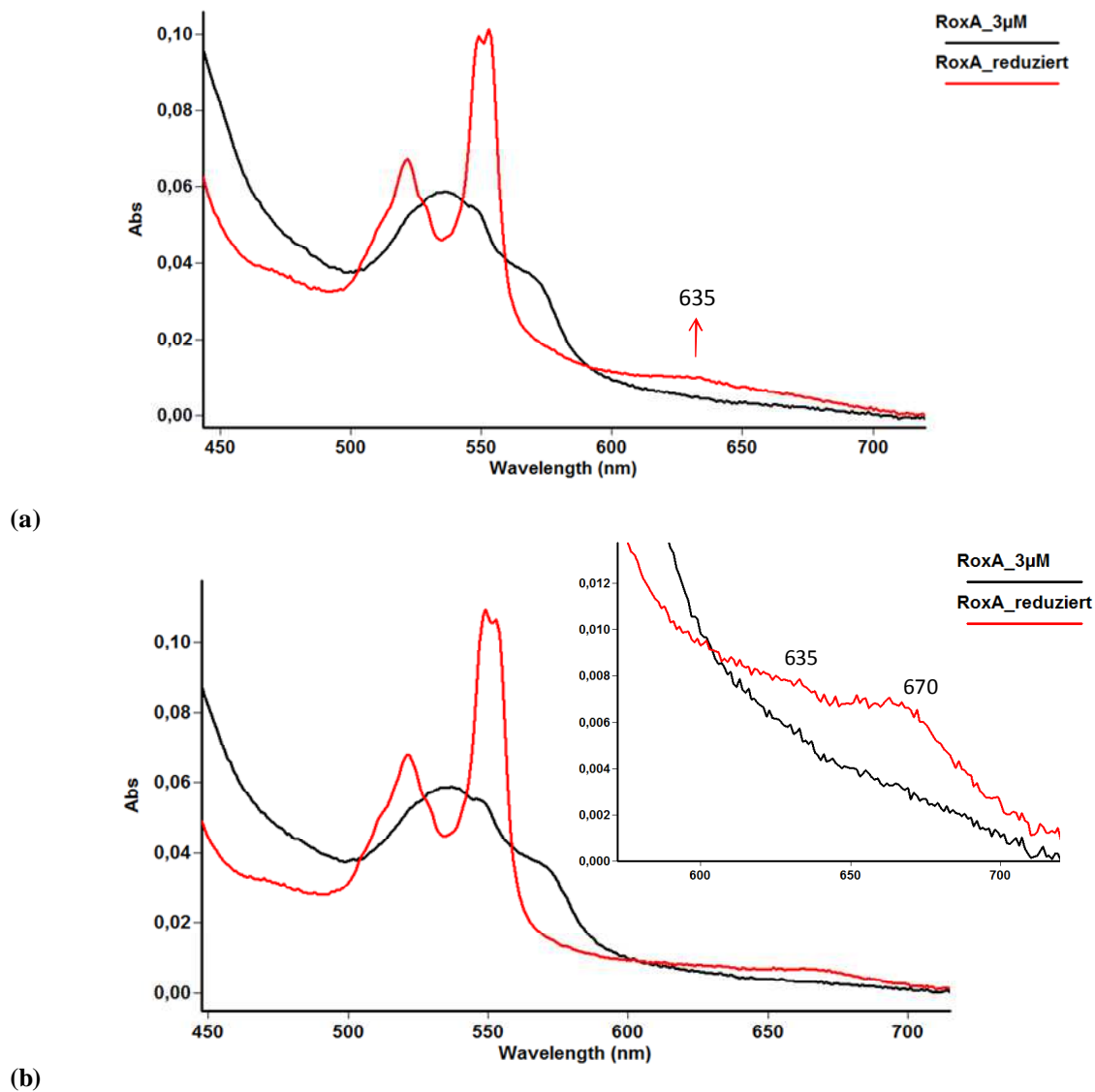


Abb. 3.33: UV-Vis-Spektren von RoxA in Experimenten nach Photoreduktion mit Deazaflavin (Kap. 3.9.4.2). In (a) ist eine Schulter um 635 nm, in (b) zusätzlich um 670 nm zu beobachten. Diese könnten auf die Entstehung von *high-spin*-Zuständen eines oder beider Hämzentren im Zuge einer Reduktion hindeuten. Der Pfeil markiert die Richtung der Zunahme.

Wie bereits unter Kap. 3.6.1 beschrieben führte die Zugabe von Reduktionsmitteln zu stark eingeschränkter RoxA-Aktivität. Gelegentlich trat nach Na^+ -Dithionit-Reduktion ein für einen *high-spin*-Zustand typisches schwaches Signal um 635 nm auf, wie es in diesem Bereich auch bei bakteriellen Peroxidasen im halbreduzierten Zustand zu sehen ist. Doch zeigte sich ein solches nicht in allen Ansätzen und trat ggf. erst nach längerer Inkubation auf. Auch im Verlauf einer Photoreduktion mit Deazaflavin wurden schwache Signale um 635 nm (Abb. 3.1.9.4 a), z. T. aber auch zusätzlich um 670 nm beobachtet (Abb. 3.1.9.4 b). Sie traten jedoch wiederum lediglich präparations- bzw. versuchsabhängig auf. Trotz der fehlenden Reproduzierbarkeit sollen diese Signale nicht unerwähnt bleiben, da *high-spin*-Zustände an einem der Hämzentren in RoxA durch EPR-Experimente dokumentiert werden konnten, im Besonderen nach Reduktion mit Dithionit bei anschließender Reoxidation (s. Kap. 3.11.2).

3.9.2 RoxA "as isolated" mit Oxidationsmitteln

Die Zugabe von oxidierenden Substanzen wie K^+ -Ferricyanid oder K^+ -Permanganat konnte reduzierte RoxA-Zustände beheben, veränderten aber das UV-Vis-Spektrum von RoxA "as isolated" nicht unmittelbar. Demnach liegt aus dem *Xanthomonas*-Kulturüberstand isoliertes RoxA oxidiert vor. Beispielsweise zeigte sich das Spektrum von RoxA (2 μM) im Bereich der Q-Banden nach Inkubation auch mit einem Überschuss an Ferricyanid (1 mM) zunächst unverändert, anders jedoch nach vorheriger Reduktion des Enzyms mit Dithionit (s. u.). Die Anwesenheit von oxidierenden Substanzen, insbesondere Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im RoxA-Aktivitätstest führte zu einer verminderten RoxA-Aktivität (s. Tab. 3.2, Kap. 3.6.1).

Mit Wasserstoffperoxid waren spektrale Veränderungen festzustellen. Zwar veränderte sich das Spektrum in stöchiometrischen Mengen ebenfalls nicht, doch schienen hohe Überschüsse (10 mM) zu einer partiellen Zerstörung des Enzyms beizutragen. Eine Inkubation von RoxA (2 μM) mit einem Überschuss an H_2O_2 (1–10 mM) führte zu einer raschen Absorptionsabnahme des Soret-Maximums, die sich mit fortschreitender Inkubation verlangsamte, aber weiter fortschritt bis zu erheblichem Verlust der Absorption eines Hämzentrums (Abb. 3.34 a). Eine Zunahme der Absorption bei 280 nm, die auf eine Zerstörung des Proteins hindeuten könnte, war in diesem Experiment im betrachteten Zeitraum nicht zu verzeichnen. Bei längerer Inkubation, insbesondere mit sehr hoher Konzentration (10 mM) trat auch eine Zunahme der 280 nm-Absorption und ein allgemeiner Absorptionsanstieg ein, der auch an einer Eintrübung der Lösung zu erkennen war und auf Präzipitation bzw. kovalente Quervernetzung von RoxA-Molekülen zurückgehen könnte.

Im Bereich der α - und β -Banden trat ebenso ein Absorptionsverlust ein. Dieser zeichnete sich durch eine Abnahme bei etwa 538–540 nm und 572 nm aus (vgl. auch Abb. 3.40) und resultierte in einer "Abrundung" der Q-Banden, wobei eine klare Trennung zwischen einer Schulter um 572 nm und einem nunmehr leicht in den kurzwelligen Bereich des Spektrums verschobenen Signal in Richtung 530 nm nicht mehr möglich war. Diese

Veränderungen unterscheiden sich somit von denjenigen, die durch schlichten Absorptionsverlust zu erwarten wären. Auch nach Reoxidation durch Ferricyanid nach einer Reduktion von RoxA unter anaeroben Bedingungen entsprach der Verlauf des Q-Banden-Spektrums demjenigen in Gegenwart von H_2O_2 (Abb. 3.34 b). Dieser Verlauf erinnerte zudem an einen Zustand der Inkubation unter Sauerstoffausschluss (s. Kap. 3.9.3). Ohne eine Reduktion des Enzyms bewirkte Ferricyanid nur sehr langsam eine entsprechende Veränderung auf das "as isolated"-Spektrum. Diese wurde erst im Überschuss (1 mM) nach längerer Inkubation (>1 h) sichtbar.

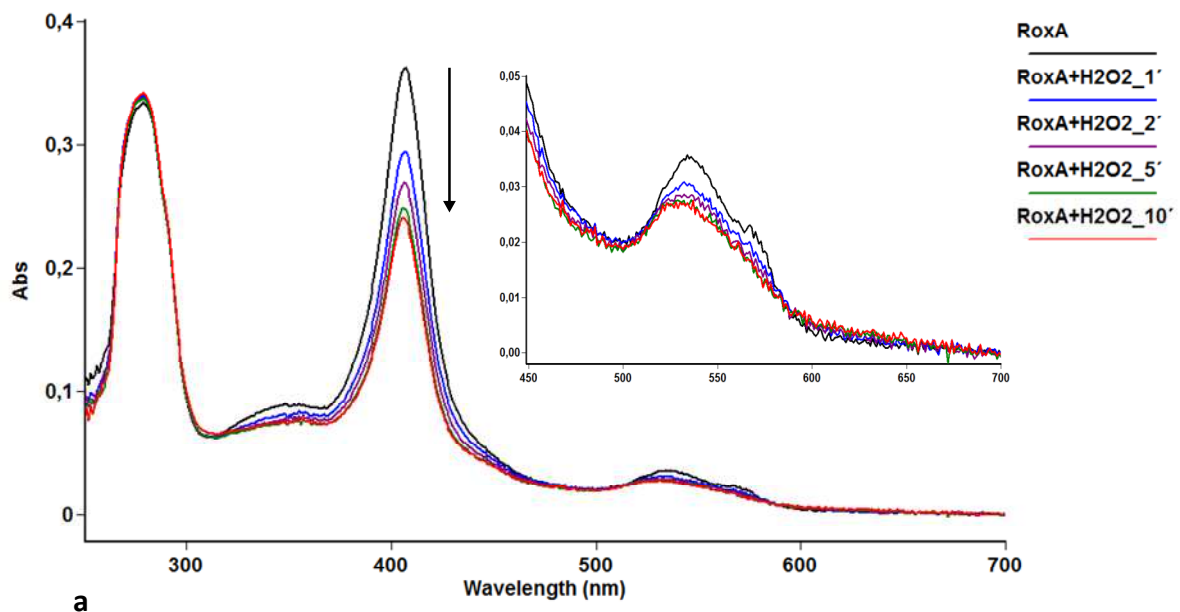
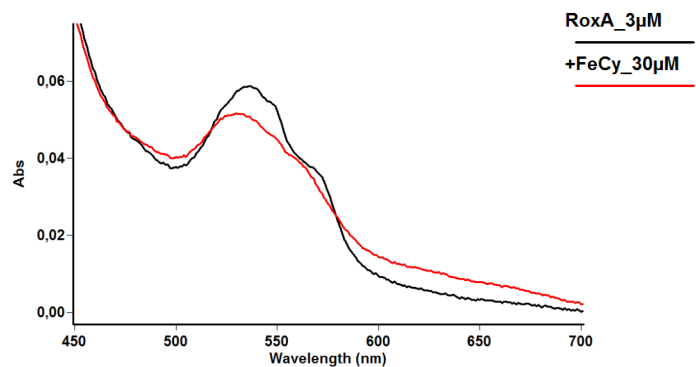


Abb. 3.34 : (a) UV-Vis-Spektren RoxA "as isolated" ($\approx 2 \mu\text{M}$) nach Zugabe von H_2O_2 (1 mM). Die Absorption des Soret-Maximums um 407 nm nahm innerhalb 10 min deutlich ab (Pfeil), die Absorption bei 280 nm blieb unverändert. Der Ausschnitt der Region um die α -/ β -Banden ist vergrößert. Auch in diesem Bereich ist eine Abnahme der typischen Wellenlängen des oxidierten Spektrums zu sehen. Gleiches gilt für (b). Dort ist das RoxA-Spektrum nach Reduktion (Dith.) und anschließender Reoxidation mit FeCy dargestellt. Die Spektren mit H_2O_2 und FeCy zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf.



b

Interessanterweise führte ebenso ein mit Pyrogallol bewirkter O₂-Entzug zu einem nahezu deckungsgleichen Spektrum der Q-Banden, die um 539 und 572 nm – etwas abweichend von den typischen Wellenlängen von RoxA "as isolated" – leicht abnahmen (s. Abb. 3.72, Kap. 3.10.3). Eine Absorptionsabnahme der Soret-Bande wurde bei der Reaktion mit FeCy aber nicht beobachtet, was umgekehrt auf die Schädigung des Hämzentrums durch einen Überschuss an H₂O₂ hinweist (s. Kap. 4.7). Mit stöchiometrischer Menge an H₂O₂ änderte sich das optische Spektrum dagegen nicht. Eine beginnende Absorptionsabnahme und eine schwache Rotverschiebung des Absorptionsmaximums aber war erst ab einem mindestens 10fachen Überschuss zu RoxA nach etwa halbstündiger Inkubation bei RT zu verzeichnen. Diese war verbunden mit der oben beschriebenen Veränderung der Q-Banden in entsprechend geringerer Intensität.

3.9.3 RoxA unter anaeroben Bedingungen

Die Abhängigkeit der Latexspaltung von molekularem Sauerstoff als einem dafür notwendigen Substrat ließ eine Betrachtung unter Sauerstoffausschluss lohnenswert erscheinen. Da das Cytochrom-typische optische Spektrum Rückschlüsse auf den Oxidations-/Reduktionszustand zulässt, waren UV-Vis-spektroskopische Untersuchungen interessant. Sauerstoff wurde durch eine Abfolge von 8–10 Zyklen Vakuum (≤ 1 mbar) und Begasung mit N₂-Gas aus RoxA-Präparationen entfernt (s. Kap. 2.10). Die Exposition in einem geeigneten Puffer (meist 100 mM KPP, pH 7) unter N₂-Atmosphäre in einer mit Gummiseptum verschlossenen Küvette aus Quarzglas rief zu Beginn zunächst keine spektralen Änderungen hervor. Dennoch zeigte sich, dass die Ausprägung der Anaerobisierung, sowie die Inkubationsdauer dabei eine sehr entscheidende Rolle spielten.

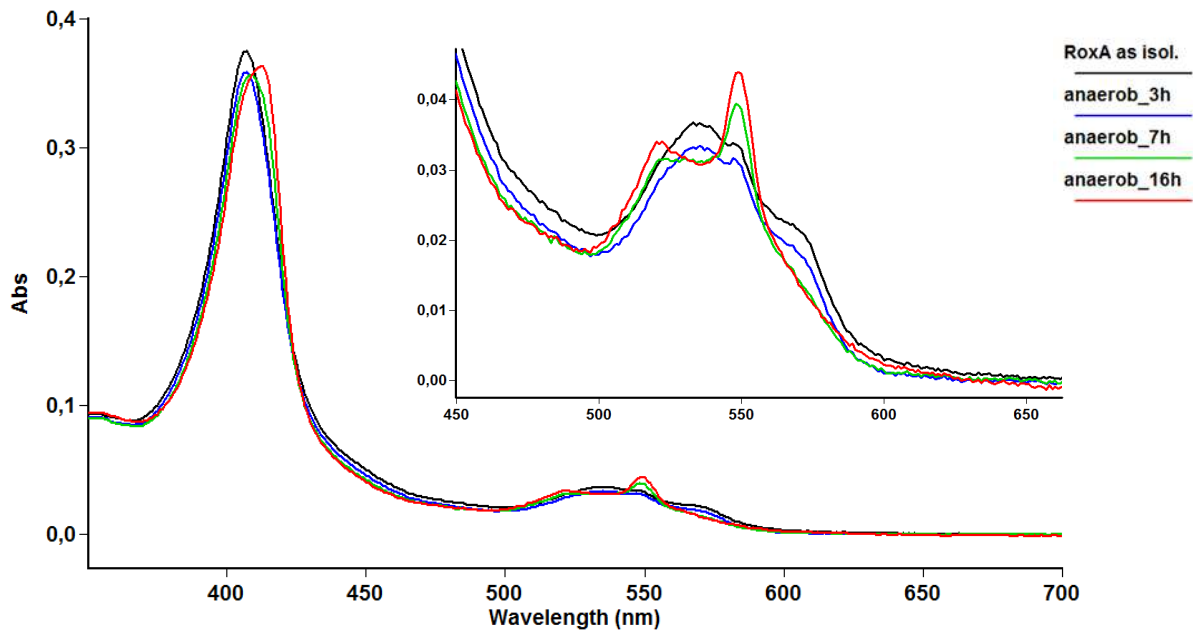


Abb. 3.35: UV-Vis-Spektrum von RoxA "as isolated" aus Latexkultur [ca. 2 μ M] (aerob) nach anaerober Inkubation (N_2 , RT). Es ist eine Verbreiterung des Soret-Maximums und Verschiebung in Richtung des reduzierten Spektrums zu erkennen. Der Bereich der α/β -Banden ist vergrößert dargestellt und zeigt eine Zunahme des 549 nm - α -Signals nach mehrstündiger Inkubation.

Es wurden in der Regel erst nach verlängerter Inkubation (Stunden) deutlich sichtbare Veränderungen im optischen Spektrum beobachtet, die sich nach Exposition des Ansatzes an Luft wieder umkehrten. Vermutlich in Abhängigkeit von noch vorhandenem Rest-Sauerstoff traten erste Veränderungen im Bereich von mehreren Minuten bis Stunden ein. Diese umfassten eine Verbreiterung des Soret-Maximums bzw. eine Verschiebung in Richtung des reduzierten Spektrums. Gleichmaßen nahmen Signale der α -Banden bei 549 nm und β -Bande bei 521 nm zu (Abb. 3.35). Im Differenzspektrum abzüglich des oxidierten Spektrums von RoxA "as isolated" lagen die absoluten Änderungen des Soret-Maximums in der Regel bei 416 nm (vgl. Abb. 3.39), in einigen Ansätzen, besonders solchen unter schwachem Vakuum (≤ 1 mbar), auch bei 417–418 nm. Insgesamt ähnelten diese Spektren denen von teilreduziertem RoxA.

Die Intensität der optischen Veränderungen muss in Abhängigkeit von der Sauerstofffreiheit und der Inkubationszeit betrachtet werden und erreichte nicht zwingend einen Endpunkt. Doch schritten die ohnehin langsam eintretenden Veränderungen ab gewissem Zeitpunkt kaum noch fort. Die UV-Vis-Spektren belegen, dass von den α -Banden allein diejenige bei 549 nm zunahm (Abb. 3.35; 3.36). Erst nach langer Inkubation (> 2 d) war häufig eine langwellige Verbreiterung des 549 nm -Signals in Richtung 553 nm ohne eine weitere Intensitätszunahme des ersteren, gelegentlich auch ein Doppelsignal auf einem geringen Intensitätsniveau bei beiden Wellenlängen zu beobachten (ohne Abb.). Ein solches lässt sich

nur bei Reduktion beider Hämgruppen eines Teils der RoxA-Moleküle. Somit könnte dies auf einen langsamen Ausgleich eines Reduktionszustandes zwischen den Hämzentren und folglich auf eine Elektronenverschiebung hindeuten. Doch aufgrund der langen Zeitspanne bis zum Eintreten dieser Effekte muss angenommen werden, dass diese auch von passiver Natur sein bzw. von geringfügigen strukturellen Umlagerungen im Zuge eines möglichen Alterungsprozesses des Enzyms begünstigt und für den Reaktionsmechanismus ohne direkte Bedeutung sein könnte.

Die Signalverbreiterung der α -Bande trat in einigen Versuchen eher unter N_2 -Atmosphäre als unter Vakuum ein und könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Verfügbarkeit von O_2 in N_2 -begasteten Proben geringer war als eine entsprechend lange Exposition unter geringem Sauerstoffpartialdruck (1 mbar). Die Anwesenheit von organischen N-enhaltenden Puffersubstanzen wie Tris in parallelen Ansätzen unter Vakuum schien diese Verschiebung zu beschleunigen. Diese Beobachtung könnte eine mögliche Wechselwirkung von Tris mit einem freien Häm-Fe bzw. dessen Wirkung als Inhibitor stützen. In Tris-Puffer war gegenüber KPP eine deutlich geringere RoxA-Aktivität festgestellt worden (s. Kap. 3.6.2).

Bei RoxA unter Vakuum trat in einigen Versuchen ein schwaches Signal bei 660–670 nm auf (Abb. 3.36), dessen Entstehung aber nicht in jedem Ansatz beobachtet wurde. Im Bereich zwischen 600 und 700 nm treten Signale auf, die auf einen *high-spin*-Zustand hinweisen können, beispielsweise auch auf das Lösen einer möglichen O_2 -Bindung an einem Hämzentrum. Bei einigen Präparationen (aus Latexkultur) fiel auf, dass unter Sauerstoffausschluss eine Verbreiterung des Soret-Maximums eintrat und keine Zunahme der 549 nm α -Bande. Dabei war jedoch eine "Abrundung" der Q-Banden unter geringem Absorptionsverlust bei den für RoxA "as isolated" charakteristischen Signalen bei 535 und 570 nm zu erkennen (Abb. 3.37).

Unabhängig davon, ob RoxA aus Latexkultur oder rekombinantes RoxA verwendet wurde, nahm ein im Zuge der anaeroben Inkubation entstandenes Signal bei 549 nm nach gewisser Zeit wieder ab, verbunden mit einer möglicherweise nur scheinbaren Zunahme um 560 nm (Abb. 3.38a, 18 h, 24 h). Bei noch längerer Inkubation (RT) war dieser Effekt z. T. ebenfalls wieder rückläufig und es konnte erneut eine bereits anfänglich beobachtete Zunahme des 549 nm Signals verzeichnet werden. Eine Schulter um 560 nm blieb bestehen (Abb. 3.38b). Derartige fließende spektrale Veränderungen gelten auch für die Veränderungen der Soret-Region und wurden sowohl in Ansätzen unter Vakuum, als auch unter N_2 -Atmosphäre beobachtet. Ein Einfluss der Licht-Exposition kann ausgeschlossen werden, da diese Beobachtungen auch bei parallelen Ansätzen im Dunkeln gemacht wurden. Dieses Phänomen trat sowohl bei RoxA aus Latexkultur als auch bei rekombinantem Enzym auf, war aber dennoch in vielen Experimenten nicht zu sehen. Es muss aber bedacht werden, dass die "intermediären" Zustände der Absorptionsverschiebungen beispielsweise während einer $\bar{U}N$ -Inkubation eingetreten und unentdeckt geblieben sein könnten.

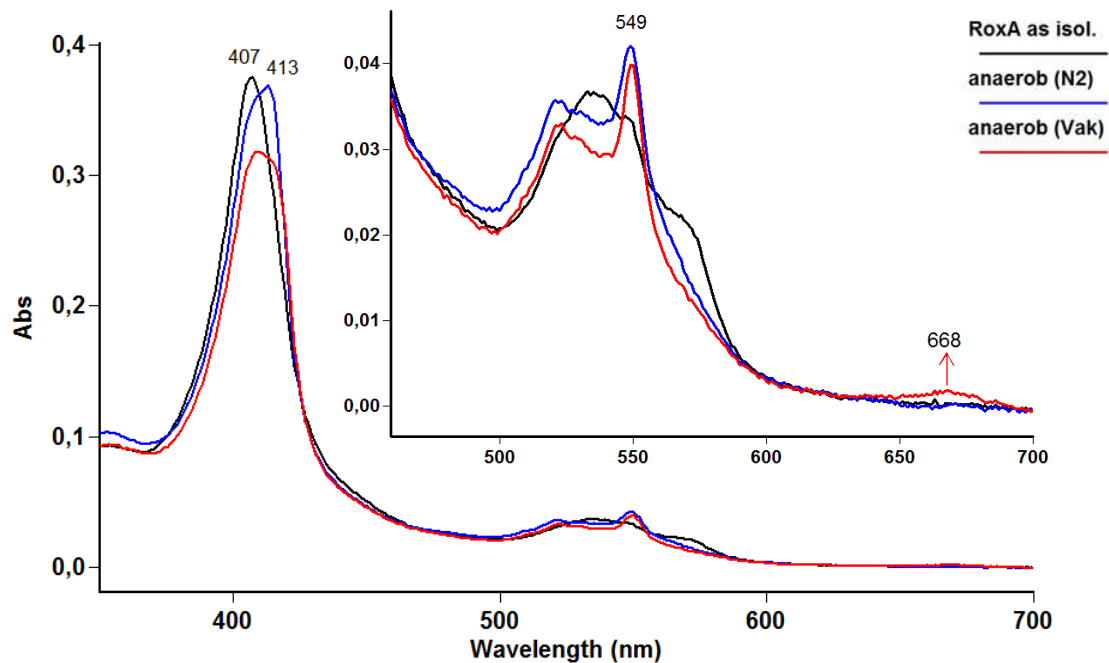


Abb. 3.36: UV-Vis-Spektren: (rek.) RoxA "as isolated" unter O_2 -Ausschluss unter Vakuum (Vak) (< 1 mbar) bzw. unter N_2 -Atmosphäre (N_2) nach etwa 20 h bei RT. Im Ansatz unter Vakuum tritt bei knapp 670 nm eine schwache Bande auf (roter Pfeil), die im Ansatz unter Stickstoff-Atmosphäre nicht zu sehen ist.

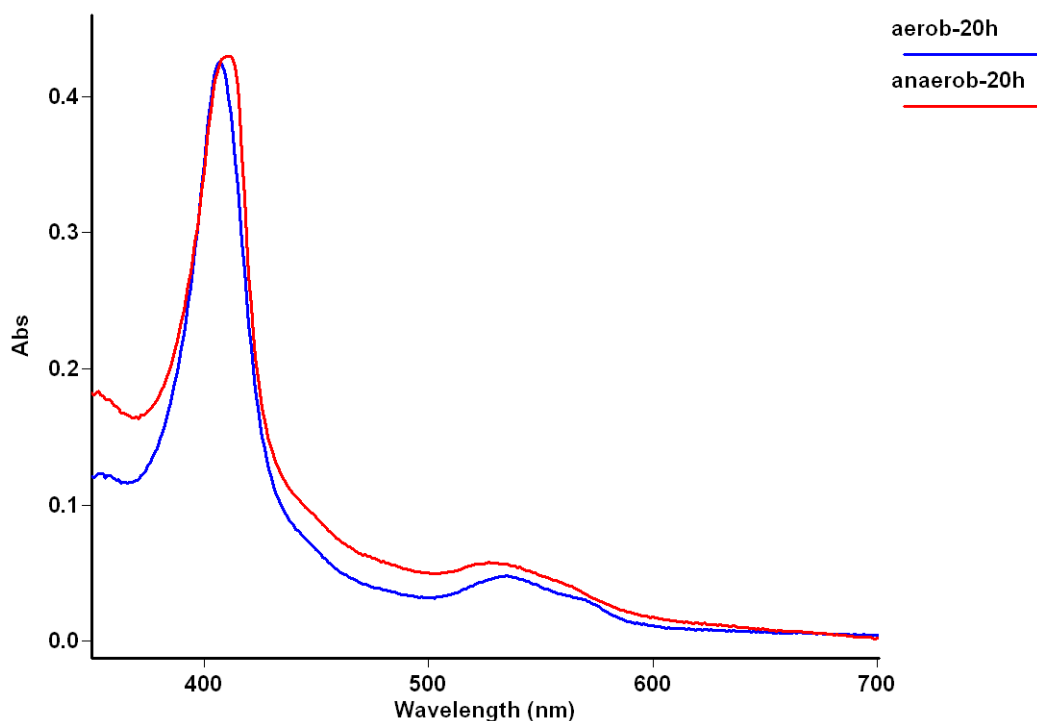


Abb. 3.37: UV-Vis-Spektrum einer Präparation von RoxA aus Latexkultur unter anaeroben Bedingungen (N_2). Nach $\ddot{U}N$ -Inkubation war eine Verbreiterung des Soret-Peaks zu sehen und eine "Abflachung" der Q-Banden. Ein genereller Anstieg der Absorption könnte hier zusätzlich auf eine nicht-physiologische Ursache hindeuten.

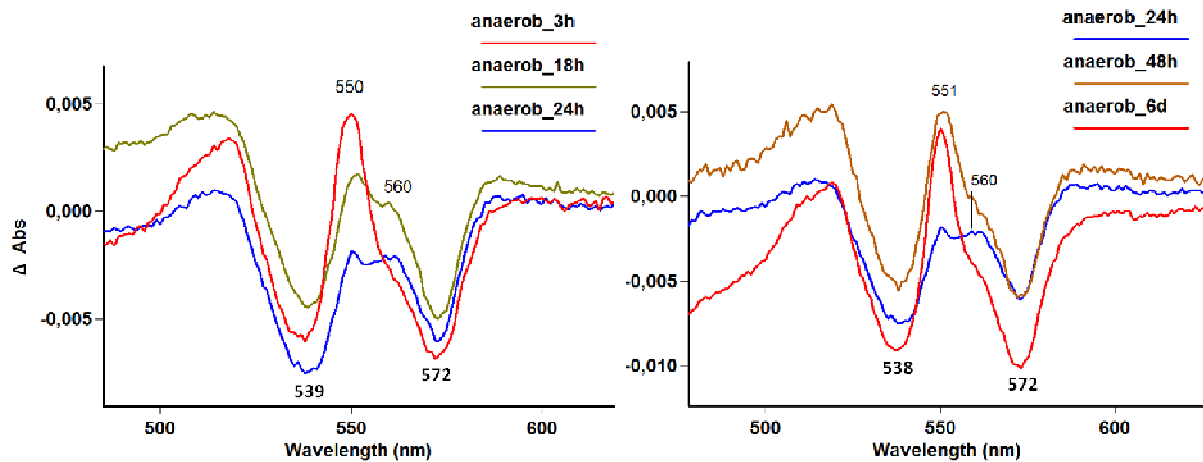


Abb. 3.38: Differenzspektren [– RoxA "as isolated"] von RoxA im Bereich der Q-Banden nach Inkubation unter mildem Vakuum bei RT zu verschiedenen Zeitpunkten. Nach einer anfänglichen Zunahme einer α -Bande bei 550 nm, war dieser Effekt wieder rückläufig (links, bis ca. 24 h), verbunden mit dem Auftreten einer Schulter bei 560 nm. Nach fortdauernder Inkubation war eine erneute Zunahme um 550 nm zu verzeichnen (rechts, 48 h).

Die Anwesenheit von Pyrogallol, welches im Alkalischen zur chemischen Entfernung von O_2 -Resten aus dem Medium genutzt werden kann, hatte ähnliche, aber schneller verlaufende spektrale Änderungen zur Folge, obgleich die Versuche meist ebenso in 100 mM KPP bei pH 7,0 unter N_2 -Atmosphäre durchgeführt wurden. Kontrollen mit Pyrogallol an Luft führten durch Umsetzung von Pyrogallol mit dem ständig verfügbaren O_2 zu einem starken Absorptionsanstieg und bewirkten weniger deutliche Signalveränderungen. Unter Sauerstoffausschluss wurde im Differenzspektrum anfänglich neben einer Zunahme der Soret-Bande bei 416 nm im Bereich der Q-Banden weniger eine Zunahme als eine Abnahme bei den für RoxA "as isolated" typischen Wellenlängen festgestellt (Abb. 3.39, rote Pfeile im Insert). Dies erinnert an ein in Abb. 3.38 dargestelltes Spektrum bzw. einen Zwischenzustand der anaeroben Inkubation in Abb. 3.39 (blau). Analog zu den weiter oben dargelegten Beobachtungen folgte eine Abnahme der Soret-Veränderungen bzw. der Häm-Absorption insgesamt, was an einem Minimum bei 406 nm sichtbar wurde (rot). Bei noch längerer Inkubation war wiederum eine Signalzunahme der Soret-Bande bei 416 nm, sowie der Q-Banden um 550 nm, übereinstimmend mit entsprechend lange (>2 d) anoxisch gehaltenen RoxA-Proben ohne Pyrogallol.

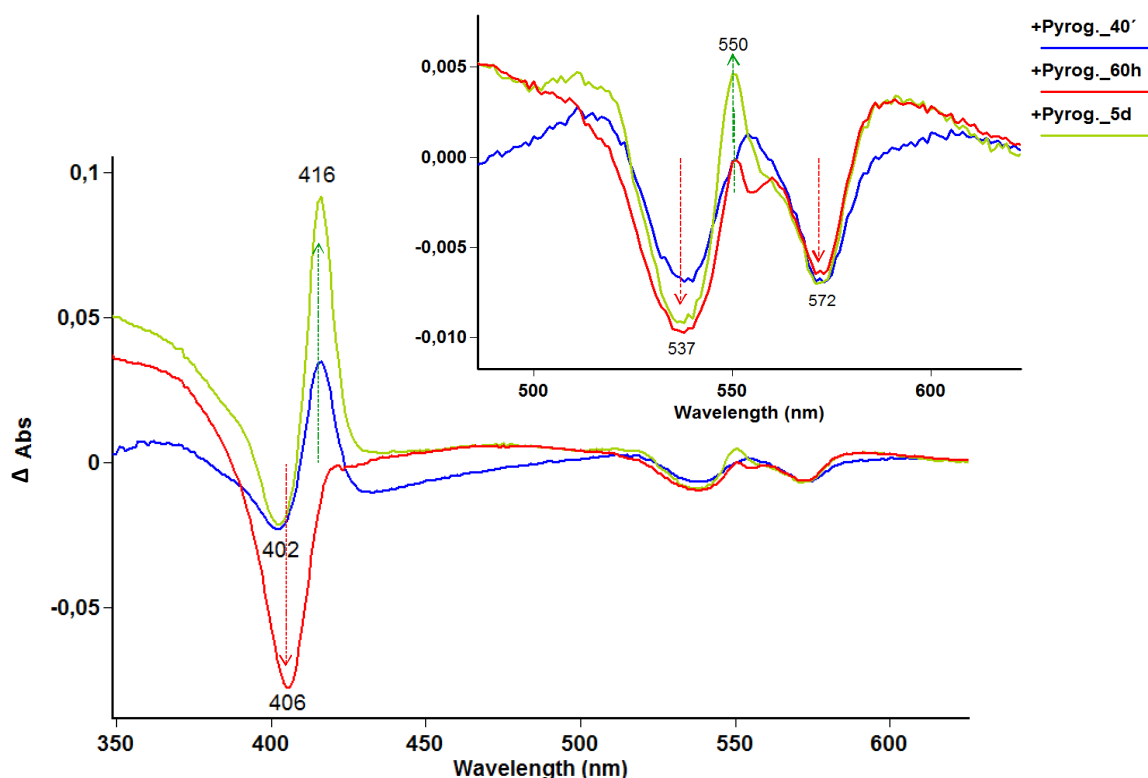


Abb. 3.39: Differenzspektren [– RoxA "as isolated"] von RoxA bei Anwesenheit von Pyrogallol unter N_2 -Atmosphäre bei RT zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Bereich der Q-Banden ist im Insert vergrößert. Zunächst war eine rasche Zunahme der Soret-Bande bei 416 nm zu sehen, im Bereich der Q-Banden eine Abnahme bei ähnlichen, für RoxA "as isolated" typischen Wellenlängen, die sich weiter verstärkte (rote Pfeile, Insert). Die anfänglichen Soret-Änderungen gingen dabei wieder zurück, begleitet von einer offensichtlich generellen Abnahme der Häm-Absorption, sichtbar am Minimum bei 406 nm, und einer Schulter um 560 nm (rot, 60 h). Nach mehreren Tagen verstärkte sich wieder das zu Beginn des Versuchs festgestellte Soret-Signal bei 416 nm. Nun trat auch die Zunahme einer α -Bande bei 550 nm ein (grün), die sich bereits nach 60 h andeutete (rot).

Der Umstand, dass die Absorptionsabnahme bei den Q-Banden bei Anwesenheit von Pyrogallol deutlich schneller eintrat als bei anaerober Inkubation alleine, spricht dafür, dass Pyrogallol verbliebenen, möglicherweise auch Häm-gebundenen O_2 abfängt, wenngleich zu erwarten ist, dass dies bei pH 7 nur langsam geschieht. Mehr noch war eine anfängliche Absorptionzunahme bei 549 nm kaum zu sehen. Auch einige Beobachtungen aus der EPR-Spektroskopie mit RoxA weisen darauf hin, dass Pyrogallol unter diesen Bedingungen durch Entzug möglichen Restsauerstoffs wirkt (s. Kap. 3.11.8). Optische Spektren von RoxA mit Pyrogallol, die parallel zu CD-spektroskopischen Aufnahmen unter aeroben Bedingungen im verschlossenen Reaktionsgefäß gemessen wurden (Kap. 3.10.3, s. Abb. 3.72), zeigten eine begrenzte Abnahme von Signalen, die charakteristisch für RoxA "as isolated" sind, sowohl der Q-Banden als auch der Soret-Bande – ein Phänomen, das ebenfalls mit Oxidationsmitteln wie Ferricyanid (vgl. Abb. 3.34 b) und in noch deutlicher und schnellerer Weise mit Wasserstoffperoxid zu sehen war (vgl. Abb. 3.34 a; Abb. 3.72).

Im Hinblick auf die Interpretation dieser vielfältigen Effekte, die nach der Entfernung von O_2 aus einer RoxA-Lösung gemacht wurden, ist zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Latexspaltung Vorsicht geboten. Denn die fehlende Reproduzierbarkeit und die langen Zeiträume, die betrachtet werden mussten, erschweren eine verlässliche Interpretation. Unter der Annahme einer Bindung von O_2 in RoxA "as isolated" lassen sich jedoch die innerhalb eines überschaubaren Zeitraums von etwa 24 h eingetretenen spektralen Veränderungen zusammen mit Befunden aus der EPR-Spektroskopie und der ähnlichen Beobachtung einer eintretenden "Abrundung" der Q-Banden mit Oxidationsmitteln in einen sinnvollen Zusammenhang bringen (s. Kap. 4.6.1; Kap. 4.11.2). Die nur nach sehr langer anaerober Inkubation sichtbaren Effekte können wie bereits erwähnt auf andere, aus der Versuchsdurchführung bzw. langen Versuchsdauer herrührende Ursachen hinweisen und sollten daher nicht überbewertet werden (s. u.).

Eine interessante und potentiell aufschlussreiche Gemeinsamkeit veranschaulichte die vergleichende Analyse der spektralen Veränderungen in Gegenwart von Oxidationsmitteln wie Ferricyanid und Wasserstoffperoxid, des O_2 -abfangenden Pyrogallols oder in fortgeschrittenen Zuständen unter Sauerstoffausschluss. Das Q-Banden-Spektrum, das nicht von der Eigenabsorption der zugesetzten Substanzen überlagert war, zeigt diese Gemeinsamkeit deutlich. Es war eine gewisse Absorptionsabnahme und eine "Abrundung" der Q-Banden mit einem nach etwa 530 nm verschobenen Maximum zu beobachten, auch wenn ein Absorptionsverlust der Soret-Bande, wie er mit höheren H_2O_2 -Konzentrationen beobachtet wurde, nicht eintrat. Diese Absorptionsveränderung kann anhand von Differenzspektren von RoxA "as isolated" minus des betreffenden Spektrums in zwei deutlich unterscheidbare Signale um 538–540 nm und 572–573 nm aufgelöst werden, die den Absorptionsverlust beschreiben (s. Abb. 3.40 a, b).

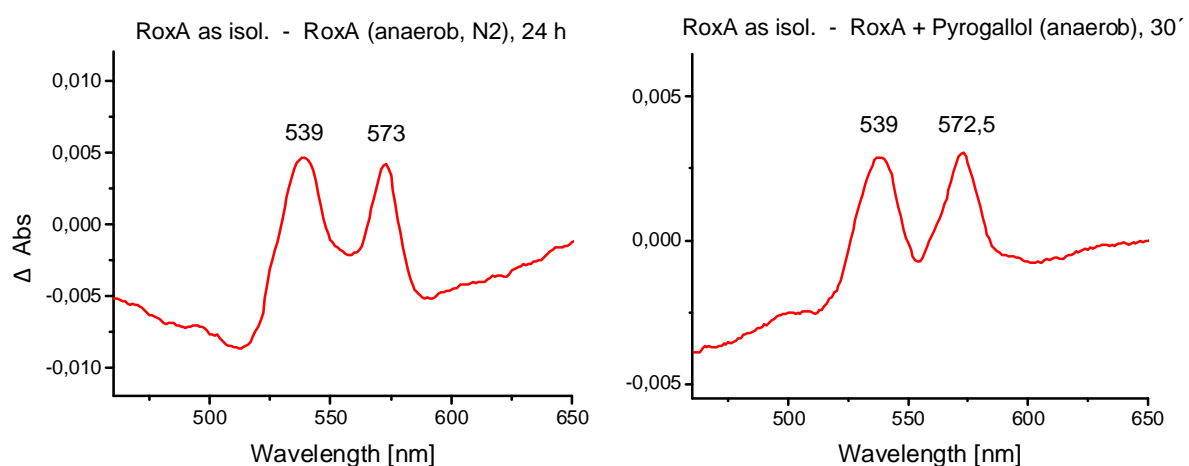


Abb. 3.40: Differenzspektren im Bereich der Q-Banden von RoxA "as isolated" ($2 \mu\text{M}$) minus RoxA unter Sauerstoffausschluss, (links) unter N_2 -Atmosphäre nach $\ddot{U}N$ -Inkubation (RT), (rechts) unter reduziertem Gasdruck (1 mbar) und nach Pyrogallolzugabe ($4 \mu\text{M}$) nach 30 min. Die Spektren geben den Absorptionsverlust nach Anaerobisierung wieder. Die Banden bei etwa 539 nm und 572–573 nm sind möglicherweise einem vorherigen O_2 -koordinierten Zustand am N-terminalen Hämzentrum zuzuordnen.

Der Verlauf dieser Banden entspricht nicht dem relativen Verlauf des Spektrums von RoxA "as isolated". Da Versuche mit Hämliganden den Zugang externer Verbindungen lediglich zur N-terminalen Hämgruppe hinweisen (s. Kap. 3.9.6), verdeutlicht diese Darstellung vermutlich die Absorptionsabnahme an diesem Hämzentrum.

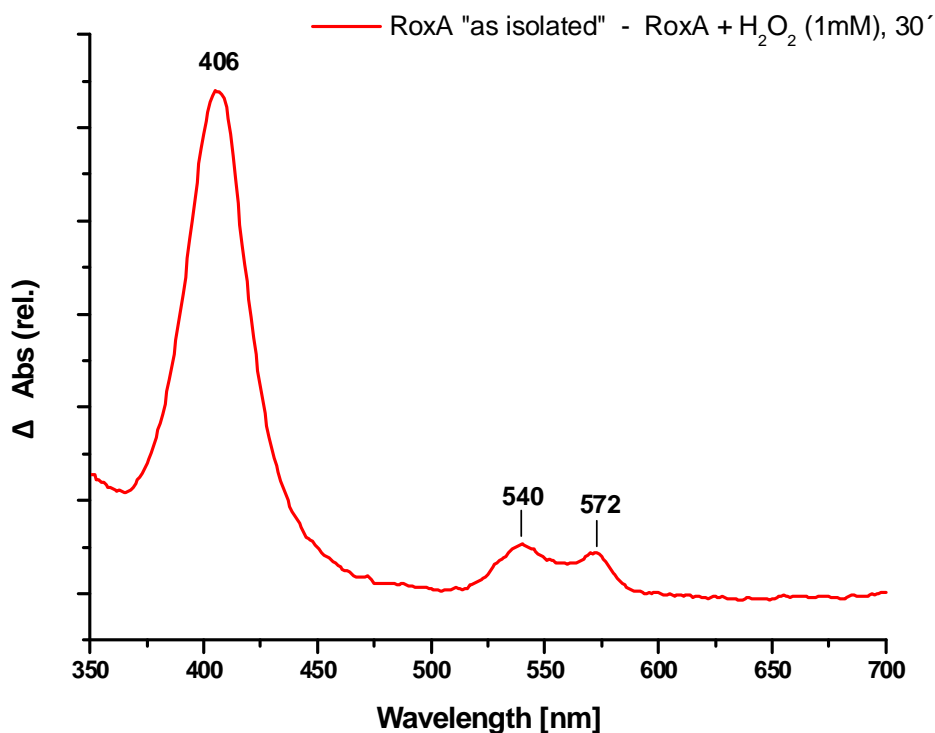


Abb. 3.41: Differenzspektrum von RoxA "as isolated" (1,5 μM) minus RoxA nach Reaktion mit H_2O_2 (1 mM, 30 min). Das Spektrum gibt den vermutlich auf das N-terminale Hämzentrum zurückgehenden relativen Absorptionsverlust durch Reaktion mit H_2O_2 wieder und könnte näherungsweise dem absoluten Spektrum eines oxygenierten Zustandes am N-terminalen Hämzentrum entsprechen. Die Q-Banden um 540 nm und 572 nm gleichen solchen Zuständen nach anaerober Inkubation (vgl. Abb. 3.40).

Die Ähnlichkeit dieser Spektren legt einen Zusammenhang zum Entzug von Sauerstoff nahe. Diese Veränderungen könnten die Differenz eines O_2 -koordinierten (oxygenierten) Zustandes in RoxA "as isolated" zur entsprechenden Desoxy-Fe(III)-Form darstellen. Denn die offensichtliche Gemeinsamkeit zwischen den Versuchsbedingungen nach Sauerstoffentfernung und solchen nach Reaktion mit Oxidationsmitteln (s. Kap. 3.9.2) besteht am ehesten in der Entfernung einer ursprünglichen O_2 -Koordination (s. Kap. 4.6.1). Unter der Annahme, dass H_2O_2 lediglich am N-terminalen Hämzentrum reagiert, könnte der eintretende Absorptionsverlust, d. h. die Differenz des Spektrums von RoxA "as isolated" zu demjenigen nach Reaktion mit H_2O_2 (1 mM), das absolute UV-Vis-Spektrum der N-terminalen Hämgruppe im Grundzustand von RoxA beschreiben. Dieses ist in Abb. 3.41 dargestellt.

3.9.4 Titration von RoxA

3.9.4.1 Das Redoxpotential der Hämzentren

Bereits im Rahmen der Dissertation von R. Braaz (2006) wurden Werte für die Redoxpotentiale der Hämzentren durch elektrophotchemische Redoxtitration ermittelt. Demnach wurde das Potential eines Hämzentrums auf -65 mV bestimmt. Das des zweiten Häms war nur schlecht aufzulösen und wurde auf -145 mV geschätzt (Schmitt *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche unternommen, das Gesamt-Standardpotential von RoxA mit zwei alternativen Verfahren näher zu bestimmen. Ein System mit Xanthin-Oxidase (XO) und Xanthin (X) als Elektronendonator (Hopkins & Williams, 1995; Büchert, 2001) sowie die photochemische Reduktion mit Deazaflavin (dFlox) (Massey *et al.*, 1978) wurden erfolgreich auf ihre Eignung zur Reduktion von RoxA getestet. Beide Methoden bieten die Möglichkeit, das Standardpotential eines Enzyms durch Titration bei Anwesenheit eines Redoxmediators mit bekanntem Standardpotential mithilfe der Nernst-Gleichung zu berechnen:

$$E_{0'}^{\text{RoxA}} = E_{0'}^{\text{Med}} - \frac{RT}{F} z_{\text{RoxA}} \times \ln\left(\frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}\right)_{\text{RoxA}}$$

Die Vorgehensweise und der theoretische Hintergrund sind im Methodenteil beschrieben (Kap. 2.10). Generell erschwert wird die Auswertung dieser Messungen durch den wohl schwer zu behebbenden Umstand, dass RoxA bereits ohne die Anwesenheit von Reduktionsmitteln unter anaeroben Bedingungen partiell reduzierte Zustände einzunehmen schien (s. Kap. 3.9.3). Da sich diese Effekte erst sehr langsam einstellten, wurden Titrationsen in möglichst kurzem Zeitraum durchgeführt, wobei jedoch auf das Eintreten eines Redoxgleichgewichts zwischen RoxA und Mediatoren zu den jeweiligen Messzeitpunkten geachtet werden musste.

Zur Bestimmung des RoxA-Standardpotentials $E_{0'}$ wurde meist die X/XO-Methode benutzt. Es wurden die Redoxmediatoren Resorufin ($E_{0'} = -51$ mV), Indigotrisulfat (-78 mV), Indigodisulfat (-125 mV), 2-Hydroxynaphthochinon (-152 mV) und Safranin T (-290 mV) verwendet (s. Tab. 2.12). Je nach Mediator wurden recht unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Demnach eignete sich Resorufin kaum zur RoxA-Titration, da es noch bevor die RoxA-Reduktion nennenswert einsetzte bereits zu erheblichem Anteil reduziert worden war. Da bei der Titration mit Resorufin das zweite Häm (*low-potential*) kaum von der Reduktion erfasst war, würden sich erhaltene Werte eher auf das Potential des ersten (*high potential*) Häms beziehen, doch lag auch dieses nicht komplett reduziert vor als der Mediator bereits umgesetzt war. Ähnlich, doch in nicht so ausgeprägtem Maße, verhielt es sich mit Indigotrisulfat, mit welchem sich ebenso unplausible Werte für das RoxA-Gesamtpotential ergaben. Ebenso wenig ließen sich mit Safranin T verwertbare Titrationskurven erhalten, da

der Mediator erwartungsgemäß aufgrund des negativeren Redoxpotentials erst reduziert zu werden begann als die Hämzentren in RoxA bereits zum großen Teil reduziert vorlagen.

Die beste Eignung zur RoxA-Titration zeigten die Mediatoren 2-Hydroxynaphtochinon (HNC) und Indigodisulfat (IDS). Dies spricht für ein RoxA-Standardpotential im gleichen Bereich der Standardpotentiale der Mediatoren, da RoxA und der Mediator in ähnlicher Weise parallel reduziert wurden. Mit HNC kommt es allerdings zur Überlappung der Absorptionsmaxima von RoxA (418 nm) und HNC (455 nm), was die Auswertung erschwerte. Es wurden Werte für $E_{0'}^{\text{RoxA}}$ zwischen -135 und -150 mV bestimmt. Aufgrund seines Absorptionsmaximums bei 608 nm bietet sich somit Indigodisulfat am ehesten zur Durchführung von RoxA-Titrationen an. Abb. 3.42 a zeigt schrittweise Titration mit Xanthin/Xanthin-Oxidase und IDS als Mediator. Die mit IDS ermittelten Werte für $E_{0'}^{\text{RoxA}}$ variierten aber etwa zwischen -115 mV und -155 mV. Dennoch erscheint ein RoxA-Standardpotential in diesem Bereich plausibel angesichts der mit elektro-photochemischen Titrationen ermittelten Häm-Potentiale von -65 mV und -145 mV. Insgesamt behinderte jedoch bei der X/XO-Methode gelegentlich ausfallendes Xanthin aufgrund dessen geringer Löslichkeit in neutralem Milieu eine Auswertung. Die erhaltenen Geradensteigungen wichen zudem gelegentlich vom theoretisch zu erwartenden Wert des $(\ln([\text{ox}]/[\text{red}])_{\text{Med}} / \ln([\text{ox}]/[\text{red}]_{\text{RoxA}}))$ -Plots ab, unter Umständen durch Verwendung eines mehr als zweifachen molaren Überschusses an Mediator zum Enzym. Bei Verwendung des jeweils zwei Elektronen akzeptierenden Mediators und RoxA sollte sich im Redoxgleichgewicht eine Geradensteigung von eins (2/2) ergeben (vgl. Abb. 3.42 b, c). Die Werte variierten im Einzelfall zwischen 0,65 und 1,25, lagen aber zumeist um 1 ($0,97 \pm 0,16$).

Um das Problem einer eintretenden Trübung zu umgehen, wurden auch Titrationen mittels Photoreduktion mit Deazaflavin vorgenommen, welche jedoch eine strikte Sauerstoffentfernung und die Durchführung im Dunkeln erforderten. Die Verwendung von Tris und EDTA als Elektronendonoren resultierte im gleichen Ergebnis. Die ermittelte Geradensteigung lag nahe der zu erwartenden Steigung um 1,0. Daraus ergab sich für $E_{0'}^{\text{RoxA}}$ ein Wert von $-139,8 \pm 3$ mV. Kalkuliert man sämtliche, mit beiden Techniken durchgeführte Titrationen, ergäbe sich ein Wert für das RoxA-Standardpotential $E_{0'}^{\text{RoxA}}$ von ca. -138 ± 9 mV, wobei die meisten Werte zwischen -120 und -143 mV lagen. Berücksichtigte man lediglich solche Titrationen mit annähernd optimaler Geradensteigung, ergab sich ein Wert von -135 ± 7 mV. Diese Werte liegen im Bereich desjenigen, der für das *low-potential* Hämzentrum angenommen wurde.

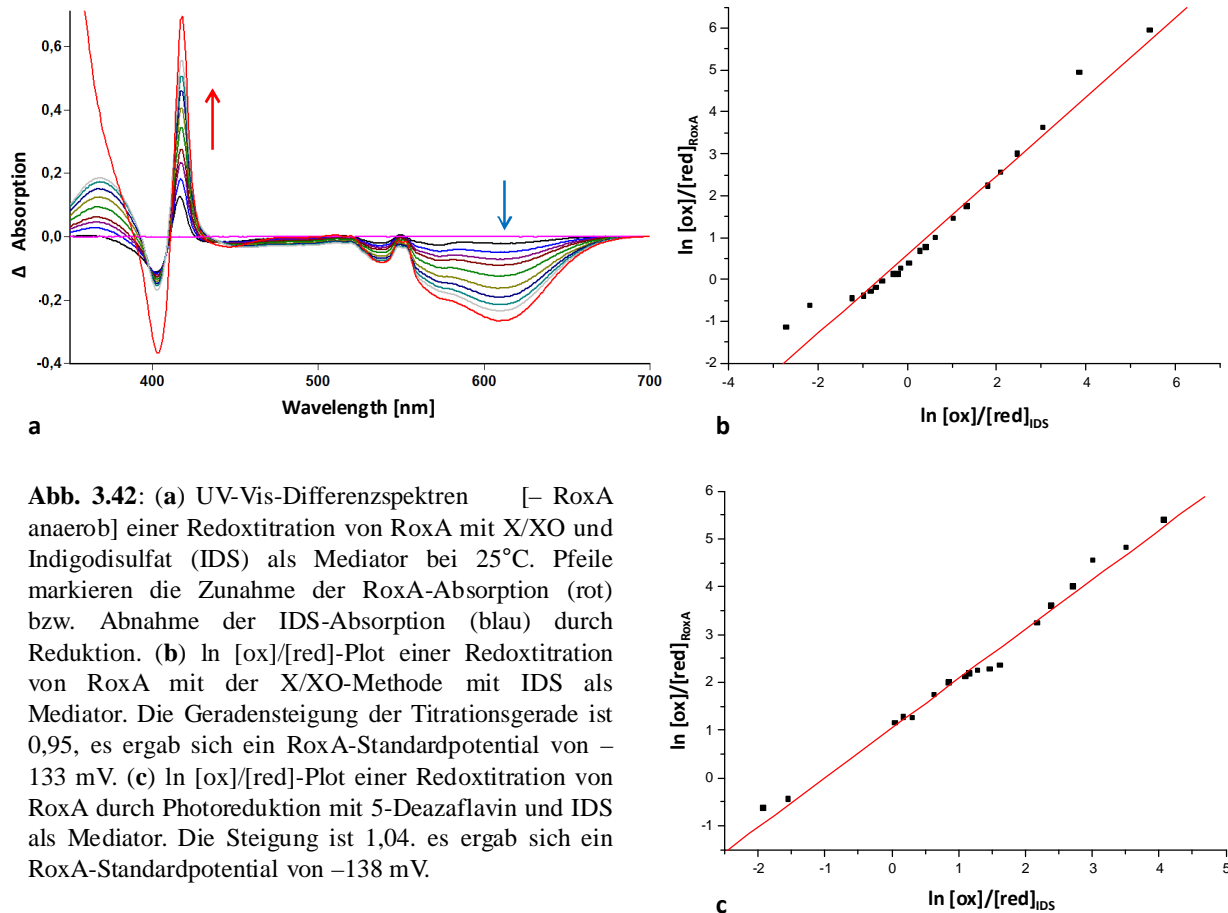


Abb. 3.42: (a) UV-Vis-Differenzspektren [– RoxA anaerob] einer Redox Titration von RoxA mit X/XO und Indigodisulfat (IDS) als Mediator bei 25°C. Pfeile markieren die Zunahme der RoxA-Absorption (rot) bzw. Abnahme der IDS-Absorption (blau) durch Reduktion. (b) $\ln [ox]/[red]$ -Plot einer Redox Titration von RoxA mit der X/XO-Methode mit IDS als Mediator. Die Geradensteigung der Titrationsgerade ist 0,95, es ergab sich ein RoxA-Standardpotential von -133 mV. (c) $\ln [ox]/[red]$ -Plot einer Redox Titration von RoxA durch Photoreduktion mit 5-Deazaflavin und IDS als Mediator. Die Steigung ist 1,04, es ergab sich ein RoxA-Standardpotential von -138 mV.

3.9.4.2 RoxA kann zwei Elektronen aufnehmen

Nach kompletter Reduktion konnte RoxA durch Addition von K^+ -Ferricyanid (K_4FeCN_6) wieder vollständig reoxidiert werden. Die von RoxA aufgenommenen Elektronen nach Photoreduktion mit Deazaflavin, wurden anhand der Oxidationsäquivalente durch Rücktitration mit Ferricyanid (FeCy) bestimmt. Die Titrations wurden im Dunkeln durchgeführt und durch Aufnahme von UV-Vis-Spektren dokumentiert. Die Photoreduktion bzw. Regenerierung von Deazaflavin ließ sich bei einem Absorptionsmaximum um 395 nm verfolgen. Der Reduktionszustand wurde anhand der Absorption der beiden α -Banden bestimmt. Nach vollständiger Reduktion konnte mit stöchiometrischen Mengen an Ferricyanid, bezogen auf die Anzahl an vorhandenen Hämgruppen (= 2x RoxA), das ursprüngliche Spektrum von oxidiertem RoxA "as isolated" zu 80–90 % wiederhergestellt werden, (z. B. mit 6 μ M FeCy bei 3 μ M RoxA). Die Rücktitration zweier verschiedener Ansätze ist anhand des absoluten optischen Spektrums in Abb. 3.43 bzw. des Differenzspektrums [– Ansatz ohne FeCy] in Abb. 3.44 dargestellt. Dies belegte, dass etwa zwei Elektronen von reduziertem RoxA wieder abgezogen werden können, bzw. indirekt die Fähigkeit zur Aufnahme von zwei Elektronen, eines pro vorhandener Hämgruppe. Eine

vollständige Rückführung des RoxA-Spektrums in den Ausgangszustand erforderte dennoch einen höheren, mindestens zweifachen molaren Überschuss an Ferricyanid zu Häm in RoxA und eine längere Wartezeit (Stunden) (Abb. 3.43). Prinzipiell gleiches Ergebnis wurde anhand von Titrationen durch Reduktion mit Dithionit und Rücktitration mit Ferricyanid erreicht, wobei eine vollständige Rückführung in den oxidierten Zustand bereits mit der etwa 1,3fachen Menge erreicht werden konnte. Bei der Photoreduktion könnten demnach bei diesem Prozess entstandene reduzierte Deazaflavin-Zwischenprodukte für die benötigte größere Menge an Ferricyanid verantwortlich sein.

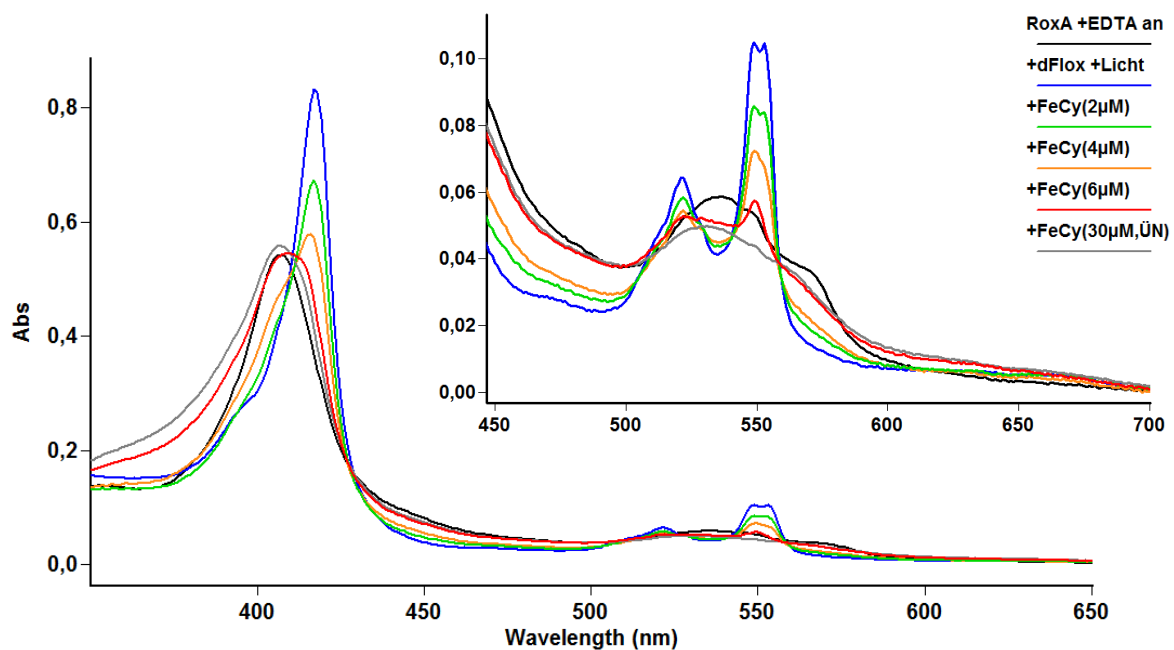


Abb. 3.43: UV-Vis-Spektren von RoxA (3 µM) während Rücktitration mit K⁺-Ferricyanid (FeCy) nach Photoreduktion mit Deazaflavin (dFl_{ox}) (2 µM) bei Anwesenheit des Elektronenmediators EDTA (5 mM) unter anaeroben Bedingungen. Die Spektren wurden nach 15 minütiger Äquilibration im Dunkeln nach der FeCy-Zugabe aufgenommen. Den hier dargestellten Spektren ist die Absorption eines mitgeführten Kontrollansatzes von 2 µM Deazaflavin (ohne RoxA) der gleichen Belichtungsdauer abgezogen.

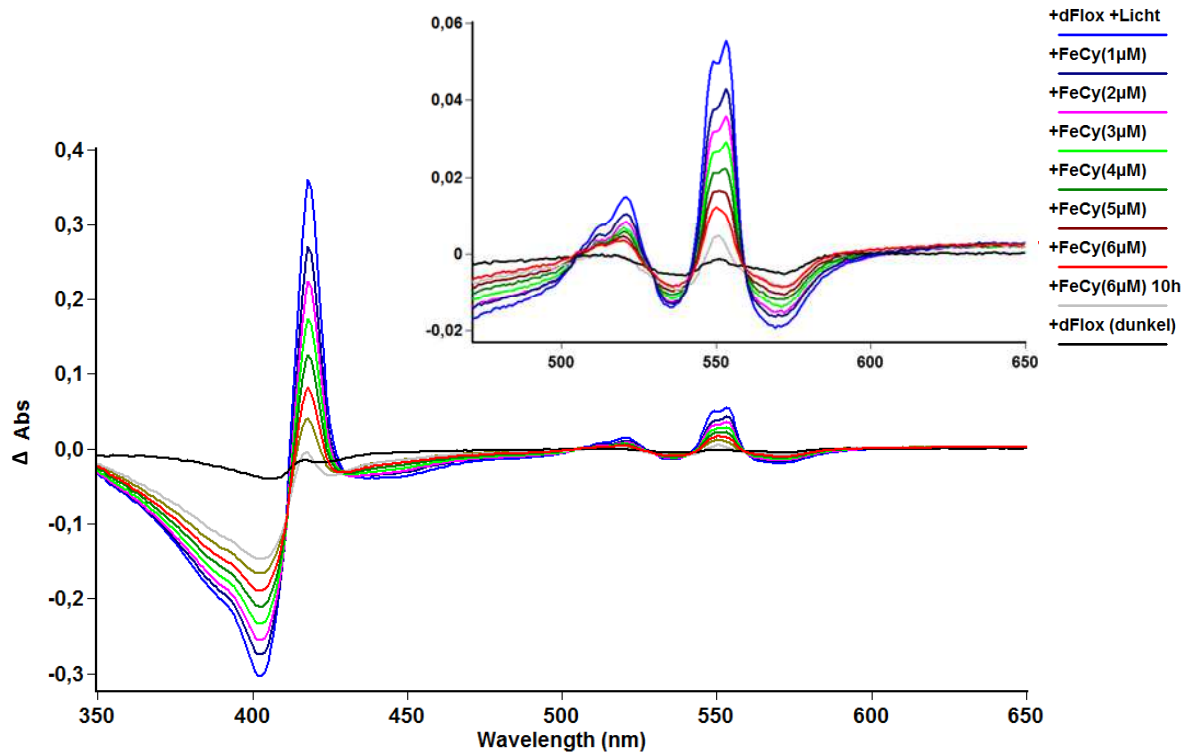


Abb. 3.44: UV-Vis-Differenzspektren von RoxA (3 µM) [– Ansatz ohne FeCy] während der Rücktitration mit K^+ -Ferricyanid (FeCy) nach Photoreduktion mit Deazaflavin (dFl_{ox}) (2 µM) bei Anwesenheit des Elektronenmediators EDTA (5 mM) unter anaeroben Bedingungen (N_2). Die Spektren wurden etwa 10 min nach der jeweiligen FeCy-Zugabe im Dunkeln aufgenommen. Es ist eine schrittweise Abnahme der durch Reduktion verursachten spektralen Veränderungen und damit eine schrittweise Reoxidation mit stöchiometrischen Mengen an FeCy zu sehen. Diese verlief jedoch auch nach N_2 -Inkubation nicht ganz vollständig, doch könnte dabei der Effekt anaerober Inkubation auf das UV-Vis-Spektrum entgegen wirken. Die geringfügig stärkere Intensität der zweiten α -Bande bei 553 nm gegenüber derjenigen bei 549 nm lässt sich auf den Abzug der Absorption des Ansatzes direkt nach der Anaerobisierung zurückführen, welcher bereits ein geringes α -Signal bei 549 nm zeigte. Ein zur Kontrolle aufgenommenes Spektrum von RoxA mit Deazaflavin nach Inkubation im Dunkeln zeigte nur eine minimale Veränderung ohne Belichtung innerhalb eines Versuchszeitraums von 4 h an.

Eine erneute Photoreduktion und anschließende Rücktitration mit Ferricyanid war möglich und resultierte stets im gleichen Ergebnis. Die Exposition eines reduzierten Ansatzes an Luft stellte das oxidierte Spektrum innerhalb ca. 30–60 Minuten nahezu vollständig wieder her. Ein Kontroll-Ansatz mit RoxA, EDTA und Deazaflavin, der ohne Belichtung unter N_2 -Atmosphäre vergleichbar lange im Dunkeln gehalten wurde, zeigte eine spektrale Veränderung, die derjenigen von entsprechend lange anaerob (N_2) gehaltenem RoxA "as isolated" entsprach (ohne Abb.) (vgl. Kap. 3.9.3). Demnach entstehen durch das Deazaflavin keine bedeutenden zusätzlichen spektralen Veränderungen. Zu bedenken ist, dass ein optimales Ergebnis generell nur bei minimaler Überbelichtung, die dennoch eine vollständige RoxA-Reduktion gewährleistete, erzielt wird, sowie durch den Einsatz einer möglichst geringen katalytischen Menge an Deazaflavin (1–2 µM), da dessen Absorption die Soret-

Bande von RoxA beeinflusst. Daraus ergeben sich gegebenenfalls eine geringfügige Absorptionsüberlappung und das "Wegtitrieren" überschüssiger reduzierter Deazaflavin-Produkte durch Ferricyanid im Falle einer starken Überbelichtung als potentielle Fehlerquellen.

Ein bereits bei einigen Ansätzen von RoxA unter anaeroben Bedingungen beobachtetes schwaches Signal bei ca. 670 nm trat bereits in der Anfangsphase der Reduktion mit Deazaflavin auf (s. Abb. 3.33). Beim Rückoxidieren mit Ferricyanid fiel auf, dass sich das Soret-Maximum im Differenzspektrum mit fortschreitender Reoxidierung von zunächst 418 nm hin zu 416 nm veränderte, obwohl auch eine geringfügig reduzierte RoxA-Probe ein Soret-Differenz-Maximum bei 418 nm aufweist. Dies könnte durch Beeinflussung von in diesem Bereich ebenfalls absorbierenden, schrittweise erhöhten Konzentrationen an Ferricyanid zustande kommen. Aber auch die bei längerer anaerober Inkubation eintretenden spektralen Effekte (s. o.) könnten dabei eine Rolle spielen.

Der größte Teil der spektralen Veränderungen nach Reduktion ließ sich durch Zugabe stöchiometrischer Mengen an FeCy beheben. Zum vollständigen Rückgang war jedoch ein molarer Überschuss und längere Inkubation nötig. Im Spektrum nach ÜN-Inkubation mit 30 μ M FeCy waren die Effekte komplett verschwunden, dafür zeigte sich im Bereich der Q-Banden (Insert) ein zuvor mehrfach bei RoxA mit FeCy bzw. anderen Oxidationsmitteln festgestellter Rückgang der typischen Absorption um 535 nm und 572 nm (s. Text).

3.9.5 UV-Vis-Spektren in Gegenwart von Substrat-ähnlichen Verbindungen

Die UV-Vis-spektroskopische Untersuchung mit Poly(*cis*-1,4-isopren) und kleineren, dem Substrat ähnlichen Verbindungen wie β -Carotin, α -Tocopherol oder Squalen erwies sich als unpraktikabel. Aufgrund ihrer mangelnden Löslichkeit in wässrigem Milieu erlaubten die entstehenden Emulsionen mit RoxA selbst bei Einsatz sehr geringer Substratmengen nur eine unzulängliche optische Charakterisierung. Durch den starken generellen Absorptionsanstieg im Bereich der Hämabsorption wurden entsprechende Signale überlagert bzw. verfälscht und machten eine verlässliche Untersuchung entsprechender Ansätze durch UV-Vis- und CD-Spektroskopie schwierig. Nach Abzug entsprechender Nulllinien (Basislinie) von Substratsuspensionen ohne RoxA ergab sich dennoch die Möglichkeit im UV-Vis-Spektrum, Signalverschiebungen zu erkennen.

Mit dem eigentlichen Substrat Latex, sowie einem Oligoisoprenstandard (PSS, Mainz; \AA MW ca. 750 Da), α -Tocopherol, Squalen oder Pristan konnten keine sichtbaren Veränderungen der Absorptionsmaxima verglichen mit dem Spektrum von RoxA "as isolated" beobachtet werden. Eine Durchführung der Versuche in 50 % Propanol verbesserte zwar die Löslichkeit der Substanzen, führte jedoch zum Aktivitätsverlust des Enzyms. Mit 30 % Ethanol wurde noch eine Restaktivität von ca. 10–15 % ermittelt, keine dagegen in 30 % Propanol. Eine geringe Verschiebung des Soret-Maximums nach 408 nm bzw. eine Schulter

Richtung des reduzierten Spektrums war unter aeroben Bedingungen in KP--Puffer mit β -Carotin zu beobachten, das von den genannten Substanzen noch am besten löslich war. Im Differenzspektrum [– RoxA "as isolated" + β -Carotin, 0 min] zeigte sich eine minimale Signalzunahme bei 416 nm nach wenigen Minuten, die jedoch bei längerer Inkubation (> 1 h) wieder abnahm.

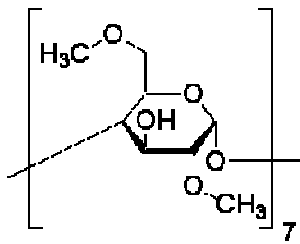


Abb. 3.45: Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin. Das β -Cyclodextrin-Derivat bildet eine geschlossene Ringstruktur mit 7 gleichen Einheiten aus. Die dem Zentrum zugewandten Methylgruppen sorgen für eine hydrophobe Mikroumgebung innerhalb eines wässrigen Milieus und können auf diese Weise unpolare Substanzen in Lösung bringen.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, die Substrate mit Cyclodextrinen (Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin; Fluka) zu lösen (Abb. 3.45), welches eine Ringstruktur mit hydrophobem Inneren besitzt. Dies gelang mit einem Verhältnis von β -Cyclodextrin zum Substrat von >20 : 1. Im Versuch zeigte sich eine Aufklärung der Suspension in 100 mM KPP (pH 7) mit niedrigen Substratmengen (ca. 50 μ M) und einer Cyclodextrinkonzentration von ca. 1 mM. Dennoch traten im optischen Spektrum von RoxA keine signifikanten Veränderungen ein. Doch auch bei diesen Versuchen war es fraglich, in wie weit die Substrate für das Enzym verfügbar waren, wenn deren hydrophober Molekülteil von der Cyclodextrin-Ringstruktur umschlossen war.

3.9.6 Die Wirkung externer Hämiliganden

3.9.6.1 Der Effekt von Imidazol auf das RoxA-Spektrum

Die Struktur von RoxA nach Kristallisation zeigte eines der Hämzentren in einem fünffach koordinierten Zustand mit einer freien Bindestelle am Häm-Eisen. Zudem lagen bereits Hinweise aus der EPR-Spektroskopie für einen solchen Zustand (*high-spin*) vor (s. Kap. 4.5; 4.8). Durch Zugabe von aromatischen N-Verbindungen lassen sich solche freien Koordinationsstellen unter Umständen besetzen. Gewöhnlich können Veränderungen im optischen bzw. im EPR-Spektrum ein solches Ereignis anzeigen. Imidazol und verwandte Verbindungen eignen sich für derartige Untersuchungen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Aminosäure Histidin, die einen Imidazol-Ring besitzt und häufig als Häm-Ligand auftritt, so auch in RoxA. Imidazol, Pyridin und andere Derivate fanden als potentielle Liganden zur Charakterisierung von Koordinierungszuständen freien Häms in zahlreichen Studien

Verwendung (z. B. Walker, 1999). Analog wurde in RoxA zunächst die Auswirkung von Imidazol auf das optische Spektrum und die Enzymaktivität untersucht, um mehr über die Verfügbarkeit freier Koordinationsstellen im Enzym zu erfahren. Diese Experimente wurden in der Regel in 100 mM KP-Puffer (pH 7) mit einer RoxA-Konzentration von 2–4 μM unter aeroben Bedingungen durchgeführt, verwendete Imidazol-Stammlösungen [1 M] wurden zuvor mit HCl auf pH 8 eingestellt.

Die Zugabe von Imidazol hatte bemerkenswerte Auswirkungen auf das optische Spektrum von RoxA. Innerhalb von Minuten trat eine Soret-Signalverbreiterung ein, die bis zur Ausbildung eines zweiten Maximums bei ca. 417-418 nm im UV-Vis-Spektrum fortschritt, wobei ein für den oxidierten Zustand typisches Signal bei 407-408 nm bestehen blieb (Abb. 3.46 a). Das Differenzspektrum minus RoxA "as isolated" ohne Zusätze zeigt deutlich die absoluten Veränderungen (Abb. 3.46 b). Es trat eine Zunahme des Soret-Maximums bei 418 nm, zudem bei 521 und 550 nm ein. Die eingetretenen Veränderungen ähnelten somit stark einer partiellen Reduktion des Enzyms. Die im Verlauf der Reduktion bald nach dem Auftreten der 549 nm α -Bande entstehende Bande bei 553 nm fehlte hingegen vollständig (vgl. Abb. 3.31). Insofern war auch der Verlauf beider Effekte bei schrittweiser Betrachtung nicht deckungsgleich. Denn bei Anwesenheit von Imidazol entstand lediglich eine einzelne α -Bande bei 550 nm.

Wie rasch diese Effekte eintraten hing von der eingesetzten Imidazol-Konzentration ab. In jedem Fall erreichten die optischen Veränderungen einen Endpunkt, der hingegen unabhängig von der eingesetzten Konzentration war, sofern Imidazol im Überschuss zu RoxA vorlag. Während bei pH 7 mit 1 mM Imidazol die Reaktion nach ca. 90 Minuten nicht weiter fort schritt, wurde mit 10 mM die maximale Ausprägung der Effekte nach weniger als 30 Minuten erreicht. Gemessen an der Intensität der Soret-Veränderungen betragen diese etwa ein Drittel der Intensität nach vollständiger Reduktion mit Dithionit (s. Tab. 5.1), mit welchem sich bei 2 μM RoxA eine Soret-Absorptionsänderung von etwa 400 mAU ergibt. Die gleichzeitige Abnahme bei Wellenlängen zwischen 402 und 406 nm typisch für isoliertes RoxA, wie sie im Zuge der Reduktion mit Na^+ -Dithionit oder NADH/PMS in etwa proportional zur Zunahme bei 418 nm auftritt, war in Experimenten mit Imidazol weniger deutlich (vgl. 3.31 und Abb. 3.46 b). RoxA-Aktivitätstests mit ÜN-Inkubation belegten eine Verminderung der Latex spaltenden RoxA-Aktivität durch die Anwesenheit von Imidazol, wobei 1 mM noch etwa 50 %, 10 mM noch etwa 20 % Aktivität lieferten (Tab. 3.2). Über drei Stunden durchgeführte Aktivitätstests zeigten noch eine Restaktivität von ca. 15 % mit 1 mM Imidazol an (Tab. 5.1; s. auch Kap. 4.2.3).

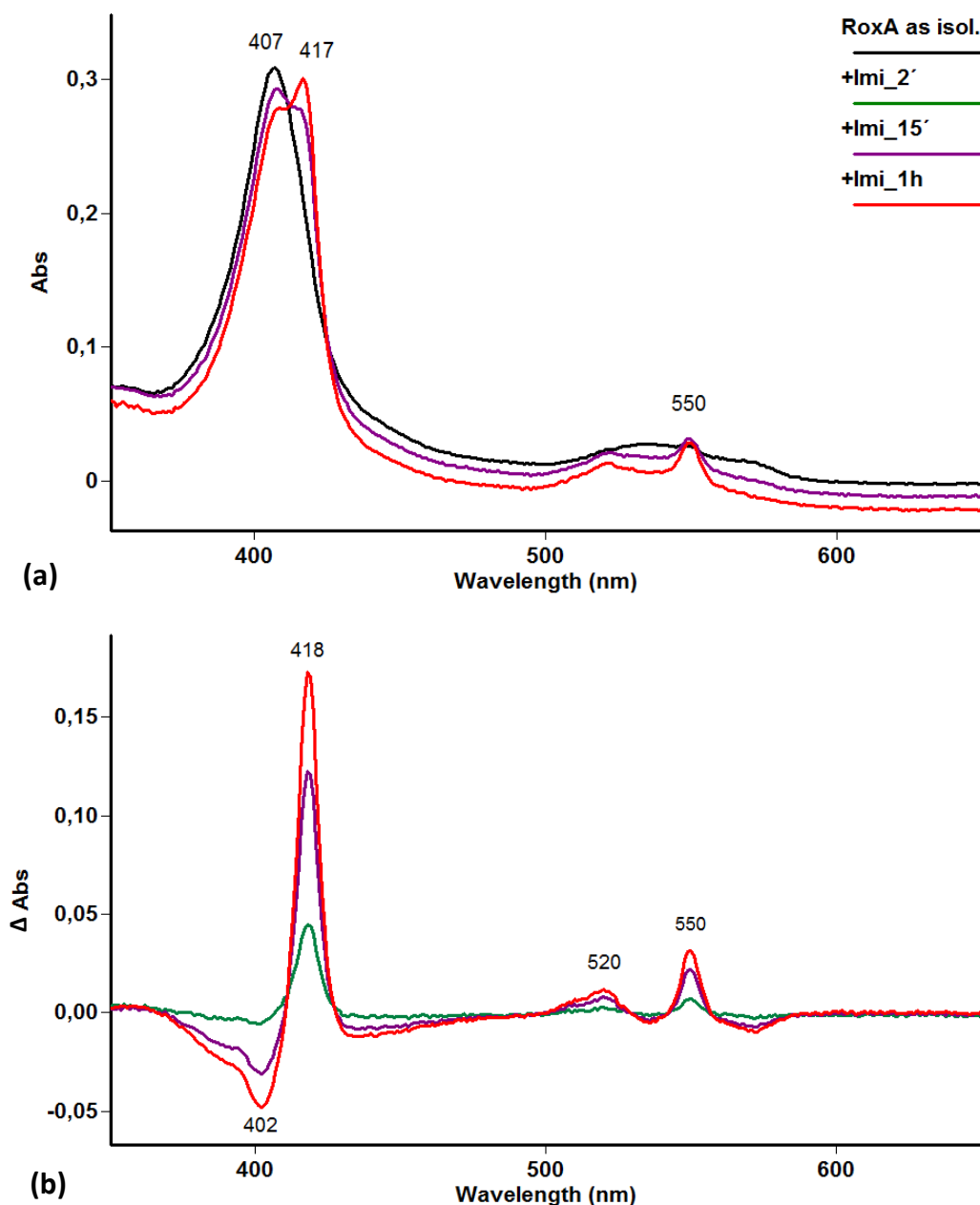


Abb. 3.46: (a) Absolutes UV-Vis-Spektrum von RoxA "as isolated" ($1,5 \mu\text{M}$) mit Imidazol im Überschuss (10 mM) in KPP (100 mM , pH 7). Es sind zwei Maxima der Soret-Bande bei etwa 407-408 und 417-418 nm, sowie Q-Banden bei 520 und 550 nm zu beobachten. (b) Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"], das die absoluten Änderungen zu RoxA "as isolated" ($\approx 2 \mu\text{M}$) mit Imidazol (10 mM) zeigt. Es ist eine klare Zunahme der Soret-Absorption bei 418 nm und eine demgegenüber geringe Abnahme um 402 nm zu sehen. Nur eine der α -Banden (550 nm) nahm zu. Sie entspricht der α -Bande bei 549 nm mit anderen Hämliganden (vgl. Tab. 5.1).

3.9.6.2 Die Effekte weiterer N-heterozyklischer Verbindungen

Aufgrund der interessanten spektralen Veränderungen mit Imidazol wurden eine Reihe weiterer Imidazol-Derivate bzw. strukturell ähnliche aromatische Verbindungen wie Pyridin in gleicher Weise auf Veränderungen im optischen Spektrum von RoxA und dessen Aktivität untersucht. Diese Versuche sollten dazu dienen, den optisch einer Teilreduktion ähnelnden Effekt von Imidazol besser zu verstehen bzw. die Interpretation der spektroskopischen Daten als Auswirkung einer möglichen Bindung an einer freien Eisen-Koordinationsstelle zu unterstreichen. Betrachtet wurden daher auch Analoga mit Seitenketten, die eine mögliche Bindung behindern könnten, wie z. B. 1- oder 2-Methylimidazol. Mit einigen dieser Imidazol-Analoga ergaben sich ähnlich starke Effekte auf das optische Spektrum und führten gleichermaßen zu verringerter RoxA-Aktivität. Eine Übersicht über alle getesteten Verbindungen und deren Effekte auf das UV-Vis-Spektrum von RoxA, sowie die bei deren Anwesenheit ermittelten RoxA-Restaktivitäten gibt Tab. 5.1. Veränderungen des absoluten optischen RoxA-Spektrums bei Anwesenheit einiger dieser Verbindungen sind aus Abb. 3.47 und Abb. 3.48 ersichtlich. Wie bereits für Imidazol beschrieben, erreichten die Veränderungen im UV-Vis-Spektrum einen im Überschuss konzentrationsunabhängigen Endpunkt. Die Effekte aber waren je nach Analogon unterschiedlich und variierten z. T. deutlich von denen mit Imidazol, insbesondere im Bereich der Soret-Bande. Bedenkenswert bei der Interpretation der Effekte ist, dass kein Unterschied zwischen der Durchführung dieser Tests an Luft oder unter Sauerstoffausschluss festgestellt wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass die unter Sauerstoffausschluss entstehenden Effekte (zunächst) das gleiche Hämzentrum betrafen.

Die intensivsten Veränderungen im UV-Vis-Spektrum zeigten sich mit Imidazol und 1-Methylimidazol, bei denen die Effekte mit einem Differenzmaximum bei 418 nm optisch am ehesten denen einer partiellen Reduktion glichen. Auch ein doppeltes Soret-Maximum im absoluten UV-Vis-Spektrum, das auf die Reaktion mit nur einem Hämzentrum hindeutet, gab es lediglich mit diesen beiden Derivaten. Mit allen übrigen Verbindungen (vgl. Strukturformeln in Abb. 3.52) waren verschobene Gesamtmaxima bei Wellenlängen im mittleren Bereich zwischen 407 und 418 nm zu sehen (s. Tab. 5.1). Schon geringe strukturelle Unterschiede lieferten deutlich unterscheidbare Signalverschiebungen im Spektrum. Diese lassen sich gut beim Vergleich von Imidazol (1,3-Diazol) und Pyrazol (1,2-Diazol) beschreiben, die sich nur in der Position eines N-Atoms unterscheiden. Mit Imidazol ergab sich im Differenzspektrum ein Maximum bei 418 nm (Abb. 3.46), der Endpunkt bei 1 mM wurde innerhalb von etwa 90 Minuten erreicht. Mit Pyrazol erfolgte die Reaktion sehr schnell, innerhalb weniger Minuten, die beobachtete Spektralverschiebung lag bei 415-416 nm und war etwa ein Drittel weniger intensiv. Auch die Veränderung der α -Banden war nicht exakt die gleiche (Abb. 3.49, Abb. 3.50).

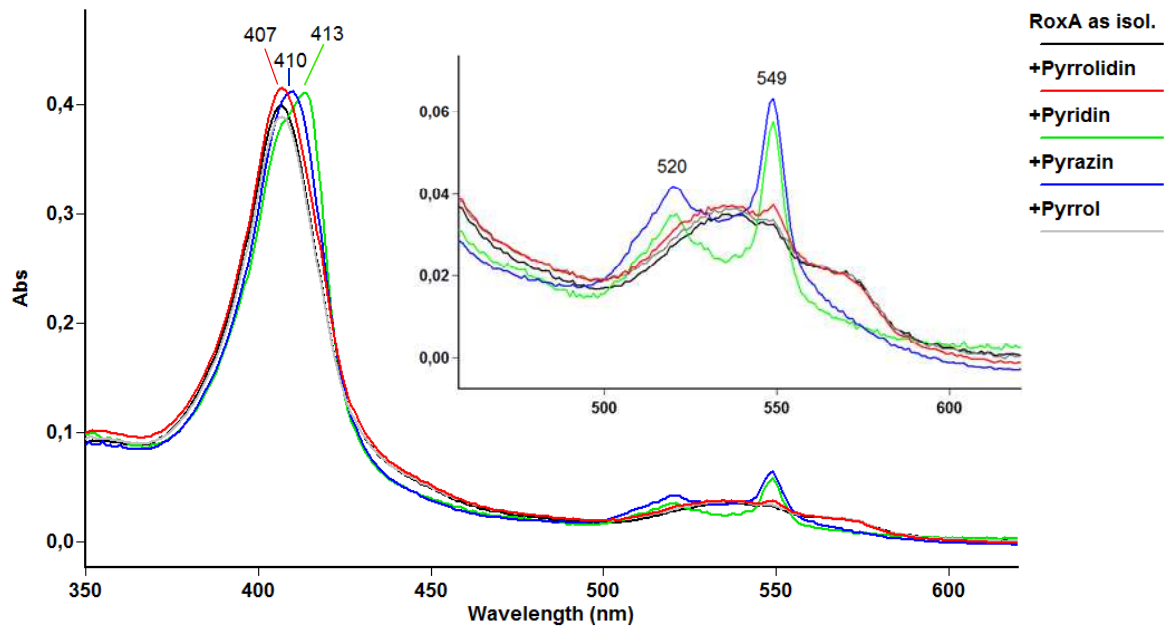


Abb. 3.47: UV-Vis-Spektren von RoxA (2 μ M) mit Pyrrol, Pyrazin, Pyridin bzw. Pyrrolidin (5 mM) am Endpunkt der Reaktion (aerob). Der Bereich der Q-Banden ist im Insert vergrößert. Gegenüber RoxA "as isolated" zeigen die Spektren bei Anwesenheit von Pyrrolidin und Pyrrol kaum, mit Pyrazin und Pyridin dagegen deutliche Veränderungen der Soret-Bande, sowie eine Zunahme einer α -Bande bei 549 nm und β -Bande bei 520 nm.

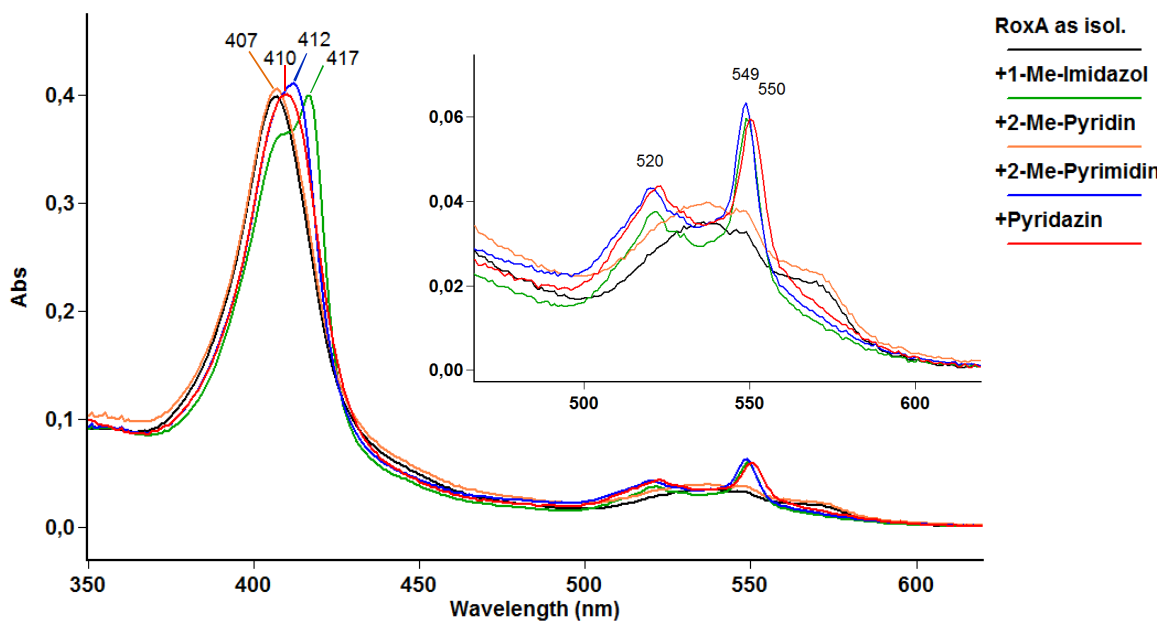


Abb. 3.48: UV-Vis-Spektren von RoxA (2 μ M) mit 1-Methylimidazol, 2-Methylpyridin, 2-Methylpyrimidin bzw. Pyridazin (5 mM) am Endpunkt der Reaktion (aerob). Mit 2-Methylpyridin treten im Gegensatz zu Pyridin (s. Abb. 3.47) keine Veränderungen zu RoxA "as isolated" ein. Mit den übrigen Verbindungen entstehen unterschiedliche Veränderungen der Soret-Bande, sowie einer Zunahme der Q-Banden, deren Bereich im Insert vergrößert ist. Mit 2-Methylpyrimidin liegt die α -Bande des betroffenen Häm bei 549 nm, mit 1-Methylimidazol bei 549-550 nm und mit Pyridazin bei 550-551 nm.

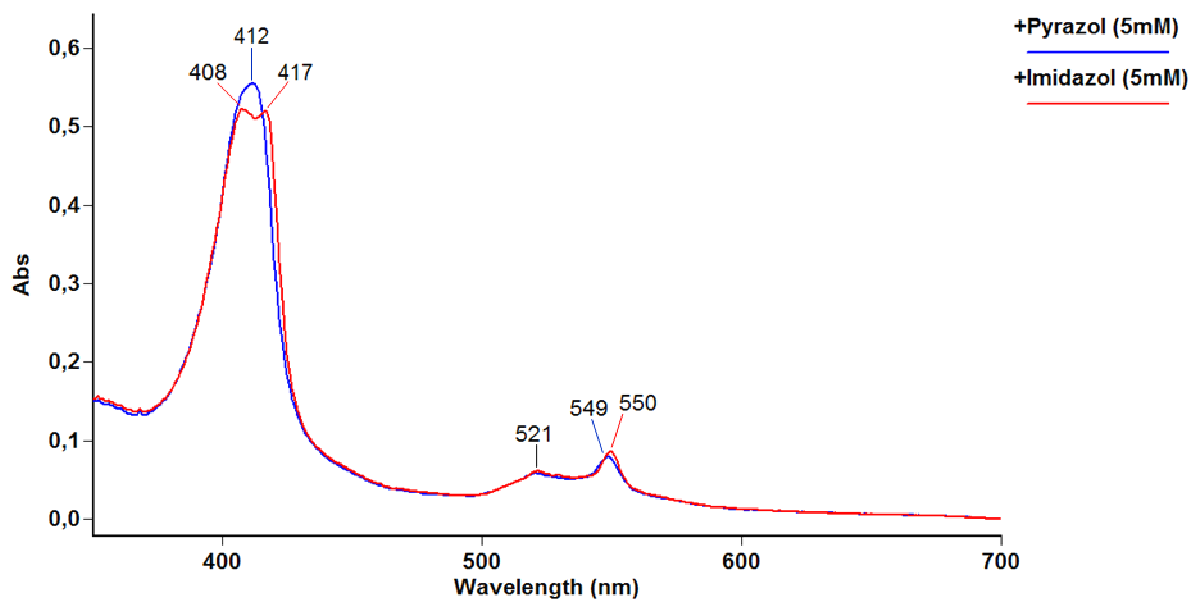


Abb. 3.49: UV-Vis-Spektrum von RoxA mit Pyrazol bzw. mit Imidazol nach 1 h bei RT. Die Effekte beider Substanzen unterscheiden sich deutlich. Mit Pyrazol entsteht ein Soret-Maximum bei 412 nm gegenüber zwei getrennten Maxima mit Imidazol bei 408 und 417 nm. Auch die α -Maxima unterscheiden sich geringfügig voneinander (549 bzw. 550 nm).

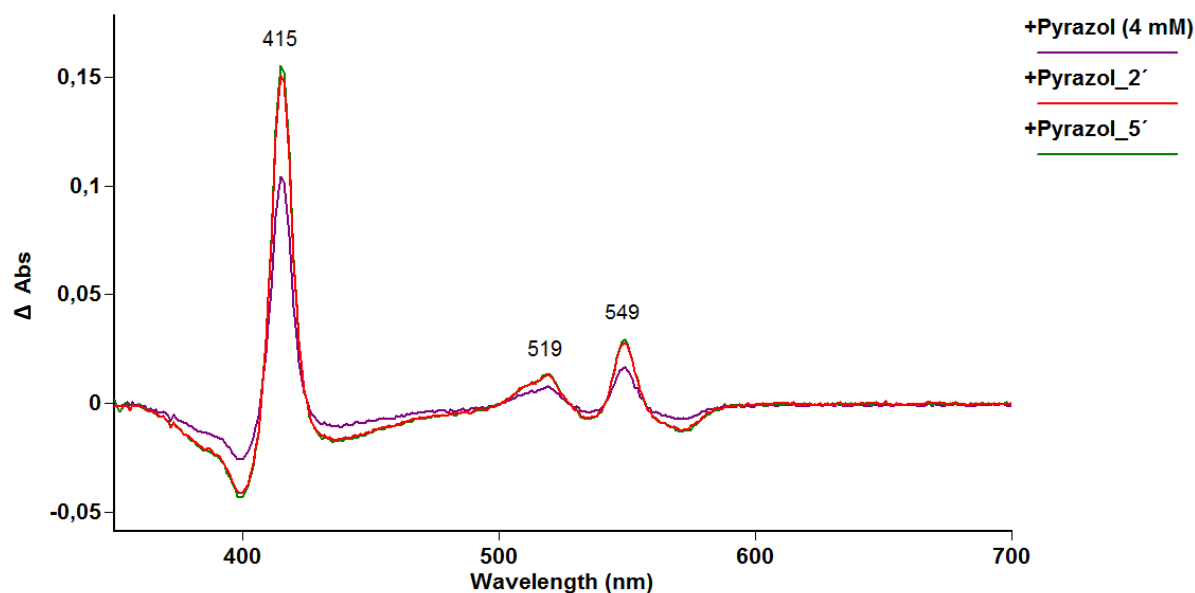


Abb. 3.50: Differenzspektrum [- RoxA "as isolated"]. Die absoluten Änderungen mit einem Maximum bei 415 nm und der Zunahme einer α -Bande bei 549 nm. Die Reaktion von RoxA mit Pyrazol trat sehr rasch ein, erreichte in weniger als 2 min ihren Endpunkt. Die violette Kurve zeigt das Spektrum direkt nach Zugabe des Liganden.

Die Zunahme der α -Bande um 549–550 nm war bei gleicher RoxA-Konzentration mit allen getesteten Verbindungen etwa gleich intensiv, was vermutlich auf den gleichen Ursprung aus einer Fe–N-Bindung hinweist. Die Intensitäten der Veränderungen der Soret-Bande unterschieden sich aber teilweise deutlich. Abhängig von der chemischen Struktur der

getesteten Verbindung unterschieden sich die absoluten Veränderungen am Endpunkt bezüglich (i) der Wellenlängenverschiebung im Bereich der Soret-Bande, (ii) der Intensität dieser Signaländerungen und (iii) im relativen Verhältnis der Signalintensität der Soret-Banden-Verschiebung zu derjenigen im Bereich der Q-Banden. Dies veranschaulicht exemplarisch der Vergleich der Effekte von Imidazol, Pyridin und Pyrazin in Abb. 3.51. Die Relation der Intensität der Signaländerung der α -Bande zu derjenigen der Soret-Bande kann als charakteristisch für die Reaktion einer bestimmten Verbindung mit RoxA, genauer einer Bindung an einem Häm-Fe, angesehen werden und ist aus Tab. 5.1 ersichtlich. So beträgt dieses Verhältnis für Imidazol etwa 0,18 mit einer vergleichsweise starken Soret-Änderung, für Pyridin 0,3 und Pyrazin 0,5 mit einer vergleichsweise schwachen Soret-Änderung (vgl. Abb. 3.51 b). Bei Verbindungen mit Fünfring-System ergaben sich geringere Werte als bei solchen mit Sechsring-System. Bei diesen wurden höhere Werte insbesondere dann erhalten, wenn die Substanz zwei N-Atome enthielt und diese im Ring möglichst weit entfernt lokalisiert und nicht durch nahe liegende Methylreste beeinflusst waren, wie z. B. im Falle von Pyrazin verglichen mit 2-Methyl-Pyrazin und 2,5-Dimethyl-Pyrazin (vgl. Abb. 3.52).

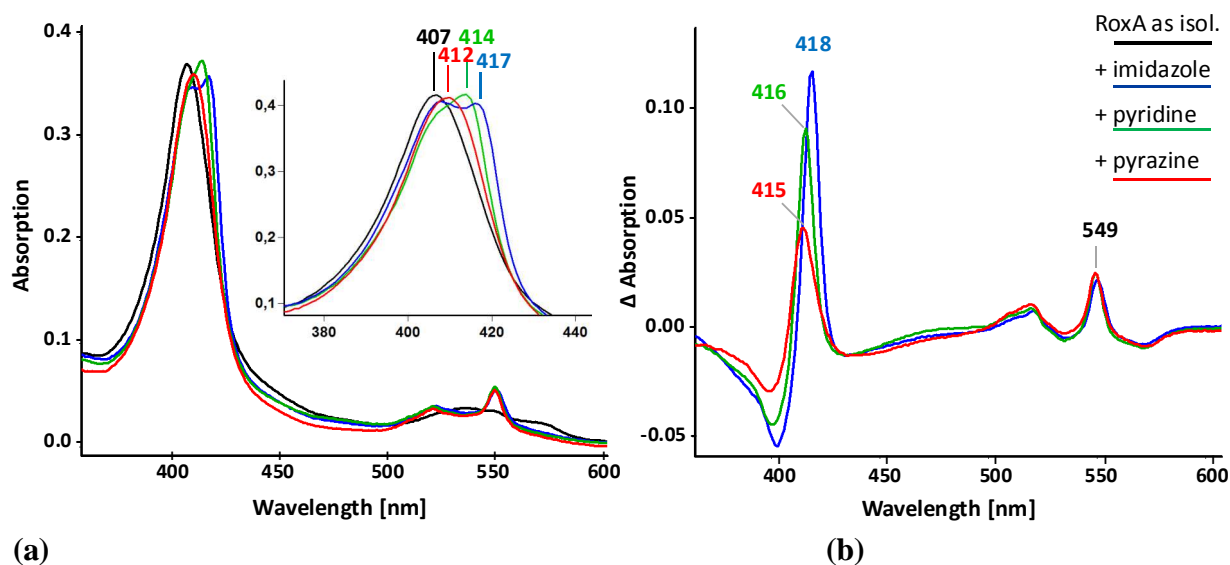


Abb. 3.51: (a) UV-Vis-Spektrum bzw. (b) Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] von RoxA nach Zugabe von Imidazol (blau), Pyridin (grün) oder Pyrazin (rot) am Endpunkt der Reaktion (aerob). Die Wellenlängen der Soret-Maxima im absoluten Spektrum (a, Insert) bzw. die entsprechenden zugehörigen absoluten Veränderungen (b) sind angegeben. Die von den unterschiedlichen Verbindungen verursachten Soret-Verschiebungen unterscheiden sich in Wellenlänge und Intensität, während sich die Änderungen der α -Banden um 549 nm gleichen.

Keine oder nur vergleichsweise minimale Veränderungen des optischen Spektrums und der RoxA-Aktivität bei pH 7 wurden dagegen mit 2-Methylimidazol, 1,2-Dimethylimidazol, Dimethylpyrazol, Pyrrol, 2,5-Dimethylpyrazin, 2-Methylpyridin, Methimazol und 1,2,4-Triazol beobachtet (Tab. 5.1). Soret-Maxima bei 418 nm im Differenzspektrum waren mit

Imidazol, 1-Methylimidazol und Pyrrolidin zu beobachten. Maxima um 415-416 nm zeigten Pyrazol, Pyrazin, 2-Methylpyrazin, Pyridin, 4-Methyl-Pyrimidin, Pyridazin und 1-Methylimidazol-Carboxaldehyd. Auffällig ist, dass nur eine der beiden α -Banden, diejenige um 549 nm zunahm. Diejenige bei 553 nm fehlte vollständig, obwohl die Intensität der Veränderungen bei 549 nm in vielen Fällen diejenige überstieg, bei der im Prozess einer echten Reduktion bereits ein Signalbeitrag bei 553 nm zu erkennen war. Hinzu kommt, dass bei allen Verbindungen, die Effekte hervorriefen, die Zunahme der α -Bande etwa gleich intensiv war, unabhängig von der Intensität der zugehörigen Soret-Banden-Veränderung (s. Abb. 3.51 b).

Mit einigen der Analoga lag das α -Banden-Maximum nicht bei 549 nm, sondern eher bei 550 nm. Dennoch handelt es sich um ein Signal vom selben Hämzentrum, dessen Absorptionsverhalten vermutlich aufgrund der Struktur bzw. elektronischen Beschaffenheit des neuen Liganden unterschiedlich ist. α -Banden bei 550 nm ergaben sich mit Imidazol und 1-Methylimidazol, außerdem mit Pyrrolidin und Pyridazin, mit allen übrigen untersuchten Verbindungen bei 549 nm. Eine allgemeine Erwähnung der α -Bande bei 549 nm im Folgenden schließt ebenso diejenige bei 550 nm mit diesen Analoga ein. Diese geringe Differenz bezüglich der α -Bande stellten CD-Spektren ebenso heraus (s. Kap. 3.10.4; Abb. 3.75; 3.76). Daneben gab es auffällige Unterschiede bezüglich der Schnelligkeit der eintretenden Reaktion bei pH 7 (vgl. Tab. 5.1). Die Hemmung der RoxA-Aktivität korrelierte tendenziell mit der Stärke und der Schnelligkeit der Reaktion. So konnte z. B. mit Pyrrolidin in einem über drei Stunden durchgeführten Aktivitätstest keine signifikante Hemmung festgestellt werden, da die Reaktion sehr langsam eintrat und im Spektrum erst nach ÜN-Inkubation deutlich zu sehen war. Mit Pyrazol trat die beobachtete Reaktion recht schnell ein, die optische Veränderung war jedoch nicht so stark. Auch hier wurde kaum verminderte Aktivität registriert, möglicherweise aufgrund einer geringeren Stabilität der Bindung. Demnach hemmten solche Verbindungen, die deutliche Effekte auf das optische Spektrum hatten, auch die Latex spaltende Aktivität von RoxA deutlich. Eine vollständige Hemmung trat (fast) mit keiner der getesteten Analoga ein, was im Einklang mit der zeitlichen Verzögerung bis zum Erreichen des Endpunktes der jeweiligen Reaktionen zu sehen ist. Demnach sollte im Aktivitätstest noch ein gewisser Umsatz an Substrat zu erwarten sein. Mit Pyridin dagegen prägten sich die Effekte fast unmittelbar aus (1–2 min) und es wurde nach drei Stunden eine fast vollständige Hemmung beobachtet.

Die Ermöglichung einer Bindung von Imidazol am Häm-Fe ist abhängig von der Deprotonierung des die Bindung eingehenden N-3-Atoms. Da Imidazol einen pK_s -Wert von ca. 7 besitzt, darunter vorwiegend protoniert vorliegt, sollte dieses bei sinkendem pH-Wert zunehmend seltener binden, bei höherem pH dagegen vorwiegend deprotoniert vorliegen und somit die Bindung begünstigen. Im Experiment fanden diese Annahmen Bestätigung. Bei pH 4,5 (KPP) trat selbst nach einstündiger Inkubation mit 5 mM Imidazol nur eine minimale Reaktion ein, bei pH 9 (KPP) deutlich schneller als bei pH 7, nur binnen weniger Minuten bis

zur Ausprägung der beschriebenen Effekte. Die Durchführung des Versuchs bei pH 11 (NaOH) führte dagegen nicht etwa zu einer weiter beschleunigten Reaktion, sondern die zu erwartende Veränderung im optischen Spektrum blieb nahezu vollständig aus. Ebenso führte nach vollständiger Ausprägung des Imidazol-Effektes in einem Ansatz bei pH 9 das Einstellen auf pH 11 rasch zu einem Kompletterverlust der zuvor eingetretenen Veränderungen.

Allen Verbindungen, bei denen sich ein Effekt mit RoxA zeigte, zunächst unabhängig von der Schnelligkeit und Intensität, war eines gemeinsam: Ein frei zugängliches N-Atom mit freiem Elektronenpaar, welches nicht im aromatischen Ringsystem eingebunden ist, scheint für die Wirkung entscheidend zu sein (s. Abb. 3.52).

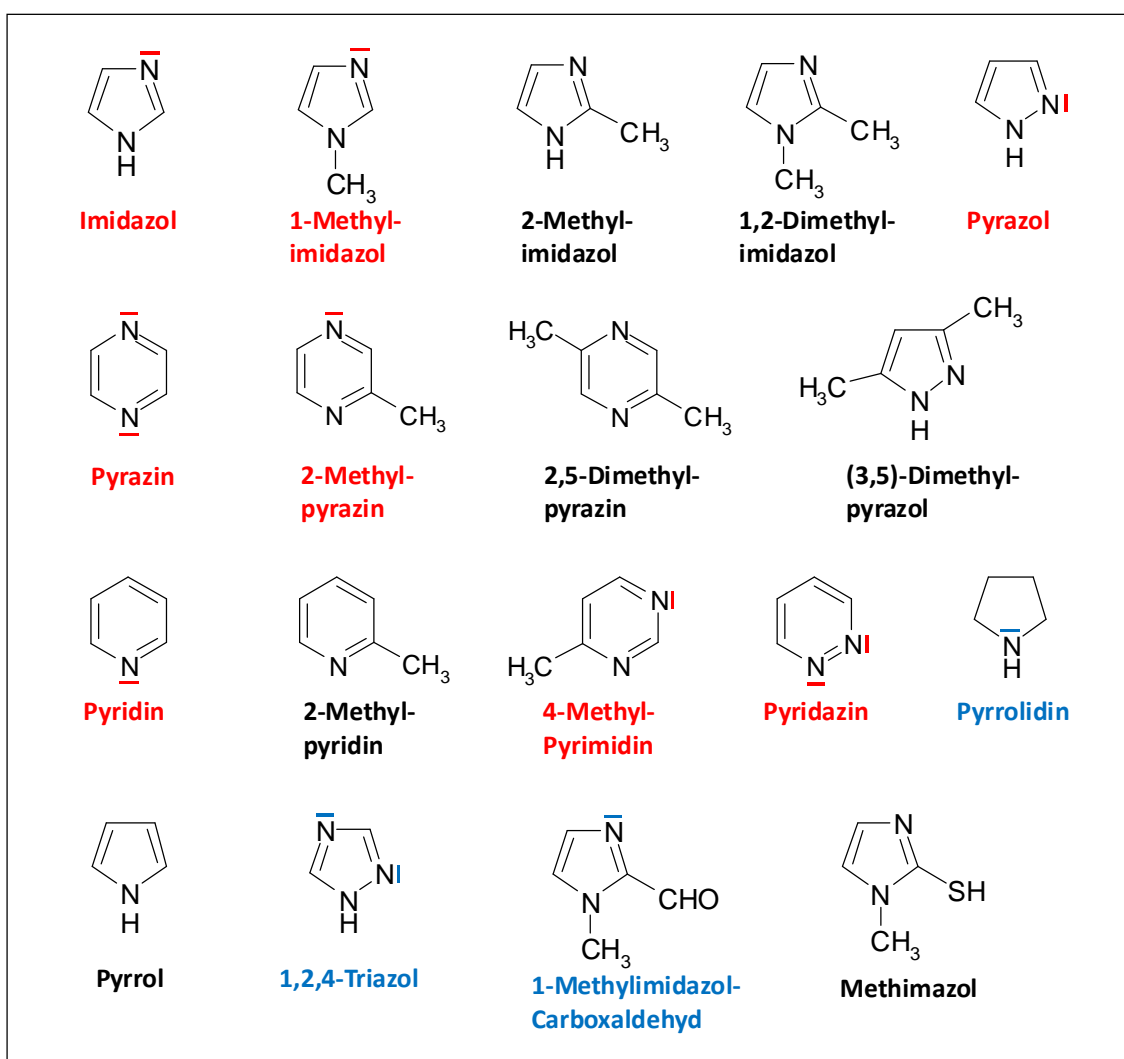


Abb. 3.52: Strukturformeln der wichtigsten auf ihre Wirkung auf das optische Spektrum und die Aktivität von RoxA untersuchten aromatischen N-Verbindungen. Solche, die bei pH 7 deutliche Effekte zeigten, sind rot, mit geringerem Effekt blau, mit minimalem oder keinem Effekt schwarz dargestellt. Rote bzw. blaue Balken markieren freie Elektronenpaare an N-Atomen, die vermutlich für eine Bindung am Häm-Eisen verantwortlich sind.

Seitengruppen wie Methylgruppen an einem benachbarten C-Atom minimierten spektrale Veränderungen bzw. die hemmende Wirkung in den meisten Fällen. Eine solche sterische Hinderung einer Häm-Eisen-Bindung lässt sich gut am Vergleich echter Imidazol-Derivate erkennen. 2-Methylimidazol und 1,2-Dimethylimidazol zeigten kaum Wirkung auf Aktivität und Spektrum im Vergleich zu den deutlichen Reaktionen mit 1-Methylimidazol und Imidazol (s. Abb. 3.53).

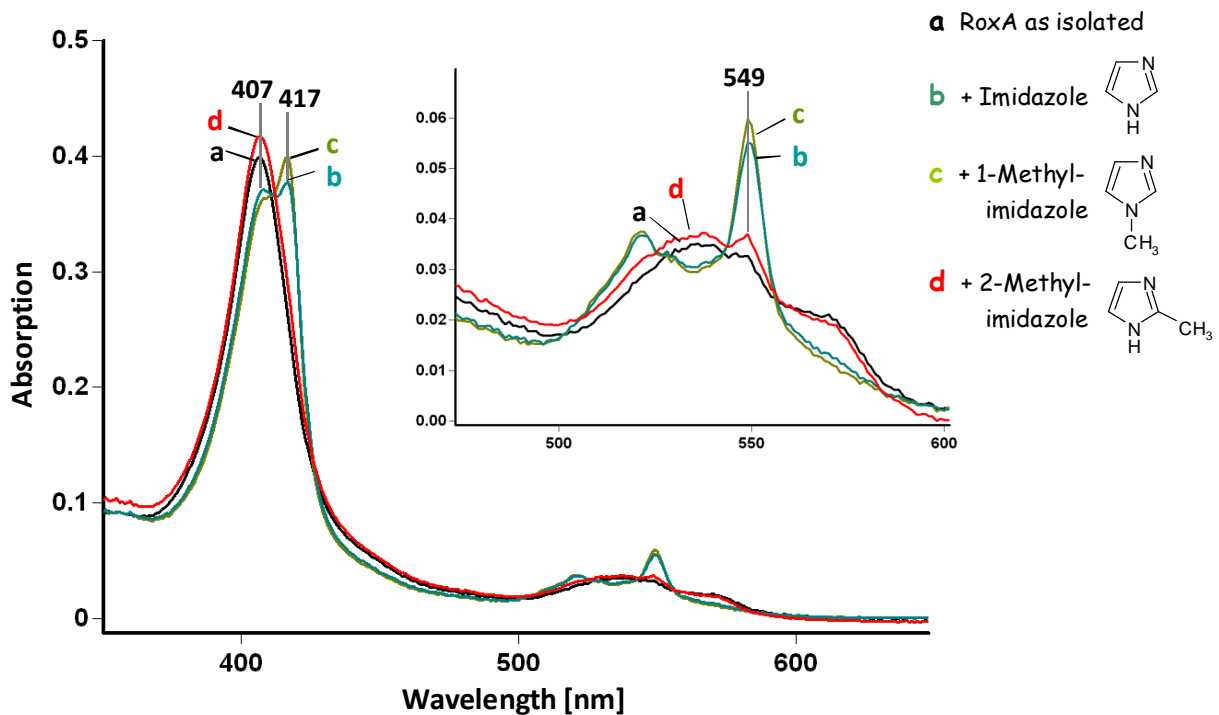


Abb. 3.53: UV-Vis-Spektren von RoxA "as isolated" (a, schwarz) und bei Anwesenheit von 1 mM Imidazol (b, blau), 1-Methylimidazol (c, grün) bzw. 2-Methylimidazol (d, rot) nach einstündiger Reaktion bei RT. Mit Imidazol und 1-Methylimidazol ist ein doppeltes Soret-Maximum bei 407 und 417 nm zu sehen, sowie die Zunahme einer α -Bande bei 549-550 nm (im Fenster vergrößert). Mit 2-Methylimidazol erschien das Spektrum nahezu unverändert (aus: Schmitt *et al.*, 2010).

Allerdings passen 1,2,4-Triazol, Pyrrolidin und 1-Methylimidazol-Carboxaldehyd nicht uneingeschränkt in dieses Schema. 1,2,4-Triazol zeigte trotz Anwesenheit von zwei freien Elektronenpaaren (vgl. Abb. 3.52) zwar Signalzunahmen im Differenzspektrum zu RoxA "as isolated" bei 418, 521 und 549 nm, diese aber waren von geringer Intensität (s. Tab. 5.1). Pyrrolidin zeigte wenn auch nur sehr langsam eintretende Effekte (ÜN), besitzt jedoch wie Pyrrol kein freies, exponiertes Elektronenpaar. Pyrrolidin verfügt jedoch über ein gesättigtes Ringsystem, wodurch ein N-Elektronenpaar zur Bindung zur Verfügung stehen könnte. Trotz einer Aldehydgruppe am benachbarten C-Atom, zeigte sich ein Effekt mit 1-Methylimidazol-Carboxaldehyd, der aber ebenfalls nur langsam eintrat. Bezüglich der Schnelligkeit der Reaktionen müssen weitere Faktoren wie der Protonierungszustand beim vorliegenden pH-

Wert bedacht werden, die zusammen mit den bereits erwähnten Faktoren die jeweiligen Reaktionen der Verbindungen nachvollziehen lassen (s. Kap. 4.9.3).

3.9.6.3 Spektren nach Entfernung durch Gelfiltration

Um festzustellen, ob die eingetretenen spektralen Veränderungen, sowie die Aktivitätsminderung von RoxA durch Entfernung der Imidazol-Analoga aus dem Puffer umkehrbar sind, wurden optische Spektren und Restaktivitäten vor und nach Gelfiltration (HiPrep 26/10_Desalting-Säule) verglichen. Die RoxA-Konzentration nach Umpufferung wurde nochmals optisch bestimmt, so dass für den anschließenden Aktivitätstest stets die gleichen Enzymkonzentrationen eingesetzt wurden. Getestet wurden Verbindungen, die klare Effekte gezeigt hatten: Imidazol, 1-Methylimidazol, Pyrazol, Pyrazin, Pyridin, Pyridazin, Pyrrolidin und 1-Methylimidazol-Carboxaldehyd (s. Tab. 5.2).

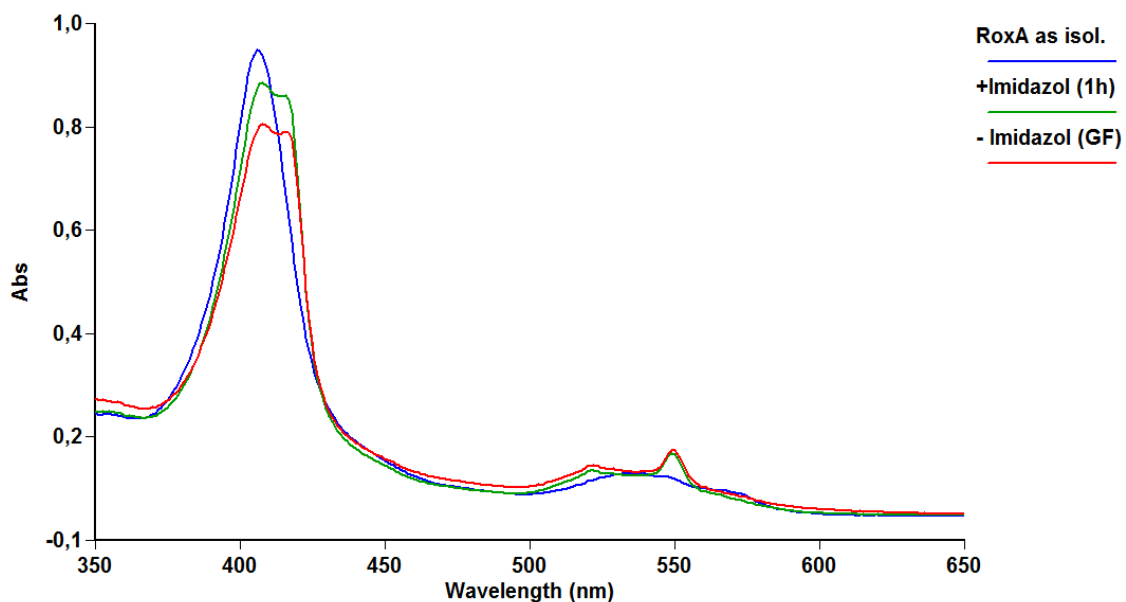


Abb. 3.54: UV-Vis-Spektren von RoxA ($\approx 4,5 \mu\text{M}$) mit Imidazol (5 mM), jeweils vor und nach einer Gelfiltration im gleichen Puffer (100 mM KPP, pH 7). Die spektralen Veränderungen mit Imidazol sind nach Entfernung des Imidazols aus dem Puffer durch Gelfiltration (GF) noch immer vorhanden. Die Intensitätsunterschiede sind auf die Verdünnung durch Gelfiltration zurückzuführen.

Mit allen diesen Substanzen blieb die optische Veränderung auch nach der Gelfiltration bestehen (s. Abb. 3.54; Tab. 5.2). Allein ein Ansatz mit Pyrazol ergab nach Entfernung aus dem Puffer wieder annähernd das Ausgangsspektrum von RoxA "as isolated". Dies bestätigte, dass diese Verbindungen noch immer am Enzym gebunden vorlagen. Dennoch konnte die ursprüngliche RoxA-Aktivität nach der Umpufferung stets wieder hergestellt werden. Diese Ergebnisse stützen die Idee einer Konkurrenz zwischen Häm-Liganden und dem Substrat um

eine Bindung am Enzym, da im Aktivitätstest nach Entfernung der Substanzen aus dem Puffer, also im Überschuss an Latex die RoxA-Aktivität kaum mehr beeinträchtigt war. Auch wären strukturelle Umlagerungen bei Anwesenheit von Latex möglich, die zum Ablösen des Liganden führten. Eine gewisse Hemmung wurde nach Gelfiltration lediglich noch bei Imidazol und 1-Methylimidazol festgestellt, welche beide direkte Homologie zu Histidin besitzen.

3.9.6.4 Reduktion und Oxidation von RoxA nach Bindung externer Liganden

Unter der Annahme, dass diese Spektralverschiebungen eine partielle Reduktion anzeigen, sollte sich diese durch Zugabe eines starken Reduktionsmittels wie Na^+ -Dithionit ergänzen lassen bis zur Ausbildung des damit erreichten vollständig reduzierten Spektrums (vgl. Abb. 3.30; 3.31). Daher wurden RoxA-Präparationen nach Ausprägung der Effekte mit verschiedenen Analoga wie Imidazol, Pyridin u. a. mit Na^+ -Dithionit im Überschuss versetzt und einige Minuten unter Verschluss inkubiert. Die observierten UV-Vis-Spektren entsprachen jedoch nicht demjenigen von mit Dithionit reduziertem RoxA. Sie zeigten eine stärkere Absorption bei den entsprechenden mit Imidazol-Analoga aufgetretenen Signalen um 549–550 nm zulasten einer klaren Trennung der beiden α -Maxima bei 549/553 nm (Abb. 3.55). Diese Beobachtungen widersprechen der Annahme einer "echten" Reduktion durch Imidazol-Analoga und unterstützen eher eine durch Bindung hervorgerufene Veränderung der Elektronenübergänge des Porphyrins als Ursache der optischen Veränderungen (s. Kap. 4.9.2.1). Das gleiche Resultat hatten entsprechende Versuche mit Pyridin, bei denen sich die Effekte ebenfalls in gewisser Weise addierten. Ein solcher Ansatz mit Pyridin wurde zudem im CD-Spektrum betrachtet (s. Kap. 3.10.5, Abb. 3.77). Verlängerte Exposition an Luft (ÜN) von RoxA-Ansätzen mit Imidazol und Dithionit ergab wieder das Spektrum von RoxA mit Imidazol alleine, führte also zur Aufhebung der Dithionit-Reduktion, nicht aber des Imidazol-Effektes (Abb. 3.55). Letzterer ließ sich aber durch Zugabe anderer Oxidationsmittel weiter beeinflussen (s. u.). Aus diesen Versuchen existieren auch experimentelle Hinweise, dass bereits unter anaeroben oder reduzierenden Bedingungen beobachtete mögliche *high-spin*-Signale zwischen 600 und 700 nm in entsprechenden Ansätzen mit Dithionit und Imidazol unterblieben.

Zum Vergleich wurde auch das UV-Vis-Spektrum des eine Hämgruppe enthaltenden (Horse Heart) Cytochroms *c* (2 μM) mit Imidazol, Pyrazol und Pyrazin (je 10 mM) betrachtet. Es waren keine mit RoxA vergleichbaren spektralen Änderungen zu beobachten. Cytochrom *c* fungiert nur als Elektronenüberträger und besitzt keine freie Hämbindestelle (His-Fe-Met) in nativen Zustand. Mit Hämoglobin [Häm *b*] allerdings ergab sich mit Imidazol eine spektrale Verschiebung der Soret-Bande bei 408 nach 412 nm im absoluten Spektrum bzw. eine Abnahme bei 405 nm und Zunahme bei 418 nm im Differenzspektrum, ähnlich wie mit RoxA. Die Q-Banden bei 540 und 575 nm blieben jedoch nahezu unverändert (ohne Abb.).

Die Hämgruppen von Hämoglobin binden O_2 , sind aber auch für externe Liganden zugänglich. Die festgestellten spektralen Unterschiede zum Ausgangsspektrum sind vermutlich wie auch im Falle von RoxA durch Bindung der Liganden zu erklären.

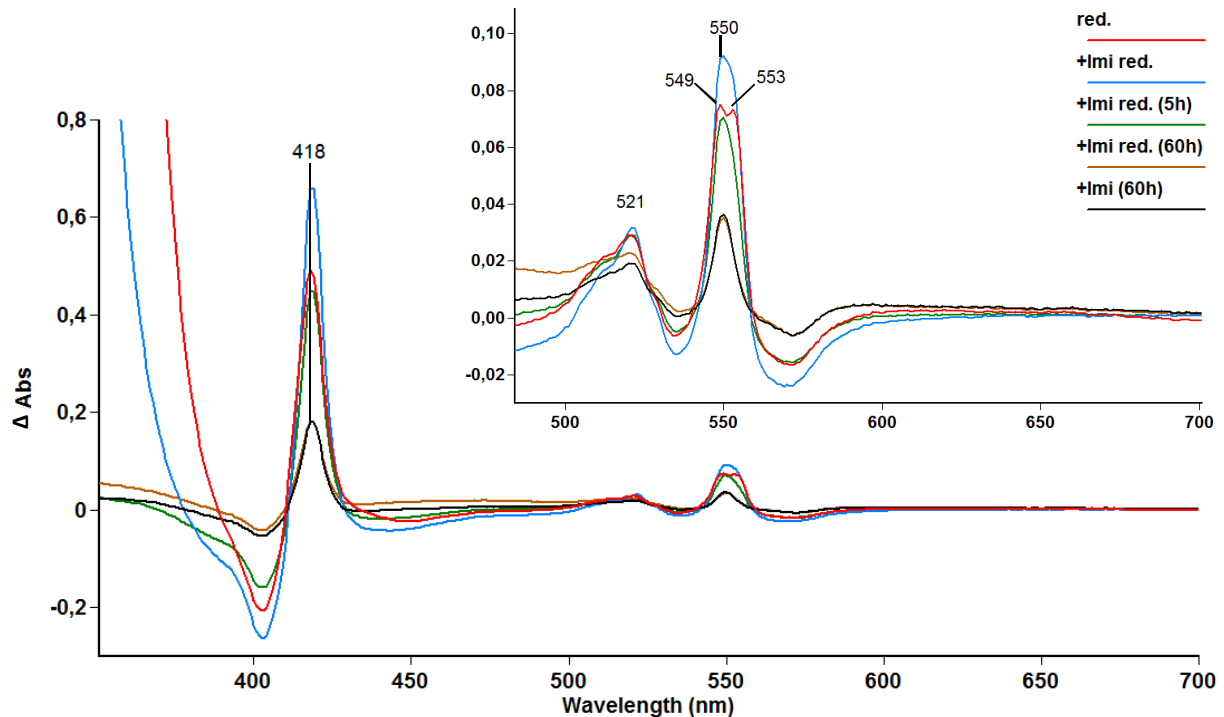


Abb. 3.55: Differenzspektren [– RoxA "as isolated"] von RoxA mit Imidazol (1 mM) und Dithionit (Überschuss) unter aeroben Bedingungen. Rechts oben ist der Bereich der Q-Banden vergrößert dargestellt. Nach Reaktion mit Imidazol reduziertes RoxA zeigt eine Zunahme der Absorption von reduziertem RoxA "as isolated" bei 418 nm und 550 nm auf. Das Spektrum von reduziertem RoxA mit Imidazol ist demnach bei den für RoxA mit Imidazol typischen Signalen intensitätsstärker als reduziertes RoxA alleine. Gezeigt sind zwei Zustände der Reoxidation an Luft (5 h, 60 h). Nach vollständiger Reoxidation entspricht das Spektrum wieder demjenigen von RoxA mit Imidazol alleine.

Um die Ursache des "Imidazol-Effekts" besser zu verstehen, wurde versucht, die Wirkung von Imidazol-Analoga durch die oxidierende Wirkung von Oxidationsmitteln wie Ferricyanid und Wasserstoffperoxid umzukehren. Mit H_2O_2 im Überschuss führte dies zu einer Abnahme der Häm-Absorption insgesamt, wie es bereits bei RoxA "as isolated" mit H_2O_2 festgestellt wurde. Die von Imidazol verursachte Verschiebung im Spektrum konnte dabei durch H_2O_2 -Zugabe annähernd beseitigt werden. Das nunmehr vorliegende Spektrum entsprach etwa demjenigen nach Inkubation mit H_2O_2 alleine (Abb. 3.56). Dies könnte auf eine Verdrängung der Imidazol-Liganden von einer Fe-Bindestelle und auf eine direkte Wirkung des Oxidationsmittels am Hämzentrum hindeuten.

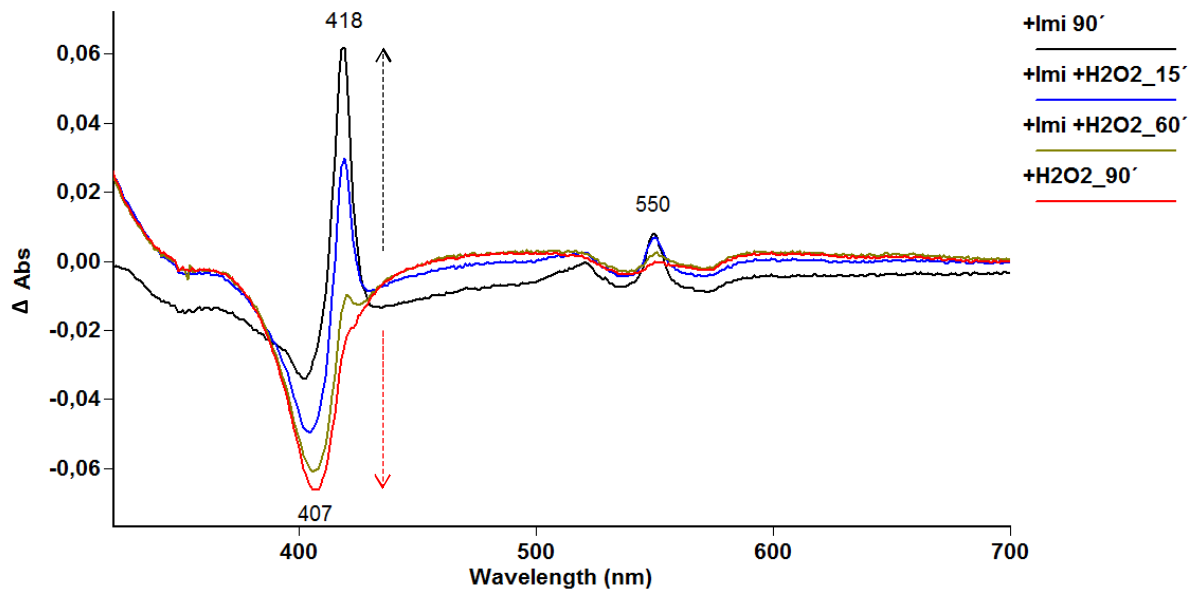


Abb. 3.56: Differenzspektra [– RoxA "as isolated"] von RoxA (1 μM) + Imidazol (5 mM) und nach Addition von H_2O_2 (10 mM) in 100 mM KPP (pH 7). Die Signaländerungen mit Imidazol gehen nach H_2O_2 -Zugabe vollständig zurück. Zusätzlich tritt wie mit H_2O_2 alleine eine generelle Häm-Absorptionsabnahme ein, erkennbar an den für oxidiertes RoxA "as isolated" charakteristischen Absorptionsminima im Differenzspektrum.

Die Zugabe von Ferricyanid in äquimolaren Mengen zu RoxA hatte keinen nennenswerten Effekt auf das durch Imidazol-Analoga veränderte RoxA-Spektrum. Hingegen konnte ein moderater Überschuss ($> 5x$) zu RoxA, jedoch deutlicher Unterschuss zur vorliegenden Liganden-Konzentration, allmählich innerhalb eines Zeitraums von Stunden diese Veränderungen zu großem Teil beheben, das Ausgangsspektrum aber nicht vollständig wieder herstellen (Abb. 3.57). Ein größerer Überschuss (1 mM) zu RoxA (2–3 μM) konnte die nach Bindung von externen Häm-Liganden (5 mM) auftretenden teilreduktiven Veränderungen schneller und vollständig umkehren (s. Abb. 3.58).

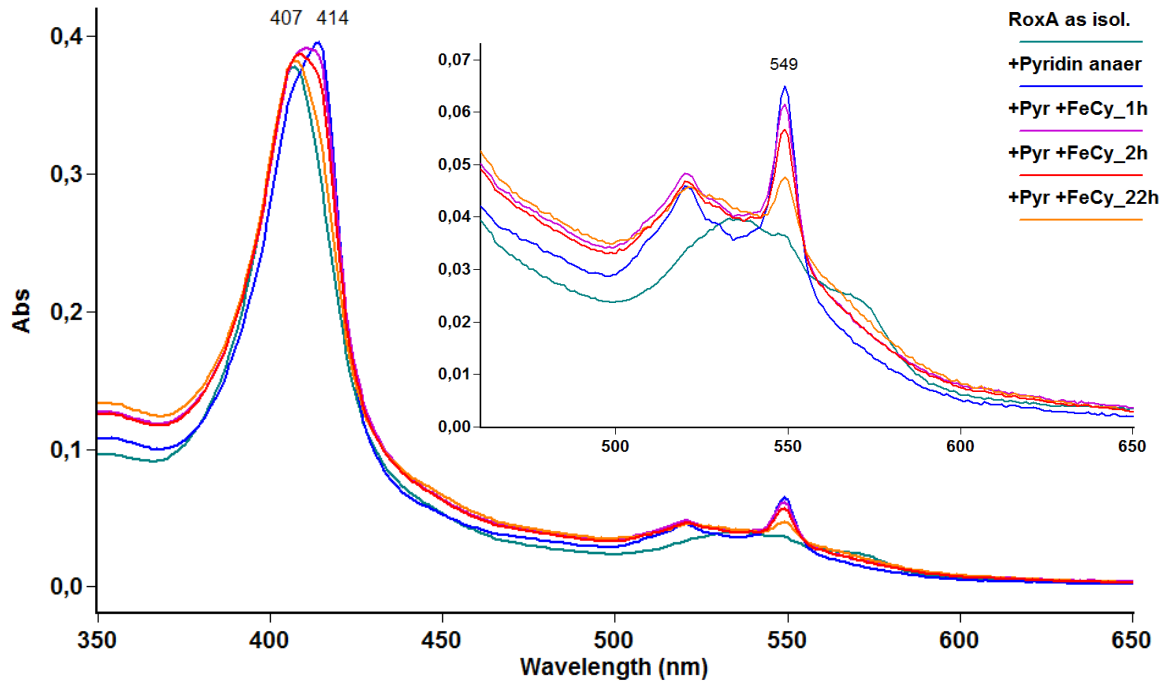


Abb. 3.57: UV-Vis-Spektrum von RoxA (2 µM) mit Pyridin (Pyr) (1 mM) nach Zugabe des Oxidationsmittels Ferricyanid (FeCy) (15 µM, N₂) unter anaeroben Bedingungen (N₂) in 100 mM KPP (pH 7). Der Bereich der Q-Banden ist im Insert vergrößert. Es ist eine deutliche Abnahme der zuvor durch Pyridin verursachten spektralen Veränderungen zu sehen. Der moderate Überschuss an FeCy zu RoxA reichte nicht aus, um das Ausgangsspektrum nach ÜN-Inkubation vollständig wiederherzustellen.

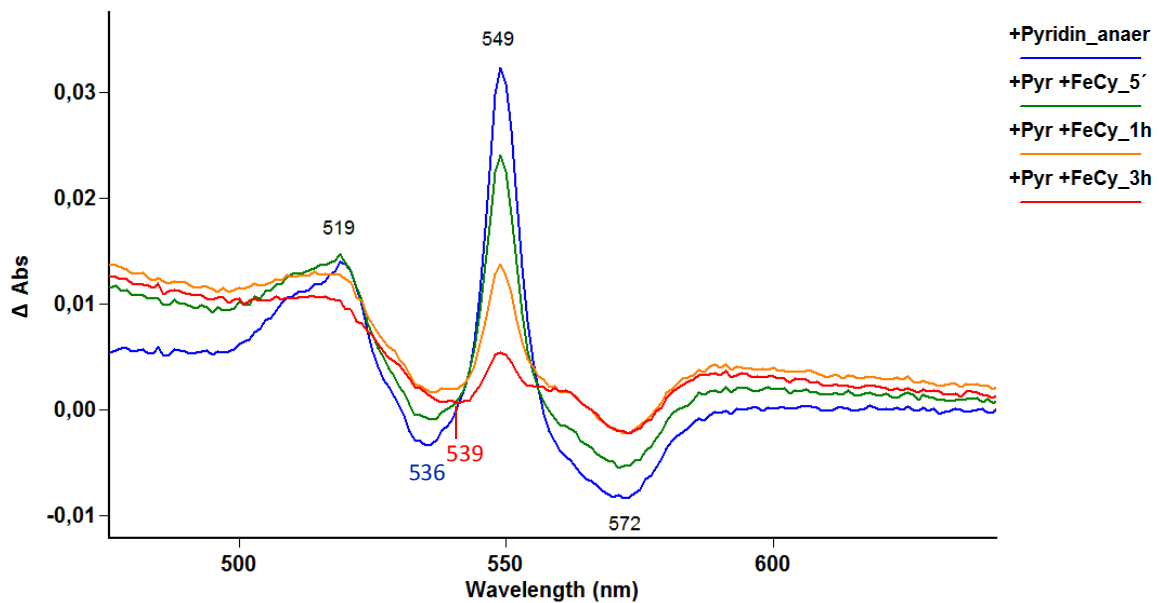


Abb. 3.58: Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] im Bereich der Q-Banden von RoxA mit Pyridin (Pyr) (5 mM) nach Reoxidation mit Ferricyanid (FeCy) (1 mM) im Überschuss zu RoxA (1 µM) unter Sauerstoffausschluss (N₂). Es ist eine langsame, aber deutliche Abnahme der durch Pyridin verursachten spektralen Veränderungen zu sehen.

Bei gleichzeitiger Zugabe von Ferricyanid (1 mM) und Pyridin traten die reduktiven Effekte ebenso ein und nahmen entsprechend vollständig wieder ab (≈ 2 h) (ohne Abb.). Das sich dabei ergebende Spektrum im Bereich der Q-Banden entsprach demjenigen, das nach Reduktion und anschließender Reoxidation mit Ferricyanid erhalten wurde (vgl. Abb. 3.34 b) oder aber nach längerer Inkubation alleine mit Ferricyanid, ebenso solchen Spektren mit H_2O_2 (vgl. Abb. 3.34 a) oder nach anaerober Inkubation mit Pyrogallol (vgl. Abb. 3.39). Die Zugabe von Pyrogallol (1 mM, anaerob, 2 h bei RT) nach Reaktion von RoxA mit einem Hämliganden hatte hingegen keinen Effekt auf die entstandenen Banden.

Diese Beobachtungen erscheinen umso interessanter, da sämtliche von Imidazol-Analoga verursachten spektralen Veränderungen gleichermaßen unter anaeroben wie aeroben Bedingungen, also auch bei Anwesenheit des Oxidationsmittels O_2 eintraten, dieser also im Gegensatz zu anderen starken Oxidationsmitteln diese Veränderungen nicht aufhielt bzw. zu mindern vermochte. Dies steht im Einklang mit der fehlenden Wirkung von Pyrogallol auf diese Veränderungen nach deren Ausprägung. Die Effekte müssen im Zusammenhang mit den Änderungen des UV-Vis-Spektrums durch andere Oxidationsmittel wie H_2O_2 bedacht werden. Ob ein Lösen der Ligandenbindung am Häm-Fe die Ursache oder andere Vorgänge dafür verantwortlich waren, ließ sich anhand der UV-Vis-Spektren nicht entscheiden. In dieser Frage konnten aber entsprechende EPR-Experimente weiter helfen (Kap. 3.11.5; s. dazu Kap. 4.9.4.2). Kontrollansätze in KPP bei pH 7 und pH 8 mit Imidazol (5 mM) bzw. Pyridin (5 mM) und Ferricyanid (1 mM), aber ohne RoxA, zeigten im entsprechenden Versuchszeitraum (2 h) keine signifikante Abnahme der FeCy-Absorption bei 420 nm und somit keine zur Reduktion führende Reaktion mit dem Hämliganden in Lösung. Übereinstimmend resultierte die anschließende Zugabe von RoxA zu diesen Ansätzen wiederum in der Entstehung der Liganden-typischen Veränderungen, die sich entsprechend den oben genannten Beobachtungen durch die Anwesenheit des FeCy allmählich wieder umkehrten.

Bisher nicht hinreichend untersucht, aber von Bedeutung für die Ergründung der Ursache der teilreduktiven Veränderungen durch Hämliganden, ist deren Wirkung auf das Spektrum von RoxA nach "Abrundung" der Q-Banden, d. h. nach Eintreten der Effekte von Oxidationsmitteln oder der anaeroben Inkubation mit Pyrogallol (s. Kap. 3.9.2.; 3.9.3), und nach Entfernung dieser Substanzen durch Gelfiltration. Einen ersten Hinweis gab ein Versuchsansatz mit RoxA "as isolated" nach ÜN-Inkubation mit Ferricyanid (1 mM), bei welchem ein Absorptionsverlust bei 539 und 572 nm zu erkennen war. Die Zugabe von Pyridin (5 mM) rief nunmehr eine weniger intensive spektrale Veränderung hervor als gewöhnlich, während demgegenüber die gleichzeitige Addition von FeCy und Pyridin zu RoxA "as isolated" die Entstehung der typischen reduktiven Effekte nicht verhinderte (s. o.). Dies weist bereits darauf hin, dass der einer partiellen Reduktion gleichende Effekt nach Ligandenbindung auf eine negative Ladung am RoxA-Molekül zurückgehen könnte (s. Kap. 4.9.4.2).

3.9.6.5 Lineare N-Verbindungen

Lineare Stickstoff-Verbindungen wie Hydrazin, Phenylhydrazin und Hydroxylamin, die auch als Katalase-/Peroxidase-Inhibitoren bekannt sind (Wariishi *et al.*, 2000), führten zur Inaktivierung der Latexspaltung durch RoxA. Deren Effekte auf das optische Spektrum waren hingegen nur gering. Mit Hydrazin kam es rasch zu ähnlichen Veränderungen wie mit Imidazol-Analoga, doch von nur geringer Intensität im Bereich der Soret-Bande und der Q-Banden. Es trat mit zunehmender Inkubationszeit eine generelle Häm-Absorptionsabnahme ein, die auf eine einsetzende Zerstörung des Enzyms bzw. eines der Eisen-Zentren hindeuten könnte (Abb. 3.59). Darauf wiesen auch EPR-Spektren hin, indem eine Zunahme des Signals für unspezifisch gebundenes Nicht-Häm-Fe bei $g=4,3$ zu sehen war. Dies zeigt sich an einem Minimum bei 406 nm (blau) gegenüber einem zunächst festgestellten Minimum bei 402 nm (rot), wie es auch bei reduziertem RoxA auftritt.

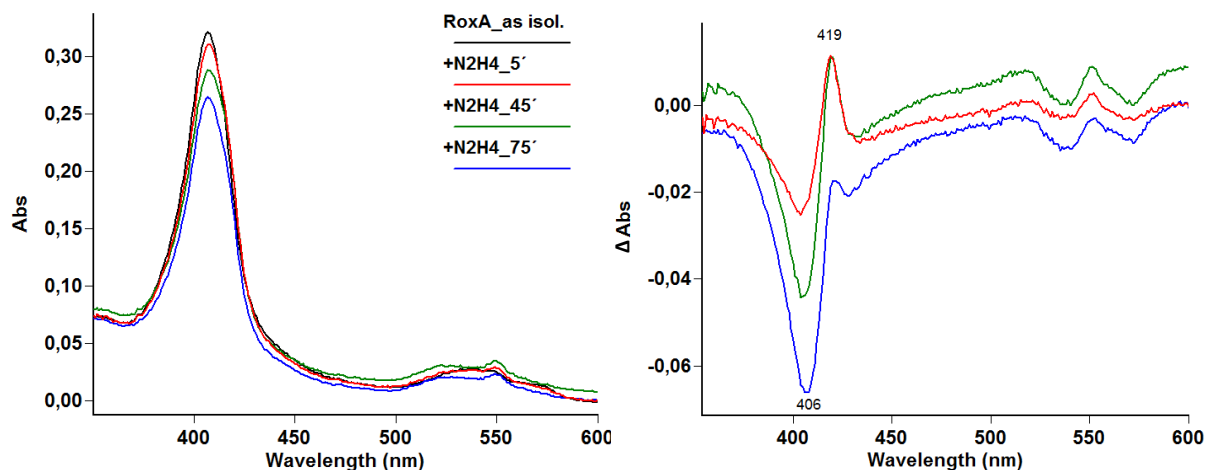


Abb. 3.59: (rechts) UV-Vis-Spektrum, (links) Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] von RoxA mit Hydrazin (1 mM) ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$). Zunächst tritt eine leichte Zunahme der Soret-Bande bei 416 nm bzw. einer α -Bande bei 549 nm ein (rot), gefolgt von einer generellen Abnahme der Hämabsorption bei fortdauernder Inkubationszeit (blau).

Insgesamt deuten die spektroskopischen Veränderungen darauf hin, dass sie durch eine Bindung der Imidazol-Analoga an einer freien Bindestelle des Häm-Eisens zustande kommen und somit unter den Versuchsbedingungen eines der Hämzentren, nicht aber das zweite für externe Hämliganden zugänglich ist.

3.9.6.6 Anionische Liganden

Desweiteren wurden Versuche zur Bindung anionischer Liganden (Fluorid, Azid, Cyanid) durchgeführt wie sie für einige Peroxidasen gezeigt sind (Rönnerberg & Ellfolk, 1979 a; Ellfolk *et al.*, 1983). Auch hier waren mit RoxA unter aeroben Bedingungen nur geringe Unterschiede zu RoxA "as isolated" festzustellen.

Mit Na^+ -Fluorid (F^-) traten auch mit Konzentrationen über 10 mM keine spektralen Veränderungen ein, mit Na^+ -Azid (N_3^-) wurde allenfalls eine minimale Veränderung im Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] registriert. Das Verhalten von K^+ -Cyanid (CN^-) auf die Aktivität von RoxA war bereits von R. Braaz (2005 b) untersucht worden. Im Spektrum traten nur sehr langsam Veränderungen ein. Sie ähnelten denen anderer aromatischer Hämiliganden (s. o.) und deuteten auf eine Bindung an einem Häm-Fe hin (Abb. 3.60).

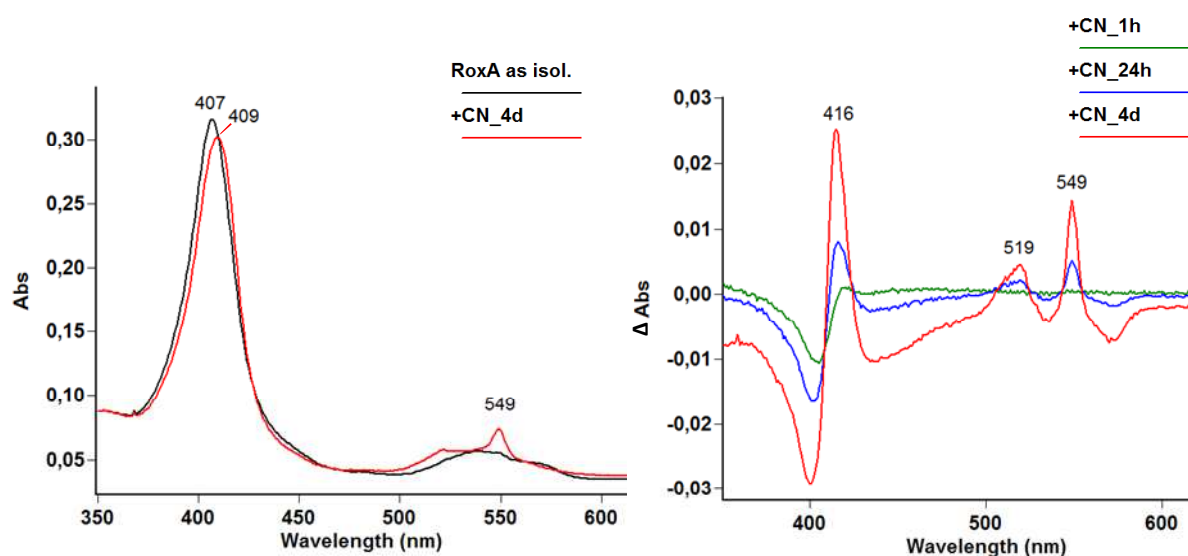


Abb. 3.60: (rechts) UV-Vis-Spektrum, (links) Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] von RoxA ($\approx 1,5 \mu\text{M}$) mit 10 mM K^+ -Cyanid (CN) (aus 1 M Stammlösung) in 100 mM KPP (pH 7). Es sind langsam eintretende spektrale Veränderungen zum Ausgangsspektrum zu sehen, die nur ein Hämzentrum betreffen, was die Zunahme nur einer α -Bande bei 549 nm zeigt (rechts). Dies weist auf eine Häm-Bindung hin.

3.10 Untersuchung von RoxA mit CD-Spektroskopie

Die räumliche Struktur von RoxA konnte nach Röntgenstrukturanalyse bereits bis zu einer Auflösung von 1,8 Å gelöst werden (Hoffmann, 2007). Daher war es nicht von Interesse, eine aufwändige exakte Dekonvolution aller CD-Datensätze vorzunehmen, um die relativen Anteile an Sekundärstruktur-Elementen zu ermitteln. Vielmehr sollte das Eintreten möglicher struktureller Umlagerungen zwischen unverändertem RoxA und mit verschiedenen Liganden (Imidazol, Pyridin), Substratanaloga (β -Carotin), sowie unter reduzierenden Bedingungen untersucht werden. Eine Aussage anhand eines CD-Spektrums über die Natur solcher struktureller Veränderungen ist generell aber sehr schwierig. Da bisher keine mit CD-Spektroskopie ermittelten Daten zu RoxA vorlagen, wurden die unter verschiedenen Bedingungen gemessenen CD-Spektren genau dokumentiert und auf durch UV-Vis-Spektroskopie beobachtete Veränderungen bezogen. Die bisher erhobenen Daten sind nicht ausreichend, eine umfassende oder gar abschließende Betrachtung von RoxA mit der CD-Technik vorzunehmen. Sie können aber zur unterstützenden Interpretation von Ergebnissen dienen; die mit anderen spektroskopischen Techniken erhalten wurden, und stellen eine wichtige Grundlage für künftige vergleichende Untersuchungen mit RoxA-Mutanten dar.

3.10.1 Das CD-Spektrum von RoxA "as isolated"

Das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich setzt sich aus dem Einzelbeitrag der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zusammen und ist sehr spezifisch für ein Protein. Es kann als eine Art Proteinsignatur verstanden werden. Unterschiede beispielsweise zwischen dem natürlich exprimierten bzw. überexprimierten Protein können auf Fehler bei der Proteinprozessierung und auf eine fehlerhafte Faltung des rekombinant exprimierten Proteins hindeuten. Das durch Rhamnose-Induktion homolog überexprimierte, rekombinante RoxA wurde daher mit dem vom natürlichen Promotor substratinduzierten RoxA aus *Xanthomonas* sp. mittels CD-Spektroskopie verglichen. Weitere wichtige Informationen zum Vergleich zwischen Wildtyp- und rekombinantem RoxA sollte die Aufzeichnung von CD-Schmelzkurven liefern. Eine allgemeine Darstellung des Ursprungs beobachteter Signale in Bezug zu einigen strukturellen Merkmalen in RoxA liefert die Diskussion.

3.10.1.1 Der Fern-UV-Bereich

Durch Analyse der räumlichen Struktur von RoxA wurde ein Gehalt an α -Helices von ca. 34 % und β -Faltblatt-Strukturen von nur etwa 1 % bestimmt, die restlichen 65 % umfassen weniger geordnete Strukturen wie Loops (s. Abb. 3.61). Dies spiegelt sich auch im CD-Spektrum von RoxA im fernen UV-Bereich wider. Dennoch weist der Verlauf des Spektrums

einige Auffälligkeiten auf, die als ungewöhnlich bezeichnet werden müssen und in Kap. 4.3.1 diskutiert werden.

Das CD-Spektrum von RoxA besitzt ein Minimum bei etwa 206–207 nm (Abb. 3.62), das im Wesentlichen auf den Beitrag der α -Helices zurückzuführen ist. Ein Maximum ergab sich bei 190–191 nm und zeigt, dass α -Helix- und β -Faltblattstrukturen gegenüber ungeordneten Strukturen in RoxA überwiegen. Ein weiteres schwächeres Maximum wurde um 232 nm erhalten, das präparationsabhängig leicht variierte (232–233 nm). Dieses geht auf den Einfluss von nicht als α -Helix oder β -Faltblatt organisierten Strukturen ("random coil") zurück, deren CD-Signal als einziges in diesem Bereich leicht positiv ist (s. Abb. 2.7, Kap. 2.12.2). Sämtliche, von vier verschiedenen Präparationen an rekombinantem RoxA aufgenommenen Spektren zeigten den gleichen Verlauf und unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Abb. 3.62 gibt das gemittelte CD-Spektrum von RoxA aus vier verschiedenen Präparationen gleicher Proteinkonzentration wieder (vgl. Abb. 3.63).

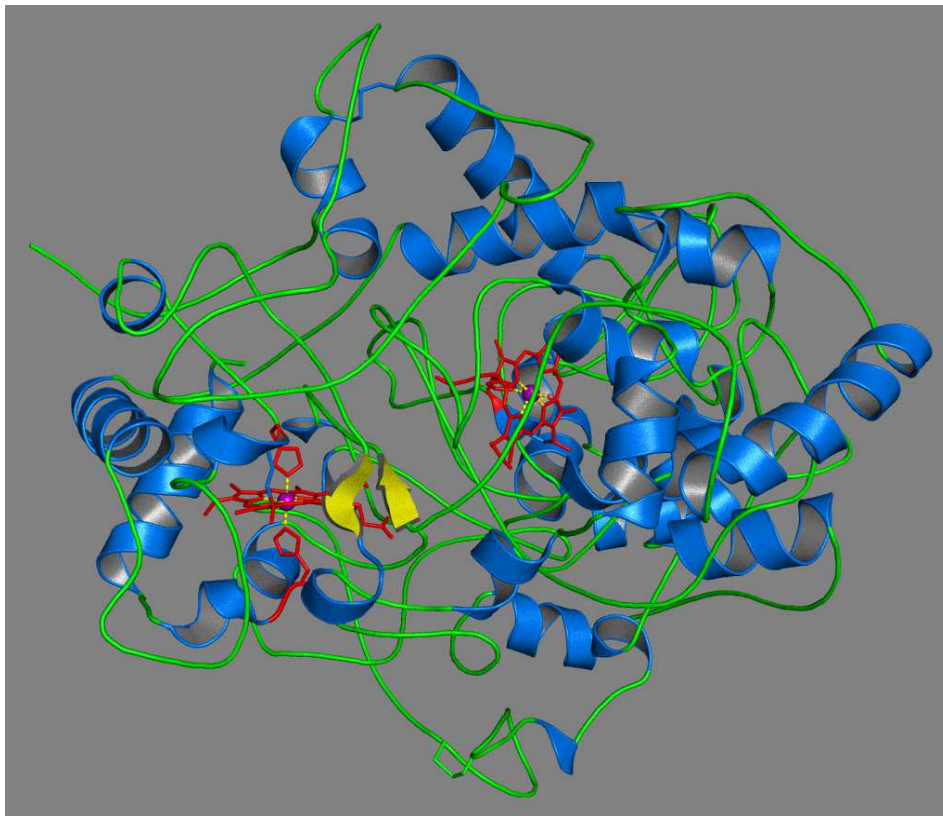


Abb. 3.61: Schematische Darstellung der räumlichen Struktur von RoxA. Die Sekundärstrukturelemente sind farbig unterschieden in α -Helix (blau), β -Faltblatt (gelb) und "random coil" (grün); die fast senkrecht zueinander stehenden Hämgruppen und axialen Liganden sind rot dargestellt. (erstellt mit PyMol Version 1.1r1)

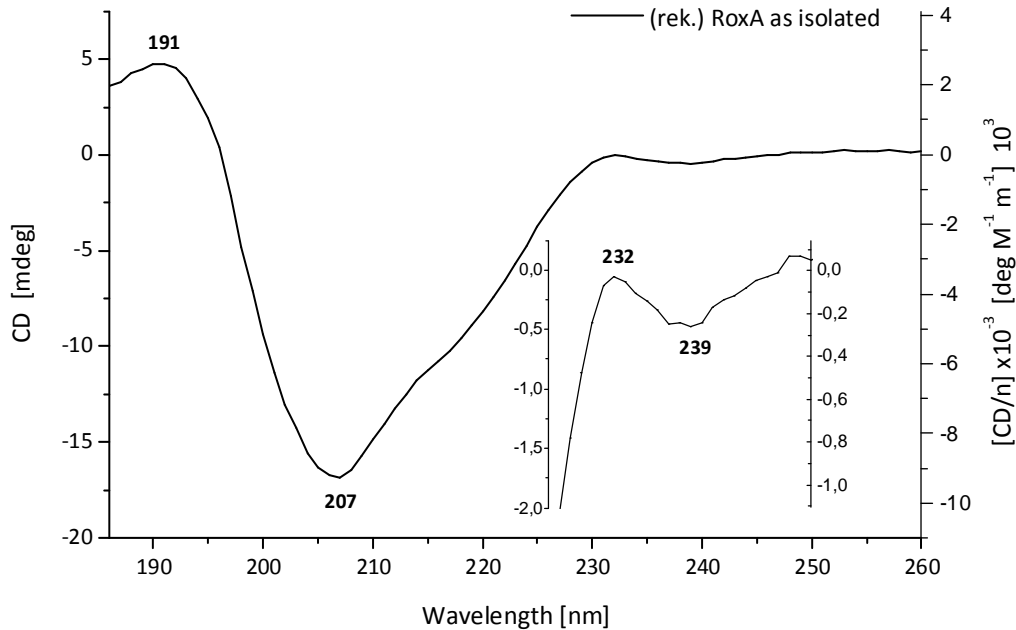


Abb. 3.62: CD-Spektrum von rekombinantem RoxA "as isolated" im fernen UV-Bereich (185–260 nm). Dargestellt ist das an die gleiche Proteinkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ angepasste, gemittelte CD-Signal von vier verschiedenen RoxA-Präparationen. Das CD-Spektrum ist als Elliptizität θ [mdeg] (Y-Achse links) und als durchschnittliche molare Elliptizität $[\theta/n]$ pro Aminosäure $[\theta/n]$ (Y-Achse rechts) dargestellt. Das eingefügte Fenster zeigt einen der X-Achse entsprechenden Ausschnitt des Spektrums bezüglich den Y-Achsen vergrößert. Das Spektrum von RoxA besitzt ein Minimum um 207 nm, ein Maximum bei 190–191 nm, ein weiteres schwächeres Maximum bei 232 nm und Minimum um 239 nm.

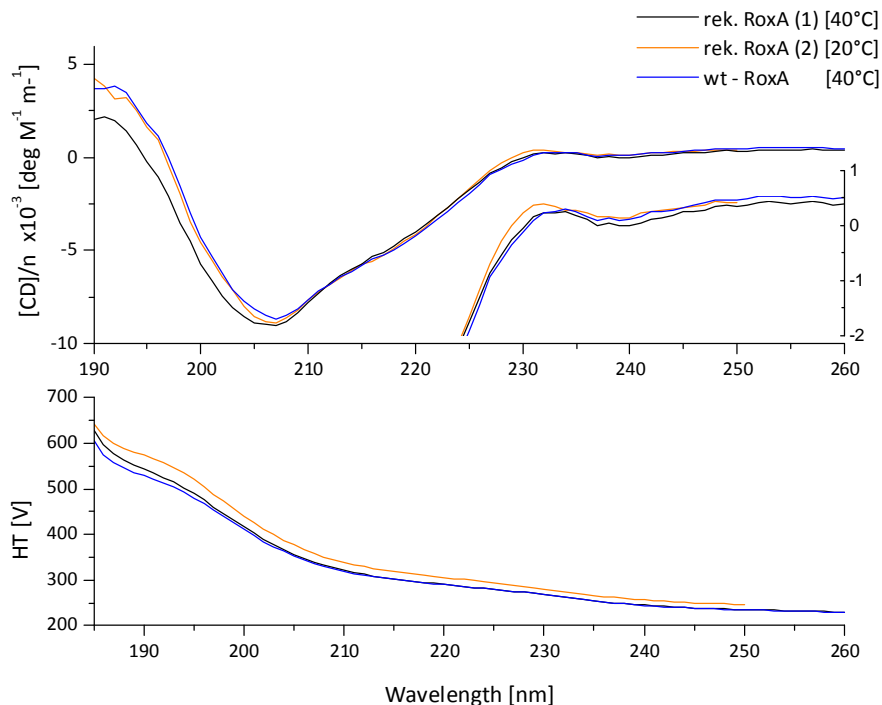


Abb. 3.63: Vergleich von CD-Spektren im fernen UV-Bereich von RoxA "as isolated" aus Latexkultur (Minimalmedium) und zwei Präparationen von rekombinantem RoxA aus LB/NB-Kultur bei 20°C und 40°C. Das CD-Signal ($CD = \theta$) ist in der Abb. oben, die zugehörige Spannung (HT) unten dargestellt. Das eingefügte Fenster (oben) zeigt den der X-Achse entsprechenden Ausschnitt des Spektrums vergrößert. Das Spektrum von Wt-RoxA entspricht im Wesentlichen dem von rek. RoxA. Geringe Unterschiede sind im Bereich des Minimums zu sehen.

Die Aufnahme von CD-Schmelzkurven bei einer Temperaturerhöhung von 1°C pro Minute belegte die Temperaturstabilität des Enzyms bis nahezu 50°C, wobei beginnend ab etwa 47°C ein leichter Anstieg des CD-Signals zu erkennen war. Es zeichnete sich ein scharfer, geordneter Übergang der Entfaltung ab, der fast vollständig zwischen 52°C und 57°C stattfand (Abb. 3.64). Für rekombinantes RoxA wurde aus drei verschiedenen Enzympräparationen ein Schmelzpunkt von $54,3^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (54,0 – 54,65°C) ermittelt. Eine Rückfaltung des Enzyms wie sie bei manchen Proteinen beobachtet werden kann, wurde in keinem Versuch beobachtet. Die irreversible Denaturierung des Proteins war bereits an der sichtbaren Eintrübung bzw. Verklumpung der Lösung zu erkennen. Eine Renaturierung von RoxA ist folglich nach einer Erhitzung auf 70°C in KP-Puffer nicht mehr möglich.

Das CD-Spektrum von Wt-RoxA "as isolated" aus Latexkultur zeigte den gleichen Verlauf wie die von überexprimiertem RoxA ermittelten Spektren, was das Vorliegen des gleichen Proteins bestätigte. Geringe Unterschiede waren im Bereich des Minimums um 207 nm und des schwachen Maximums bei 233 nm zu erkennen. Der Vergleich zu Einzel-Spektren von rekombinantem RoxA (Abb. 3.63) deutet aber nicht auf einen signifikanten Unterschied zwischen Wt-RoxA und dem überexprimierten Enzym hin. Die CD-Schmelzkurve zeigte den mit rekombinantem RoxA übereinstimmenden gleichen scharfen Übergang innerhalb eines Bereichs von ca. 5°C. Der Schmelzpunkt für frisch präpariertes Wt-RoxA wurde auf 53,8°C bestimmt und liegt damit um 0,5°C unterhalb des bei rekombinantem Enzym erhaltenen Wertes (Abb. 3.65).

Aufgrund der Schwierigkeiten, die zuletzt bei der Präparation von Wildtyp-RoxA aus Latexkultur, bedingt durch veränderte Eigenschaften der verfügbaren Latex-Suspensionen (s. Kap. 3.2.2) aufgetreten waren, konnte dieser Vergleich nur mit einer Präparation vorgenommen werden. Eine Aussage über mögliche Signifikanz der Abweichung ist daher anhand dieses Befundes kaum möglich. Hinzu kommt ein nicht zu vermeidender Altersunterschied zwischen den Präparationen von Wildtyp- und rekombinantem RoxA bei Abschluss der Reinigung, der bei der vergleichenden Betrachtung bedacht werden sollte. Denn bei gealterten RoxA-Proben konnten im CD-Spektrum Unterschiede zum Ausgangsspektrum festgestellt werden (s. Kap. 3.10.1.2). Angesichts dieser Tatsache und den geringfügigen Schwankungen zwischen verschiedenen Präparationen von rekombinantem RoxA hinsichtlich des Schmelzpunktes, sowie des CD-Spektrums erschienen die leichten Differenzen zum Wt-RoxA innerhalb des Toleranzbereichs zu liegen. Insbesondere sprachen aber die gleiche spezifische Aktivität von Wt-RoxA und rekombinantem Enzym, sowie das gleiche optische Spektrum und Verhalten gegenüber Liganden bzw. Inhibitoren (s. Kap. 3.9) für die korrekte Faltung des überexprimierten RoxA.

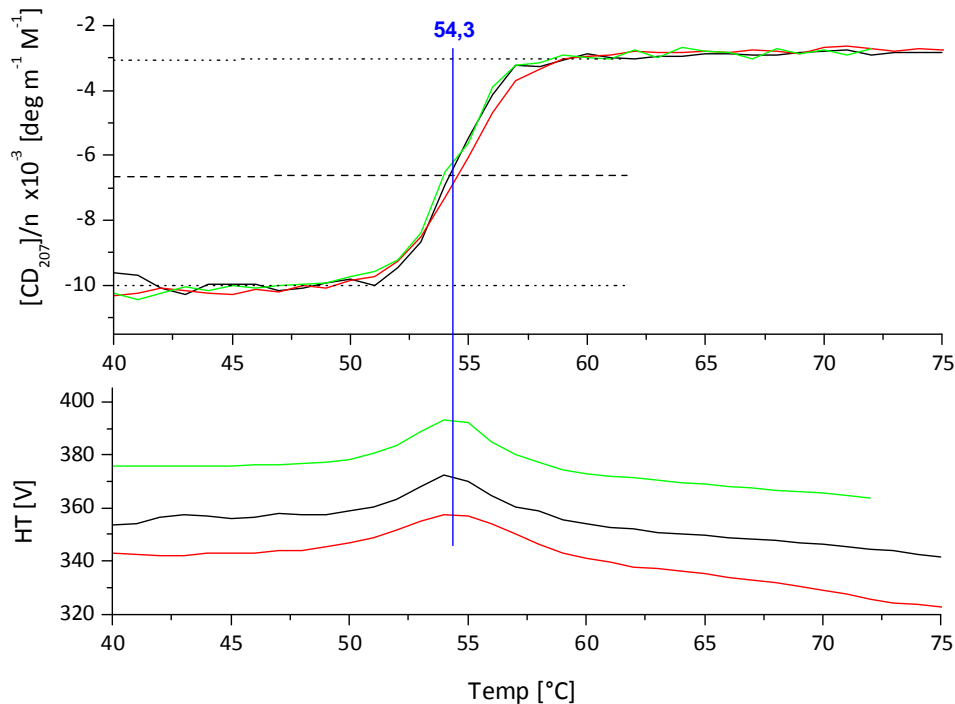


Abb. 3.64: CD-Schmelzkurven von rekombinantem RoxA "as isolated" aus drei verschiedenen Enzympräparationen, normiert auf die Proteinkonzentration (200 µg/ml). Gemessen wurde am Minimum der CD-Absorption bei 207 nm. Das CD-Signal (θ) ist in der Abb. oben, die zugehörige Spannung (HT) unten dargestellt. Der Mittelpunkt des Übergangs entspricht etwa dem Maximum von HT. Es kann eine mittlere Schmelztemperatur für rek. RoxA von etwa 54,3°C abgelesen werden.

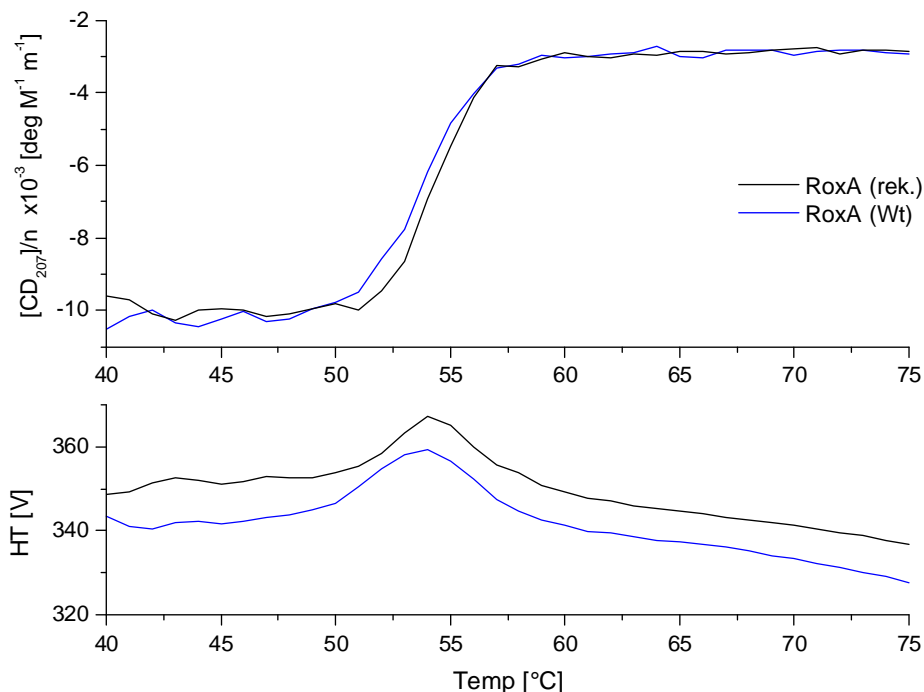


Abb. 3.65: Vergleich der CD-Schmelzkurven von RoxA "as isolated" aus Latexkultur (Minimalmedium) und rekombinantem RoxA aus LB/NB-Kultur in jeweils hoher Reinheit ($\epsilon_{406}/\epsilon_{280} > 1,3$), angeglichen an die Proteinkonzentration (200 µg/ml). Gemessen wurde am Minimum der CD-Absorption bei 207 nm. Das CD-Signal (θ) ist in der Abb. oben, die zugehörige Spannung (HT) unten dargestellt. Der Schmelzpunkt von RoxA aus Latexkultur liegt hier mit 53,8°C leicht unterhalb des für rek. RoxA ermittelten Wertes von 54,3°C.

3.10.1.2 Der Nah-UV- und Vis-Bereich

Wie bereits im Methodenteil erwähnt birgt das CD-Spektrum im nahen UV-Bereich zwischen 250 und 300 nm Informationen zur Tertiärstruktur eines Proteins. In diesem Bereich lassen sich solche Änderungen am ehesten erkennen, ohne jedoch direkt auf die Ursache bzw. den Ort innerhalb des Proteins schließen zu können. Es finden sich im Nah-UV-Bereich in erster Linie Signale der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, ebenso von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen (s. Kap. 2.12.2). Deren CD-Signal wird maßgeblich von der Aminosäureumgebung beeinflusst. Zudem gibt es eine Überlagerung von den Hämzentren entstammenden Signalen (Willick *et al.*, 1969). Für Hämproteine ist auch der Vis-Bereich oberhalb von 300 nm von Interesse, da dort Interaktionen von Metallzentren und koordinierenden bzw. umgebenden Aminosäuren zum Tragen kommen (s. Kap. 4.3.3). Da RoxA zwei Hämgruppen besitzt, wurde dieser Bereich im CD-Spektrum bei reduzierten Zuständen des Enzyms und bei Anwesenheit von Häm-Liganden (s. u.) betrachtet. Das CD-Spektrum von rekombinantem RoxA "as isolated" zwischen 250 und 700 nm ist in Abb. 3.66 dargestellt.

Das Nah-UV-CD-Spektrum eines Proteins dominieren Elektronenübergänge zwischen bindenden und antibindenden Orbitalen aromatischer Aminosäuren (s. Kap. 2.12.2). Doch können Banden weiterer Chromophoren diesen Bereich überlagern. RoxA besitzt mit 11,4 % einen relativ hohen Anteil an Aromaten (Phe 3,7 %, Tyr 4,6 %, Trp 3,1 %), wobei besonders der Anteil von Tryptophan ungewöhnlich hoch ist. Im RoxA-Spektrum zeigt sich dies in einem Signalminimum bei knapp 295 nm und einem Maximum bei 290 nm. Es existieren zahlreiche weitere, z. T. schlecht auflösende Signale (s. Abb. 3.66 oben, Insert) die zwischen 290 und 270 nm wahrscheinlich Tyrosinübergänge, zwischen 270 und 250 nm Phenylalaninübergänge anzeigen.

Da sich die im Photomultiplier (PM) moderner CD-Spektrophotometer gemessene Spannung (HT) proportional zur optischen Absorption verhält, kann diese nach Abzug der Grundspannung des verwendeten Puffers als Näherung für das relative UV-Vis-Spektrum angesehen werden (z. B. Miron *et al.*, 2005; Castiglioni *et al.*, 2010). Dies ist für den Vergleich der erhaltenen CD-Spektren mit den in Kap. 3.9 dokumentierten UV-Vis-Spektren sehr hilfreich, da von einer Probe zeitgleich die CD-Absorption und die relative optische Absorption gemessen werden konnten. Da für den Vergleich der im Folgenden präsentierten Daten lediglich das relative Verhältnis der Absorption verschiedener Spektren zueinander von Bedeutung ist, wurde auf eine exakte Umrechnung aus der Spannung (HT) in Absorptionseinheiten, wie gelegentlich von anderen Autoren vorgenommen (z. B. Zsila, 2011; Castiglioni *et al.*, 2010), verzichtet.

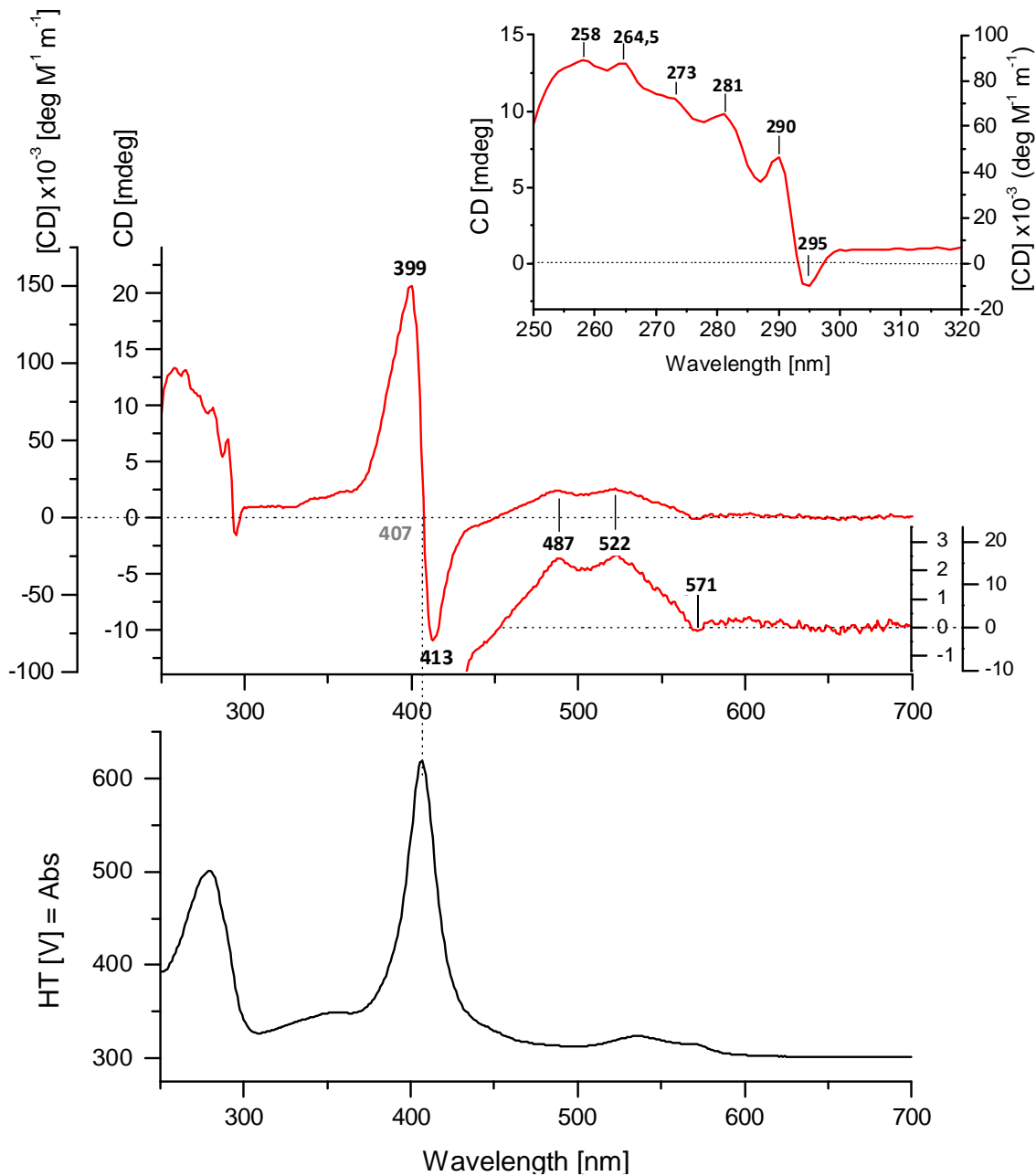


Abb. 3.66: (oben) CD-Spektrum von RoxA "as isolated" im Nah-UV (250–300 nm) und Vis-Bereich bis 700 nm. Das dargestellte Spektrum wurde aus drei verschiedenen RoxA-Präparationen [5,5 mg/ml] mit dem gleichen Spektrum gemittelt. Insetiert ist der vergrößerte Ausschnitt des Spektrums im Nah-UV-Bereich. (unten) Gemessene Spannung HT (*high tension voltage*) abzüglich der Grundspannung des Puffers (10 mM KPP + 300 mM NaCl). Diese entspricht der relativen Absorption der RoxA-Lösung (UV-Vis-Spektrum). Die hohe Reinheit der Probe ist am Verhältnis der Absorption bei 406 nm zu derjenigen bei 280 nm von ca. 1,35 zu erkennen. Signale der aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp finden sich im Nah-UV-Bereich (250–300 nm) mit einem deutlichen Trp-Signal bei 290 nm und weiteren schwächeren Signalen (Insert oben). Die Signale im Vis-Bereich (>300 nm) stammen von den Hämgruppen und deren Umgebung, mit Maximum/Minimum bei 400/413 nm und Maxima bei 487 und 522 nm. Es sind nicht alle Signale bezeichnet.

Die Hämgruppen und deren Umgebung dienen als Chromophore im Vis-Bereich. Entsprechend dem Soret-Maximum im optischen Absorptionsspektrum besitzt RoxA ein starkes CD-Signal mit einem Maximum positiver Elliptizität bei 399–400 nm und einem Minimum negativer Elliptizität bei 413 nm, wobei der Nulldurchgang mit dem Absorptionsmaximum des optischen Spektrums bei 406–407 nm zusammen fällt. Das CD-Soret-Signal in RoxA weist damit einen positiven und negativen Cotton-Effekt (s. Kap. 2.12.2) auf (s. Kap. 4.3.3). Zudem traten sehr schwache Signale bei 341 und 358 nm (Maxima) auf. Weitere, den Q-Banden im Absorptionsspektrum entsprechende Signale finden sich bei 487 und 522 nm (Maxima) (Abb. 3.66). Im Bereich zwischen 600 und 700 nm wurde kein CD-Signal erhalten. Ein solches ist aber bei bakteriellen Peroxidasen im CD-Spektrum zu beobachten (z. B. Rönneberg, 1979, vgl. Tab. 4.1, Kap. 4.3.3.2) und deutet auf einen *high-spin*-Zustand hin.

Die CD-Spektren einer nach Präzipitation wieder gelösten RoxA-Probe, sowie einer für 10 Tage bei Raumtemperatur gehaltenen Probe von rekombinantem RoxA wiesen nur minimale Unterschiede auf. Nach einer Präzipitation wurde für resolubilisiertes RoxA ein Schmelzpunkt von knapp 53,9°C ermittelt, der damit etwa 0,6°C über dem entsprechenden Wert von RoxA "as isolated" aus der gleichen Präparation lag. Angesichts geringer Abweichungen vom mittleren Schmelzpunkt von 53,3 ± 0,3°C bei (rek.) RoxA (Abb. 3.64), sowie der Fern-UV-CD-Spektren (Abb. 3.63) sind diese Unterschiede wenig signifikant und deuten auf eine relativ hohe Stabilität der Sekundärstruktur-Elemente von RoxA hin. Mehrfach präzipitiertes, resolubilisiertes RoxA und eine deutlich gealterte Enzympräparation (18 Monate, –20°C) unterschieden sich im Fern-UV-CD-Spektrum deutlicher von frisch isoliertem Enzym. Übereinstimmend zeigten diese Spektren eine Abnahme des CD-Signals zwischen 225 und 240 nm. Das bei frischem RoxA "as isolated" zu beobachtende schwache Maximum bei 232 nm fehlte folglich im Spektrum beider Proben. Dies könnte auf ähnliche, einen bestimmten Teil des Enzyms betreffende strukturelle Veränderungen durch die Prozesse der Präzipitation und Alterung hinweisen, die gleichermaßen mit einem schrittweisen Verlust der Aktivität einhergehen.

3.10.2 RoxA unter reduzierenden Bedingungen

Die hohe Absorption bereits geringer Konzentrationen von Na⁺-Dithionit im fernen UV-Bereich und der damit verbundene starke Anstieg der Spannung machen eine direkte Aufnahme des CD-Spektrums von reduziertem RoxA in diesem Bereich unmöglich. Da eine apparative Möglichkeit zu Messungen unter Sauerstoffausschluss nicht bestand, wären für eine direkte Reduktion von RoxA (200 µg/ml) unter aeroben Bedingungen zu große Dithionitmengen notwendig. Daher wurde ein CD-Spektrum nach Verdünnung aus einer konzentrierten, Dithionit-reduzierten RoxA-Lösung (5 mg/ml) auf 200 µg/ml aufgenommen. Zur Verdünnung wurde ein zuvor anaerobisierter (N₂) 10 mM KP-Puffer verwendet, die

Küvette mit einem Quarzdeckel verschlossen und die Messung unmittelbar durchgeführt. Die verminderte Dithionit-Menge ließ die Aufnahme eines Fern-UV-CD-Spektrums zu. Dieses kann aber nur als Näherung des Spektrums von reduziertem RoxA betrachtet werden. Das so ermittelte Spektrum unterschied sich nicht von RoxA "as isolated" (Abb. 3.67). Dies deckt sich auch mit der jüngst für reduziertes, rekombinantes RoxA ermittelten Kristallstruktur, wonach keine signifikanten Unterschiede zur bereits gelösten Struktur von RoxA aus Latexkultur (Hoffmann, 2007) festgestellt wurden (mündl. Mitteilung O. Einsle). Dieser Effekt war bereits bei gealtertem oder nach Präzipitation resolubilisiertem RoxA in noch deutlicherer Weise aufgefallen (s. o.). Darüber hinaus wurden keine eindeutigen Hinweise auf strukturelle Umlagerungen im Enzym nach Reduktion sichtbar, das CD-Spektrum zeigt jedoch prinzipiell nur Änderungen im Verhältnis der einzelnen Sekundärstrukturelemente an.

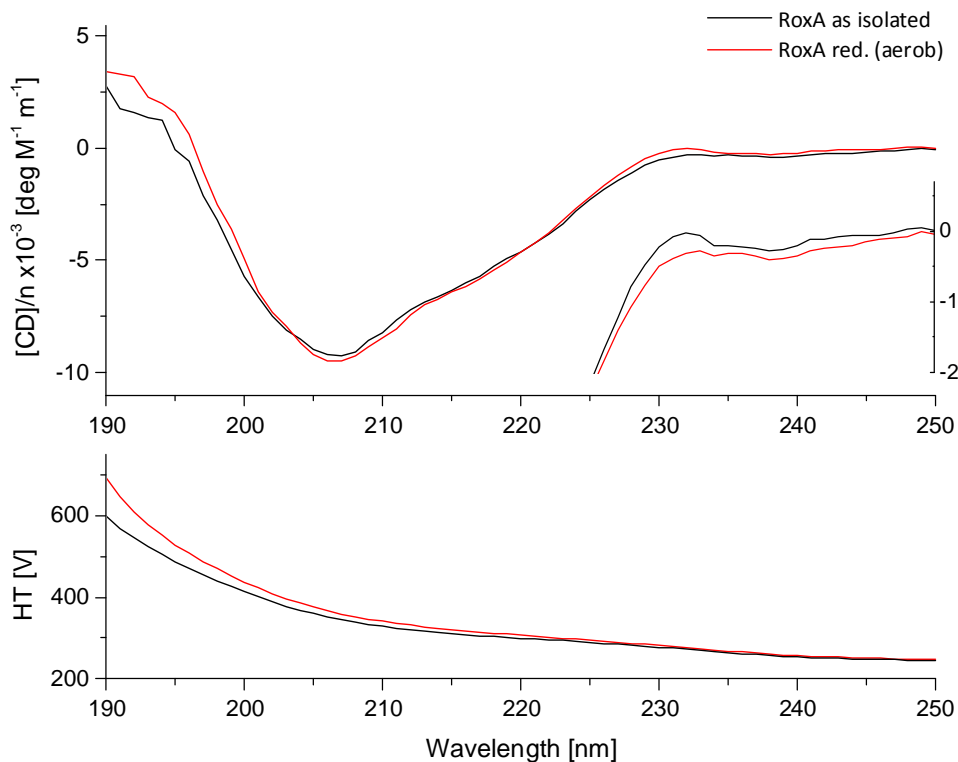


Abb. 3.67: Vergleich der CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von (rek.) RoxA "as isolated" und einem Ansatz aus gleicher Präparation nach Reduktion. Die Probe wurde durch Verdünnung aus einer konz. RoxA-Lösung [ca. 5 mg/ml], die mit einem Überschuss an mit Dithionit (10x) vollständig reduziert worden war, auf 200 $\mu\text{g/ml}$ mit N_2 -anaerobisiertem Puffer (10 mM KPP, pH 7) verdünnt und unmittelbar gemessen. Die Vollständigkeit der Reduktion war zuvor durch UV-Vis- und CD-Spektrum im Vis-Bereich bestätigt worden. Das CD-Signal θ ist in der Abb. oben, die zugehörige Spannung HT unten dargestellt. Das eingefügte Fenster (oben) zeigt einen der X-Achse entsprechenden Ausschnitt des Spektrums vergrößert. Beide Spektren entsprechen sich, mit gleichem Minimum bei 207 nm. Allenfalls war das schwache Maximum bei 232 nm leicht vermindert (Insert, oben).

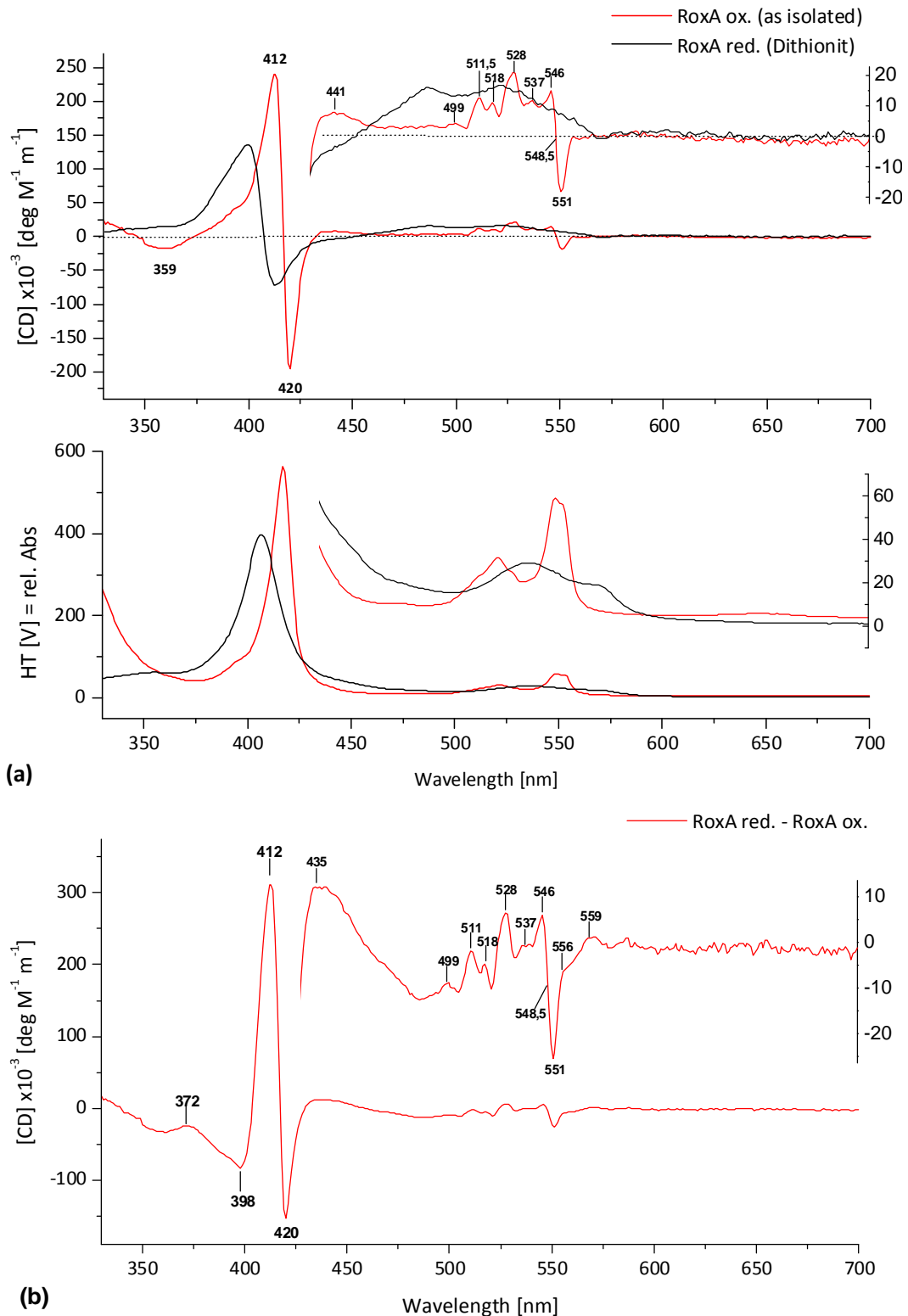


Abb. 3.68: (a) (oben) CD-Spektrum von reduziertem RoxA (Dithionit, ca. 10x) und oxidiertem RoxA ("as isolated", 5,5 mg/ml); (unten) gemessene Spannung abzüglich der Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl), die dem optischen Spektrum (UV-Vis) entspricht. (b) Differenz-CD-Spektrum von reduziertem RoxA [– RoxA "as isolated"]. Diese Darstellung zeigt die absoluten Veränderungen nach Reduktion gegenüber dem oxidierten Zustand von RoxA. Der Bereich zwischen 425 und 700 nm ist zusätzlich vergrößert dargestellt, relevante Signale (Minima, Maxima) sind eingetragen.

Aufgrund der hohen Absorption von Na^+ -Dithionit konnte ebenso im Nah-UV-Bereich, in welchem sich Änderungen der Tertiärstruktur abzeichnen könnten, kein CD-Spektrum aufgenommen werden. Abb. 3.68 zeigt das CD-Spektrum im Soret- und Vis-Bereich (>330 nm). Es zeichnet sich durch ein charakteristisches starkes Soret-Signal mit Maximum bei 412 nm und Minimum bei 420 nm aus. Das Spektrum im Bereich der Q-Banden spaltet sich in zahlreiche Signale zwischen 500 und 560 nm auf. Diese schwer zu trennenden CD-Signale werden im Folgenden anhand der ersichtlichen Maxima wie in Abb. 3.68 bezeichnet, ausgenommen eines gut aufgelösten Signals mit positiver und negativer Elliptizität und einem Nulldurchgang bei 549 nm. Die absoluten Veränderungen nach Reduktion sind im Differenzspektrum minus RoxA "as isolated" in Abb. 3.68 b dargestellt. Im CD-Spektrum wurde bei keiner der reduzierten oder reoxidierten RoxA-Proben ein Hinweis auf ein Signal zwischen 600 und 700 nm erhalten, jedoch waren aus UV-Vis-Spektren nur gelegentlich *high-spin*-typische Signale in diesem Bereich bei reduzierten Zuständen abzulesen. Denkbar ist aber, dass solche *high-spin*-Zustände erst nach längerer Inkubation nach einer Reduktion sichtbar werden könnten (s. Kap. 3.9.1). Da kein hoher Überschuss an Dithionit eingesetzt werden konnte und zudem die Messung unter definierten anaeroben Bedingungen nicht möglich war, ließ sich dies im CD-Spektrum nicht untersuchen.

Bei der Kautschukspaltung durch RoxA wird Sauerstoff benötigt und es spielt dabei wahrscheinlich eine Änderung des Redoxzustandes mindestens eines der Hämzentren eine Rolle. Daher könnte die Betrachtung partiell reduzierter Zustände bzw. solcher im Verlauf einer Reoxidation weiteren Aufschluss zum Verständnis des Reaktionsmechanismus geben. Abb. 3.69 zeigt zwei Zustände einer RoxA-Probe nach Dithionit-Reduktion und Reoxidation an Luft, die zum größten Teil wieder reoxidiert, aber noch teilreduziert vorlagen. Die zahlreichen CD-Signale von reduziertem RoxA zwischen 500 und 560 nm gingen rasch zurück. Die reoxidierten Zustände entsprachen in diesem Bereich wieder annähernd dem Spektrum von RoxA "as isolated". Lediglich ein entsprechend schwächeres, vermutlich geteiltes Signal mit Nulldurchgang bei 549 nm war von den zahlreichen CD-Signalen bei reduziertem RoxA noch zu sehen, was darauf hindeutet, dass nur noch eines der Hämzentren von der Reduktion betroffen war. Deutlichere Unterschiede zeigten sich um die Soret-Bande. Es fielen ebenso in Wiederholungen des Experimentes zwei Minima auf, eines bei 413 und ein zweites bei knapp 420 nm. Diese stimmen mit den charakteristischen Minima von RoxA "as isolated" (412–413 nm) bzw. vollständig reduziertem RoxA (420 nm) überein. Es ist anzunehmen, dass ein gewisser Teil der RoxA-Moleküle noch ein reduziertes Hämzentrum besaß, während bei dem (im gezeigten Beispiel) größten Teil beide Zentren wieder oxidiert waren. Dass einige RoxA-Moleküle noch zwei reduzierte Hämgruppen aufwiesen, lässt sich nicht ausschließen, deren Anteil kann aber angesichts nur einer α -Bande bei 549 nm im optischen Spektrum der betrachteten Proben als sehr gering eingeschätzt werden.

Schon aus den in Abb. 3.69 gezeigten beiden Zwischenzuständen lässt sich erkennen, dass vermutlich für die Prozesse der Reduktion bzw. der Reoxidation isosbestische Punkte existieren. Diese liegen etwa bei 404 und 417,5 nm. Die Betrachtung von Titrationspektren wie sie mit UV-Vis-Spektroskopie gezeigt wurden (Kap. 3.9.1, Abb. 3.31) wäre v. a. für den Vergleich zwischen der schrittweisen Reduktion bzw. der Reoxidation mit Blick auf eine Elektronenverschiebung zwischen den Metallzentren interessant.

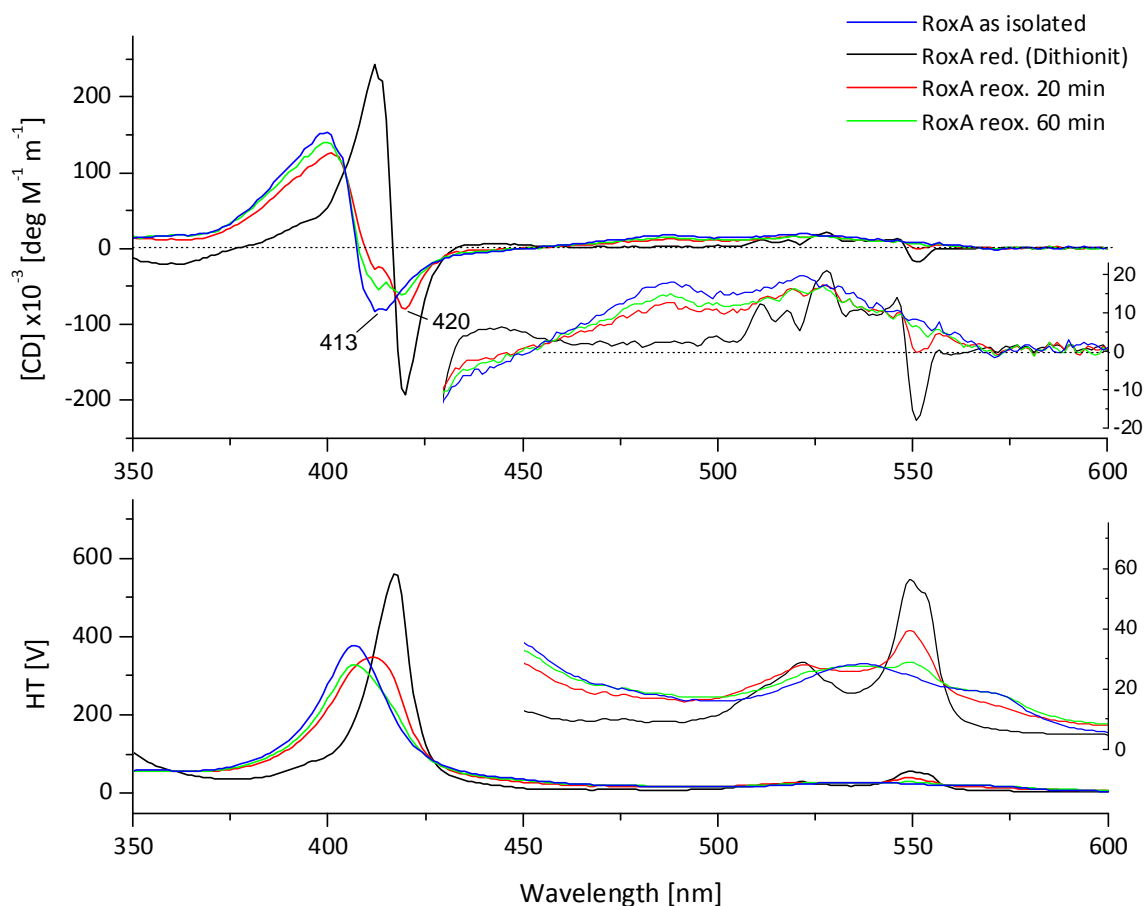


Abb. 3.69: CD-Spektren im Vis-Bereich (oben) und die zugehörige Spannung (unten) von RoxA "as isolated" (aerob) [5,5 mg/ml], nahezu vollständig reduziertem RoxA (Dith.) aus gleicher Präparation und zwei Zuständen desselben Ansatzes nach Reoxidation an Luft. Der unten dargestellten Spannung (HT) ist die Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl) abgezogen; sie entspricht dem relativen optischen Absorptionsspektrum (UV-Vis). In den Abbildungen (oben, unten) ist ein der X-Achse entsprechender Teil der Spektren vergrößert dargestellt. Von den zahlreichen CD-Signalen zwischen 500 und 560 nm bei reduziertem RoxA ist bei den reoxidierten Zuständen nur noch ein entsprechend schwächeres Signal bei 549 nm zu sehen. Im Bereich der Soret-Bande weisen die teilweise reoxidierten Proben zwei Minima bei 412–413 und 419–420 nm auf, die darauf hindeuten, dass sich beide Hämzentren bezüglich ihres Reduktionszustandes geringfügig unterscheiden müssen.

3.10.3 Die Wirkung von Wasserstoffperoxid

Neben dem reduzierten CD-Spektrum wurde auch das Spektrum mit dem Oxidationsmittel und Peroxidase-Substrat Wasserstoffperoxid untersucht. Mit diesem (1 mM) trat analog zu UV-Vis-Spektren auch im CD-Spektrum eine rasche generelle, endpunktbezogene Häm-Absorptionsabnahme ein. Die Abnahme der Intensität der Häm-typischen Signale lag gleichermaßen im optischen wie dem CD-Spektrum bei etwa 70 % des Ausgangsspektrums (vgl. Abb. 3.34). Ohne Berücksichtigung dieser Intensitätsabnahme wurde insgesamt ein zu RoxA "as isolated" sehr ähnliches CD-Spektrum erhalten (Abb. 3.70). Ein breites, schwaches Signal trat bei 347 nm auf, das bei RoxA "as isolated" fehlte. Das anhand der gemessenen Spannung (HT) der RoxA-Probe ermittelte optische Spektrum wies eine leichte Verbreiterung in Richtung 416 nm auf (Abb. 3.70 unten; vgl. Abb. 3.72 links), die bei der Aufnahme entsprechender mit H_2O_2 , aber auch mit Pyrogallol unter Sauerstoffausschluss versetzter RoxA-Proben mit einem UV-Vis-Spektrometer in Differenzspektren [– RoxA "as isolated"] zu erkennen war (s. Kap. 3.9.3).

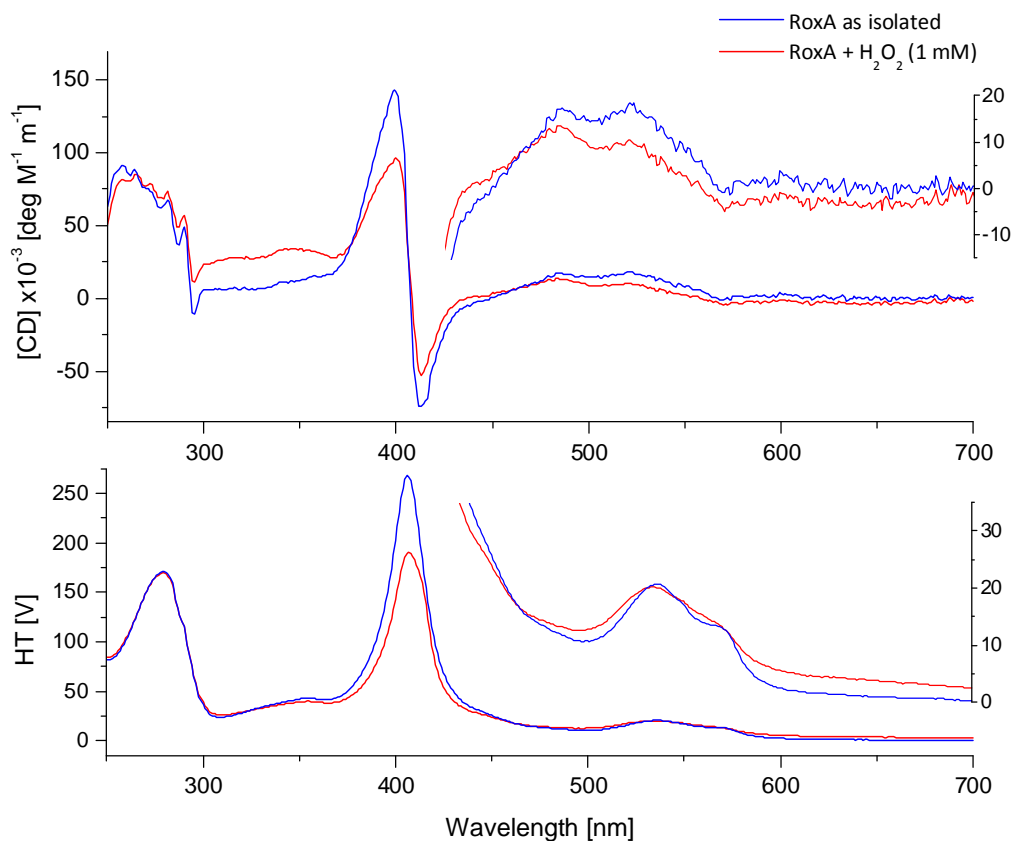


Abb. 3.70: (oben) CD-Spektren von RoxA mit H_2O_2 (1 mM) im Nah-UV- und Vis-Bereich bei 20°C nach 20 min im Vergleich zu RoxA "as isolated" aus derselben Präparation [5 mg/ml = ca. 70 μM], (unten) die zugehörige Spannung (HT) nach Abzug der Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl). Diese entspricht dem relativen optischen Absorptionsspektrum (UV-Vis). In den Abbildungen ist ein der X-Achse entsprechender Teil der Spektren vergrößert dargestellt. Es ist eine deutliche Abnahme der RoxA-Absorption nach Inkubation mit H_2O_2 zu erkennen. Die CD-Signale sind insgesamt vermindert, weisen leichte Veränderungen der Soret- und Q-Banden-Region auf (s. Text).

Im UV-Vis-Differenzspektrum (Abb. 3.71 unten) wurde in diesem Bereich neben der Absorptionsabnahme bei 406 nm eine Schulter bzw. eine weniger deutliche Abnahme bei 416 nm offenbar. Dass es sich hierbei trotz der sich andeutenden Ähnlichkeit nicht um eine partielle Reduktion handelte, zeigt das CD-Spektrum (Abb. 3.70 oben) bzw. CD-Differenzspektrum (Abb. 3.71 oben), indem die typischen Minima im Soret-Bereich, die sich für einen auch noch so geringfügig reduzierten Zustand einer RoxA-Probe ergaben (vgl. Abb. 3.69), fehlten. Zudem entstanden keine zusätzlichen Signale im Bereich der Q-Banden, wie es sowohl bei (partieller) Reduktion als auch bei Bindung starker Liganden der Fall war. Es konnte lediglich eine Abnahme bei den für RoxA "as isolated" typischen Wellenlängen im UV-Vis-Spektrum beobachtet werden (Abb. 3.70 unten), mit der eine entsprechende Abnahme im CD-Spektrum einherging (Abb. 3.70 oben). Gleichzeitig wurde aber ein schwaches Signal bei etwa 409 nm im CD-Differenzspektrum und ein diesem entsprechendes bei 416 nm im UV-Vis-Differenzspektrum beobachtet (Abb. 3.71 oben). Ein solches optisches Spektrum entstand auch mit Pyrogallol (vgl. Abb. 3.72), und gelegentlich auch unter anaeroben Bedingungen alleine (s. Kap. 3.9.3; Kap. 4.6.1).

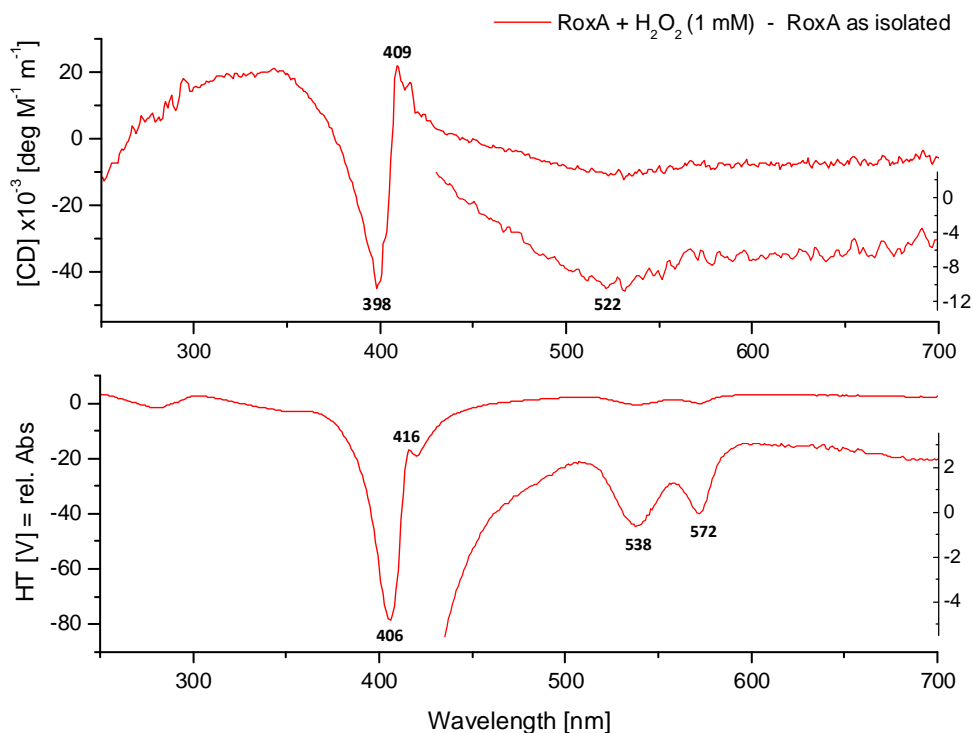


Abb. 3.71: (oben) CD-Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] von RoxA mit H₂O₂ (1 mM, 20 min RT), (unten) die zugehörige Spannungsdifferenz (Δ HT) nach Abzug der Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl), die dem relativen optischen Differenzspektrum entspricht (Δ UV-Vis). Die absoluten Unterschiede zum Ausgangsspektrum sind eine deutliche Abnahme des Soret-Signals mit einem Minimum im CD-Spektrum bei 398–399 nm (oben) und 406 nm im optischen Spektrum (unten), zudem eine leichte Abnahme der CD-Absorption bei 522 nm und des für RoxA "as isolated" typischen UV-Vis-Signale bei 538 und 572 nm. Die in Abb. 3.72 ersichtliche leichte Verbreiterung der Soret-Bande des UV-Vis-Spektrums kann im Differenzspektrum als Schulter bei 416 nm aufgelöst werden (unten). Diesem entspricht ein schwaches zusätzliches Signal um 409 nm im CD-Spektrum (oben).

Würde man das intensitätsschwächere Spektrum von RoxA mit H_2O_2 der Intensität des "as isolated"-Spektrums gleicher Proteinkonzentration angleichen, erhielte man im Soret-Bereich ein Differenzspektrum [– RoxA "as isolated"] mit einem Maximum bei 416 nm, das demjenigen nach Bindung bestimmter Häm-Liganden wie Pyridin oder nach Teilreduktion ähnelte (ohne Abb.). Ein solches Signal deutete sich bereits im tatsächlichen Differenzspektrum an (Abb. 3.71). Es fehlte aber die bei allen untersuchten Häm-Liganden oder einer Reduktion beobachtete Zunahme einer α -Bande. Wasserstoffperoxid könnte seine Wirkung durch Bindung am Fe(III) eines Hämzentrums entfalten unter Verdrängung eines möglicherweise gebundenen H_2O - oder O_2 -Moleküls. Die Oxidation des Häm-Eisens könnte auch zu einem Sauerstoffradikal-vermittelten Ausbleichen der Häm-Absorption führen (s. Kap. 4.7). Unter Annahme einer direkten Interaktion mit einem Fe-Zentrum ließe sich der Effekt auf eines der Hämzentren beschränken, was auch das Erreichen eines Endpunktes begründen würde. Um die spektralen Veränderungen zu erklären, müsste dieses Häm eine bei etwa 539 nm und 572 nm verminderte Absorption aufweisen bzw. auch eine Restabsorption mit einem nach 416 nm verschobenen Maximum zeigen, während die Signale des anderen Häms unverändert blieben. Dieses Phänomen könnte möglicherweise durch das Lösen einer ursprünglichen O_2 -Koordination erklärt werden (s. Kap. 4.6.1) oder auch durch das Zusammenwirken mehrerer Effekte, des Hämverlustes und der Verdrängung eines gebundenen, schwachen O_2 -Liganden.

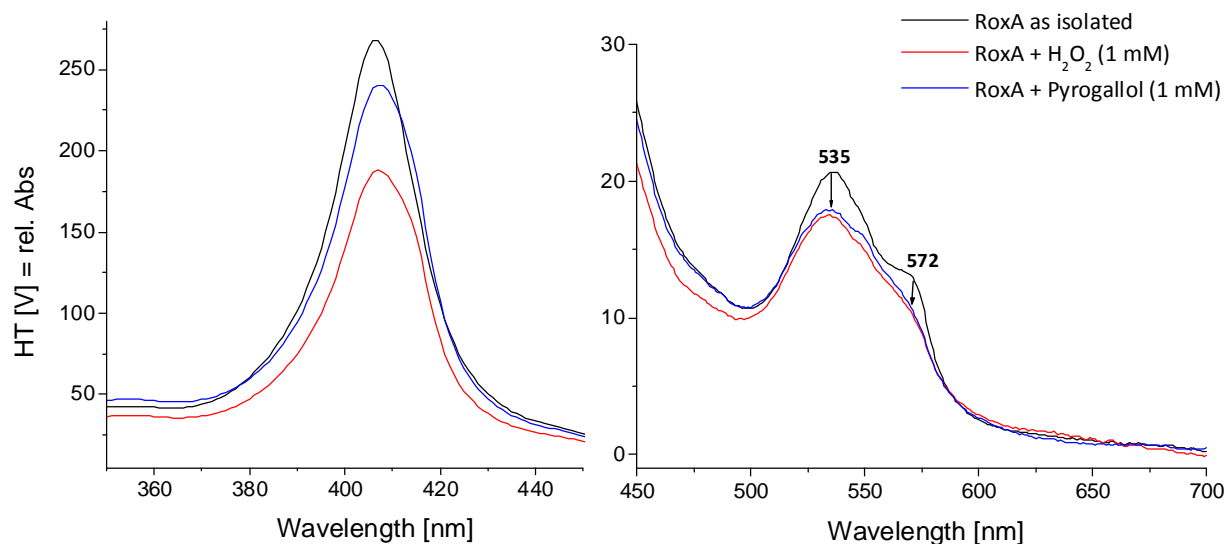


Abb. 3.72: Aus der PM-Spannung (HT) ermitteltes relatives optisches Absorptionsspektrum von RoxA "as isolated", eines Ansatzes mit H_2O_2 (1 mM) nach 20 min und eines Ansatzes mit Pyrogallol (1 mM) nach 2 h bei RT. Zur besseren Ersichtlichkeit der Effekte sind die Spektren mit Pyrogallol und H_2O_2 leicht nach unten versetzt dargestellt. Neben einer Absorptionsabnahme und einer langwelligen Verbreiterung des Soret-Maximums (links) ist ebenso eine Abnahme der Q-Banden um etwa 535 und 572 nm zu sehen (rechts).

Interessanterweise ähnelte das Bild des Spektrums der Q-Banden im optischen Spektrum mit H₂O₂ stark demjenigen nach Inkubation von RoxA mit Pyrogallol unter aeroben Bedingungen bei pH 7. Es trat in beiden Ansätzen eine Abnahme der Signale um 535 und 572 nm ein (Abb. 3.71 unten; 3.72 rechts). Die Soret-Bande im optischen Spektrum von RoxA mit Pyrogallol war ebenso wie diejenige mit H₂O₂ leicht langwellig verbreitert (Abb. 3.71 links). Aufgrund eines Absorptionsanstiegs bei 280 nm im Ansatz mit Pyrogallol bzw. einer sichtbaren Farbänderung der Lösung, war die Entstehung von Oxidationsprodukten anzunehmen, ebenso wie der Entzug von O₂ aus der Lösung. Pyrogallol ist bei Anwesenheit von O₂ auch für die Bildung von Superoxid-Radikalen (O₂^{•-}) verantwortlich, die der Reaktion mit H₂O₂ ähnliche, doch unter den Versuchsbedingungen langsamer eintretende spektrale Veränderungen bewirken könnten. Diese Beobachtungen zeigten analog zur UV-Vis-Spektroskopie einen Zusammenhang zwischen der Zugabe von Oxidationsmitteln und der Inkubation von RoxA "as isolated" unter Sauerstoffausschluss auf und könnten auf eine O₂-Koordination im Grundzustand hinweisen (s. Kap. 4.6.1).

3.10.4 Die Wirkung Substrat-ähnlicher Verbindungen

Niedermolekulare Substratanaloga von Polyisopren wie β -Carotin oder Squalen hemmten die RoxA-Aktivität teilweise sehr deutlich, doch war es aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit nur schwer möglich, deren Auswirkung auf das optische Spektrum zu untersuchen. Diese Schwierigkeit bestand folgerichtig auch bei der CD-Spektroskopie.

Es gelang mit β -Carotin, welches die vergleichsweise beste Löslichkeit der Substratanaloga aufwies, mit etwa dreifachem molarem Überschuss zu RoxA das CD-Spektrum im Vis-Bereich zu untersuchen. Das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich wurde nach Verdünnung aus dieser RoxA-Probe [75 μ M], die mit β -Carotin [200 μ M] versetzt worden war (vgl. Abb. 3.73) aufgenommen. Dieses zeigte keinen signifikanten Unterschied zu RoxA "as isolated" (ohne Abb.) und weist demnach nicht auf Veränderungen der Sekundärstrukturen durch die wahrscheinlich eintretende Interaktion von β -Carotin mit RoxA hin. Ebenso war beim Vergleich der CD-Spektren im Vis-Bereich auch nach verlängerter Inkubation (ÜN) kein signifikanter Unterschied zu unbehandeltem RoxA aus der gleichen Präparation festzustellen (Abb. 3.73). Auch das Spektrum im Nah-UV-Bereich entsprach demjenigen von RoxA "as isolated" (Abb. 3.73 oben rechts). Dieses Ergebnis bestätigte die fehlenden Unterschiede im UV-Vis-Spektrum. Dass jedoch eine die Hämzentren betreffende Veränderung am Enzym im Bereich des fünffach koordinierten Hämzentrums stattgefunden haben musste, bewiesen EPR-Spektren, die u. a. von der gleichen, hier dargestellten Probe aufgenommen wurden (s. Kap. 3.11.9, Abb. 3.101). Da im CD-Spektrum keine deutlichen Veränderungen sichtbar wurden, können Änderungen der Sekundärstruktur, sowie eine signifikante Änderung der Tertiärstruktur durch Anwesenheit von β -Carotin ausgeschlossen

werden, zumal die Wirkung auf das EPR-Spektrum bereits nach kurzer Inkubation (<20 min) eingetreten waren.

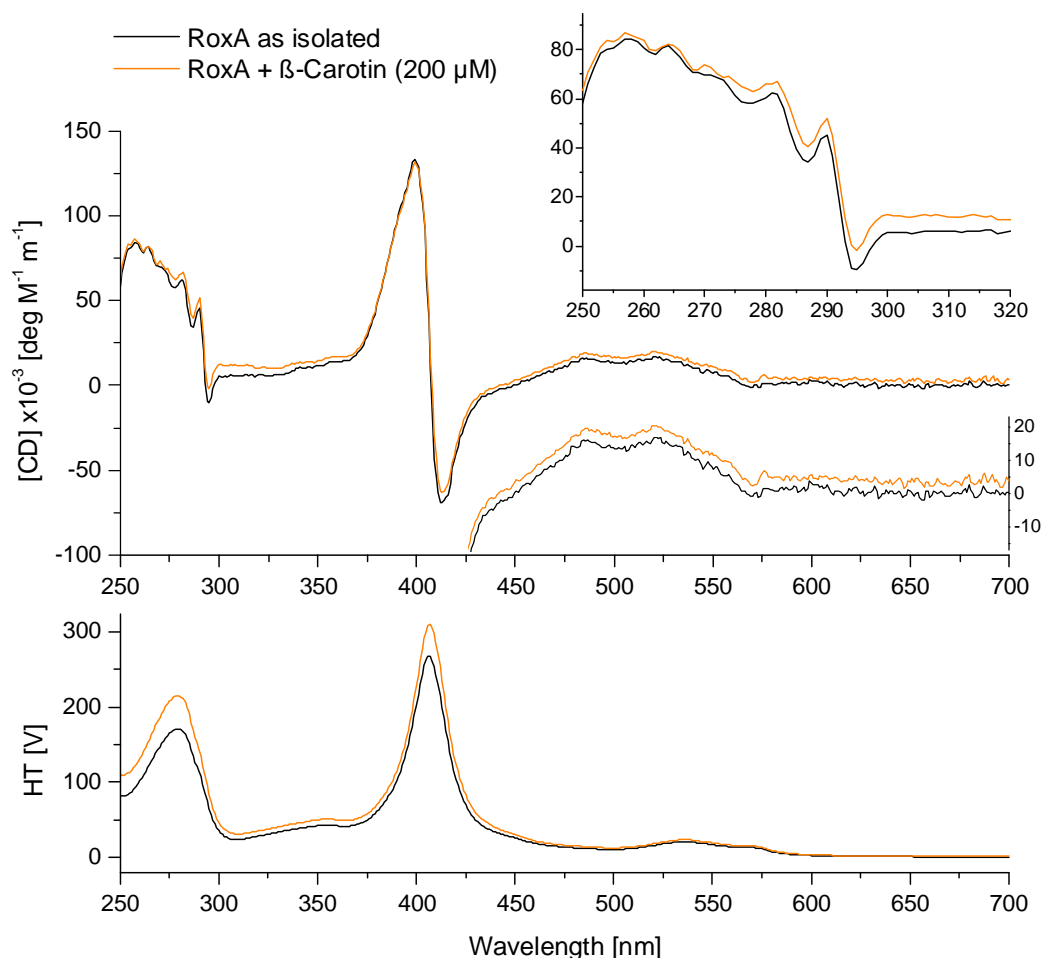


Abb. 3.73: (oben) CD-Spektren im Nah-UV- und Vis-Bereich bei 20°C, (unten) die zugehörige Spannung von RoxA "as isolated" [5,4 mg/ml = 75 μM] und einem Ansatz mit β-Carotin (200 μM) nach dreistündiger Inkubation bei RT (aerob). Dieses wurde aus einer 10 mM Stammlösung [in 50 % EtOH] zugegeben. Der unten dargestellten Spannung (HT) ist die Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl) bzw. des Puffers mit 200 μM β-Carotin abgezogen; sie entspricht dem rel. optischen Absorptionsspektrum (UV-Vis). Im CD-Spektrum (oben) ist ein der X-Achse entsprechender Teil vergrößert dargestellt (425–700 nm). Das Fenster oben rechts stellt den Ausschnitt aus dem CD-Spektrum im Nah-UV-Bereich vergrößert dar (250–320 nm). Es sind keine signifikanten Veränderungen des CD-Spektrums durch β-Carotin zu erkennen.

3.10.5 Die Wirkung externer Hämliganden

Die markanten Effekte von typischen Hämliganden wie Imidazol auf das optische Spektrum von RoxA ließen auch eine Untersuchung durch CD-Spektroskopie interessant erscheinen. Im UV-Bereich jedoch stören diese Stoffe die CD-Messung durch ihre starke Absorption erheblich. Da durch UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, dass durch die Inkubation mit Hämliganden verursachte spektrale Veränderungen nach Entfernung der

Substanzen aus dem Puffer noch immer vorlagen, wurden entsprechende CD-Spektren mit Liganden nach Verdünnung auch in der UV-Region aufgenommen. Die Ansätze wurden aus konzentrierter RoxA-Lösung (≈ 5 mg/ml) mit Imidazol (10 mM) nach Ausprägung der Effekte auf $200 \mu\text{g/ml}$ verdünnt und das jeweilige UV-Spektrum (190–250 nm) aufgenommen. Dieses entsprach im Wesentlichen dem von RoxA "as isolated". Mögliche Abweichungen wie am Minimum bei 207 nm (Abb. 3.74) erscheinen marginal und müssten durch mehrfache Wiederholung des Versuches überprüft werden.

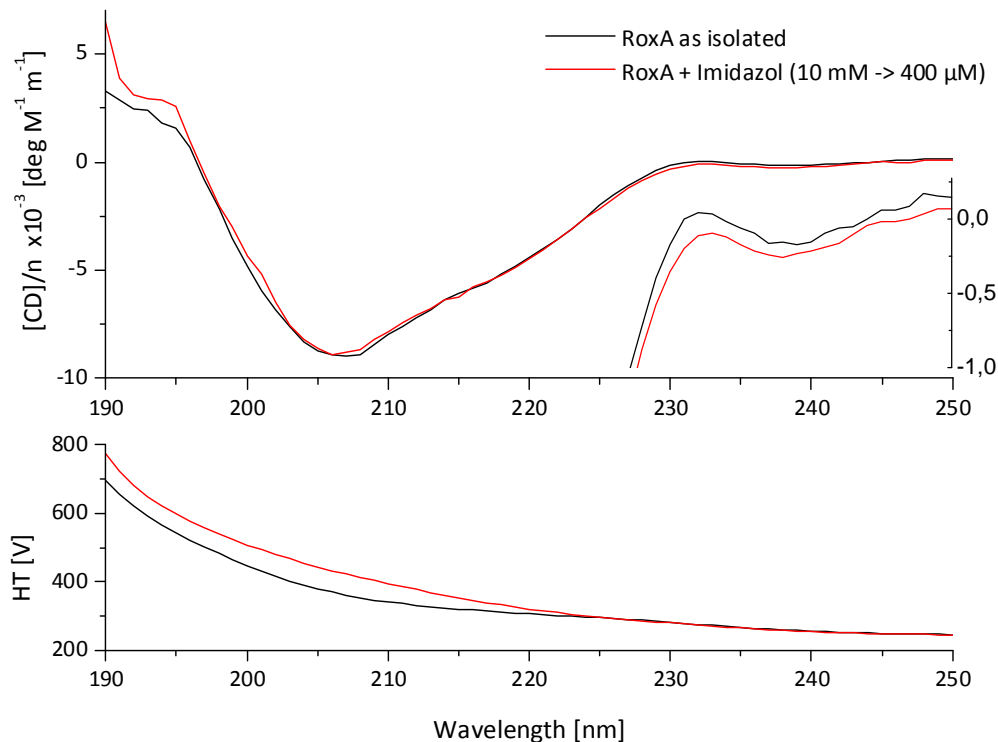


Abb. 3.74: (oben) Fern-UV-CD-Spektrum von RoxA mit Imidazol gegenüber RoxA "as isolated", (unten) die gemessene Spannung (HT) der Proben. Der Ansatz mit Imidazol wurde aus einer konz. RoxA-Lösung (ca. 5 mg/ml), die zuvor 2 h mit 10 mM Imidazol inkubiert worden war (vgl. Abb. 3.75) auf ca. $200 \mu\text{g/ml}$ verdünnt. Rechnerisch lagen somit noch $400 \mu\text{M}$ Imidazol vor, was sich an der erhöhten Spannung der Probe bei niedrigen Wellenlängen zeigt (unten). Das (oben) eingefügte Fenster zeigt einen der X-Achse entsprechenden Ausschnitt des CD-Spektrums vergrößert.

Analog zu Untersuchungen mit UV-Vis-Spektroskopie konnten aber entsprechend hohe Konzentrationen (1–10 mM) an aromatischen Liganden zur Aufnahme von CD-Spektren des Enzyms im Nah-UV- und Vis-Bereich (>250 nm) eingesetzt werden. Es wurden entsprechende Ansätze von RoxA mit Imidazol bzw. mit Pyridin betrachtet. Wie auch im optischen Spektrum (Kap. 3.9.6) wurden mit beiden Hämliganden im CD-Spektrum Veränderungen im Bereich der Soret-Bande und der Q-Banden beobachtet (Abb. 3.75 b).

Im Allgemeinen gleichen die CD-Spektren eher demjenigen von RoxA "as isolated" als dem von reduziertem RoxA. Das CD-Signal im absoluten Spektrum lag in der Soret-Region mit

Pyridin bei 401/415 nm (Max./Min.), mit Imidazol bei 401/417–418 nm (Abb. 3.75 a) im Vergleich zu RoxA "as isolated" mit 399–400/413 nm (Abb. 3.66 a) und reduziertem RoxA mit 413/420 nm (Abb. 3.68 a). Die absoluten Veränderungen gegenüber unbehandeltem RoxA sind in Abb. 3.76 dargestellt und mit denen von reduziertem RoxA verglichen. Während im optischen Spektrum die Änderungen im Bereich der α - und β -Banden stark an eine partielle Reduktion erinnern, unterscheiden sie sich in dieser Region im CD-Spektrum von reduziertem RoxA. Lediglich die der α -Bande eines Hämzentrums entsprechenden Signale um 549 nm bzw. der β -Bande um 522 nm nahmen zu, wohingegen nach einer Reduktion eine Vielzahl von Signalen auftrat (Abb. 3.76, vgl. auch Abb. 3.68).

Wie bereits anhand der Beobachtungen aus der UV-Vis-Spektroskopie zu vermuten war, wurde hierdurch noch klarer, dass die durch aromatische Hämliganden verursachten spektralen Veränderungen vom gleichen Hämzentrum stammen. Dass Imidazol und Pyridin die Signale dieses Häms unterschiedlich beeinflussen, zeigt das CD-Spektrum besonders deutlich im Bereich der α -Banden, indem sich die Signale von Pyridin (549 nm) und Imidazol (551 nm) unterscheiden (Abb. 3.75 a). Im UV-Vis-Spektrum ist dieser Unterschied zwischen Pyridin (549 nm) und Imidazol (\approx 550 nm) bereits zu erkennen, doch weniger offensichtlich, umso mehr aber im Bereich der Soret-Bande (Abb. 3.75 b).

Das CD-Spektrum jedoch kann im Soret-Bereich die Effekte der Bindung eines starken Liganden am Hämzentrum von einer Reduktion unterscheiden. Vergleicht man die CD-Soret-Minima von RoxA mit Pyridin bzw. Imidazol mit denen von nach vollständiger Reduktion reoxidiertem RoxA, das noch teilreduziert vorlag, so fällt auf, dass letzteres zwei Minima aufweist gegenüber nur einem bei RoxA, das mit einem externen Hämliganden versetzt worden war (Abb. 3.75 a). Im UV-Vis-Spektrum war zu erkennen, dass in diesem Beispiel die reoxidierte RoxA-Probe noch partiell reduziert, die Signal bei 549 nm jedoch von geringerer Intensität als die durch die Hämliganden hervorgerufenen Signale war (Abb. 3.75 b). Auch im CD-Spektrum zeigte sich eine entsprechend geringere Signalzunahme um 549 nm als einzige Veränderung in diesem Bereich, weshalb von der partiellen Reduktion nur eines, vermutlich desselben Hämzentrums auszugehen ist. So besitzt das CD-Spektrum im Soret-Bereich zwei Minima, eines bei 413 nm, typisch für oxidiertes RoxA, eines bei 420 nm, typisch für reduziertes RoxA (Abb. 3.75 a, oben rechts). Für RoxA mit Pyridin oder Imidazol offenbarte sich nur jeweils ein Minimum, das in Abhängigkeit des Liganden zwischen diesen beiden lag, also von den für reduziertes RoxA charakteristischen Minima abwich. Dieser Umstand birgt den Schluss, dass aus der Bindung dieser Substanzen keine "echte" Reduktion resultiert. Obwohl angenommen werden muss, dass nur eines der Hämzentren zur Signalveränderung durch Ligandenbindung beiträgt, war dennoch kein Minimum bei 413 nm zu sehen (s. Kap. 4.9.2.1).

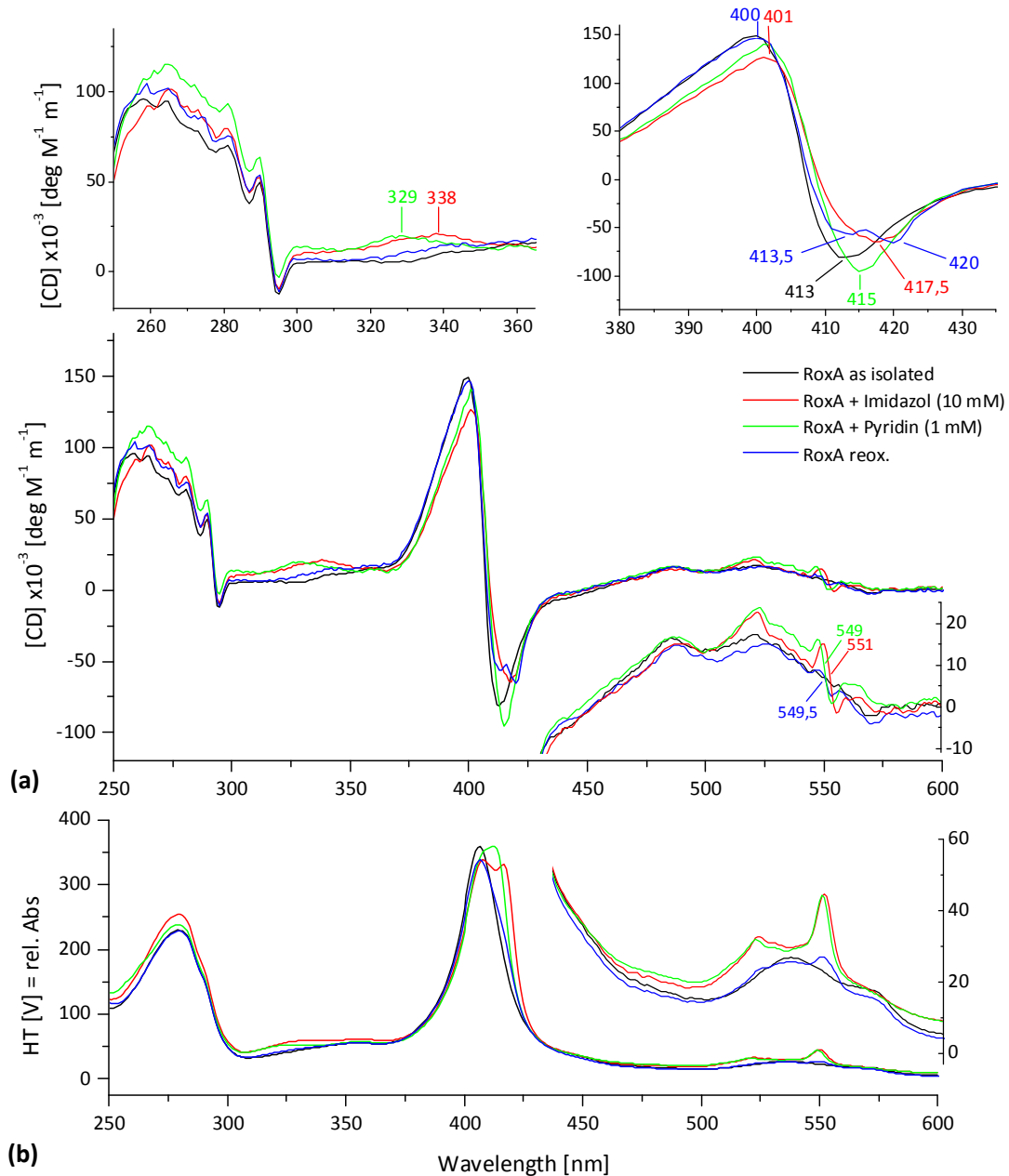


Abb. 3.75: (a) CD-Spektren im Nah-UV- und Vis-Bereich bei 20°C in Abhängigkeit der Anwesenheit von Pyridin bzw. Imidazol im Vergleich zu reoxidiertem RoxA, (b) die zugehörige Spannung von (rek.) RoxA mit Imidazol (10 mM; aus 1 M Stammlösung, pH 8) und RoxA mit Pyridin (1 mM) nach 2 h bei RT. Zum Vergleich sind RoxA "as isolated" [5,5 mg/ml] und ein Ansatz von Dithionit-reduziertem RoxA (aerob) nach Reoxidation angegeben. Der in (b) dargestellten Spannung (HT) ist die Grundspannung des Puffers abgezogen; sie entspricht dem rel. optischen Absorptionsspektrum. In den Abbildungen (a, unten; b) ist ein der X-Achse entsprechender Ausschnitt vergrößert dargestellt (430–700 nm). Das Fenster in (a) oben links zeigt das CD-Spektrum im Nah-UV-Bereich, oben rechts den Bereich um das Absorptionsmaximum vergrößert. Das CD-Spektrum mit den Hämliganden Imidazol bzw. Pyridin (oben) weist entsprechend dem UV-Vis-Spektrum (unten) Veränderungen gegenüber unbehandeltem RoxA auf. Das CD-Signal in der Soret-Region liegt mit Pyridin bei 401/415 nm (Max./Min.), mit Imidazol bei 401/417 nm im Vergleich zu RoxA "as isolated" mit 399/413 nm. Reoxidiertes (noch zu einem geringen Anteil reduziertes) RoxA dagegen weist zwei Minima um 413–414 und 419–420 nm auf (vgl. Abb. 3.69). RoxA mit Pyridin zeigt ein klares CD-Signal bei 549 nm, mit Imidazol bei 551 nm, partiell reduziertes RoxA bei ca. 549,5 nm. Im Nah-UV-Bereich zwischen 250 und 280 nm sind minimale Abweichungen zu RoxA "as isolated" zu sehen (oben rechts). RoxA mit Pyridin besitzt ein zusätzliches, breites CD-Maximum bei 329 nm, RoxA mit Imidazol bei 338 nm.

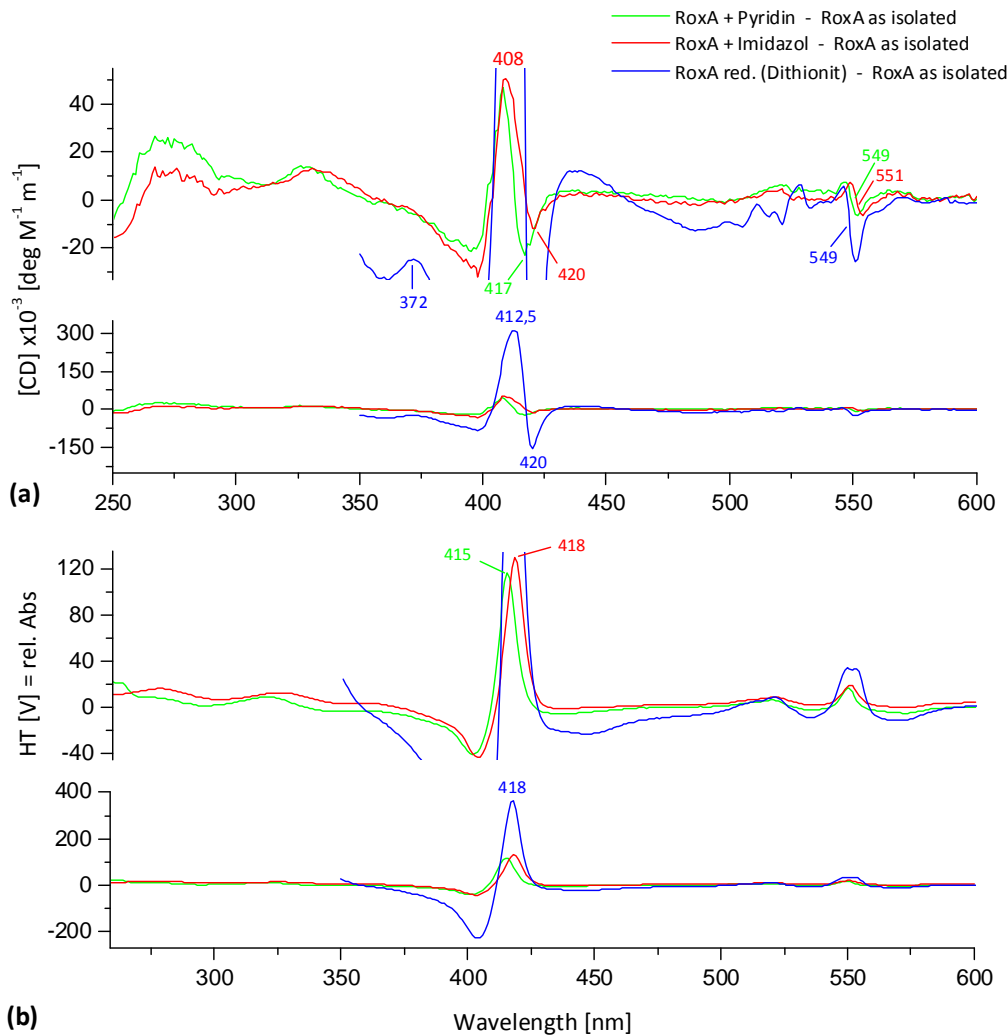


Abb. 3.76: (a) Differenz-CD-Spektren minus RoxA "as isolated" von RoxA mit Pyridin (1 mM) bzw. Imidazol (10 mM) nach 2 h bei RT (vgl. Abb. 3.75). (b) Die aufgenommene Spannung (ΔHT) der Proben nach Abzug der Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl) entspricht dem rel. optischen Differenzspektrum ($\Delta\text{UV-Vis}$). Die Abbildungen (a) und (b) zeigen jeweils die vollständigen Spektren (unten) und einen bezüglich der Y-Achse vergrößerten Ausschnitt (oben). Wie auch im UV-Vis-Spektrum (unten) unterscheiden sich die absoluten Veränderungen im CD-Spektrum (oben) mit Pyridin und Imidazol voneinander und sind deutlich weniger intensiv als diejenigen nach vollständiger Reduktion. Sie sind zudem im Bereich der Q-Banden deutlich simpler, beeinflussen nur die Signale eines Hämzentrums in unterschiedlicher Weise.

Analog zu früheren Versuchsansätzen mit UV-Vis-Spektroskopie wurde ebenso das CD-Spektrum im Vis-Bereich einer mit Pyridin (1 mM) versetzten RoxA-Probe nach Reduktion mit Na^+ -Dithionit im Überschuss (ca. 10fach, aerob) betrachtet. Die beobachteten Signale waren qualitativ deckungsgleich mit denjenigen von in gleicher Weise reduziertem RoxA "as isolated" ohne Zusatz von Hämliganden, doch offenbarte sich bei gleicher RoxA-Konzentration gegenüber diesem eine Intensivierung des Soret-Signals bei der für den reduzierten Zustand typischen Wellenlängen, sowie des Signals bei 549 nm (Abb. 3.77 oben). Dies entspricht den Veränderungen im UV-Vis-Spektrum (Abb. 3.77 unten) und bestätigte

damit zuvor gemachte Beobachtungen bei RoxA mit Pyridin und Imidazol (s. Kap. 3.9.6.4), wonach die Intensität des Signals von reduziertem Pyridin-ligiertem RoxA nicht einfach durch Addition der Veränderungen durch Pyridin und der Reduktion durch Dithionit zustande kommt. Damit beschreiben die CD- und UV-Vis-Spektren von reduziertem, mit Häm-liganden versetztem RoxA plausiblerweise vielmehr einen veränderten Zustand des Enzyms nach einer Reduktion, nämlich denjenigen bei Koordination der sechsten Bindestelle des Eisen-Zentrums durch einen entsprechenden neuen Häm-liganden. In diesem Zustand könnte reduziertem RoxA einen veränderten Spinzustand und höheren Absorptionskoeffizienten bei 418 nm aufweisen, zu dem vermutlich nur das neu koordinierte Hämzentrum beiträgt, wie es auch im UV-Vis-Spektrum anhand der einseitigen Zunahme des Signals bei 549 nm gegenüber dem bei 553 nm ersichtlich ist (vgl. Kap. 3.9.6).

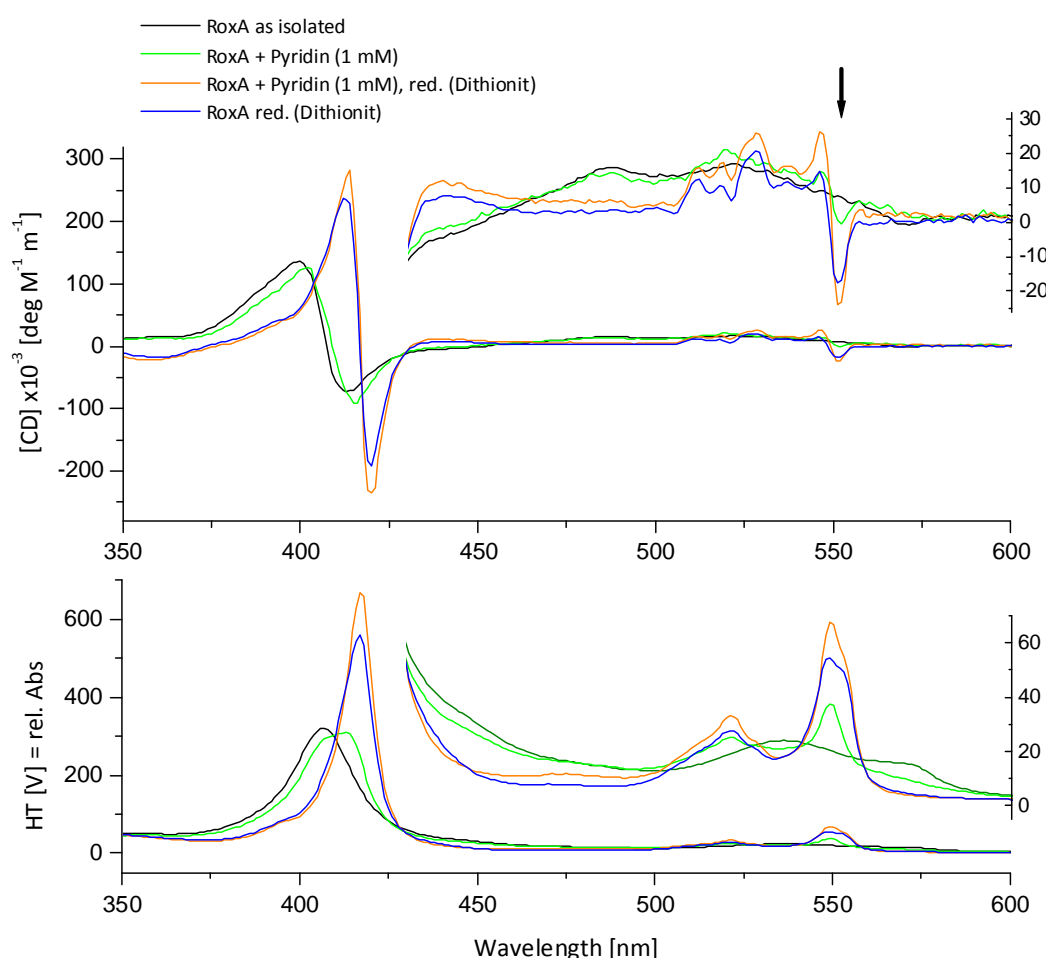


Abb. 3.77: (oben) CD-Spektren im Vis-Bereich bei 20°C, (unten) die zugehörige Spannung (HT) von (rek.) RoxA mit Pyridin (1 mM) und dem gleichen Ansatz nach Reduktion mit Dithionit, verglichen mit RoxA "as isolated" [5,5 mg/ml] und Dithionit-reduziertem RoxA. Der unten dargestellten Spannung (HT) ist die Grundspannung des Puffers (50 mM KPP + 300 mM NaCl) abgezogen; sie entspricht dem rel. optischen Absorptionsspektrum. In beiden Teilabbildungen (oben, unten) ist ein der X-Achse entsprechender Teil der Spektren vergrößert dargestellt (430–700 nm). Wie auch im UV-Vis-Spektrum (unten) zeigt der mit Pyridin versetzte Ansatz nach Reduktion im CD-Spektrum ein intensiveres Signal im Soret-Bereich, sowie um 549 nm (Pfeil). Alle übrigen Signale im Bereich der Q-Banden entsprechen denen von reduziertem, unbehandeltem RoxA.

Diese Ergebnisse veranschaulichen erstmals die Eigenschaften der Rubber Oxygenase A im CD-Spektrum, sowohl des Fern-UV-Bereiches (190–250 nm) als auch des Nah-UV- (250–300 nm) und des Soret- und Vis-Bereichs (> 300 nm). Sie stellen eine Grundlage für einen künftigen Vergleich mit RoxA-Mutanten dar. Insbesondere bietet sich zu diesem Zweck eine Betrachtung des Nah-UV-, des Soret- und Vis-Bereiches an, da dort eine Einflussnahme auf die Tertiärstruktur bzw. die Häm-Signale insbesondere durch aromatische Aminosäuren erkennbar sein sollte (s. Kap. 4.3.2, 4.3.3). Der Vergleich von RoxA aus Latexkultur zeigte keine signifikanten Unterschiede im Spektrum und bezüglich des Schmelzpunktes auf, der auch etwa 54°C bestimmt werden konnte. Als Ergänzung zur UV-Vis-Spektroskopie erwies sich die CD-Spektroskopie als hilfreich zur Unterscheidung der Effekte von Hämliganden und einer (Teil-)Reduktion. Auch stellen die Beobachtungen die Eignung der Aufnahme von Schmelzkurven als Mittel zur Untersuchung der Stabilität des Enzyms bzw. von Mutanten unter verschiedenen Bedingungen in Aussicht.

3.11 Untersuchung von RoxA mit EPR-Spektroskopie

RoxA besitzt zwei Hämgruppen mit dem Übergangsmetall Eisen als potentielle Zentren der katalytischen Aktivität. Fe(III) lässt sich aufgrund eines ungepaarten Elektrons durch EPR-Spektroskopie nachweisen. Prinzipiell lassen sich anhand des g -Wertes als vergleichbarem Kriterium von Signalen Informationen über den Spin-Zustand des Eisens und die Umgebung eines Hämzentrums, insbesondere über die koordinierenden Liganden erhalten. Desweiteren können Radikale im EPR-Spektrum sichtbar sein, mit deren Auftreten im Verlauf des Spaltungsprozesses der C=C-Doppelbindung zu rechnen ist. Es war zu hoffen, dass der Vergleich von EPR-Spektren bei An- bzw. Abwesenheit von Substrat(en) und/oder Eisen-Liganden Informationen zum noch unverstandenen Ablauf und Ort der Latexspaltung durch RoxA liefern könnte. Generell erschwerten aber präparationsabhängige Abweichungen im Spektrum bzw. die Quantifizierbarkeit von Signalen, sowie geringe Differenzen zwischen den Spektren von RoxA aus Latexkultur und rekombinantem RoxA die Auswertung.

3.11.1 RoxA "as isolated"

Das EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" weist Signale von zwei unterschiedlichen Hämzentren auf. Jedes lieferte ein Set von rhombischen Signalen mit drei unterscheidbaren Achsenkomponenten (x , y , z). Bei RoxA aus Latexkultur (Uni Konstanz) wurden Signale mit g -Werten typisch für ein sechsfach, von zwei Histidinen koordiniertes Hämzentrum im *low-spin*-Zustand (Palmer, 1983) gefunden, mit g -Werten bei $g=3,09$ (z), $g=2,23$ (y) und bei $g\approx 1,5$ (x) (Abb. 3.78). Diese Signale weisen auf ein Häm mit eher parallelen Imidazolebenen der His-Liganden hin (Walker, 1999). *Low-spin*-Signale bei $g=3,39$ (z) und um $g=1,9$ (y), sowie einer schwer aufzulösenden x -Komponente mit niedrigerem g -Wert sind einem zweiten Hämzentrum mit eher senkrecht zueinander stehenden Imidazolebenen der axialen Liganden zuzuordnen. Dieses Hämzentrum lag zumindest teilweise auch in einem nur fünffach koordinierten *high-spin*-Zustand mit einer freien bzw. von einem schwachen Liganden koordinierten Fe-Bindestelle vor. Dies zeigte ein *high-spin*-Signal um $g=6$ (Abb. 3.78), welches präparationsabhängig in unterschiedlicher Intensität auftrat und bisweilen auch fehlte (Schmitt *et al.*, 2010). Die Signalkomponente um $g=1,9$ variierte bezüglich des g -Wertes leicht, trat zumeist bei $g=1,92$ auf, war aber bisweilen kaum zu sehen oder von Cavity-Signalen überlagert. In unterschiedlicher Intensität trat in allen Präparationen auch ein *high-spin*-Signal bei $g=4,3$ auf, welches charakteristisch ist für unspezifisch gebundenes Nicht-Häm-Fe(III). Da die sehr breiten x -Komponenten rhombischer *low-spin*-Spezies im Bereich hoher Feldstärke (>450 mT) meistens nicht ersichtlich waren, wurde bei der Darstellung einiger Spektren zugunsten einer besseren Übersicht über vorhandene Signale auf diesen Bereich verzichtet. Die in allen Abbildungen auf der Y-Achse angegebenen Werte bezeichnen stets die relative Intensität der EPR-Signale und sind zwischen verschiedenen Abbildungen

nicht direkt vergleichbar. Insgesamt konnten sich die Intensitäten der Signale beider Hämzentren zueinander von Präparation zu Präparation deutlich unterscheiden. Während die Signale des stets *low-spin* vorliegenden (bis-His-) Häms in jeder Präparation in gleicher Ausprägung auftraten, variierten ggf. insbesondere die Signale des auch teilweise *high-spin*-vorliegenden Häms. Vermutlich stammen weitere, nur gelegentlich und in schwacher Intensität auftretende *low-spin*-Signale bei $g=2,8$ bzw. $g=2,6$ bzw. $g=2,5$ ebenso von diesem Hämzentrum (s. u.). Dies könnte darauf hinweisen, dass präparationsabhängig und möglicherweise alterungsbedingt ein geringer Anteil der RoxA-Moleküle Veränderungen in der Umgebung oder Koordination eines Hämzentrums aufweist. Das Schockfrieren von RoxA in flüssigem N_2 und die anschließende Lagerung in N_2 oder bei -70°C hatten sich gegenüber der Lagerung bei -20°C zur Erhaltung der Aktivität als optimal erwiesen. Auch bei der Betrachtung im EPR-Spektrum bestätigte sich dies. Die Intensitäten der Signale wichen z. T. voneinander ab, insbesondere die Erhaltung eines im isolierten Zustand meist sichtbaren *high-spin*-Signals war nach Lagerung bei -20°C nicht immer gewährleistet.

Häufig wurde das EPR-Spektrum im Bereich etwa zwischen 300 und 350 mT, bei g -Werten um $g=2$, durch unspezifische Hintergrundsignale aus der Cavity überlagert, weshalb diese mit Vorsicht zu interpretieren sind. Nicht in allen Fällen ließen sich durch Aufnahme einer Baseline und Abzug vom RoxA-Spektrum Fremdsignale in diesem Bereich ausschließen, oft nur vermindern. Bei der Aufnahme von EPR-Spektren aus rekombinantem RoxA mit einem zweiten Gerät (Uni Stuttgart) bestand häufig zudem das Problem eines starken, den gesamten Messbereich überlagernden Hintergrundes, der zwar nicht zur Verfälschung des g -Wertes von RoxA-Signalen führte, aber ein direktes Ablesen der Form und Intensität störte. Um dies zu verdeutlichen, ist in Abb. 3.79 das Originalspektrum einer Präparation von rekombinantem RoxA "as isolated" (schwarz) mit demjenigen nach Abzug des Puffer-Spektrums verglichen. Ein Einfluss des zumeist verwendeten KP-Puffers mit NaCl kann nicht ausgeschlossen werden, doch wurde ein solches Hintergrundsignal bisweilen bereits bei Messung eines leeren EPR-Röhrchens beobachtet. Es wurden bezüglich des Hintergrundes keine signifikanten Unterschiede zwischen dem in 20 mM Tris/HCl (pH 7,7–8,2) und in 50–100 mM KPP (pH 7) aufgenommenen Spektren festgestellt. Die meisten in dieser Arbeit dargestellten EPR-Spektren, insbesondere diejenigen von rekombinantem RoxA, wurden in KPP (pH 7) nach Zusatz von 300 mM NaCl aufgenommen, sofern nicht anders angegeben, Spektren von RoxA aus Latexkultur meist in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8) mit 300 mM NaCl.

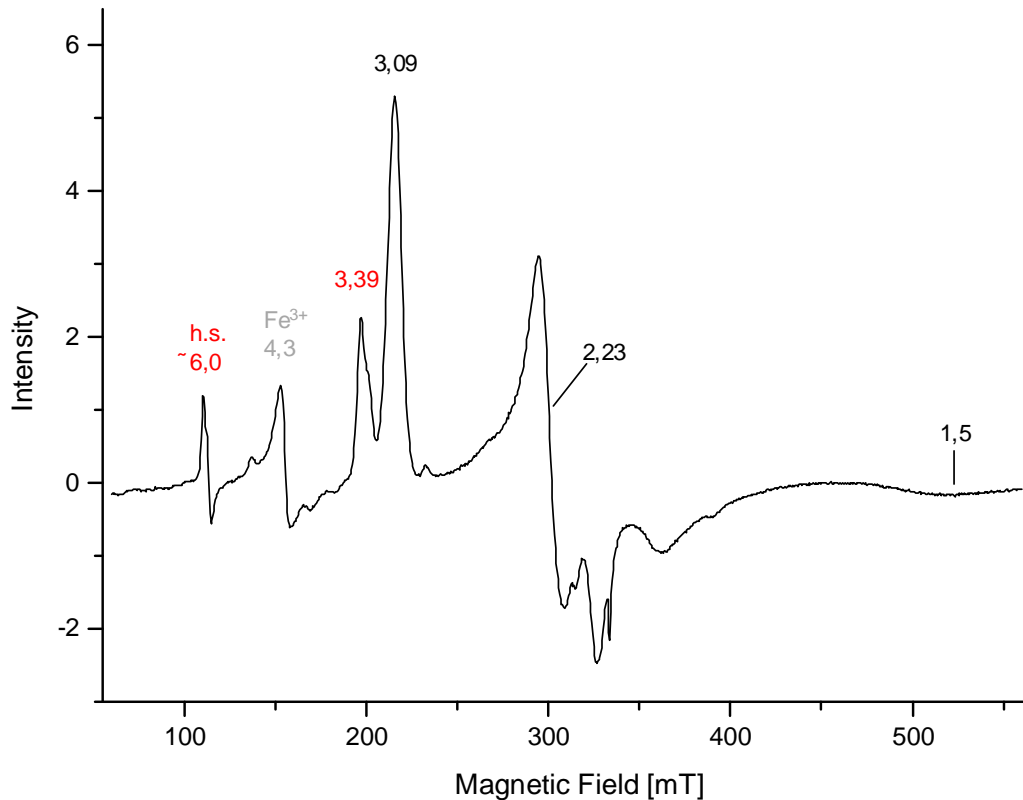


Abb. 3.78: EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" aus Latexkultur (Minimalmedium + 0,05 % Latex, 12 d 30°C) [12 mg/ml] in 20 mM Tris/HCl + 300 mM NaCl (pH 7,8). Es zeigen sich Signale zweier Fe(III)-Hämzentren, eines im sechsfach koordinierten *low-spin*-Zustand (bis-His) mit Signalen bei $g=3,09$, $2,23$ und $1,5$ (schwarz), eines teilweise *low-spin* mit Signalen bei $g=3,39$ und um $g=1,9$ und teilweise in einem fünffach koordinierten *high-spin*-Zustand mit $g\approx 6,0$ (rot). Ein *high-spin*-Signal bei $g=4,3$ ist charakteristisch für unspezifisch gebundenes Fe(III). Die Intensitäten der Signale zueinander konnten zwischen unterschiedlichen Präparationen variieren.

Rekombinantes RoxA aus LB/NB-Medium verhielt sich in nahezu sämtlichen Vergleichsparametern wie seiner Aktivität und dem optischen Spektrum annähernd gleich dem Enzym aus Latexkultur. Das EPR-Spektrum dagegen zeigte reproduzierbar einen Unterschied. Die Signale des Hämzentrums, welches auch im *high-spin*-Zustand vorliegen kann, waren meist nur sehr gering, bisweilen kaum zu sehen. Bei aus Latexkultur isoliertem RoxA variierte deren Intensität deutlich. Eine signifikante Abweichung zeigte das *low-spin*-Signal mit höherem g -Wert, das in RoxA aus Latexkultur bei $g=3,39$ aufgetreten war (s. o.). Bei rekombinantem RoxA war ein g -Wert von $g=3,57$ eines stets intensitätsschwachen Signals abzulesen (Abb. 3.79), bisweilen fehlte dieses Signal in rekombinantem RoxA "as isolated" sogar gänzlich. Die restlichen Hämsignale, insbesondere die des bis-His-koordinierten *low-spin*-Häms waren bezüglich ihres g -wertes unverändert. Gründe für die Abweichung dieses *low-spin*-Signals waren zunächst unklar. Ein Einfluss des Puffers kann dabei ausgeschlossen werden, da auch mit rekombinantem RoxA im gleichen Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,8) kein Signal bei $g=3,39$ erhalten wurde (ohne Abb.). Es musste ein

Zusammenhang mit der Expression des Proteins in Anwesenheit seines Substrates, d. h. der Reinigung aus einem Latex enthaltenden Medium bzw. einer deutlich längeren Kultivierungszeit vermutet werden.

Die Mehrzahl der EPR-Untersuchungen wurde mit dem leichter und schneller zu reinigenden rekombinanten RoxA vorgenommen. Abhängig von der jeweiligen Präparation wurden verschiedene intensitätsschwache EPR-Signale beobachtet, von denen einige ebenfalls in nicht konstanter Weise auch bei RoxA aus Latexkultur aufgetreten waren. Solche Signale machten nur einen geringen Prozentsatz an der Gesamt-EPR-Intensität von RoxA aus. Beispielsweise zeigte eine Präparation eine Anhäufung solcher Signale im Bereich zwischen etwa 220 und 300 mT, d. h. g-Werten von 2,9–2,3 (Abb. 3.80, oben), denen weitere, ebenso intensitätsschwache Signalkomponenten bei höherem Feld (>350 mT) zugehören könnten. Die Signale könnten von einem Hämzentrum stammen, welches möglicherweise einen von Histidin verschiedenen distalen Liganden aufweist oder anderweitig in der Hämumgebung verändert ist, worauf bereits weiter oben hingewiesen wurde. Ungeachtet der Ursachen läge in diesem Fall ein geringer Anteil der RoxA-Moleküle der Präparation in einer vom "Konsens" abweichenden Form vor, die Präparation wies also eine gewisse Inhomogenität auf. Unter Umständen können aber auch Verunreinigungen des Puffers oder des EPR-Messröhrchens, ggf. auch nur für manche dieser schwachen Signale verantwortlich sein. Darauf wies im gezeigten Beispiel das ERP-Spektrum nach Reduktion (Dithionit) hin, in welchem sämtliche RoxA-typischen Signale ausgenommen der untypischen im Bereich zwischen 220 und 300 mT verschwunden waren. Auch aus Abb. 3.79 (oben) lässt sich erkennen, dass auch im Puffer ausnahmsweise unspezifische Signale bei $g=2,5$ und $g=2,35$ in diesem Bereich auftraten. Das Spektrum dieser Präparation nach Abzug des vollständig reduzierten Spektrums zeigt Abb. 3.80 (unten), welches annähernd dem gewöhnlichen Spektrum von RoxA "as isolated" gleicht.

Das Auftreten mancher dieser oben angegebenen ungewöhnlichen Signale mag eine verlässliche Interpretation solcher Spektren erschweren, konnte sich dennoch im Einzelfall als nützlich erweisen. Denn in manchen Experimenten unter bestimmten Versuchsbedingungen, wie beispielsweise der Anwesenheit von Substraten oder Liganden, veränderten sich solche Signale, die im "Standardspektrum" von RoxA nicht sichtbar gewesen wären. Oder aber deren Neuentstehung warnte vor einer möglichen Fehlinterpretation, solche Signale der Änderung von Versuchsbedingungen als alleiniger Ursache zuzuweisen.

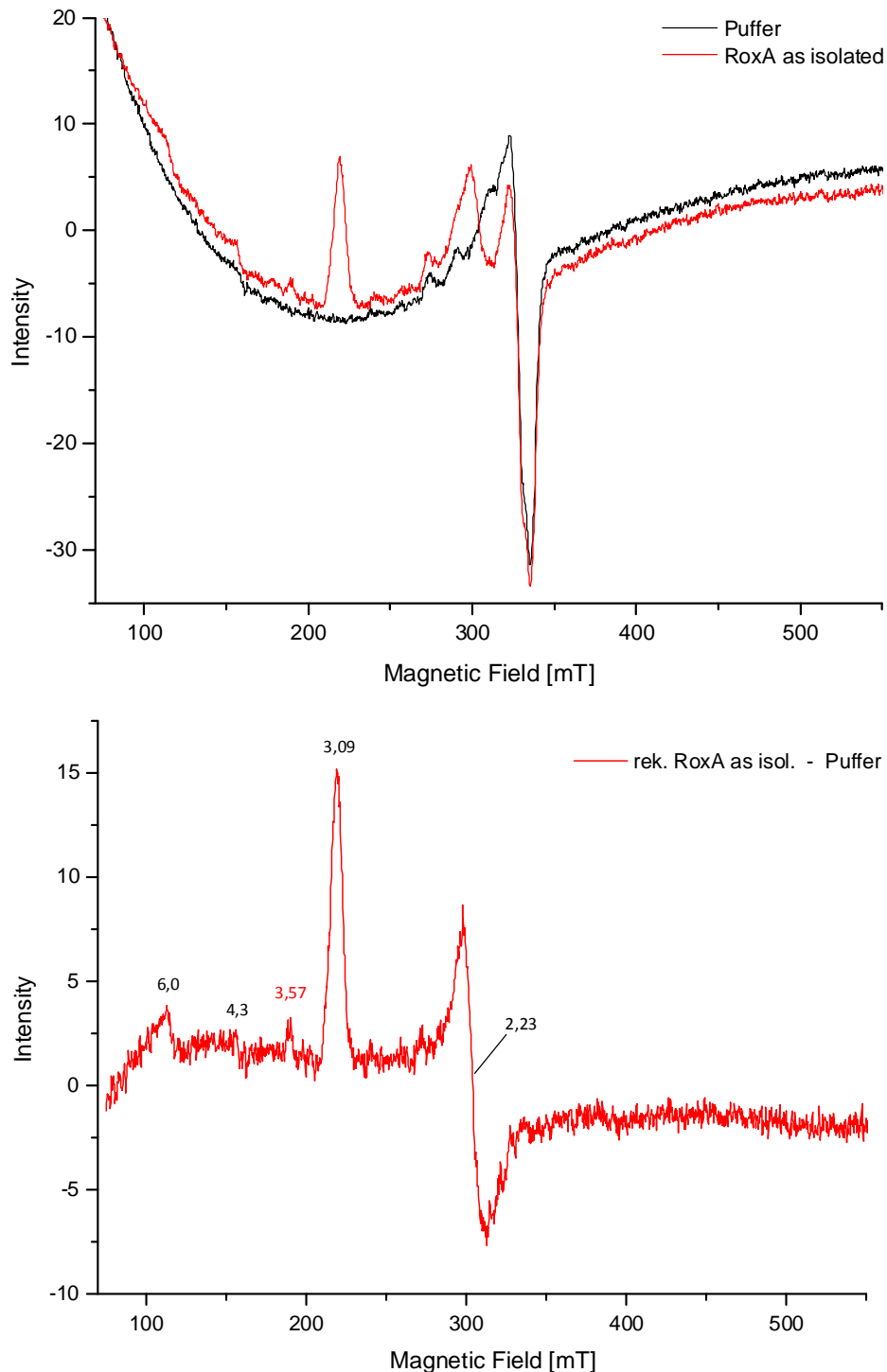


Abb. 3.79: EPR-Spektrum von rekombinantem RoxA "as isolated" (LB/NB-Kultur + 0,1 % Rhamnose, 60 h, 30°C). (oben) EPR-Spektren von rek. RoxA und ein Kontrollspektrum des Puffers (50 mM KPP, pH7 + 300 mM NaCl) ohne Enzym zeigten eine Überlagerung des gesamten Messbereichs durch ein starkes Hintergrundsignal, sowie kleinerer Signale an, die aus dem Puffer, dem EPR-Quarzröhrchen oder der Cavity stammen könnten. Das RoxA-Spektrum nach Abzug der Grundabsorption ist (unten) dargestellt. Es zeigen sich die typischen markanten *low-spin*-Signale bei $g=3,09$ und $2,23$, sowie ein *high-spin* bei $g=6$ und ein in dieser Präparation ungewöhnlich intensitätsschwaches Signal für unspezifisch gebundenes Fe(III) bei $g=4,3$. Wie bei allen anderen Präparationen von rek. RoxA ist hier das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ nur schwach ausgeprägt und mit einem zu RoxA aus Latexkultur abweichenden g -Wert.

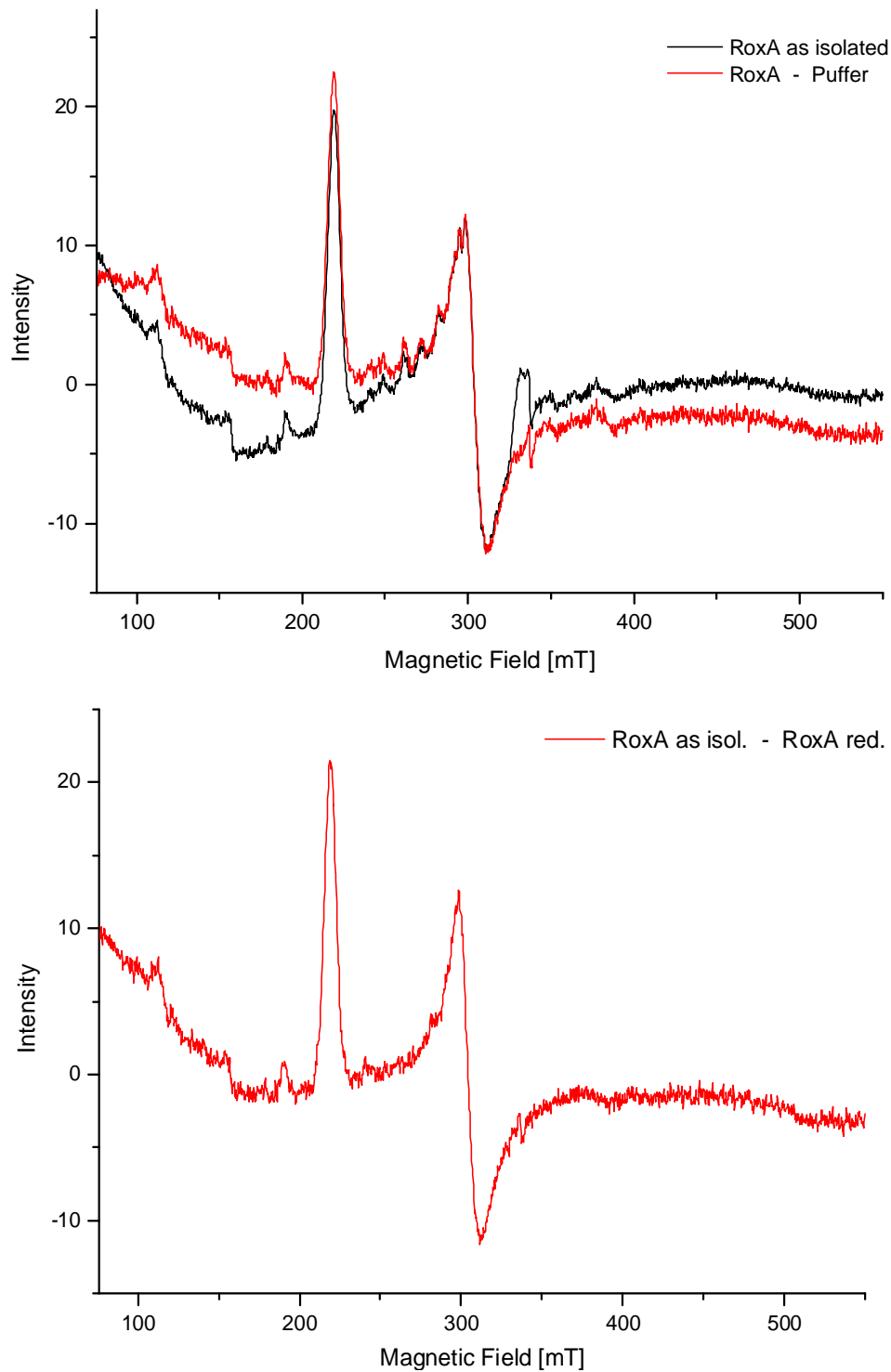


Abb. 3.80: EPR-Spektrum von rekombinantem RoxA "as isolated" mit und ohne Abzug des Pufferspektrums (oben) bzw. nach Abzug des Spektrums von Dithionit-reduziertem RoxA (unten). Einige schwache Signale waren nach Reduktion erhalten geblieben und stammten möglicherweise nicht von den Hämzentren in RoxA. Das unten dargestellte Differenzspektrum entspricht einem "normalen" EPR-Spektrum von RoxA "as isolated".

3.11.2 RoxA nach Reduktion und Reoxidation

Im UV-Vis- und dem CD-Spektrum besitzt RoxA nach Reduktion charakteristische Signale, anhand derer sich die Oxidationszustände klar unterscheiden lassen. Anders verhält sich dies im EPR-Spektrum bei Betrachtung von Eisen-Zentren. Ein Hämzentrum weist nach Reduktion ein Fe(II) auf, welches aufgrund des ganzzahligen Gesamtspins im EPR unsichtbar bleibt. Es lassen sich demnach nur (oxidierte) Fe(III)-Zustände durch die EPR-Spektroskopie charakterisieren. Eine vollständige Reduktion von konzentrierten RoxA-Proben wurde standardmäßig nach Sauerstoffentfernung durch 8–10 Zyklen von Vakuum und N₂-Begasung und anschließende Zugabe eines moderaten Überschusses (ca. 10 x) an Na⁺-Dithionit aus einer konzentrierten, sauerstofffreien Lösung erreicht. Die Vollständigkeit der Reduktion zeigte sich am Fehlen sämtlicher, von RoxA stammender EPR-Signale.

Nach Reduktion wurden verschiedene Proben von rekombinantem RoxA an Luft exponiert und erneut im EPR-Spektrum betrachtet. Die nach kompletter Reoxidation erhaltenen Spektren entsprachen jedoch nicht genau den ursprünglichen oxidierten Spektren von isoliertem RoxA. Das reoxidierte RoxA-Spektrum enthielt nun ein sehr intensives *high-spin*-Signal bei $g \approx 5,97$ (Signalspitze) (Abb. 3.81), unabhängig davon, ob zuvor bereits ein weniger intensives *high-spin* sichtbar war oder keines.

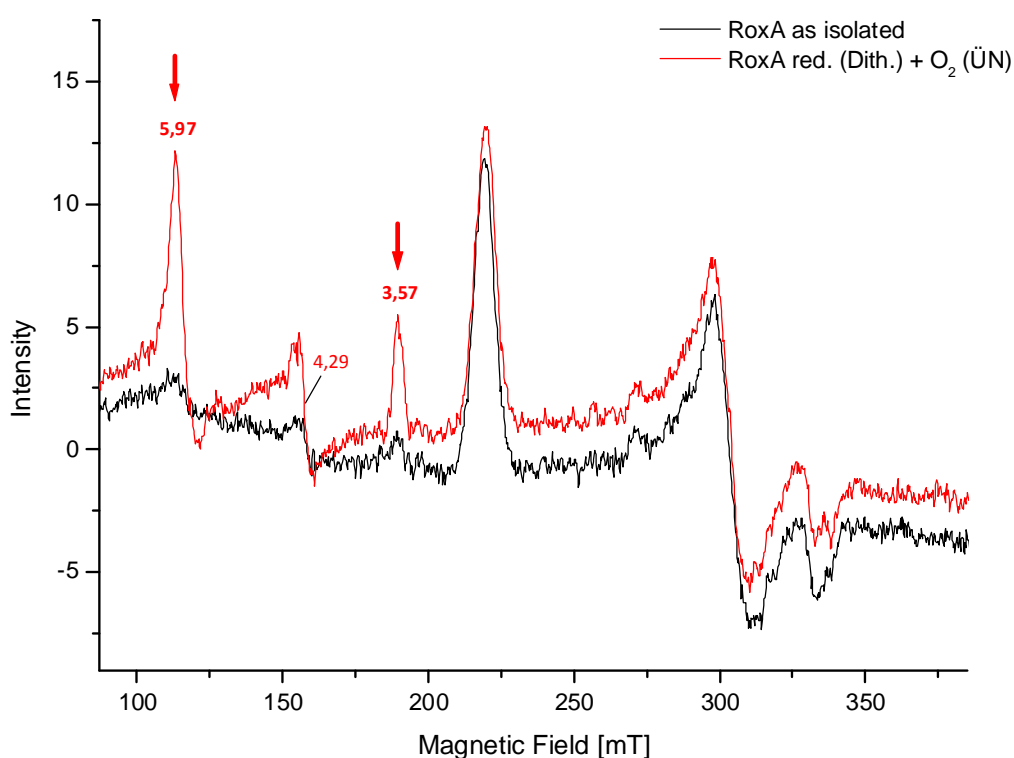


Abb. 3.81: EPR-Spektrum von (rek.) RoxA nach vollständiger Reduktion mit Na⁺-Dithionit (N₂-Atmosphäre) und anschließender vollständiger Reoxidation durch Exposition an Luft über Nacht (ÜN, 4°C) im Vergleich zu RoxA "as isolated". Es stellte sich nach Reoxidation ein intensiveres *low-spin* bei $g=3,57$, v. a. aber *high-spin*-Signal bei $g \approx 6$ ein. Auch das Signal für unspezifisches Fe(III) bei $g \approx 4,3$ nahm zu. Die Signale des zweiten Hämzentrums zeigten keine signifikante Veränderung.

Ebenfalls verstärkte sich danach ein zuvor meist nur intensitätsschwaches *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ (Abb. 3.81). Dies kann als weiterer Beleg für den Ursprung dieser beiden Signale vom gleichen Hämzentrum gedeutet werden. Die sehr wahrscheinlich zum sechsfach (bis-His)-koordinierten Hämzentrum gehörenden *low-spin*-Signale bei $g=3,09$ und $g=2,23$ waren weder in ihrer Intensität (unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Dithionit-Zugabe) noch ihrem g -Wert signifikant verändert.

Mehr noch offenbarten in verschiedenen Stadien im Verlauf der Reoxidation aufgenommene Spektren weitere Unterschiede. Ganz zu Beginn der Reoxidation bzw. bei Anwesenheit einer geringen O_2 -Konzentration traten deutlich zwei verschiedene *high-spin*-Signale im Bereich um $g\approx 6$ auf, eines bei $g=6,14$, ein zweites bei $g=5,95$. Ersteres nahm mit fortschreitender Reoxidation rasch ab bis schließlich nur noch das Zweite sichtbar war. Dieses blieb intensitätsstark und veränderte sich nach vollständiger Reoxidation bei längerer aerober Exposition über Stunden, ggf. Tagen kaum weiter. Oft wurde eine leichte Signalverschiebung von anfänglich $g=5,93$ in Richtung $g=6$ beobachtet (Abb. 3.82, Insert). Nach vollständiger Reoxidation wurde übereinstimmend in jedem dieser Experimente ein gegenüber dem Spektrum von RoxA "as isolated" deutlich intensiveres *high-spin*-Signal bei $g=5,95$ beobachtet. Manchmal wurde zusätzlich bereits zu Beginn der Reoxidation ein schwächeres *high-spin* bei $g\approx 6,6$ gesehen, welches nach der Reoxidation häufig erhalten blieb, gelegentlich zusammen mit einem schwachen Signal bei $g=5,66$ (Abb. 3.82).

Hinsichtlich der Intensität der beschriebenen *high-spin*-Signale wurden versuchsabhängige Unterschiede beobachtet. In manchen Ansätzen wurde das Signal bei $g=5,95$ in höherer Intensität zu einem späteren Zeitpunkt der Reoxidation beobachtet, während ersteres bereits wieder abnahm. In anderen Ansätzen ließ sich eine weitere Zunahme des Signals bei knapp $g=6,0$ nach längerer Exposition an Luft (ÜN) erkennen. Ein weiterer Ansatz dagegen zeigte das Doppelsignal intensiver als die nach Reoxidation persistente Komponente bei $g=5,95$ (Abb. 3.82). Dabei sollte bedacht werden, dass ein solches Spektrum nur eine Momentaufnahme dieses Prozesses darstellt und im Einzelfall nicht genau entschieden werden kann, ob der Scheitelpunkt der Signalintensität bereits überschritten war. Hinzu kommen präparationsabhängige Abweichungen. Ebenso können infolge des Einfrierens der Proben Intensitätsunterschiede, insbesondere des *high-spins* im EPR-Spektrum entstehen, wie es häufig auch bei anderen Hämproteinen wie CCPs zu beobachten ist (s. Kap. 4.8). Im Verlauf dieses Kapitels sind weitere Spektren nach Reduktion und Reoxidation im Zusammenhang mit darauf aufbauenden Versuchsansätzen dargestellt.

Häufig waren im Verlauf der Reoxidation Radikale bei $g\approx 2$ zu beobachten, die jedoch rasch wieder zurückgingen. Sie könnten aus der Anwesenheit von Dithionit-Zerfallsprodukten wie SO_2^- resultieren und im EPR-Spektrum zu Radikalsignalen führen (Yu *et al.*, 2010). Diese entstanden im RoxA-Spektrum jedoch erst nach erneuter Zufuhr von Luft und verschwanden nach längerer Exposition wieder. Wurde der Sauerstoffeintrag durch aktives

Mischen gefördert, ging dies schneller vonstatten. Wahrscheinlicher könnten daher Sauerstoffradikale zu diesen Radikalsignalen führen (s. Kap. 4.8).

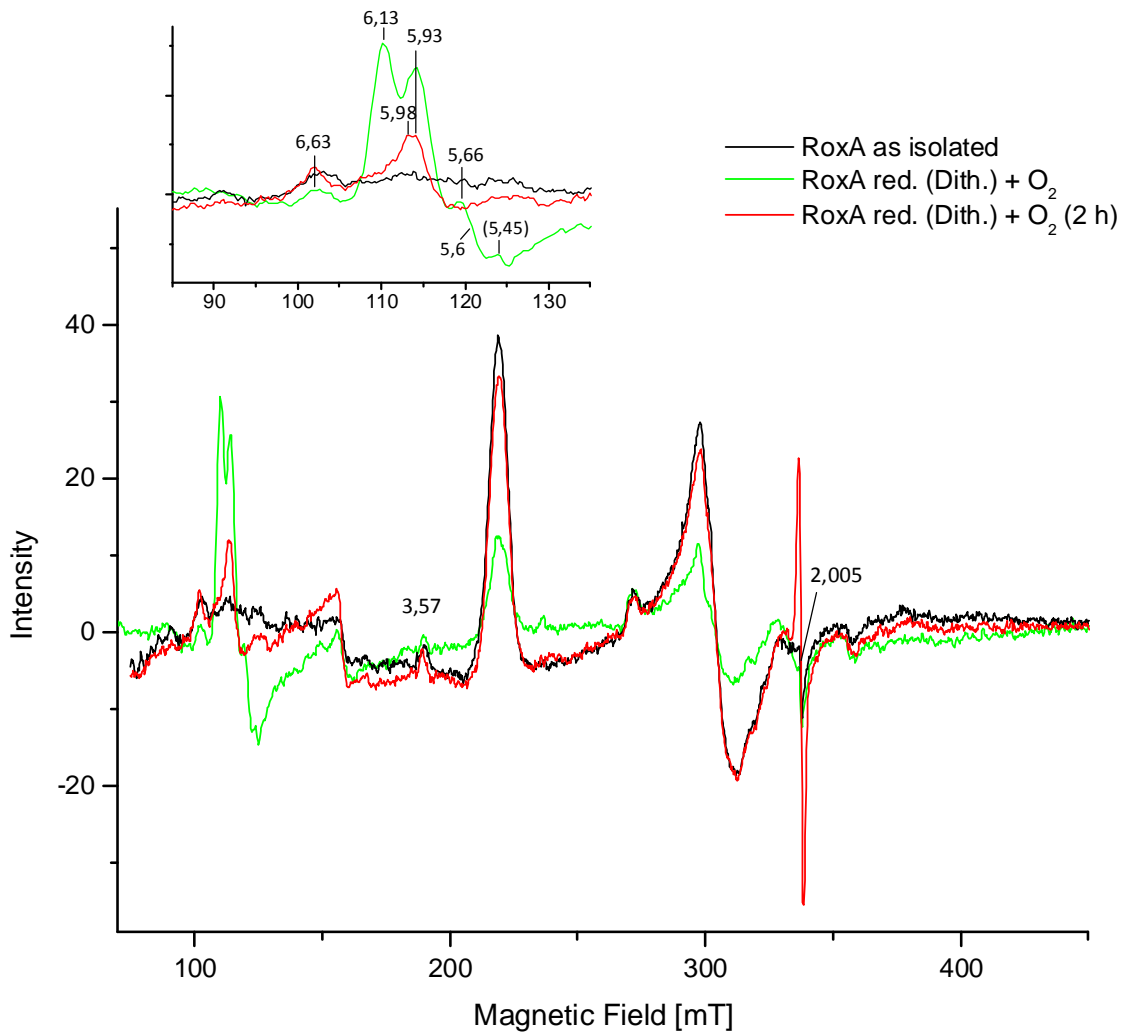


Abb. 3.82: EPR-Spektren von (rek.) RoxA nach Reduktion mit Dithionit zu verschiedenen Zeitpunkten der Reoxidation an Luft im Vergleich zu RoxA "as isolated". Den gezeigten Spektren wurde eine künstliche, signalfreie Grundlinie abgezogen zur verbesserten Ersichtlichkeit von Signalen. Im Insert (oben) ist der Bereich um die *high-spin*-Signale vergrößert dargestellt. Die grüne Kurve zeigt das RoxA-Spektrum kurz nach der Exposition an Luft. Ein starkes doppeltes *high-spin*-Signal bei $g=6,13$ und $5,93$ trat zu Beginn des Reoxidationsprozesses auf, wovon beide Signale, insbesondere aber das Signal bei $g=6,13$ rasch wieder abnahmen. Außerdem waren schwächere Signale bei $g=6,63$, sowie bei $g=5,66$ (Insert) zu sehen. Nach fortschreitender Oxidation blieben nur die Signale bei $g\approx 6,6$ und $g=5,93$ erhalten. Letzteres veränderte sich nach $g=5,98$ (vgl. auch Abb. 3.81; Abb. 3.83). Ein vom gleichen Häm stammendes *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ nahm geringfügig an Intensität zu. Es wurde ein freies Radikal bei $g\approx 2$ beobachtet, welches sich nach längerer Exposition an Luft auflöste (vgl. Abb. 3.88; 3.89).

Ein analoges Experiment wurde auch durch Reoxidation mit dem Oxidationsmittel K^+ -Ferricyanid (FeCy) statt Luftsauerstoff durchgeführt. Dabei wurde einer zuvor unter N_2 -

Atmosphäre vollständig mit Na^+ -Dithionit reduzierten RoxA-Probe Ferricyanid aus einer mit N_2 -Gas anaerobisierten Stammlösung zugegeben. Es wurde die etwa doppelte stöchiometrische Menge zu RoxA eingesetzt und der Ansatz nach 15-minütiger Inkubation auf Eis im EPR-Spektrum betrachtet. Darin zeigten sich die gleichen Auffälligkeiten wie sie auch mit an Luft reoxidierten RoxA-Proben beobachtet wurden (s. o.). Abb. 3.83 zeigt die Differenzspektren abzüglich des jeweiligen Ansatzes nach Reduktion. Ein *low-spin*-Signal bei $g=3,56$ nahm an Intensität zu, insbesondere aber ein vermutlich vom selben Hämzentrum stammendes *high-spin* bei $g=6$. Auch wenn nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass noch Restsauerstoff im Ansatz verblieben war bzw. eventuell nach FeCy-Injektion zugeführt wurde, so spricht die Schnelligkeit der mit einer stöchiometrischen FeCy-Menge eingetretenen Reaktion gegenüber dem erst nach Stunden abgeschlossenen Effekt an Luft eindeutig für die oxidierende Wirkung von Ferricyanid als Urheber der spektralen Veränderungen. Die Zugabe von Ferricyanid zu RoxA "as isolated" führte nicht zu unmittelbar eintretenden Veränderungen des Ausgangsspektrums. Die Inkubation über einen längeren Zeitraum wurde nicht untersucht.

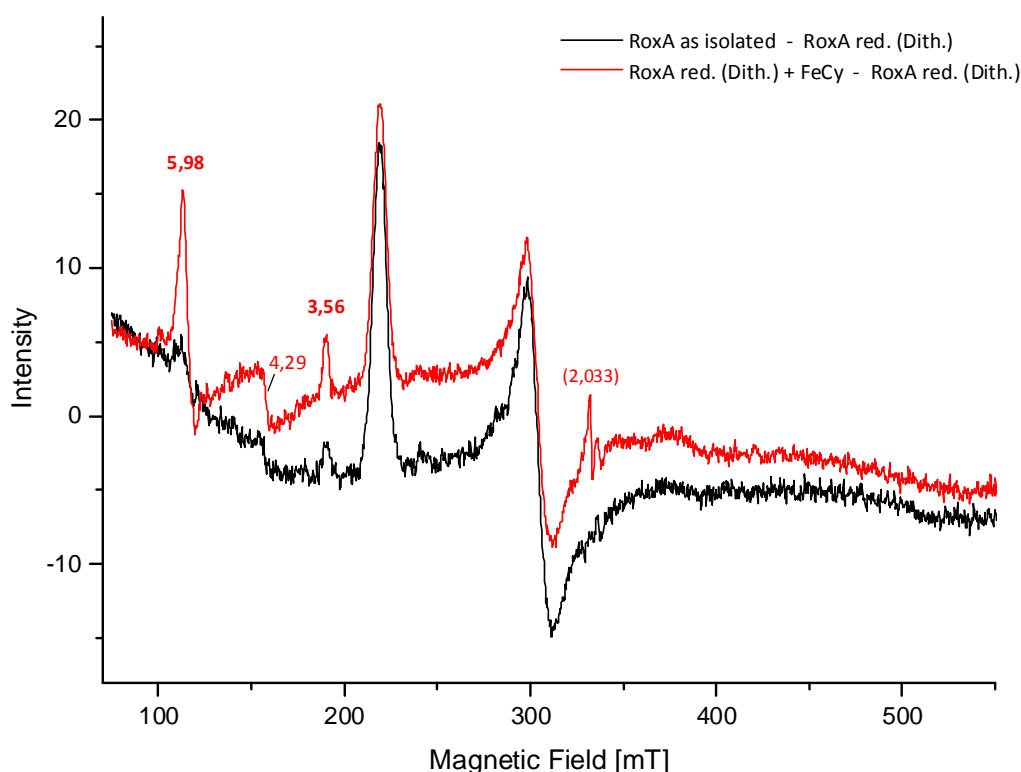


Abb. 3.83: EPR-Differenzspektren nach Abzug des jeweiligen (mit Dithionit) vollständig reduzierten Spektrums von RoxA "as isolated" bzw. reduziertem RoxA ($\approx 100 \mu\text{M}$, N_2) nach Reoxidation mit Ferricyanid ($\text{FeCy} \approx 200 \mu\text{M}$, N_2) nach 15 min auf Eis. Es sind prinzipiell die gleichen Signalveränderungen abzulesen wie nach Reoxidation mit Luftsauerstoff (vgl. Abb. 3.81), jedoch nach deutlich kürzerer Inkubationszeit. Insbesondere nahm ein *high-spin*-Signal bei $g=6$ stark zu, ferner ein vermutlich vom selben Häm stammendes *low-spin* ($g=3,56$) und das Signal für freies Fe(III) ($g=4,3$). Ein Radikal bei $g=2,033$ wurde auch in einem entsprechenden Kontrollansatz mit Ferricyanid und Dithionit beobachtet und hat seinen Ursprung nicht in RoxA, sondern freiem FeCy.

Der Vorgang von Reduktion und Reoxidation führte zu deutlichen Veränderungen der Signale eines der beiden Hämzentren, insbesondere zur Entstehung eines stabilen *high-spin*-Zustands. Offenbar konnte die Reduktion des betreffenden Hämzentrums zum Lösen von distalen Liganden bzw. zu geringen strukturellen Veränderungen in der Hämumgebung führen – ein Hinweis darauf, was nach einer Bindung von Poly(*cis*-1,4-isopren) geschehen könnte.

3.11.3 RoxA mit Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid als ein weiteres Oxidationsmittel führte ebenso kaum zu qualitativen Veränderungen der Häm-signale im EPR-Spektrum, konnte aber die Intensitäten bestimmter Signale beeinflussen. Abhängig von der H_2O_2 -Konzentration nahm das Signal für unspezifisch gebundenes Fe(III) um $g=4,3$ zu. Ebenso wurde ein z. T. sehr intensives Radikal bei $g\approx 2,005$ sichtbar, das mit höherer H_2O_2 -Konzentration stärker erschien (Abb. 3.84 und Abb. 3.85) und zweifelsfrei auf von H_2O_2 stammende Sauerstoffradikale zurückgeht. Da in Kontrollansätzen dieses nicht oder in deutlich geringerer Intensität auftrat, kann eine Beteiligung von RoxA an dessen Entstehung vermutet werden. Mutmaßlich ist eine Reaktion von H_2O_2 mit einem der Hämzentren als Ursache anzunehmen, auf die bereits UV-Vis-Spektren hinwiesen (s. Kap. 3.9.2).

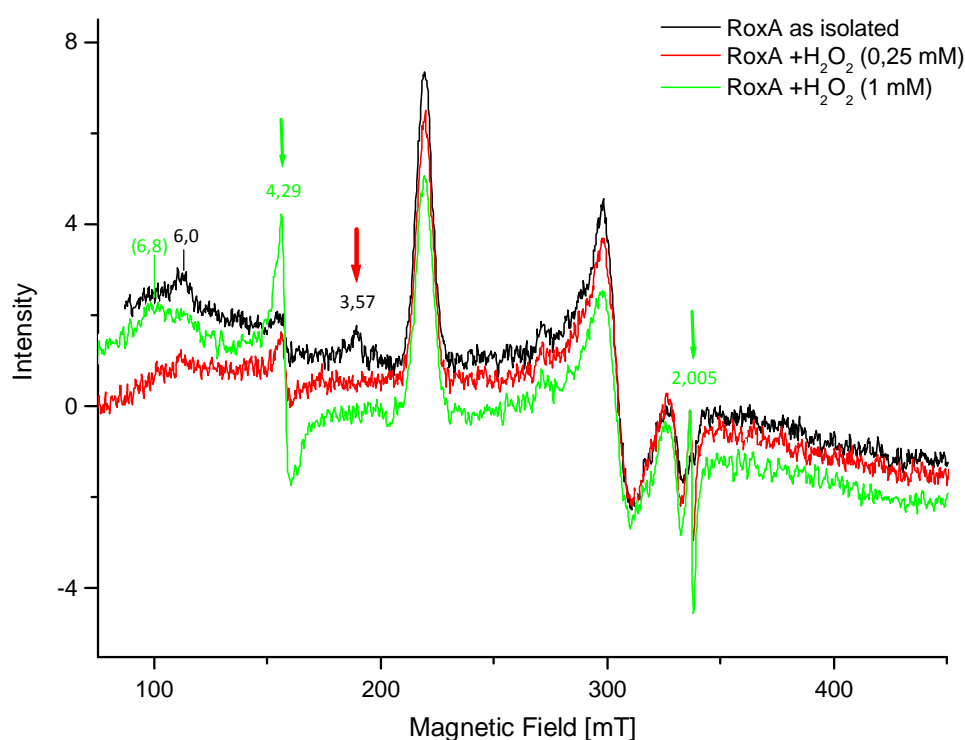


Abb. 3.84: EPR-Spektren von rek. RoxA ($\approx 90 \mu\text{M}$) mit H_2O_2 unter aeroben Bedingungen. Dargestellt ist das Spektrum eines Ansatzes mit H_2O_2 ($250 \mu\text{M}$) nach 20 minütiger Inkubation auf Eis und mit 1 mM nach 2 h. Bereits mit niedriger H_2O_2 -Konzentration kam es zum Verschwinden des *low-spin*-Signals bei $g=3,57$ (roter Pfeil). Eine Verstärkung des Signals für unspezifisch gebundenes Fe(III) und die Entstehung eines Radikals bei $g=2,005$ ist mit höherer H_2O_2 -Konzentration bzw. längerer Inkubation klar ersichtlich (grüne Pfeile). Mit 1 mM H_2O_2 fällt auch eine Veränderung im Bereich der *high-spin*-Signale auf mit einer leichten Signalzunahme bei höherem g -Wert.

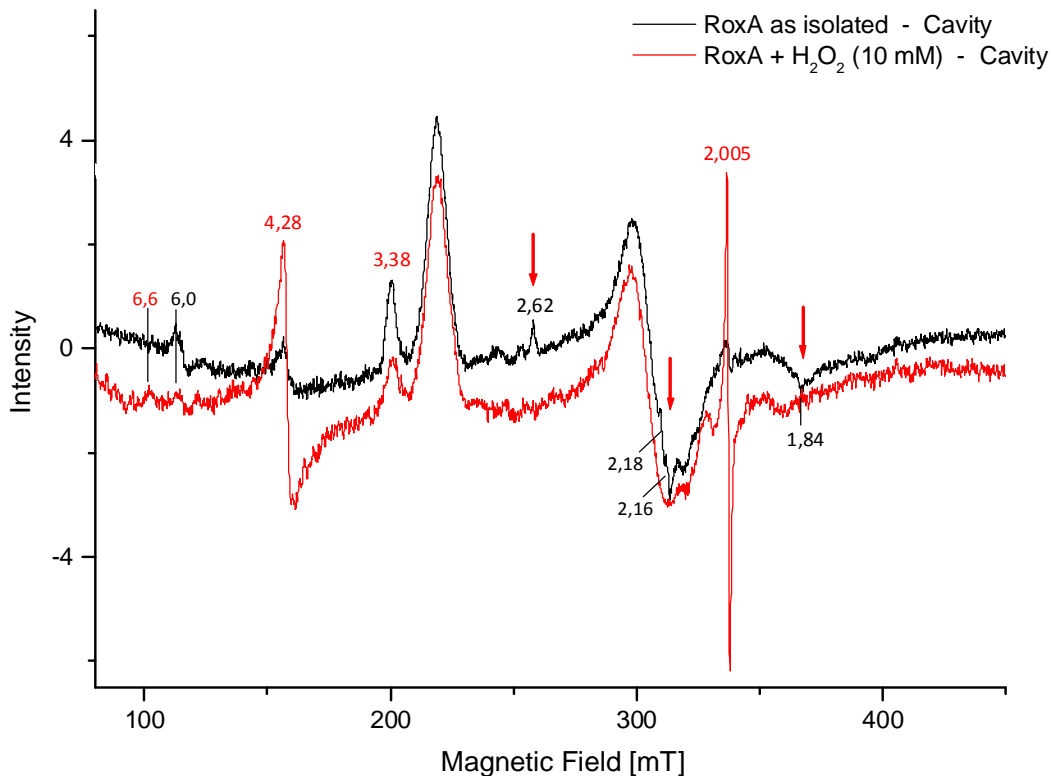


Abb. 3.85: EPR-Spektren von RoxA aus Latexkultur nach kurzer Inkubation (15 min) mit H_2O_2 . Die Spektren sind nach Abzug des gemessenen Hintergrundsignals der Cavity, sowie einer künstlichen, signalfreien Grundlinie zur besseren Veranschaulichung der RoxA-Signale dargestellt. Die Spektren wurden bezüglich der Y-Achse leicht verschoben. Es zeigte sich mit H_2O_2 ein deutliches Signal eines Radikals bei $g=2,005$. Ein *low-spin*-Signal bei $g=3,38$ war in geringerer Intensität noch immer vorhanden. Vom gleichen Hämzentrum stammen vermutlich auch schwache Signale bei $g=2,62$, $g=2,18$ bzw. $2,16$ und $g=1,86$, die in diesem Versuch bereits bei RoxA "as isolated" aus Latexkultur auftraten. Diese lösten sich nach Peroxid-Zugabe auf (rote Pfeile). Leichte Veränderungen traten eventuell auch im Bereich der *high-spin*-Signalen ($6,0$; $6,6$) auf. Das Signal für unspezifisch gebundenes Fe(III) bei $g=4,3$ war deutlich stärker.

Die Zunahme eines *high-spin*-Signals bei $g=6$ wurde nicht beobachtet. Dennoch gab es klare Indizien für eine Reaktion am *low-spin/high-spin*-Hämzentrum. Denn sofern ein *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ bei rekombinantem RoxA "as isolated" sichtbar war, nahm dieses nach H_2O_2 -Zugabe an Intensität ab bzw. verschwand vollständig (Abb. 3.84). Ggf. waren auch Veränderungen im Bereich von *high-spin*-Signalen zu sehen, tendenziell eine leichte Zunahme bei $g\approx 6,6$ mit höheren H_2O_2 -Konzentrationen. Bei RoxA aus Latexkultur nahm das entsprechende *low-spin*-Signal ($g=3,39$) bei nur kurzer Inkubation mit einem H_2O_2 -Überschuss an Intensität ab (Abb. 3.85).

Insbesondere bei RoxA aus Latexkultur waren bereits im "as isolated"-Zustand gelegentlich intensitätsschwache *low-spin*-Signale bei $g=2,62$, bzw. $g=2,16$ und um $g=1,86$ zu beobachten, von denen ein Ursprung am gleichen Hämzentrum vermutet wird, von dem das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ bzw. *high-spin*-Signale stammen. Nach Zugabe von H_2O_2 lösten

sich diese *low-spin*-Signale vollständig auf (Abb. 3.85), während solche bei $g=3,09$ und $2,23$ gleich blieben. Dies kann als Beleg für die Reaktion mit dem entsprechenden, zumindest partiell fünffach koordinierten Hämzentrum gedeutet werden. Die Zunahme des $g=4,3$ -Signals weist im Einklang mit der starken Abnahme der Hämabsorption im optischen Spektrum auf die Zerstörung eines Fe-Zentrums hin.

3.11.4 RoxA unter anaeroben Bedingungen

Durch die Beobachtung von Veränderungen des optischen Spektrums von RoxA, die einer dem Effekt partiellen Reduktion ähnelten, während der Exposition unter Sauerstoffausschluss war die Frage aufgeworfen worden, ob O_2 bereits im isolierten Zustand des Enzyms an einem der Hämzentren gebunden sein könnte. Zudem waren, wenn auch nicht reproduzierbar, Unterschiede im optischen Spektrum zwischen der Exposition unter geringem Sauerstoffpartialdruck (Vakuum) und unter N_2 -Atmosphäre festgestellt worden. Eine Untersuchung mit EPR-Spektroskopie sollte beim Verständnis der Ursachen helfen. Da O_2 ein Substrat der Latexspaltung ist, waren unabhängig von diesen Beobachtungen auch Versuche bei Abwesenheit von O_2 und Anwesenheit von Substrat(en) interessant, die in Kap. 3.11.8 beschrieben sind.

Analog zur fehlenden Klarheit der Veränderungen unter Sauerstoffausschluss im UV-Vis-Spektrum, zeigten auch EPR-Spektren keine eindeutigen Veränderungen an. Mit rekombinantem RoxA offenbarten sich unter N_2 -Atmosphäre keine unmittelbaren, nach längerer Inkubation bisweilen geringe, nicht signifikante Abweichungen vom Ausgangsspektrum. In einigen Ansätzen wurden minimale Veränderungen an Signalen beobachtet, die vermutlich dem *high-spin*-/*low-spin*-Häm zuzuordnen sind. Deren Signifikanz muss insgesamt bezweifelt werden, auch zumal sich andere Ansätze von rekombinantem RoxA selbst nach mehrtägiger Inkubation mit dem Ausgangsspektrum deckten. Auch der Vergleich von RoxA "as isolated", das in EPR-Schliff Röhrchen durch mehrere Einfrier-Auftau-Zyklen unter Vakuum (ca. 10^{-2} mbar) entgast worden war, zeigte nach viertägiger Exposition ($4^\circ C$) je eines Ansatzes unter Vakuum, unter N_2 - bzw. unter Argon-Atmosphäre keinen signifikanten Unterschied an. Da jedoch im Falle einer Reduktion eines Häm-Eisens nach Entfernung eines möglicherweise koordinierten O_2 -Moleküls das Hämzentrum durch EPR unsichtbar bliebe, lassen sich entsprechende Zustände schwer detektieren. Es sei auch zu bedenken, dass spektrale Veränderungen in Abhängigkeit von der Vollständigkeit der Anoxie unterschiedlich schnell und generell nur langsam eintraten, ein direkter Vergleich verschiedener Messungen, insbesondere auch entsprechenden Ansätzen der UV-Vis-Spektroskopie daher schwierig ist.

Mit rekombinantem RoxA wurden somit keine signifikanten Veränderungen des EPR-Spektrums unter anaeroben Bedingungen beobachtet. In einer Präparation von RoxA aus Latexkultur in 20 mM Tris/HCl (pH 8) wurden dagegen nach mehrstündiger anaerober Inkubation (Argon) auffällige Veränderungen beobachtet, die in einem Kontrollansatz an Luft nicht zu sehen waren (Abb. 3.86). Es handelte sich dabei um zwei neu auftretende *low-spin*-Signale bei $g=2,8$ und $g=2,6$, die in Ausnahmefällen auch schon in geringer Intensität bei RoxA "as isolated" früherer Präparationen aus Latexkultur aufgefallen waren (vgl. Abb. 3.85). Weitere Signalkomponenten zeigten sich um $g=1,85$ bzw. $g\approx 1,7$, sowie Signale bei $g=2,189$ bzw. $2,167$ (Signalspitze), die vermutlich mit je einem der beiden erstgenannten zusammen einen Teil je einer rhombischen Hämспеzies darstellen. Alle Signale konnten auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Latex beobachtet werden, sowie in intensiverer Ausprägung bei mittels NADH/PMS unter Sauerstoffausschluss (Argon) teilreduziertem RoxA.

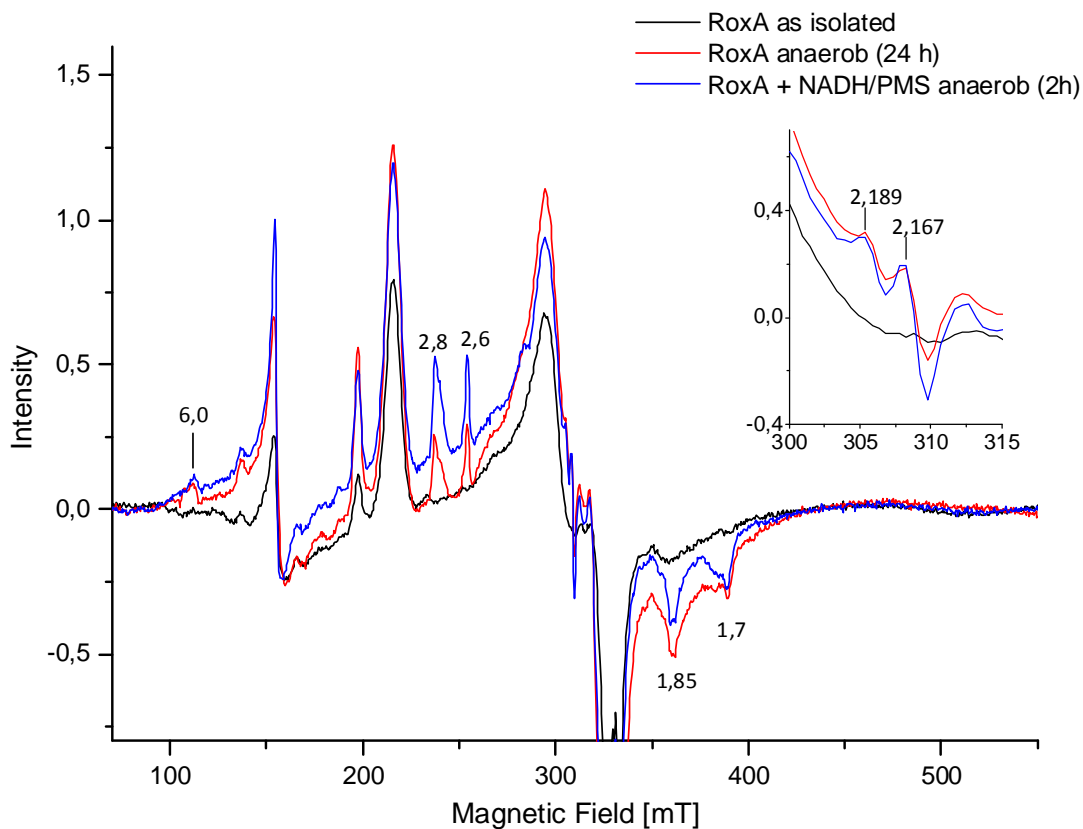


Abb. 3.86: EPR-Spektren einer Präparation von RoxA aus Latexkultur (ca. 7 mg/ml) in 20 mM Tris/HCl (pH 8) unter anaeroben Bedingungen (Argon) bzw. nach anzunehmender Teilreduktion mit einer zu RoxA stöchiometrischen Menge NADH (Mediator PMS, anaerob). Es traten in beiden Fällen die qualitativ gleichen Signale auf, zwei *low-spin*-Signale bei $g=2,8$ und $2,6$ und zwei zugehörige Signale bei $g=1,85$ und $g\approx 1,7$, sowie ein doppeltes Radikalsignal bei $g=2,189$ und $2,167$. Letztere sind im Insert vergrößert dargestellt. Ein wenig intensives *high-spin*-Signal um $g=6$ wurde zudem beobachtet. Das Spektrum eines Parallelansatzes an Luft entsprach demjenigen von RoxA "as isolated".

Alle neu aufgetretenen Signale könnten verschiedene Zustände desselben Hämzentrums, nämlich des *low-spin-/high-spin* -Häms beschreiben. So ist eine durch den langen Expressionszeitraum (14 Tage) begünstigte Inhomogenität dieser Präparationen möglich. Diese Signaländerungen ließen sich in Versuchen mit rekombinantem RoxA nach Zugabe von NADH/PMS nicht erreichen. Da aber ein Parallelansatz des in Abb. 3.86 dargestellten Versuches mit RoxA aus Latexkultur an Luft keine signifikanten Änderungen zum Ausgangsspektrum zeigte, können diese die Vermutung stützen, dass – wie auch im optischen Spektrum (s. Kap. 3.9.3) – allein der Entzug von O₂ Veränderungen an einem Hämzentrum bewirken kann und sämtliche Signale einen Ursprung in RoxA haben. Darauf wies ebenso das nach Zugabe von H₂O₂ aufgenommene EPR-Spektrum des in Abb. 3.86 dargestellten Ansatzes mit NADH/PMS (anaerob) hin. Die beschriebenen Veränderungen kehrten sich innerhalb kurzer Zeit (Minuten) vollständig um, einhergehend mit einer Zunahme des g=4,3-Signals. Davon abgesehen ähnelte das Spektrum wieder demjenigen von RoxA "as isolated" (ohne Abb.).

3.11.5 Die Wirkung externer Häm-Liganden

Lineare, N-enthaltende Verbindungen wie Hydrazin und Diphenylamin, die RoxA stark inhibierten, bewirkten eine deutliche Zunahme des Signals für Nicht-Häm-Fe(III) bei g=4,3, sowie eine Abnahme der typischen Hämsignale mit längerer Inkubation. Dies deutete auf eine teilweise Zerstörung des Enzyms bzw. der Hämzentren hin, die in den Proben bereits anhand von Präzipitation und leichter Rotbraun-Färbung zu erkennen war. Eine Neuentstehung oder vollständiger Verlust von Signalen wurde nicht beobachtet (ohne Abb.).

Die Zugabe bestimmter typischer Hämliganden mit Ähnlichkeit zum Imidazolring von Histidin hatte auffällige charakteristische Veränderungen des optischen Spektrums einer RoxA-Präparation zur Folge und führte meist zu einer deutlichen Einschränkung der RoxA-Aktivität (Kap. 3.9.6). Insgesamt sprachen die Beobachtungen einheitlich für eine Bindung dieser Substanzen an einer freien Fe-Bindestelle eines der beiden Hämzentren in RoxA. Auf das Vorliegen einer solchen hatten, wie bereits beschrieben, *high-spin*-Signale um g=6,0 im EPR-Spektrum hingewiesen (s. o.). Im Falle einer Bindung eines starken Hämliganden wie Imidazol sollte sich das entsprechende Hämzentrum vorwiegend im *low-spin*-Zustand befinden. Es wurde die Auswirkung der Zugabe von Imidazol und Pyridin auf das Spektrum von RoxA "as isolated", nach Reduktion und nach Reoxidation durch O₂ mittels EPR-Spektroskopie untersucht.

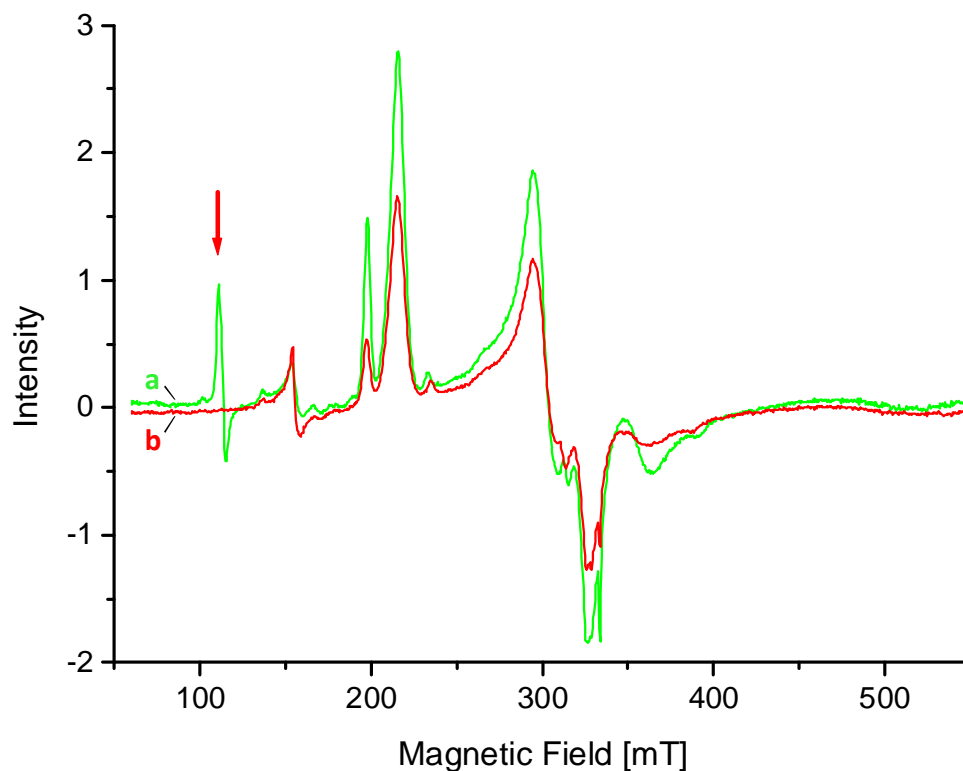


Abb. 3.87: EPR-Spektren von RoxA "as isolated" (5 mg/ml) aus Latexkultur (a, grün) in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8) und dem gleichen Ansatz versetzt mit Imidazol (10 mM) nach 30 min (b, rot). Die geringere Intensität der roten Kurve ist u. a. durch die Verdünnung des Ansatzes nach Imidazol-Zugabe verursacht. Ein *high-spin*-Signal bei ca. $g=6,0$ (roter Pfeil) verschwand nach Zugabe von Imidazol vollständig. Das *low-spin*-Signal um 200 mT bei $g=3,33$ war weniger intensiv (aus: Schmitt *et al.*, 2010).

Sowohl bei rekombinantem RoxA als auch bei RoxA aus Latexkultur nahm bei Anwesenheit des externen Hämliganden Imidazol ein bestehendes *high-spin*-Signal bis zu dessen gänzlichem Verschwinden ab. Abb. 3.87 zeigt die Veränderungen am Spektrum von RoxA aus Latexkultur nach Inkubation mit einem Überschuss an Imidazol (10 mM). Das *low-spin*-Signal bei $g=3,33$ war in seiner Intensität relativ zum Signal bei $g=3,09$ vermindert, das Signal für unspezifisch gebundenes Fe(III) bei $g=4,3$ (ca. 150 mT) nahm an Intensität zu.

Die Auflösung des *high-spins* in Gegenwart von Imidazol war ebenso bei rekombinantem RoxA festzustellen. Auch die Zugabe von Pyrazol resultierte erwartungsgemäß in der Abnahme von *high-spin*-Signalen. Eine bereits beim Experiment mit Latex-RoxA vermutete Auswirkung auch auf das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ deutete sich bei rekombinantem RoxA durch eine Signalabnahme- bzw. -verbreiterung mit Imidazol oder einer Veränderung des g -Wertes mit Pyridin an. Da bei rekombinantem RoxA "as isolated" diese Signale oft nur schwach ausgeprägt waren, wurden entsprechende Experimente nach Reduktion und anschließender Reoxidation durchgeführt. Dabei wurde die unter Kap. 3.11.2 beschriebene Verstärkung bzw. Entstehung vom entsprechenden Hämzentrum stammender *high*- und *low-spin*-Signale ausgenutzt. Es wurde nach Reoxidation von reduzierten RoxA-

Proben Imidazol bzw. Pyridin (5 mM) zugegeben. In weiteren Experimenten wurden Ansätze von RoxA mit dem jeweiligen Liganden mittels Dithionit-Zugabe reduziert und anschließend an Luft reoxidiert. Nach Addition des jeweiligen Hämliganden zur reoxidierten RoxA-Probe verminderte sich ein intensives *high-spin*-Signal bei $g=6,0$ mit zunehmender Inkubationszeit deutlich bis zu dessen Verlust. Bei den RoxA-Proben, zu denen die Liganden bereits vor der Reduktion zugegeben worden waren, unterblieb die Entstehung von *high-spin*-Signalen nahezu vollständig. Ebenso klar traten Veränderungen am *low-spin*-Hämsignal bei $g=3,57$ auf. Kontroll-Messungen der jeweiligen Liganden im verwendeten Puffer zeigten keine Störsignale der Verbindungen ohne Anwesenheit von RoxA an. Erneut weist dies auf die Zusammengehörigkeit dieser Signale zu einem Hämzentrum hin.

Abb. 3.88 zeigt das Verschwinden von *high-spin*-Signalen bei $g\approx 6,6$ und $g\approx 6,0$ in reoxidiertem rekombinantem RoxA "as isolated" nach anschließender Inkubation mit Imidazol (10 mM) für eine Stunde auf Eis. Ebenso war ein schwaches *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ nun kaum mehr zu sehen bzw. verbreitert.

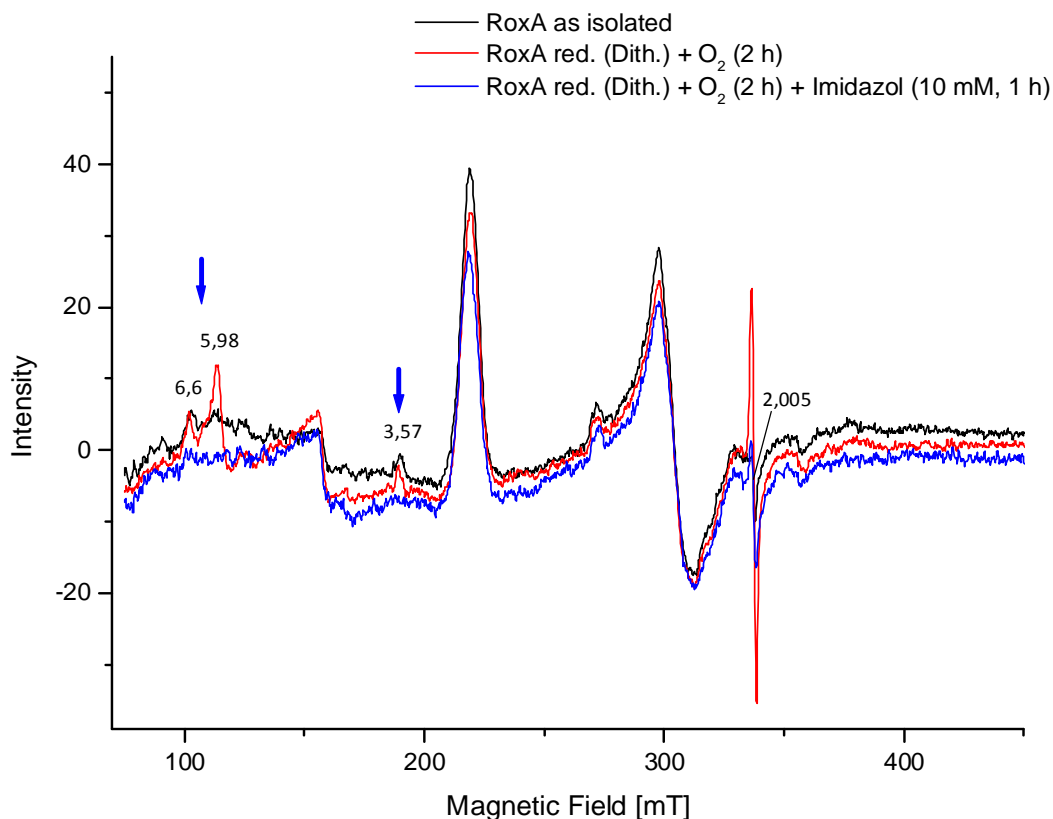


Abb. 3.88: EPR-Spektren von RoxA nach Reduktion mit Dithionit und Reoxidation an Luft (2 h), sowie anschließender Inkubation mit Imidazol (10 mM, 1 h). Die Spektren sind in Y-Richtung leicht versetzt und nach Abzug einer künstlichen, signalfreien Grundlinie zum besseren Vergleich der Signale dargestellt. Im Spektrum bei Anwesenheit von Imidazol sind die *high-spin*-Signale um $g\approx 6,6$ und $g\approx 6,0$ nicht mehr zu sehen, ebenso nur noch ansatzweise das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ (blaue Pfeile). Ein aus der Anwesenheit von Dithionit resultierendes Radikal bei $g\approx 2$ ging bei längerer Inkubation an Luft zurück.

Wiederum war auch ein starkes freies Radikal bei $g=2,005$ zu erkennen, das aber mit fortschreitender Exposition zurückging, und auf von Dithionit stammende Radikale zurückgehen könnte. Ein solches Radikal wurde auch in Ansätzen mit Imidazol beobachtet, wobei diese Signale in Abb. 3.88 und Abb. 3.89 mit Imidazol geringer erscheinen. Abb. 3.89 veranschaulicht die Veränderungen eines Ansatzes, welcher bei Anwesenheit von Imidazol reduziert und reoxidiert wurde. Diese entsprachen den soeben beschriebenen Effekten.

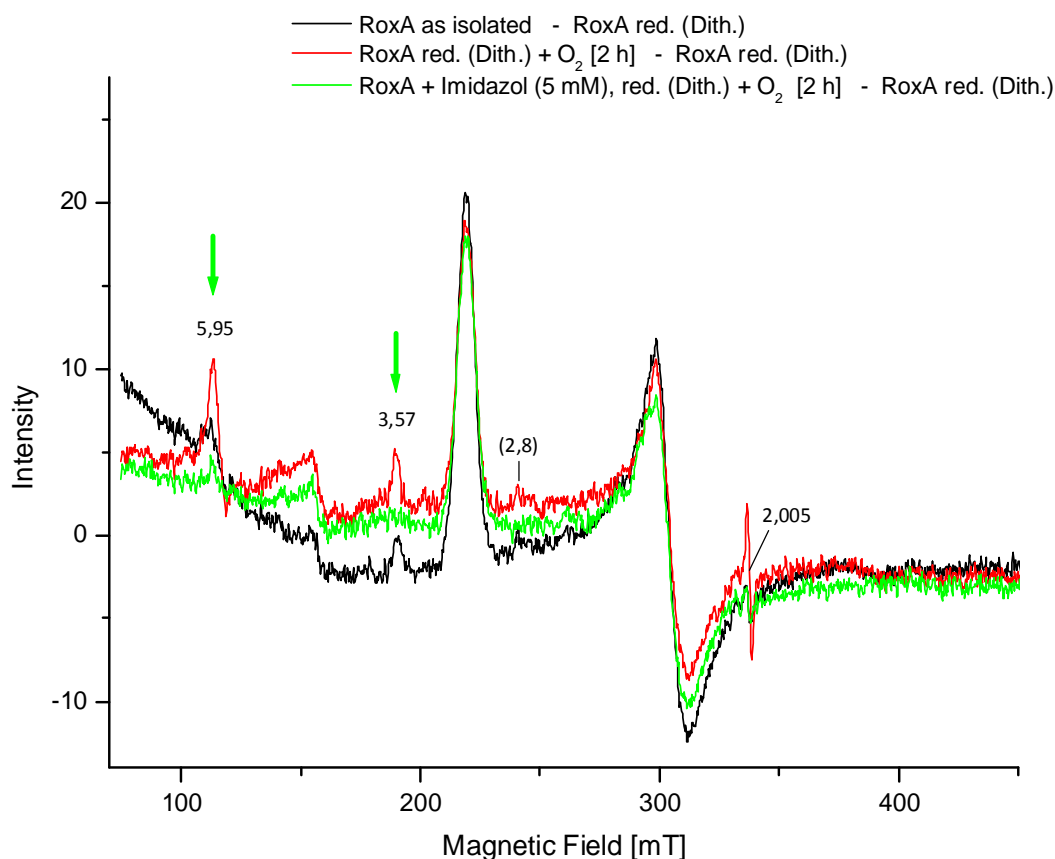


Abb. 3.89: EPR-Differenzspektra [– reduziertes RoxA (Dith.)] von Dithionit-reduziertem RoxA mit (grün) und ohne (rot) Imidazol (5 mM) nach Reoxidation an Luft für 2 h im Vergleich zu RoxA "as isolated", jeweils nach Abzug des Spektrums von vollständig reduziertem RoxA. Die Anwesenheit von Imidazol konnte die Neuentstehung des *low-spin*-Signals bei $g=3,57$ und des *high-spin*-Signals bei $g=5,95$ nach Reduktion in einem vergleichbaren Ansatz ohne Imidazol weitgehend unterbinden. Ein weiteres, schwaches *low-spin*-Signal bei $g=2,8$ verschwand ebenfalls durch die Anwesenheit von Imidazol. Im Ansatz ohne Imidazol zeigte sich nach Reduktion noch ein freies Radikal bei $g\approx 2$.

Entsprechend führte auch die Anwesenheit von Pyridin zur Abnahme bzw. Eliminierung eines *high-spin*-Signals bei $g\approx 6$. Doch unterschied sich das EPR-Spektrum zu dem von Imidazol hinsichtlich des *low-spin*-Signals bei $g=3,57$. Eine zunächst dort auftretende *low-spin*-Komponente verschob sich mit Pyridin innerhalb kürzester Zeit vollständig nach $g=3,33$ (Abb. 3.90). Dies kann übereinstimmend mit der Abnahme eines *high-spin*-Signals eindeutig durch eine Änderung des fünffach koordinierten Hämzentrums infolge der Bindung eines

unterschiedlichen Liganden erklärt werden. Die Schnelligkeit der Reaktion mit Pyridin (5 min) erscheint plausibel, da auch die im UV-Vis-Spektrum eingetretenen Änderungen schneller erfolgten als mit Imidazol. Offenbar sind N-heterozyklische Häm-Liganden auch in der Lage, einen stärkeren Liganden zu verdrängen, der die sechste Koordinationsstelle im *low-spin*-Zustand einnimmt.

Es fiel eine Ähnlichkeit des mit Pyridin erhaltenen *g*-Wertes des 1. *low-spin*-Signals mit bei RoxA aus Latexkultur gefundenen *g*-Werten (3,39 bzw. 3,33) auf. Eine Verschiebung des *g*-Wertes von $g \approx 3,57$ nach 3,33 wie nach Pyridin-Zugabe war mit Imidazol nicht zu beobachten. Dafür war das Signal bei $g \approx 3,57$ deutlich vermindert und verbreitert. Die Ergebnisse weiterer Versuche mit Häm-Liganden bei gleichzeitiger Anwesenheit von Substraten sind in Kap. 3.11.10 dargestellt.

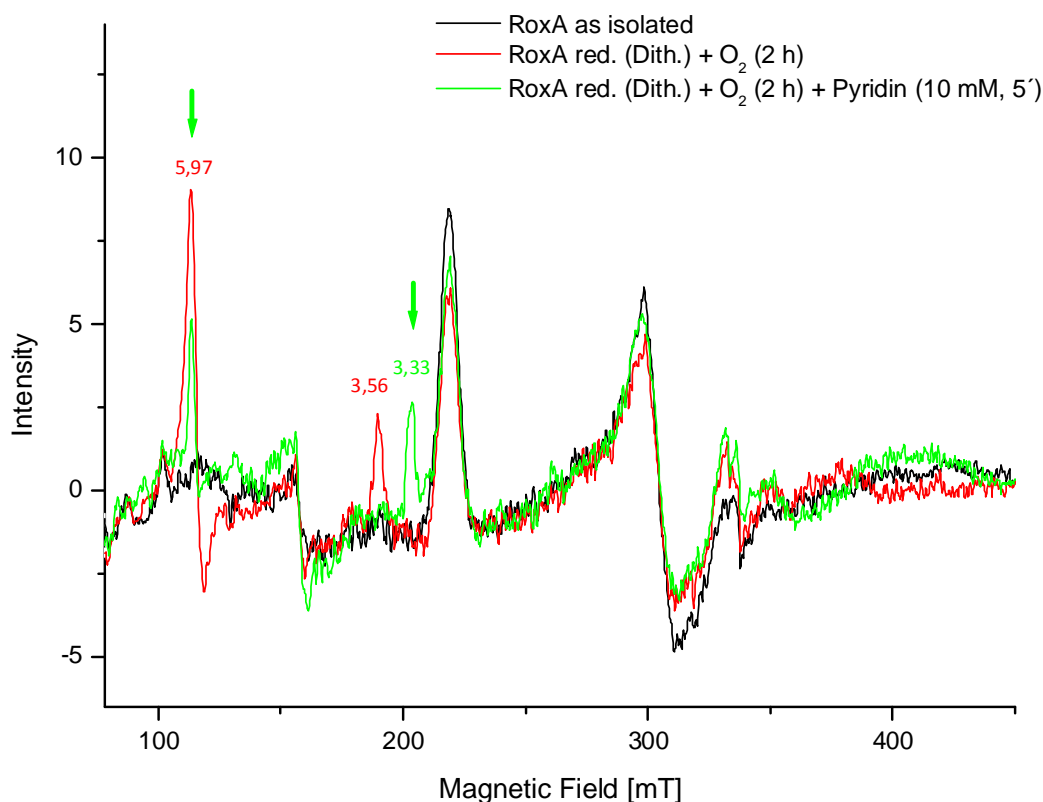


Abb. 3.90: EPR-Spektren von RoxA nach Reoxidation an Luft mit und ohne Zugabe von Pyridin (10 mM) nach vorheriger Reduktion mit Dithionit. Den dargestellten Spektren wurde eine künstliche, signalfreie Grundlinie zum besseren Vergleich abgezogen. Bei dieser Präparation wies das Spektrum von RoxA "as isolated" ein nur kaum erkennbares *low-spin*-Signal bei $g = 3,56$ auf (schwarz). Nach Reduktion und Reoxidation entstand eine deutliche Komponente mit diesem *g*-Wert, sowie ein sehr intensives *high-spin*-Signal bei $g = 5,97$ (rot). Nach Zugabe von Pyridin war nach nur 5 min eine klare Abnahme des *high-spins* zu erkennen, die sich weiter fortsetzte. Das *low-spin*-Signal bei $g = 3,57$ ging vollständig zurück und wurde nun intensitätsgleich bei $g = 3,33$ gefunden (grüne Pfeile).

Bei den Versuchen der anaeroben Inkubation von RoxA war aufgefallen, dass eingetretene Veränderungen im optischen Spektrum nicht nur durch die Zufuhr von Sauerstoff, sondern auch allein durch die Zugabe des Oxidationsmittels Ferricyanid behoben werden konnten. Darüber hinaus zeigten UV-Vis-Spektren bei Versuchen mit RoxA zusammen mit Häm-liganden wie Imidazol und Pyridin, dass Ferricyanid im Überschuss zu RoxA auch die spektralen Veränderungen umkehren konnte, die bei Anwesenheit von Luftsauerstoff eingetreten waren. Fraglich war dabei, ob das Lösen der Ligandenbindung am Häm-Eisen für die Umkehr der Effekte verantwortlich war (s. Kap. 3.9.6.4). Dies sollte nun durch EPR-Spektroskopie untersucht werden. Ein entsprechender Ansatz von RoxA ($\approx 70 \mu\text{M}$) mit Imidazol (5 mM) wurde nach Reduktion mit Dithionit und Reoxidation (s. Abb. 3.89) über Nacht an Luft gehalten. Nun wurde Ferricyanid (1 mM) zugegeben und das EPR-Spektrum nach drei Stunden mit dem ohne Ferricyanid verglichen. Tatsächlich wurde wiederum ein *low-spin*-Signal von ähnlichem g-Wert beobachtet, wie es in EPR-Spektren von RoxA "as isolated" bzw. nach Reoxidation von reduziertem RoxA enthalten war, und sich nach Zugabe von Imidazol aufgelöst hatte. Das Signal war aber insgesamt dem ursprünglichen gegenüber verbreitert und intensiver (Abb. 3.91) (s. Kap. 4.9.4.2).

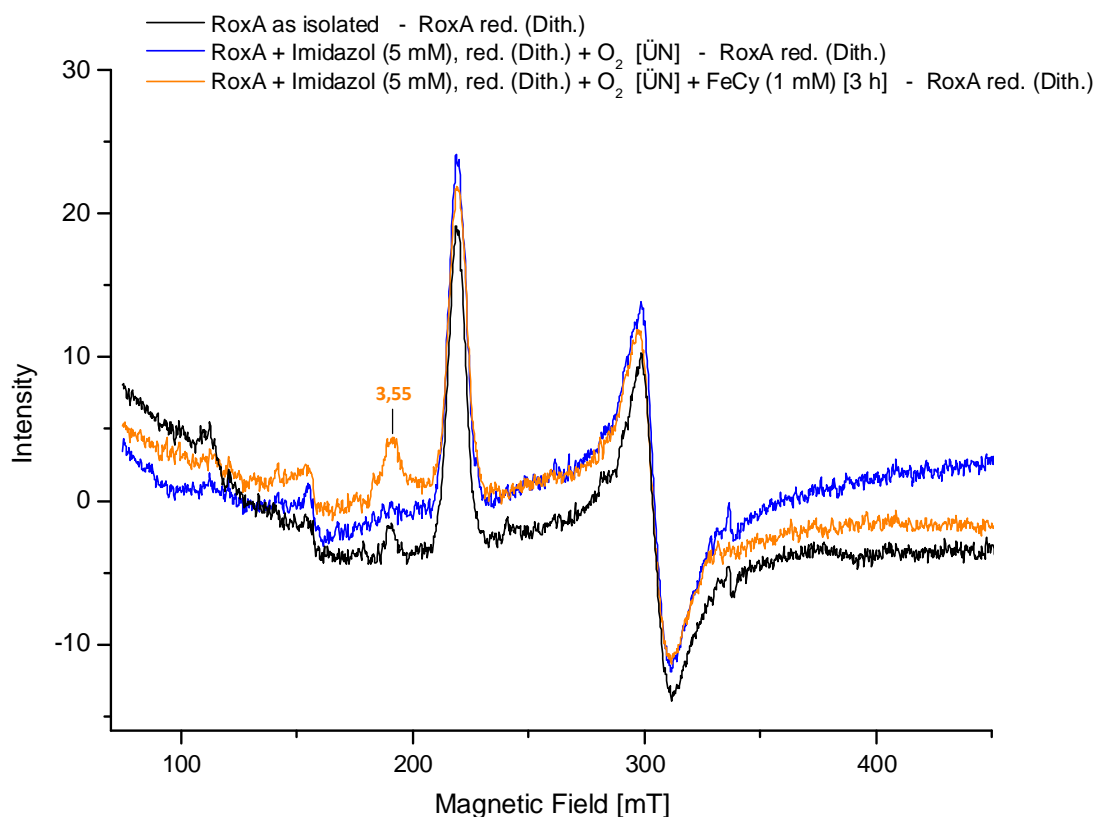


Abb. 3.91: EPR-Differenzspektrern [– reduziertes RoxA (Dith.)] von mit Dithionit reduziertem RoxA ($\approx 70 \mu\text{M}$) mit Imidazol (5 mM) nach einer Reoxidation an Luft über Nacht (ÜN) und anschließender Zugabe von Ferricyanid. Es wurde das Spektrum eines vollständig reduzierten Ansatzes von RoxA abgezogen. Es handelt sich um den gleichen, in Abb. 3.89 (grün) dargestellten Versuchsansatz. Anstelle des nach Inkubation mit Imidazol verschwundenen *low-spins* bei $g=3,57$ entstand nach FeCy-Zugabe ein ähnliches, doch intensiveres Signal ($g=3,55$) (orange). Die übrigen Signale, auch ein vermutlich vom gleichen Hämzentrum stammendes *high-spin* waren nicht von einer Änderung betroffen.

Ein klareres Bild der Wirkung von Ferricyanid zeichnete sich im entsprechenden Versuch mit Pyridin. Denn hierbei waren das ursprüngliche Signal bei $g=3,57$ und das nach Pyridin-Bindung neu entstandene bei $g=3,33$ gut zu trennen. Die Zugabe von Ferricyanid führte hierbei nicht etwa zur erneuten Entstehung der $g=3,57$ -Spezies, sondern zu einer Intensivierung des Signals bei $g=3,33$. Diese Beobachtung ist mit dem Lösen einer Ligandenbindung nicht vereinbar und lässt komplexere Ursachen vermuten. Auch stellten sich durch Ferricyanid-Zugabe keine *high-spin*-Signale ein wie sie nach einer Reoxidation ohne Anwesenheit eines Hämliganden zu beobachten waren. Der Rückgang einer partiellen Reduktion im UV-Vis-Spektrum und der Zunahme eines Fe(III)-Zustandes im EPR-Spektrum erscheint angesichts der oxidierenden Wirkung von Ferricyanid plausibel. Aus der übergeordneten Analyse der EPR-Spektren und weiterer Ergebnisse der Spektroskopie ergab sich eine aus dem Oxidationszustand folgernde Erklärungsmöglichkeit, die unter Voraussetzung der in Kap. 3.9.3 aufgestellten Hypothese einer möglichen O₂-Bindung in RoxA "as isolated" in Kap. 4.6 erläutert wird und nur mit Blick auf die Gesamtheit der Ergebnisse diskutiert werden kann.

Die Versuche mit Hämliganden wie Imidazol und Pyridin belegten, dass eines der beiden Hämzentren in RoxA für externe Liganden bzw. Substrate zugänglich sein muss. Zusätzlich ließen sie einen Zusammenhang zwischen einem *high-spin* Signal bei $g \approx 6$ mit dem ersten *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ (rek. RoxA) erkennen und zeigten weitere Signale auf, die vom gleichen Hämzentrum stammen könnten.

3.11.6 Die Wirkung Substrat-ähnlicher Verbindungen

Bei EPR-Spektroskopie ist die Entstehung von Signalen allein an das Auftreten von ungepaarten Elektronen gebunden. Eine Trübung von Proteinlösungen durch Zugabe unlöslicher Substrate stören die Messungen nicht im Gegensatz zur UV-Vis- und CD-Spektroskopie. Daher konnten mittels EPR auch Emulsionen mit Kautschuklatex und ähnlichen, nicht wasserlöslichen Substraten untersucht werden.

Die Anwesenheit des eigentlichen RoxA-Substrates Poly(*cis*-1,4-isopren) veränderte das EPR-Spektrum von RoxA "as isolated", insbesondere bei Präparationen von rekombinantem Enzym, sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen zunächst meist kaum. Daher wurden auch zum Substrat ähnliche, nicht polymere Verbindungen wie β -Carotin, α -Tocopherol, Squalen (2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexen) oder Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) (s. Abb. 3.92) auf ihre Wirkung auf die EPR-Signale von RoxA untersucht. Während im optischen Spektrum von RoxA in Gegenwart von β -Carotin (Emulsion) keine Veränderungen zu sehen waren (s. Kap. 3.9.5), wurden mit EPR-Spektroskopie Unterschiede offenbar.

Hervorzuheben ist die Entstehung eines deutlichen, schmalen Signals mit einem g -Wert von 2,16. Dieses wurde ebenso in entsprechenden Ansätzen mit α -Tocopherol (1 mM) (s. Abb. 3.93) und ähnlichen Substanzen (s. u.) beobachtet und war in Kontrollansätzen mit diesen Substanzen ohne RoxA nicht zu sehen. Präparationsabhängig waren intensitätsschwache Signale bei $g=2,18$ und 2,16 aber auch in Proben von RoxA "as isolated" aus Latexkultur festzustellen (s. ansatzweise auch Abb. 3.93, schwarz). Daneben entstanden mit diesen Substanzen weitere Veränderungen im EPR-Spektrum. Sowohl mit β -Carotin als auch mit α -Tocopherol, Pristan und Squalen traten neue Signale mit jeweils gleichen g -Werten auf, was auf die Entstehung gleicher Veränderungen hindeutet (s. Abb. 3.94, 3.95). Ein Signal bei $g=2,16$, war in allen Fällen zu beobachten. Dieses wurde ursprünglich aufgrund seiner geringen Breite als gebundenes Radikal interpretiert, da es vom Wert des freien Elektrons von $g=2,0023$ deutlich abweicht. Es erschien zunächst nahe liegend, dass es von einem in bestimmter Weise positionierten Substrat-Radikal stammen könnte (Schmitt *et al.*, 2010). Weitere, im Folgenden dargestellte Untersuchungen wiesen jedoch auf einen Zusammenhang mit weiteren Signalen hin, die auf *low-spin*-Hämspezies zurückgehen könnten und somit der Annahme eines Substratradikals widersprechen.

Denn neben dem Signal bei $g=2,16$ fiel die Entstehung von Signalen bei $g=2,62$ und $g=1,86$ auf, die im EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" bei pH 7 gewöhnlich fehlten (Abb. 3.94). In Ansätzen mit einer höheren β -Carotin-Konzentration, 1 mM verglichen mit 200 μ M bei einer RoxA-Konzentration von etwa 90 μ M, waren diese Signaländerungen stärker bzw. verliefen schneller. Zudem veränderte sich ein bei RoxA aus Latexkultur vorhandenes *low-spin*-Signal um $g=3,3-3,4$. Dieses verschob sich in einer Präparation aus Latexkultur nach α -Tocopherol-Zugabe von $g=3,38$ nach 3,33 (Abb. 3.95) bzw. nach 3,32 nach Zugabe von β -Carotin. Entsprechende Spektren mit β -Carotin sind in Kap. 3.11.9 im Zusammenhang mit einer Reduktion und Reoxidation gezeigt (vgl. Abb. 3.101 und Abb. 3.102). Die RoxA-typischen *low-spin*-Signale bei $g=3,09$ und 2,23 änderten sich dagegen nicht. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass bei Anwesenheit dieser substratähnlichen Substanzen vergleichbare Änderungen in der Umgebung nur eines der Hämzentren eintraten, dem sämtliche neuen bzw. veränderten Signale zuzuschreiben sind, während die Signale des zweiten Häms unverändert blieben. Die Änderungen betrafen das teilweise im *high-spin*-Zustand befindliche Hämzentrum, von dem das *low-spin*-Signal bei $g=3,3-3,4$ stammt. Diese Annahme stützen Ergebnisse aus Versuchen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Substrat-ähnlichen Verbindungen und Hämliganden (s. Kap. 3.11.10). Ein gelegentlich vorhandenes *high-spin* um $g=6$ zeigte sich aber nach Zugabe der Substrat-Analoga unvermindert. Dieser Umstand deutet nicht auf eine direkte Koordination der Substanzen am Häm-Fe hin.

Abweichend zu den meisten RoxA-Präparationen in KPP bei pH 7 waren gelegentlich bei RoxA aus Latexkultur, wie in der in Abb. 3.95 gezeigten Präparation aus Latexkultur in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8), bereits EPR-Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,84$ vorhanden, die möglicherweise ein Effekt des pH-Wertes oder eine Folge der Reinigung aus Latexmedium sein könnten. Unabhängig davon zeigten sämtliche Ansätze mit den genannten Polyisopren-Analoga entweder neu entstandene oder verstärkte EPR-Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$.

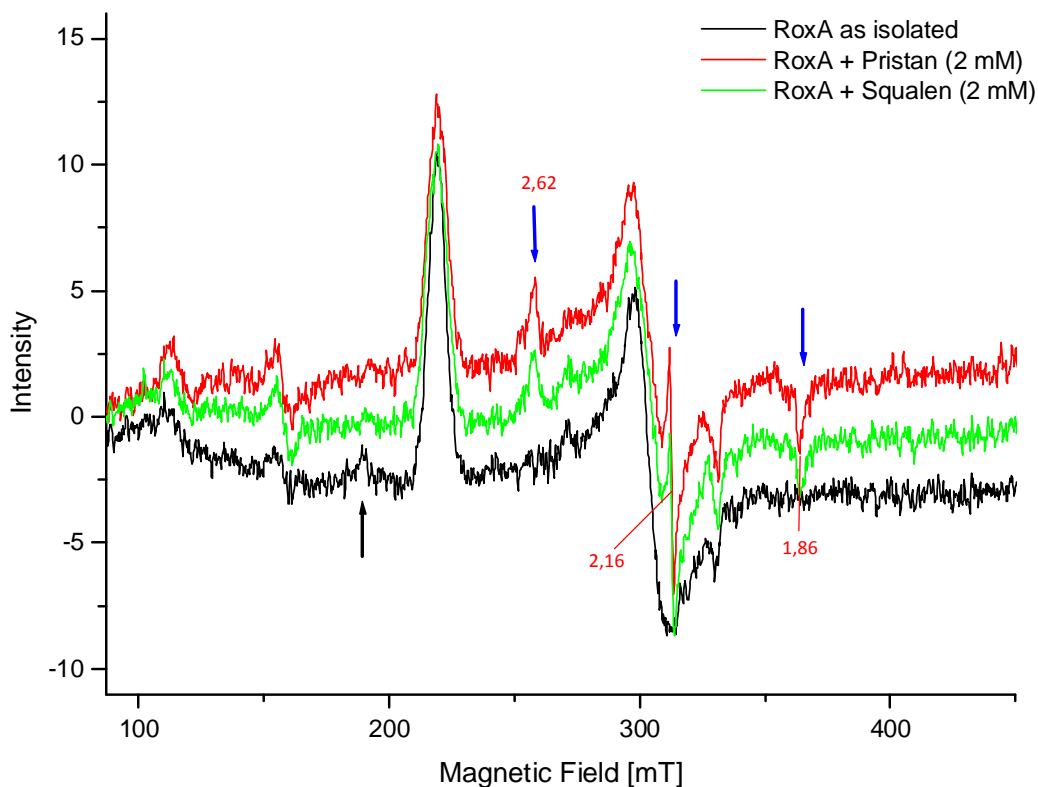


Abb. 3.94: EPR-Spektren von (rek.) RoxA mit Pristan bzw. mit Squalen (2 mM) nach ÜN-Inkubation auf Eis, im Vergleich zum entsprechenden Spektrum von RoxA "as isolated". Es tritt ein deutliches Signal bei $g=2,16$ auf, ebenso vermutlich vom gleichen *low-spin*-Häm stammende Signale bei $g=2,62$ und 1,86, die in "as isolated" fehlen (blaue Pfeile). Parallel eintretende Signalveränderungen deuten auf einen Ursprung dieser Signale vom dem Hämzentrum hin, welches teilweise auch im *high-spin*-Zustand vorliegt und zu welchem das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ gehört (schwarzer Pfeil). Denn letzteres ist bei Anwesenheit von Pristan oder Squalen vermindert.

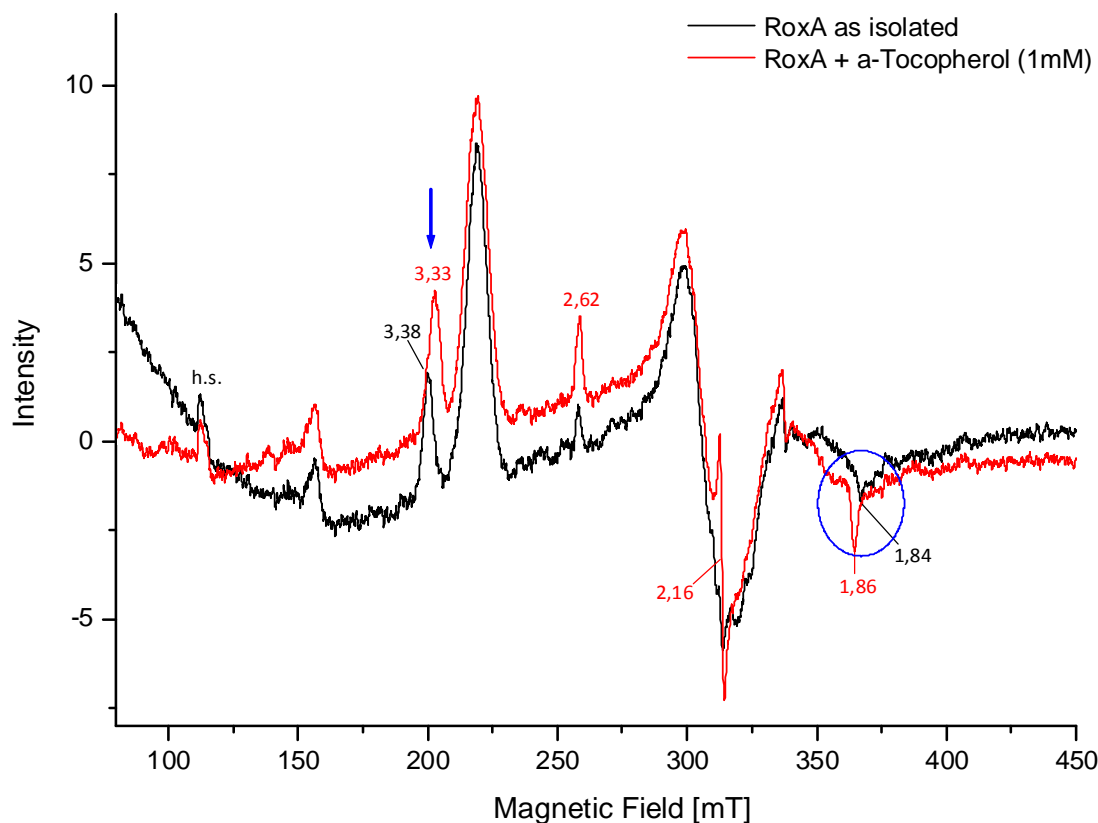


Abb. 3.95: EPR-Spektrum von RoxA aus Latexkultur mit α -Tocopherol (1 mM) in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8) nach Inkubation für 20 min bei RT verglichen mit einem Spektrum von RoxA "as isolated" aus gleicher Präparation. Es ist mit α -Tocopherol ein deutliches Signal bei $g=2,16$ zu sehen. In RoxA "as isolated" bereits sichtbare Signale bei $g=2,62$ und $g=1,84$ intensivierten sich, letzteres bei Veränderung des g -Wert nach $g=1,86$ (blauer Kreis). Ebenso weicht das 1. *low-spin*-Signal mit α -Tocopherol im g -Wert ($g=3,33$) von "as isolated" ($g=3,38$) ab (blauer Pfeil). Diese Beobachtungen zeigten sich in gleicher Weise in einem parallelen Ansatz mit β -Carotin. Diese von einer Änderung betroffenen Signale stammen vermutlich von einem veränderten *low-spin*-Zustand eines der Hämzentren.

α -Tocopherol und β -Carotin besitzen neben der strukturellen Ähnlichkeit zu Polyisopren auch die Eigenschaft als Radikalfänger. Mit Ascorbinsäure, die ebenso als Radikalfänger dient, waren in entsprechenden Versuchen keine Veränderungen im EPR-Spektrum zu beobachten. Da aber bei allen untersuchten Substraten mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu Poly(*cis*-1,4-isopren), auch mit Squalen und Pristan, bisweilen recht schnell eintretende Veränderungen im EPR-Spektrum beobachtet wurden, kann die Strukturähnlichkeit dafür verantwortlich gemacht werden. Diese Änderungen im EPR-Spektrum betrafen konsequent nur bestimmte EPR-Signale, mit gewissen Abweichungen zwischen den Substanzen in der Schnelligkeit und Intensität der Ausprägungen.

Die EPR-Untersuchungen mit Substrat-ähnlichen niedermolekularen Verbindungen zeigen eine Beeinflussung der Signale eines der beiden Hämzentren, von dem *high-spin*-Signale und ein *low-spin*-Signal um $g=3,39$ (Latexkultur) bzw. bei $g=3,57$ (rek. RoxA). Mit allen getesteten Verbindungen waren gleichzeitig zusätzliche Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$ entstanden, die demnach wahrscheinlich eine bestimmte Hämspezies repräsentieren und ebenso von diesem Hämzentrum stammen. Hinweise auf ein stabiles Substratradikal fanden sich hingegen nicht.

3.11.7 Die Wirkung von Poly(*cis*-1,4-isopren)

Unter vergleichbaren Bedingungen wie mit Substrat-ähnlichen Verbindungen traten mit dem eigentlichen RoxA-Substrat Poly(*cis*-1,4-isopren) meist keine signifikanten Abweichungen auf. Dennoch ließen sich mit den im vorhergehenden Kapitel dargestellten Befunden auch spektrale Unterschiede erklären, die in einigen Ansätzen mit Latex beobachtet worden waren. Solche meist schwächeren Veränderungen entstanden erst nach längerer Inkubationszeit, entsprachen aber tendenziell den gleichen Signalen, die mit den Substratanaloga aufgetreten waren.

Aus manchen Präparationen von RoxA aus Latexkultur ließen sich wertvolle Informationen zu einem möglichen Wirkort innerhalb des RoxA-Moleküls erhalten. Denn diese zeigten ein deutliches *low-spin*-Signal um $g=3,39$, welches sich bereits nach kurzer Inkubationszeit mit Latex veränderte (Abb. 3.96; 3.97). Es wurden Proben aus einem Batch-Ansatz mit 0,75 % Latexmilch vor und während der Inkubation bei der optimalen Reaktionstemperatur der Latexspaltung durch RoxA (40°C) gemessen. Es deuteten sich mit Latex gleiche Veränderungen an, wie sie mit den untersuchten Substratanaloga beobachtet wurden (s. o.). Dabei entstanden im Verlauf der Inkubation Signale bei $g=2,62$, 1,86 und ein Radikalsignal bei $g=2,16$ (Abb. 3.96, rote Pfeile; Abb. 3.97, blaue Pfeile). Ob die neu entstandenen Signale nicht auch durch beschleunigte Alterung bei erhöhter Temperatur entstanden sein könnten, ließ sich durch dieses Experiment nicht ausschließen.

Bereits direkt nach Latex-Zugabe fiel in diesem Experiment eine klare Veränderung des *low-spin*-Signals bei $g=3,39$ auf. Es waren parallel zwei Signale bei $g=3,39$ und 3,33 zu beobachten, die bereits in unterschiedlicher Intensität im Spektrum von RoxA "as isolated" vorhanden waren. Nach Zugabe von Latexmilch trat rasch eine Abnahme des im Ursprungsspektrum dominierenden Signals bei $g=3,39$ im Verhältnis zum Signal bei 3,33 ein. Beide Signale geben einen unterschiedlichen Zustand des vermutlich für Substrate zugänglichen Hämzentrums an. Eine sehr ähnliche Verschiebung der Signale wurde auch mit α -Tocopherol und β -Carotin gemacht (s. o., Abb. 3.95). Diese Veränderungen des entsprechenden *low-spin*-Signals wurden bereits kurz nach Zugabe bei RT sichtbar und können direkt auf die Anwesenheit des Substrates zurückgeführt werden.

Diese Beobachtung lieferte erstmalig einen konkreten Hinweis, dass neben den Polyisoprenanaloga auch Poly(*cis*-1,4-isopren) selbst in der Umgebung dieses Hämzentrums lokalisiert sein könnte. Die Veränderung des *low-spin*-Signals bei $g=3,39$ weist damit auf geringe Unterschiede in der Struktur der nahen Umgebung der entsprechenden Hämgruppe oder hinsichtlich ihrer Koordination hin. Darüber hinaus lieferten diese Ergebnisse eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen g -Werte dieses Hämzentrums zwischen RoxA aus Latexkultur ($g=3,3-3,4$) bzw. rekombinantem RoxA ($g=3,57$) in diesem Bereich des Spektrums. Denn letzteres kam zuvor nie in Kontakt mit Latex im Gegensatz zum aus Latexmedium isolierten RoxA. Es muss daher bedacht werden, dass trotz Entfernung des Substrates aus dem Medium entsprechende Veränderungen, wie sie im Zuge dieser Experimente am entsprechenden *low-spin*-Hämzentrum eintraten, noch Relikte aus der Reaktion von RoxA mit Kautschuklatex im Expressionsmedium sein könnten.

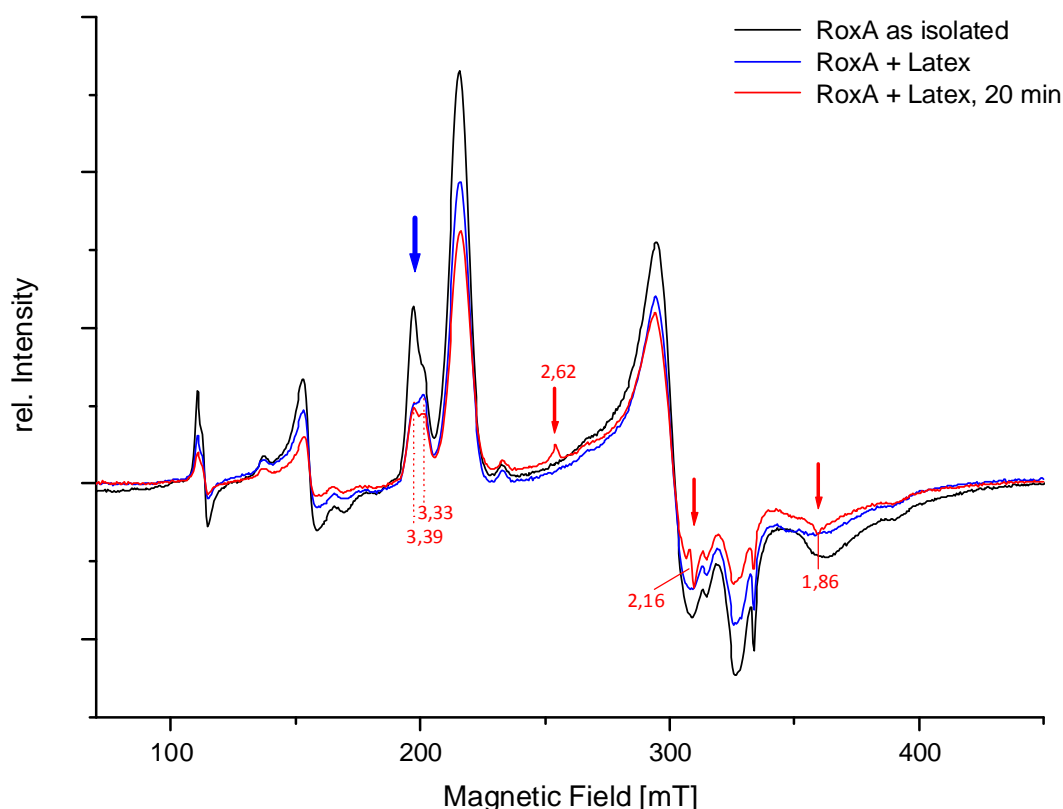


Abb. 3.96: EPR-Spektren von RoxA "as isolated" aus Latexkultur (ca. 10 mg/ml) in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8) nach Zugabe von Poly(*cis*-1,4-isopren) (=Latex, 0,75 %) und Inkubation bei 40°C. Rote Pfeile markieren neue und zunehmende Signale bei Inkubation mit Latex mit den g -Werten $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$. Diese entsprechen den mit Latexanaloga aufgetretenen Signalen (vgl. Abb. 3.94, Abb. 3.95). Der blaue Pfeil zeigt gegenüber dem Ausgangsspektrum Veränderungen am *low-spin*-Signal eines Hämzentrums, die an eine Verschiebung desselben Signals nach Zugabe anderer Latex-Analoga erinnert (vgl. Abb. 3.95). Die gegenüber dem Ausgangsspektrum insgesamt verringerte Signalintensität ist teilweise auf den Verdünnungsfaktor infolge der Latex-Zugabe zurückzuführen, eine weitere Abnahme jedoch durch Inkubation bei 40°C.

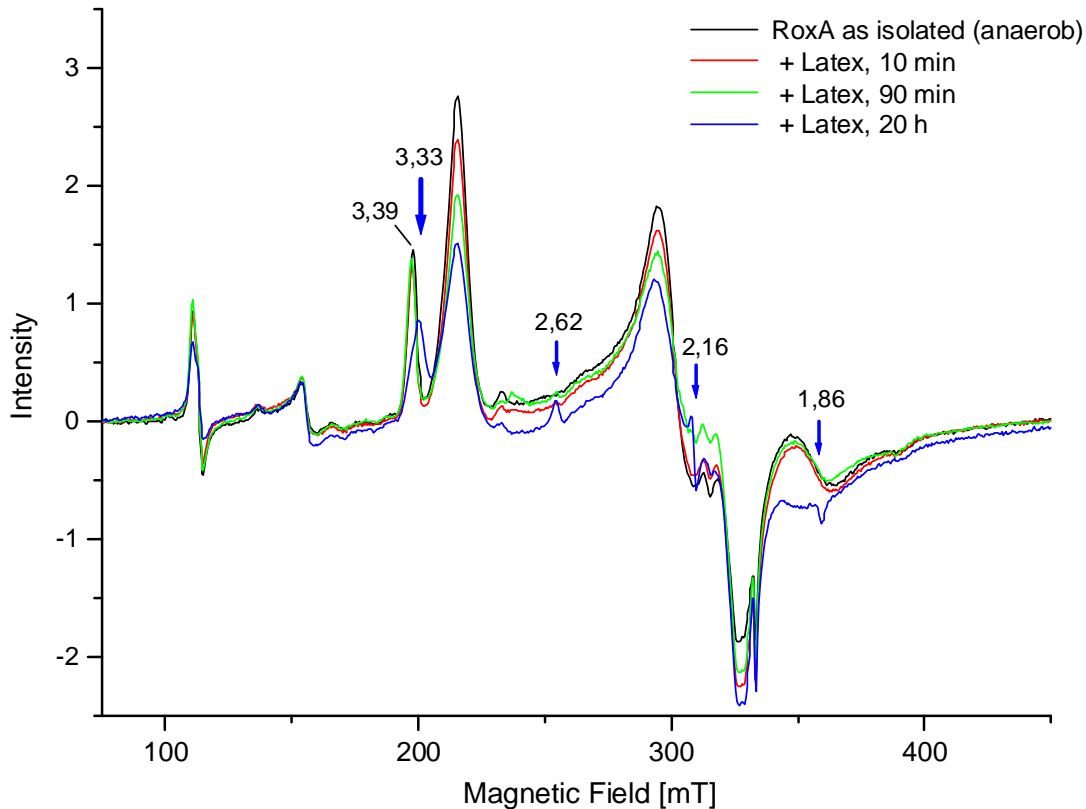


Abb. 3.97: EPR-Spektren einer Präparation von RoxA aus Latexkultur in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8) nach Inkubation mit Latex (0,8 %) bei 38°C unter Sauerstoffausschluss (Argon-Atmosphäre). Es wurde eine abnehmende Signalintensität, anfänglich v. a. der dominanten Signale um 215 mT ($g=3,09$) und 295 mT ($g=2,23$) beobachtet. Nach ÜN-Inkubation (blau) sind die gleichen Signaländerungen wie bereits mit Latex-ähnlichen Substanzen zu beobachten (kleine blaue Pfeile, vgl. Abb. 3.94, Abb. 3.95). Dazu zählt gleichermaßen eine Verschiebung des 1. *low-spin*-Signals zu einem geringeren g -Wert ($g=3,33$) (großer blauer Pfeil).

Überlegungen, dass bereits das *low-spin*-Signal in RoxA aus Latexkultur mit einem g -Wert von $g=3,39$ aus der Anwesenheit von Latex resultieren könnte, bestätigten sich nicht. Denn obwohl das vom gleichen Häm stammende *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ nur bei rekombinantem RoxA auftrat, veränderte sich dieses nach Inkubation mit Latex nicht nach $g=3,39$ (s. Kap. 3.11.8). Die generelle Abnahme der Signalintensität bei fortdauernder Inkubation bei 40°C könnte auf einen langsamen Zerfall des Enzyms bzw. eine Inaktivierung durch Aggregation und Präzipitation zurückgehen. Aufgrund der hohen Affinität des Enzyms zum Substrat muss aber eher eine Aggregation am polymeren Substrat und der Latexstränge untereinander angenommen werden.

Desweiteren muss an dieser Stelle noch einmal auf die z. T. erheblichen Unterschiede zwischen verschiedenen verwendeten Latices hinsichtlich ihrer Eignung zum Einsatz in Aktivitätstests, zur Herstellung des Spaltproduktes ODTD bzw. insbesondere zur RoxA-Expression in Latexmedium durch den *Xanthomonas* sp. Wildtyp hingewiesen werden. Die dabei beteiligten Ursachen könnten ebenso für unterschiedliche Ergebnisse in EPR-

Experimenten von RoxA mit Latex verantwortlich sein. Es lassen sich daher nur EPR-Spektren direkt vergleichen, die aus derselben Präparation und Latex-Charge stammen.

Die oben dokumentierten spektralen Veränderungen mit Poly(*cis*-1,4-isopren) bei RoxA aus Latexkultur waren mit Präparationen von rekombinantem RoxA in entsprechenden Versuchen bis zu 24stündiger Inkubation bei Raumtemperatur nicht zu beobachten. Dies ist, wie bereits angedeutet, in Zusammenhang mit Unterschieden bezüglich des *low-spin*-Signals desjenigen Hämzentrums zu bringen, das in RoxA aus Latexkultur einen g -Wert von meist $g=3,39$ annahm, bei rekombinantem RoxA dagegen nur schwache Signale um $g=3,57$ lieferte. Diese Abweichungen könnten aus der langen Expressionszeit (ca. 10–14 d) in Latex-Minimalmedium gegenüber der rekombinanten Expression (2 d) in Vollmedium bzw. des fehlenden Kontaktes von rekombinantem RoxA zum eigentlichen Substrat vor Beginn der Reinigung resultieren.

Um eine Beeinflussung durch die unterschiedlichen Expressionsmedien zu untersuchen, wurde eine Präparation von rekombinantem RoxA aus Tsuchii & Takeda-Minimalmedium (+ 0,4 % Gluconat) mit rekombinantem RoxA aus LB/NB-Medium verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im EPR-Spektrum festgestellt werden. Somit zeigte sich auch bezüglich des 1. *low-spin*-Signals nicht die Situation wie bei RoxA aus Latexkultur. Daher wurden Versuche durchgeführt, die eine entsprechend lange Inkubation von isoliertem rekombinantem RoxA mit Latexmilch beinhalteten. In einem Versuch wurden die EPR-Spektren von rekombinantem RoxA mit bzw. ohne die Anwesenheit von Latexmilch [1 %] nach sechstägiger Lagerung an Luft bei 4°C verglichen. Das Spektrum von RoxA ohne Latex zeigte keine nennenswerten Veränderungen zum ursprünglichen Spektrum von RoxA "as isolated". Im Spektrum des Ansatzes mit dem Substrat wurden dagegen Unterschiede festgestellt, die sich als Veränderungen an besagtem Hämzentrum deuten lassen. Ein *low-spin*-Signal um $g=3,55$ war nach Inkubation mit Latex kaum mehr zu sehen, ein zugehöriges *high-spin* um $g=6,0$ nahm jedoch signifikant zu (Abb. 3.98). Ein *low-spin*-Hämsignal mit g -Werten bei $g=3,39$ wie es in Präparationen von RoxA aus Latexkultur auftrat, war jedoch nicht zu beobachten.

In einem weiteren Experiment wurde rekombinantes RoxA (≈ 5 mg/ml in 100 mM KPP + 300 mM NaCl, pH 7) verdünnt (1:50) und in einem Volumen von 50 ml für 10 Tage bei RT zusammen mit einer geringen Latexkonzentration von 0,01 % in einer Zellkulturflasche (550 ml) mit gasdurchlässigem Verschluss inkubiert. Ein Parallelansatz ohne Latex wurde als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Ansätze per Ultrafiltration konzentriert und nach kurzer Zentrifugation zur Abtrennung möglicherweise ausgefallenen Proteins im EPR-Spektrum betrachtet. Der Ansatz mit Latex enthielt nun eine Latexkonzentration von ca. 0,5 %. Wiederum wurden dort deutlich erhöhte *high-spin*-Signale beobachtet, sowie ein etwas vermindertes *low-spin*-Signal bei $g=3,57$. Zudem enthielt das Spektrum ein Radikal bei $g=2$, das von freiem Latex oder einem Proteinradikal stammen

könnte. Auch in diesem Ansatz trat kein *low-spin*-Signal bei $g=3,39$ oder $g=3,33$ wie bei RoxA aus Latexkultur auf. Auch in unabhängigen Versuchsansätzen mit rekombinantem RoxA aus verschiedenen Präparationen deutete sich bereits nach 24stündiger Inkubationszeit mit Latex eine Abnahme des *low-spin*-Signals bei $g=3,57$ und Zunahme eines *high-spin*-Signals an. Im Kontrollansatz (10 d ohne Latex) waren diese Signale kaum verändert gegenüber dem Spektrum von RoxA "as isolated". Dort wurde aber im Unterschied zum Parallelansatz mit Latex die Zunahme eines schwachen *low-spin*-Signals bei $g=2,82$ beobachtet (ohne Abb.), welches bereits häufiger in frisch isoliertem RoxA, sowohl aus Latexkultur als auch bei rekombinantem RoxA aufgetreten war. Viele der nicht regelmäßig, v. a. bei RoxA aus Latexkultur auftretenden Signale, auch ein schwaches Signal bei $g=3,33$, wurden bei einer gealterten Präparation von rekombinantem RoxA beobachtet, die ohne Präzipitationsverlust für mehrere Monate bei 4°C gelagert worden war (ohne Abb.).

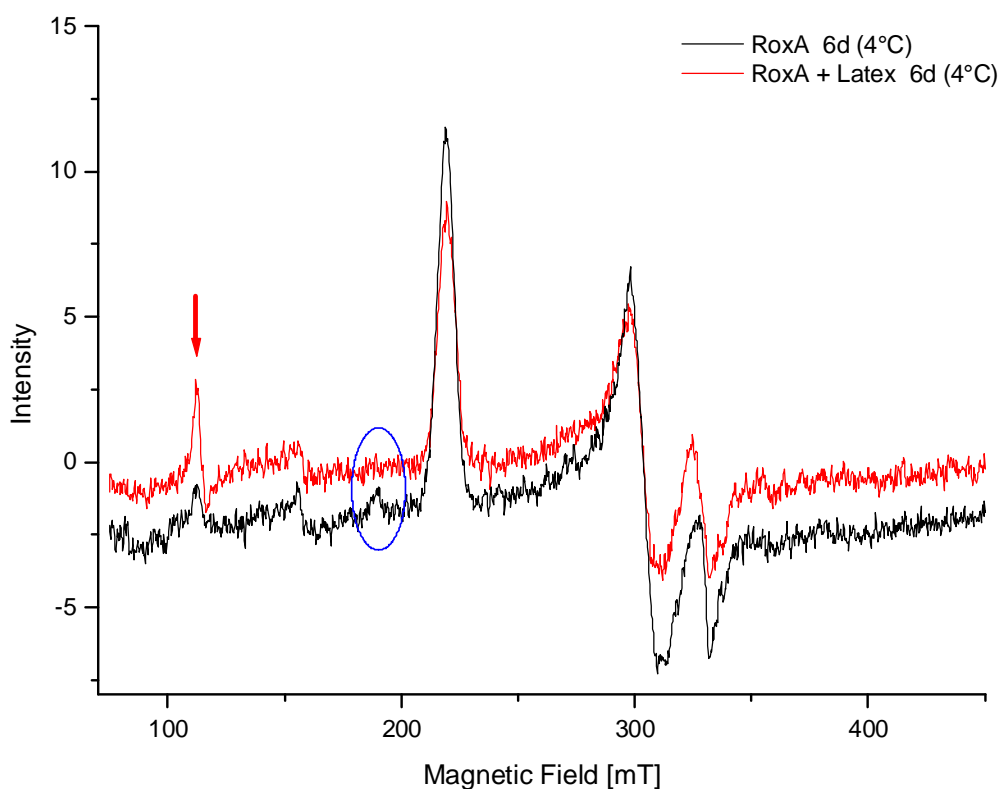


Abb. 3.98: EPR-Spektren von rek. RoxA "as isolated" [ca. 5 mg/ml] bzw. RoxA mit Latex [1 %] nach sechstägiger Lagerung der Proben bei 4°C . Im Ansatz mit Latex kann eine Abnahme des *low-spin*-Signals bei $g=3,55$ (blauer Kreis) und eine Zunahme des zugehörigen *high-spins* bei $g=6$ (roter feil) dokumentiert werden. Die insgesamt etwas verminderte Signalintensität geht auf die Verdünnung durch Latexzugabe zurück. Das Spektrum von RoxA "as isolated" unterschied sich nach 6 d nicht nennenswert von dem vor Beginn der Inkubation aufgenommenen Spektrum. Das Signal um 325 mT stellt ein Hintergrundsignal aus der Cavity dar.

3.11.8 Veränderungen mit Poly(*cis*-1,4-isopren) unter Sauerstoffausschluss

Die Betrachtung von rekombinantem RoxA mit Latex bei Abwesenheit von O₂ konnte schließlich die Bedeutung einer Signalzunahme des *high-spin*-Signals bei $g \approx 6$ unterstreichen. Die Exposition von RoxA "as isolated" unter Sauerstoffausschluss hatte insbesondere bei rekombinantem RoxA keine deutlichen Veränderungen innerhalb der betrachteten Zeiträume angezeigt (s. Kap. 3.11.4). Nach Inkubation von RoxA mit Latex unter N₂-Atmosphäre war deutlich die Zunahme eines *high-spin*-Signals bei $g=6$ zu erkennen. Diese war bereits bei einer Messung nach dreistündiger Exposition unter N₂ festzustellen. Nach verlängerter Inkubation auf Eis für ca. 48 h ließ sich ein intensives *high-spin* beobachten (Abb. 3.99), dagegen nur geringe Veränderungen am *low-spin*-Signal bei $g=3,57$. Deutlichere Veränderungen hatten sich in Versuchen mit RoxA aus Latexkultur bei $g=3,39$ gezeigt (vgl. Abb. 3.97), eine Zunahme einer entsprechenden *high-spin*-Komponente aber nur ansatzweise (vgl. Abb. 3.86). Zudem war ein schwaches Signal bei $g=2,16$ zu sehen wie es auch deutlicher mit ähnlichen niedermolekularen Substratanaloga gesehen wurde (s. o.).

Dem 48 h unter Sauerstoffausschluss gehaltenen Ansatz wurde Pyrogallol anaerob zugegeben und für weitere 90 Minuten auf Eis gehalten. Das EPR-Spektrum zeigte nun ein noch intensiveres *high-spin*-Signal bei $g=6$, zudem weitere geringe Änderungen an *low-spin*-Signalen des vermutlich gleichen Hämzentrums (s. Abb. 3.100). Ob die Präsenz von Pyrogallol als O₂-Entferner unter den Versuchsbedingungen (pH 7), bei denen die Reaktion mit O₂ nur langsam verläuft, die Ursache für die weitere Zunahme des *high-spins* darstellt, kann nicht eindeutig entschieden werden, jedoch wiesen Beobachtungen aus der UV-Vis-Spektroskopie darauf hin (s. Kap. 3.9.3; Kap. 4.6.1). Denkbar wäre auch, dass sich der Prozess der *high-spin*-Ausprägung nach dem ersten Messzeitpunkt (rot) fortsetzte, dem widerspricht jedoch die Intensität der Änderungen in nur 90 Minuten verglichen mit der vorhergehenden Inkubation für zwei Tage. Die Inkubation von RoxA mit Pyrogallol (2 mM, 30 min – ÜN) ohne Latex unter N₂-Atmosphäre hatte nur geringe Auswirkungen auf das entsprechende *high-spin* bei $g=6$ (ohne Abb.).

Durch diese Versuchsansätze ließ sich feststellen, dass nur die Anwesenheit des Substrates unter Ausschluss von Luftsauerstoff zur deutlichen Ausprägung eines *high-spin*-Signals führte, weder die anaerobe Inkubation des Enzyms alleine oder die Anwesenheit von Latex unter aeroben Bedingungen. Davon ausgenommen ist eine Zunahme des *high-spin*-Signals zusammen mit Latex nach langer Exposition (6 d) an Luft im Vergleich zur Kontrolle ohne Latex (s. Abb 3.98).

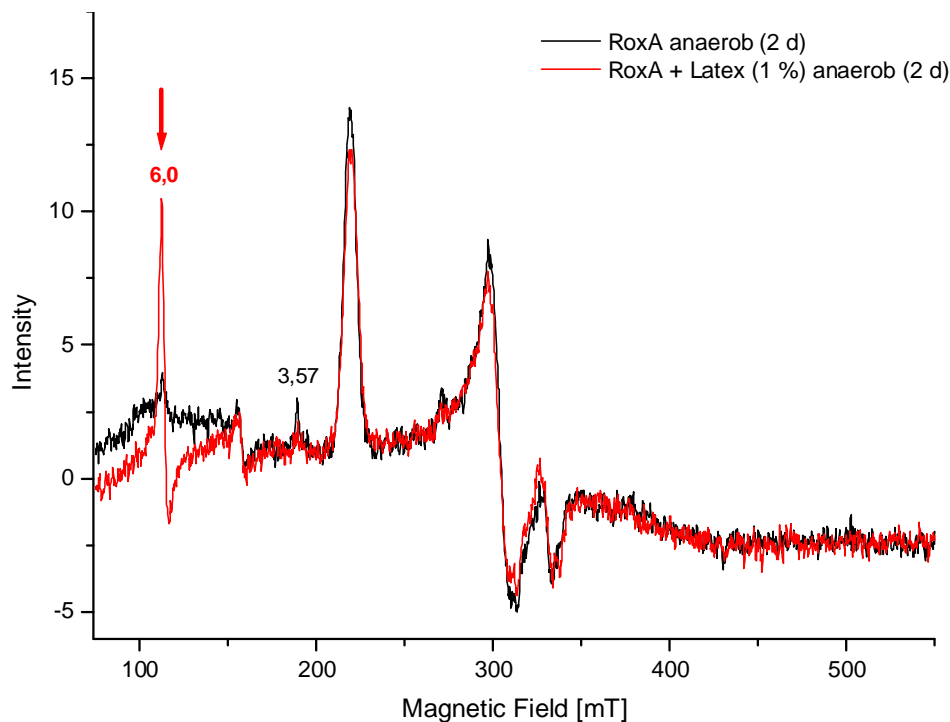


Abb. 3.99: EPR-Spektren von (rek.) RoxA unter Sauerstoffausschluss (N_2 -Atmosphäre) nach 2 Tagen auf Eis bei An- und Abwesenheit von Latex (1 %) aus gleicher Präparation. Der Pfeil markiert ein intensives *high-spin*-Signal bei $g=6$ im Ansatz mit Latex. Demgegenüber blieb das schwache *high-spin* im Ansatz ohne Latex gegenüber dem "as isolated"-Spektrum unverändert.

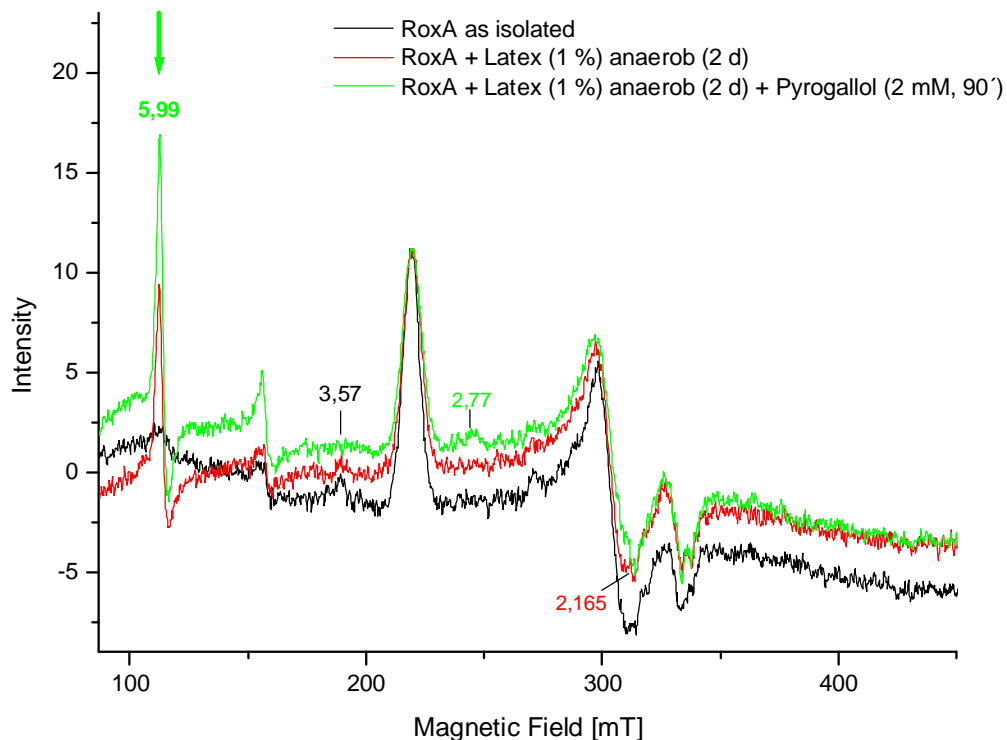


Abb. 3.100: EPR-Spektren von (rek.) RoxA unter N_2 -Atmosphäre (2 Tage) (s. auch Abb. 3.99) und nach Addition von Pyrogallol (anaerob, 90 min, auf Eis) im Vergleich zu RoxA "as isolated". Eine deutliche Zunahme einer *high-spin*-Spezies bei $g=6$ wurde nach Inkubation mit Pyrogallol beobachtet. Zudem ging ein *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ zurück, ein weiteres schwaches Signal entstand um $g=2,77$. In den Ansätzen mit Latex ist ein schwaches Signal bei $g=2,16$ zu beobachten.

Die Zunahme eines *high-spin*-Signals bei $g=6$ in Ansätzen mit Latex gegenüber Spektren von RoxA "as isolated" erschien zunächst überraschend, da eine Bindung des Substrates an einem Hämzentrum erwogen worden war. Die Beobachtung, dass in keinem Experiment die Inkubation von RoxA mit Latex unter aeroben Bedingungen zu einer Abnahme eines *high-spin*-Signals führte, lässt eine direkte Bindung des polymeren Substrats am Häm-Fe unwahrscheinlich erscheinen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass bei Abwesenheit von O_2 und Anwesenheit von Poly(*cis*-1,4-isopren) ein zum *high-spin*-Zustand verschobenes Spin-Gleichgewicht existiert. Weiter führende Experimente mit Latex bzw. Analoga unter anaeroben Bedingungen oder nach Zugabe von Hämliganden konnten in diesem Zusammenhang einen zusätzlichen Beitrag zum Verständnis liefern.

3.11.9 Effekte durch Substrate nach Reduktion und Reoxidation

Wie bereits beschrieben wurde nach Reduktion von RoxA "as isolated" im Verlauf der Reoxidation neben einem deutlichen *high-spin*-Signal stets das Auftreten eines *low-spin*-Signals um $g=3,57$ beobachtet, das präparationsabhängig und weniger intensiv auch meist bei RoxA "as isolated" sichtbar war (s. Kap. 3.11.2). Diese Versuche wurden nun unter Anwesenheit von Latex-Analoga wie z. B. β -Carotin oder anderen Substraten wiederholt. War β -Carotin (200 μ M) im Ansatz enthalten, unterblieb die Entstehung des besagten *low-spin*-Signals (Abb. 3.101). In einem weiteren Experiment wurde reduziertem RoxA erst nach der Reoxidation an Luft β -Carotin (1 mM) zugesetzt und das EPR-Spektrum nach 20minütiger Inkubation bei RT aufgenommen. Danach war das entsprechende *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ weniger intensiv und leicht verbreitert (Abb. 3.102). Diesen Beobachtungen zufolge beeinflusst β -Carotin die Signale des Hämzentrums, das auch für externe Hämliganden zugänglich ist. Dies lässt auf eine Lokalisierung der substratähnlichen Verbindung in der Umgebung dieses Hämzentrums schließen.

Sehr ähnliche Ergebnisse lieferten EPR-Messungen von RoxA in Gegenwart von Pristan und Squalen. Die entsprechende *low-spin*-Komponente trat zwar nach Reduktion und Reoxidation in Anwesenheit der Substrate wieder auf, jedoch intensitätsschwächer als es nach vorheriger Reduktion von RoxA ohne Zusätze beobachtet wurde (Abb. 3.103) bzw. zeigte einen leicht veränderten g -Wert ($g=3,53$) (Abb. 3.104). Die bei gereinigtem RoxA zusammen mit jeder dieser Verbindungen entstandenen zusätzlichen *low-spin*-Hämsignale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$ zeigten sich ebenso in gleicher Intensität im Spektrum von Dithionit-reduziertem, reoxidiertem RoxA in Gegenwart der jeweiligen Verbindung (Abb. 3.103, Abb. 3.104). Diese *low-spin*-Komponenten waren auffallend intensiv in einem Versuchsansatz, bei dem die β -Carotin-Zugabe (1 mM) erst nach Reduktion und Reoxidation von RoxA "as isolated" erfolgte (Abb. 3.102) (s. Kap. 4.9.4.2).

Die schlichte β -Carotin-Zugabe zu einer RoxA-Präparation unter aeroben Bedingungen resultierte auch ohne vorherige Dithionit-Behandlung in der Abnahme des *low-spin*-Signals bei $g=3,56$. Doch ließ sich in reoxidierten Ansätzen nach einer Reduktion des Enzyms aufgrund der Entstehung starker *high-spin*-Spezies die Auswirkung der Anwesenheit von Substraten auf den Spinzustand besser untersuchen als in Proben von RoxA "as isolated". Die bereits bei RoxA ohne Zusätze beschriebenen starken *high-spin*-Komponenten bei $g=5,95$ entstanden gleichermaßen bei vorheriger Anwesenheit der Substrate bzw. verminderten sich nicht durch anschließende Zugabe derselben (Abb. 3.101, Abb. 3.102). Eine direkte Bindung am Häm-Eisen muss angesichts dieser noch immer vorhandenen *high-spin*-Signale ebenso wie für Poly(*cis*-1,4-isopren) als unwahrscheinlich gelten.

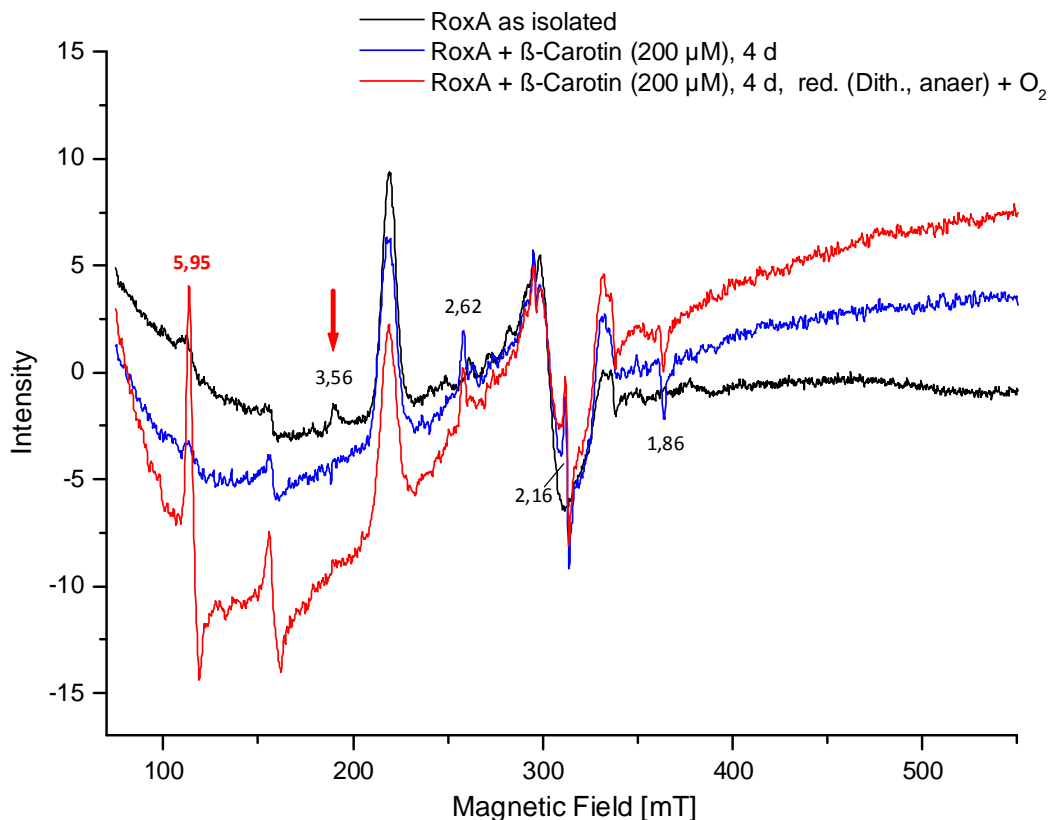


Abb. 3.101: EPR-Spektren von (rek.) RoxA "as isolated" ($\approx 75 \mu\text{M}$) nach Inkubation mit β -Carotin ($200 \mu\text{M}$) für 4 Tage auf Eis, sowie nach Reduktion des Ansatzes mit Dithionit unter N_2 -Atmosphäre und anschließender Reoxidation an Luft für 1 h. Ein *low-spin*-Signal bei $g=3,56$ verschwand nach Inkubation mit β -Carotin (blau) und war auch nach Reduktion und Reoxidation kaum zu sehen (rot). Bei Abwesenheit von β -Carotin trat dieses deutlicher auf (vgl. dazu Abb. 3.102, schwarz : Das verwendete RoxA stammte aus der gleichen Präparation; zum Spektrum von RoxA "as isolated" siehe auch Abb. 3.80). Nach Reduktion und Reoxidation entstanden erneut *low-spin*-Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$ in etwa gleicher Ausprägung. Hervorzuheben ist die Entstehung eines vergleichsweise sehr intensiven *high-spin* bei $g=5,95$, welches *high-spin*-Signale übertraf, die in RoxA "as isolated" beobachtet wurden.

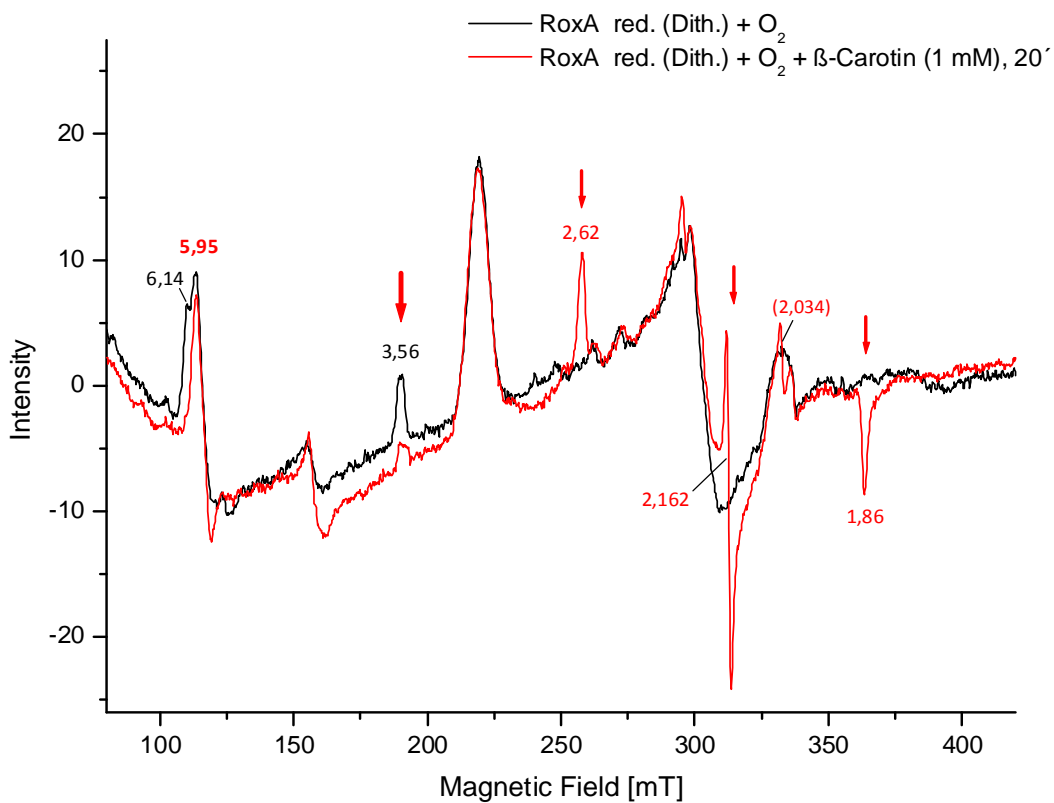


Abb. 3.102: EPR-Spektren von (rek.) RoxA "as isolated" nach Inkubation mit Dithionit (N_2 -Atmosphäre) nach kurzer Exposition an Luft (schwarz) und nach Zugabe von β -Carotin (1 mM) nach 20 minütiger aerober Inkubation (rot). Die *low-spin*-Komponente bei $g=3,56$ verminderte sich und war in Richtung $g=3,50$ verbreitert (großer Pfeil). Das *high-spin*-Signal bei $g=5,95$ verminderte sich nicht durch Inkubation mit β -Carotin. Eine anfangs noch sichtbare 2. *high-spin*-Komponente bei $g=6,14$ ging vermutlich unabhängig von der Anwesenheit von β -Carotin vollständig zurück. Für β -Carotin typische *low-spin*-Signale traten bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ nach nur kurzer Inkubation auf Eis intensiv in Erscheinung (kleine Pfeile). Einige ungewöhnliche schwache Signale bei RoxA "as isolated" zwischen 220 und 260 mT waren nach Inkubation mit β -Carotin nicht mehr zu sehen (vgl. auch Abb. 3.101 und zum Spektrum von RoxA "as isolated" Abb. 3.80).

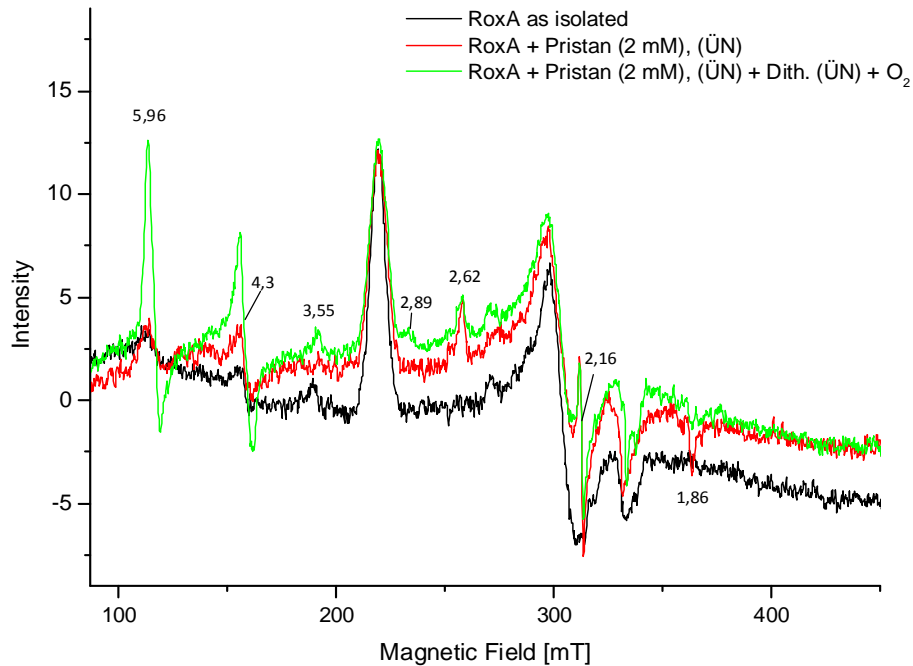


Abb. 3.103: EPR-Spektren von RoxA mit Pristan (2 mM aus EtOH-Lösung, 2 % (v/v) Ethanol im Ansatz) vor und nach Reduktion mit Dithionit und Reoxidation an Luft (ca. 3 h), verglichen mit dem Spektrum von RoxA "as isolated". Nach Reduktion entstand ein sehr deutliches *high-spin*-Signal bei $g=5,96$, wie auch in Ansätzen ohne Pristan (s. Kap. 3.11.2). Es wurde auch ein verstärktes Signal für Nicht-Häm-Fe bei $g=4,3$ registriert. Typische Signale bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ mit Pristan entstanden nach Reduktion erneut, auch das zunächst durch Inkubation mit Pristan verschwundene *low-spin* bei $g=3,55$. Zusätzlich trat nach Reduktion ein Signal bei $g=2,9$ auf.

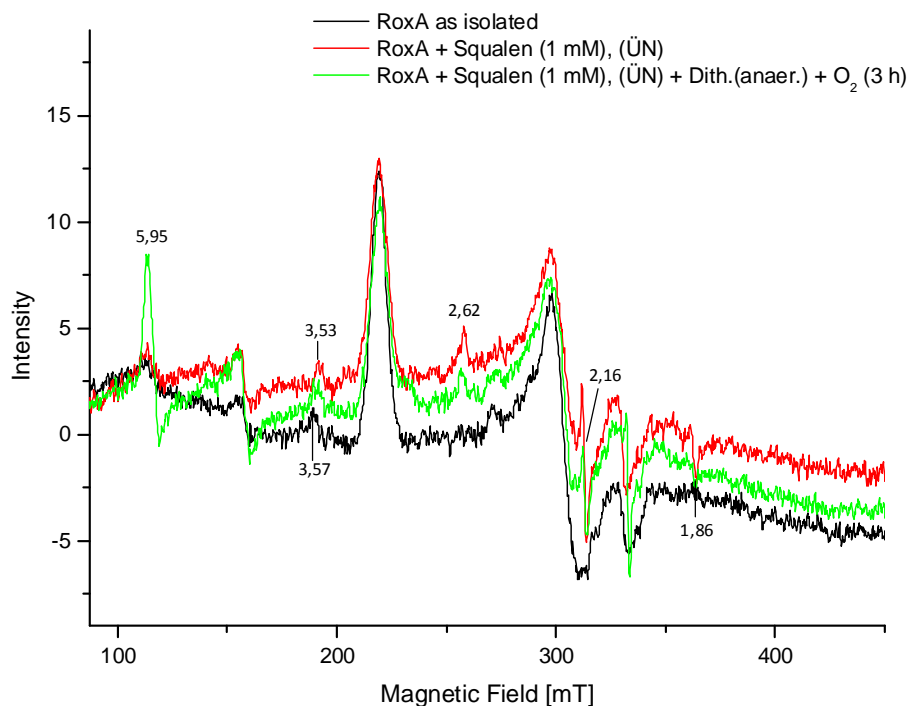


Abb. 3.104: EPR-Spektren von RoxA mit Squalen (1 mM, Suspension) vor und nach Reduktion mit Dithionit (N_2 -Atmosphäre) und Reoxidation an Luft (3 h) im Vergleich zum Ausgangsspektrum. Die Anwesenheit von Squalen verhinderte nicht die Entstehung eines deutlichen *high-spins* bei $g=5,95$. Das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ war mit Squalen leicht verändert. Die Entstehung neuer *low-spin*-Hämsignale bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ erfolgte ebenso nach vorheriger Reduktion des Enzyms.

Die Durchführung der analogen Experimente mit dem eigentlichen RoxA-Substrat Latex zeigte auffällige Ähnlichkeiten auf. Wie auch nach Reduktion und Reoxidation von RoxA "as isolated", sowie mit verwandten Substraten, entstanden deutliche, stabile *high-spin*-Zustände mit g -Werten um 5,95–6,0 (Abb. 3.105, Abb. 3.106), im Gegensatz zu den Versuchen mit Hämoglobin wie Imidazol. Gleiche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Reoxidation mit Ferricyanid unter Sauerstoffausschluss durchgeführt wurde (Abb. 3.107). Nach ÜN-Inkubation gingen diese *high-spin*-Spezies jedoch in einigen Ansätzen zurück, übertrafen aber noch immer die Intensität von Signalen, die im Grundzustand des Enzyms festgestellt wurden (Abb. 3.105). Ein langsamer Rückgang von nach Reduktion entstandenen *high-spin*-Signalen wurde auch in manchen Ansätzen von RoxA "as isolated" ohne Substrate beobachtet und sollte deshalb nicht auf die Anwesenheit des polymeren Substrates zurückgeführt werden. Es wurden wie auch in "as isolated"-Proben nach vollständiger Reduktion zu Beginn der Reoxidation zwei *high-spin*-Komponenten beobachtet (Abb. 3.106). Ebenso traten weitere, schwächere *high-spin*-Spezies bei $g \approx 6,6$ und $g = 5,66$ in präparationsabhängiger Intensität im Verlauf der Reoxidation auf.

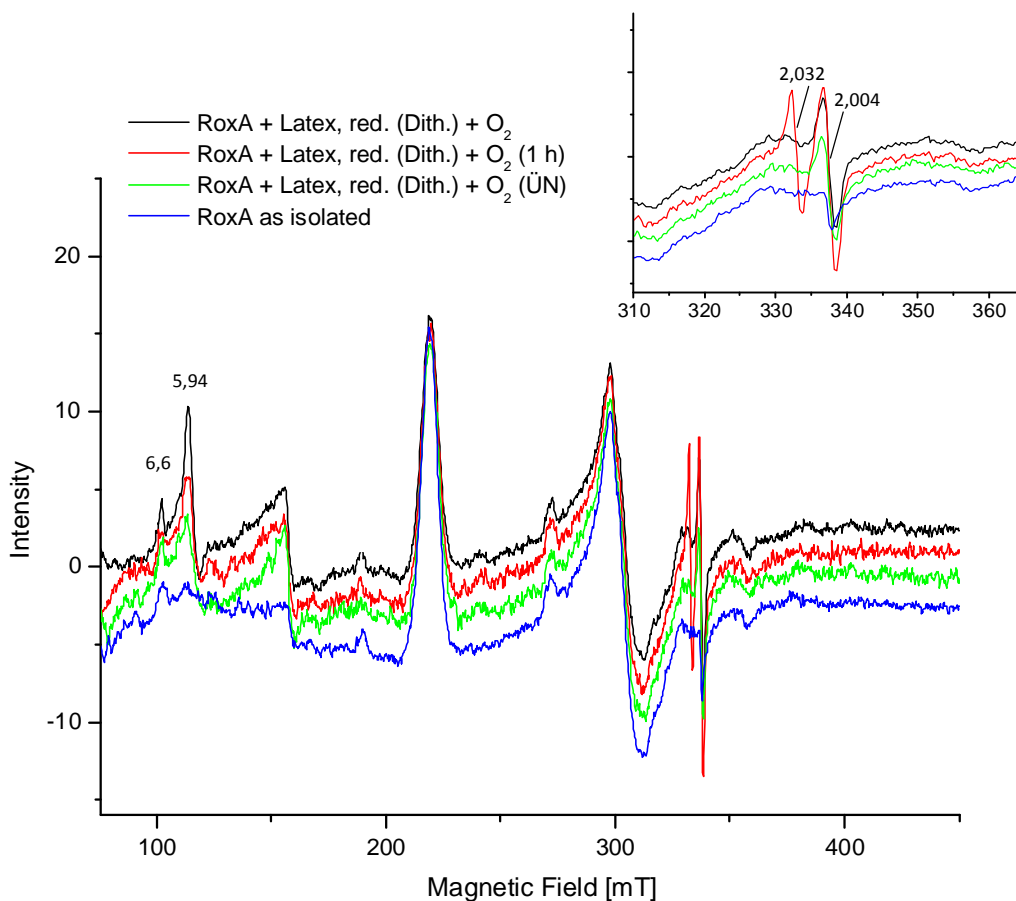


Abb. 3.105: EPR-Spektren von (rek.) RoxA mit Latex [0,75 %] nach Reduktion mit Dithionit und anschließender Reoxidation an Luft. Die Spektren sind nach Abzug einer künstlichen, signalfreien Grundlinie dargestellt und zur besseren Übersicht leicht in Y-Richtung versetzt. Gegenüber dem Spektrum von RoxA "as isolated" entstand auch mit Latex eine deutliche *high-spin*-Spezies bei $g = 5,94$, eine weitere bei $g = 6,6$ war bereits im Ausgangsspektrum sichtbar. Das Insert oben rechts zeigt den Bereich um die Radikalsignale vergrößert. Es trat ein Radikal bei $g = 2,032$ nur in der Anfangsphase der Exposition an Luft auf, ein weiteres Signal bei $g = 2,004$, das erst ÜN zurückging.

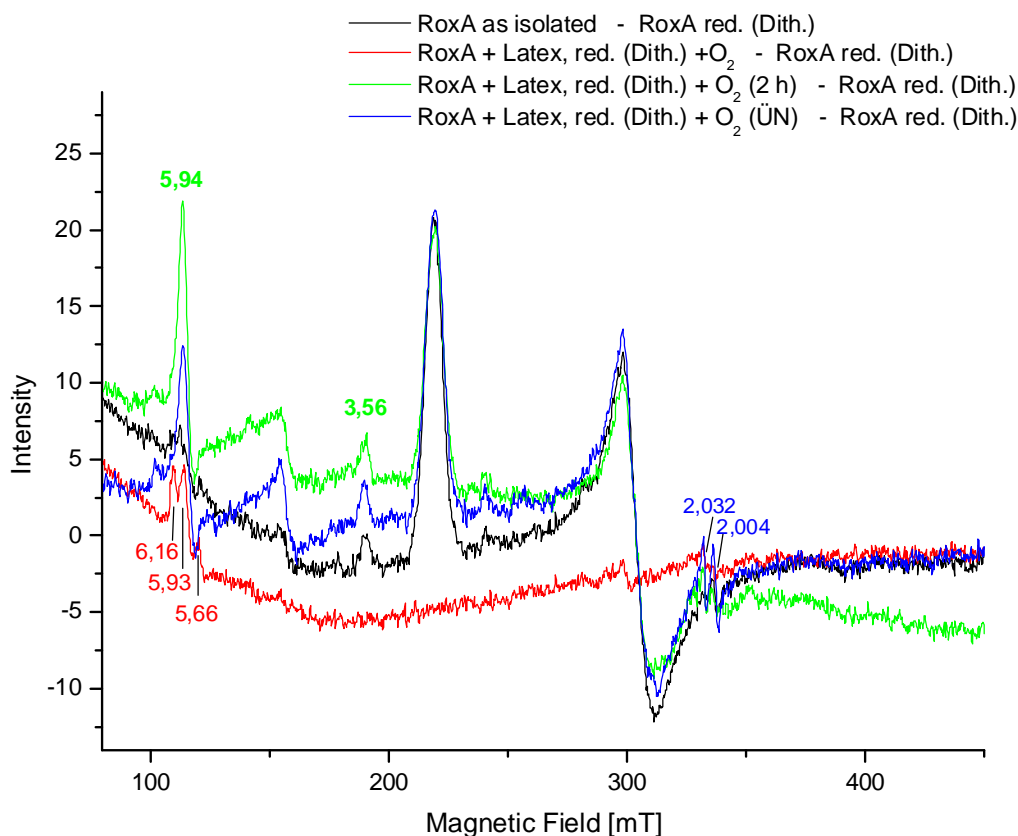


Abb. 3.106: EPR-Differenzspektren [– reduziertes RoxA (Dithionit)] von (rek.) RoxA mit Latex (0,5 %) nach Reduktion unter anaeroben Bedingungen (N_2) und Reoxidation an Luft, direkt zu Beginn (rot), nach 2 h (grün) und Exposition über Nacht (ÜN) (blau) auf Eis. Wie auch im gleichen Versuch ohne Latex entstanden zu Beginn mehrere *high-spin*-Spezies, von denen Signale bei $g=6,16$ und $5,66$ bis zur vollständigen Oxidation zurückgingen, ein intensives Signal bei $g=5,94$ bestehen blieb. Das *low-spin*-Signal bei $g=3,56$ entsprach etwa demjenigen in RoxA "as isolated". Es zeigten sich zudem Radikalsignale bei $g=2,004$ und $g=2,032$ (vgl. Abb. 3.105).

Häufig trat mit Latex bei Anwesenheit von Dithionit ein nur zeitweise existentes Radikalsignal bei $g=2,032$ auf, das zusammen mit einem weiteren Radikal bei $g\approx 2,005$ zu sehen war, welches in der Regel auch in Dithionit-reduzierten, reoxidierten Ansätzen von RoxA beobachtet worden war. Beide bildeten sich bei fortgeschrittener Reoxidation aus und gingen im Folgenden wieder vollständig zurück (ÜN), wobei sich das Signal bei $g=2,032$ schneller auflöste (Abb. 3.105). Dieses könnte auf mit Dithionit reagierende Polyisopren-Radikale zurückzuführen sein, solange noch Reduktionskraft im Puffer vorhanden war.

Da auch nach Zugabe von Kautschuklatex ohne vorherige Reduktion Veränderungen an *low-spin*-Signalen zu erkennen waren, die dem gleichen Hämzentrum wie *high-spin*-Signale zuzuschreiben sind (s. o., Kap. 3.11.7, Abb. 3.96; 3.97; 3.98), kann auf die Beeinflussung desselben Hämzentrums durch das RoxA-Substrat, sowie verwandte, niedermolekulare Substrate geschlossen werden. Die Entstehung starker *high-spin*-Spezies in Gegenwart von Latex oder der ähnlichen niedermolekularen Verbindungen, die z. T. sogar

diejenigen im Ansatz ohne Latex übertrafen, lässt darauf schließen, dass diese Substrate nicht direkt am Häm-Eisen gebunden werden. Doch kann eine Lokalisierung in unmittelbarer Umgebung angenommen werden. Denn mit allen untersuchten Substratanaloga traten neue *low-spin*-Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$, sowohl nach Zugabe der Verbindungen zu RoxA "as isolated" als auch zu diesem nach Reduktion und Reoxidation auf. In Gegenwart von Latex fehlten diese jedoch in Versuchen mit rekombinantem RoxA meist oder waren intensitätsschwächer, traten bei RoxA aus Latexkultur aber häufiger, bereits in "as isolated", auf (s. o.) (s. Abb. 3.95; 3.96). Bei diesem wurden mit Latex oder ähnlichen Verbindungen Änderungen des Signals bei $g=3,39$ festgestellt bzw. einem Intensitätsverlust des analogen Signals bei $g=3,57$ bei rekombinantem RoxA. Diese *low-spin*-Signale könnten in Zusammenhang mit den neu entstandenen *low-spin*-Komponenten bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ stehen und vom gleichen Hämzentrum stammen.

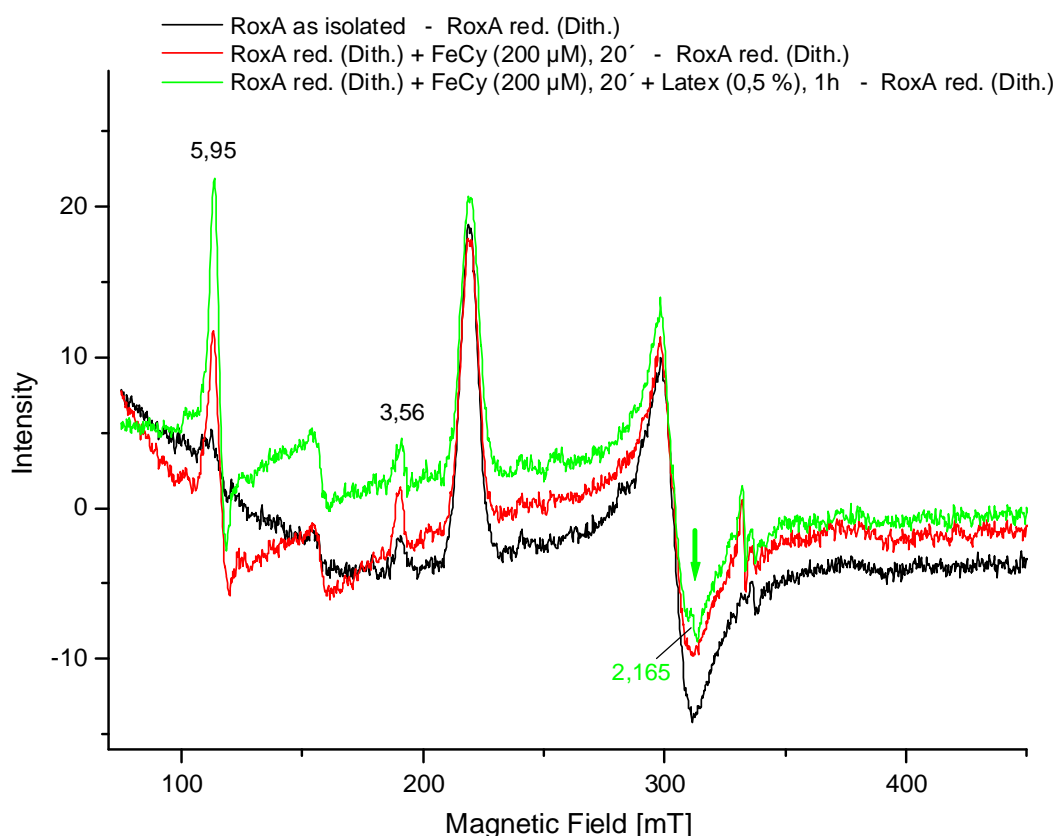


Abb. 3.107: EPR-Differenzspektren [– reduziertes RoxA (Dithionit)] von (rek.) RoxA nach Reoxidation mit Ferricyanid ($200\ \mu\text{M}$) unter N_2 -Atmosphäre, sowie nach Zugabe von Polyisopren-Latex (0,5 %) nach 1 h (aerob) nach Abzug des signalfreien Spektrums von vollständig reduziertem RoxA. Wie bereits gezeigt, entstanden auch mit Ferricyanid unter Sauerstoffausschluss deutliche *high-spin*-Spezies bei $g=5,95$, die nach Addition des RoxA-Substrats noch zunahm. Eine *low-spin*-Komponente bei $g=3,56$ ging nach Latex-Zugabe wieder leicht zurück. Eine schwache Signalkomponente bei $2,16$ zeigte sich im Ansatz mit Latex (grüner Pfeil).

3.11.10 Die Wirkung von Hämliganden auf substratinduzierte Zustände

Abb. 3.108 zeigt eine RoxA-Probe mit Latex nach anaerober Inkubation unter N_2 -Atmosphäre, die zunächst mit Dithionit reduziert und anschließend durch Exposition an Luft reoxidiert wurde. Es zeigten sich im Wesentlichen die nach Reduktion und Reoxidation beschriebenen Veränderungen mit einer deutlichen Zunahme einer *high-spin*-Spezies bei $g \approx 6$. Im Vergleich stellte sich das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$, welches durch die anaerobe Inkubation mit Latex leicht zurückgegangen war, nach Reoxidation wieder etwas deutlicher dar. Ein weiteres Signal bei $g=2,64$ entstand, welches auch mit ähnlichen Substraten ($g=2,62$) stets zusammen mit weiteren Signalen bei $g=2,16$ und $1,86$ noch intensiver auftrat und auch bei RoxA aus Latexkultur zu sehen war (s. o.). Somit ist das Auftreten eines Signals bei $g=2,64$ ein Indiz für eine ähnliche Wirkung am Enzym wie die Substratanaloga β -Carotin, Squalen und Pristan.

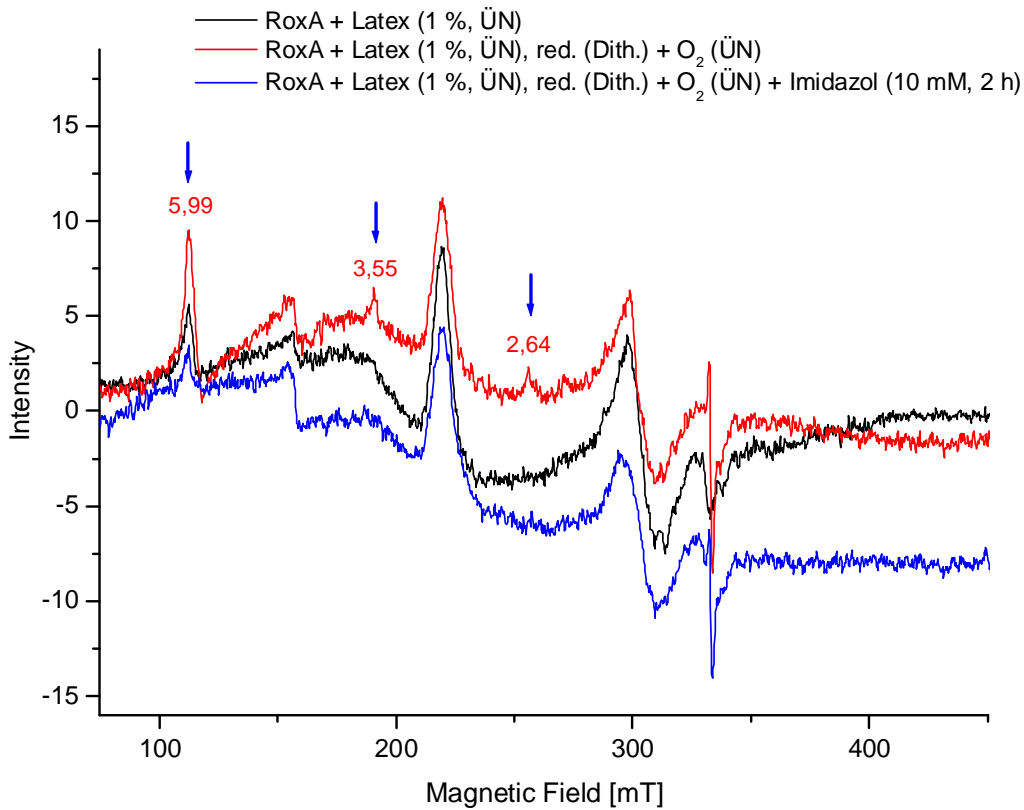


Abb. 3.108: EPR-Spektren von RoxA mit Latex (1 %) nach Inkubation über Nacht auf Eis (schwarz), nach anschließender Reduktion mit Dithionit und Reoxidation an Luft über Nacht (rot), sowie anschließender Inkubation mit Imidazol (10 mM) für 2 h (blau). Im Ansatz mit Latex war das *high-spin* bei $g=6$ etwas stärker als in RoxA "as isolated", ein *low-spin* bei $g=3,57$ dagegen schwächer. Nach Reduktion und Reoxidation trat ein deutliches *high-spin*-Signal auf, wiederum eine *low-spin*-Komponente bei $g=3,55$ und zusätzlich bei $g=2,64$. Diese Signale verschwanden nach Zugabe von Imidazol, ebenso ging das *high-spin*-Signal deutlich zurück (blaue Pfeile).

Die Zugabe des Hämliganden Imidazol zu dem reoxidierten Ansatz von RoxA mit Latex hatte prinzipiell den gleichen Effekt wie auf das Spektrum von RoxA "as isolated" (s. o.). *Low-spin*-Spezies bei $g=3,55$ und auch bei $g=2,64$ verschwanden, ebenso ging das *high-spin*-Signal bei $g=6$ deutlich zurück (Abb. 3.108). Ein ähnliches Experiment mit Squalen statt Latex, allerdings ohne vorherige Reduktion führte zum gleichen Ergebnis. Die Zugabe von Pyridin (5 mM) eliminierte ein *high-spin*-Signal, ebenso vollständig die typischen Signale der *low-spin*-Spezies bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$ (Abb. 3.109).

Da Imidazol bzw. Pyridin an einer freien Bindestelle des fünffach koordinierten Hämzentrums bindet, unterstreichen diese Beobachtungen, dass diese Signale – also auch eine mit Substraten neu entstandene *low-spin*-Spezies mit Signalen bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ – vom selben Hämzentrum stammen, während die Signale des zweiten, sechsfach koordinierten *low-spin*-Häms bei $g=3,09$ und $2,23$ unverändert blieben.

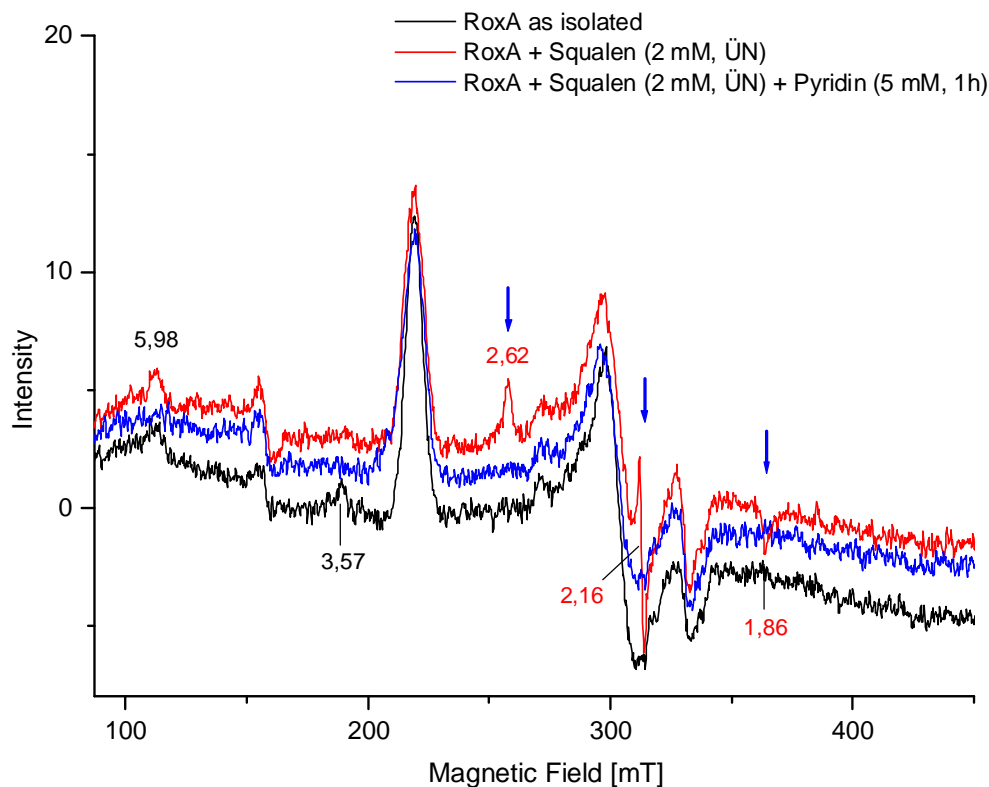


Abb. 3.109: EPR-Spektren von RoxA mit Squalen (2 mM) nach Inkubation über Nacht auf Eis unter aeroben Bedingungen (rot) und nach Zugabe von Pyridin (5 mM) und Inkubation für 1 h (blau). Mit Squalen ging das *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ aus RoxA "as isolated" zurück, gleichzeitig entstand eine neue *low-spin*-Hämspezies mit g -Werten bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ (vgl. auch Abb. 3.94, Abb. 3.104). Diese Signale verschwanden nach Zugabe von Pyridin (blaue Pfeile), ebenso ein *high-spin*-Signal bei $g\approx 6$.

Insgesamt lässt sich anhand der Experimente von RoxA bei An- und Abwesenheit verschiedener Liganden und Substrate aussagen, dass durch die erzwungene Reduktion der Hämzentren nach Reoxidation solche EPR-Signale erneut hervortraten, die unter den

jeweiligen Bedingungen bereits ohne eine Reduktion neu entstanden waren. Es traten intensive *high-spin*-Spezies auf, wenn keine externen Hämiliganden anwesend waren. Somit könnte man von einer Art "Reset"-Funktion der Reduktion sprechen, nach welcher gebundene Liganden, möglicherweise ein O₂-Molekül, gelöst und eine Zugänglichkeit für externe Substrate erleichtert sein könnte. Die Ergebnisse legten sowohl eine fehlende direkte Bindung am entsprechenden fünffach koordinierten Hämzentrum nahe, als auch eine Lokalisierung in der nahen Umgebung dieses Hämzentrums. Denn während das zugehörige *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ allein durch die Inkubation mit den Substraten meistens zurückging oder in seinem g -Wert leicht verändert war, so war die Entstehung dieses Signals in Versuchen nach Reduktion und Reoxidation bei Anwesenheit dieser Substrate erschwert gegenüber dem Parallelansatz ohne Substrate. Zur Veranschaulichung dessen zeigt Abb. 3.110 noch einmal eine Gegenüberstellung der EPR-Spektren von RoxA mit Pristan, Squalen bzw. Poly(*cis*-1,4-isopren) mit dem entsprechenden Spektrum von RoxA "as isolated" aus der gleichen Enzympräparation nach Reduktion mit Dithionit und Reoxidation an Luft.

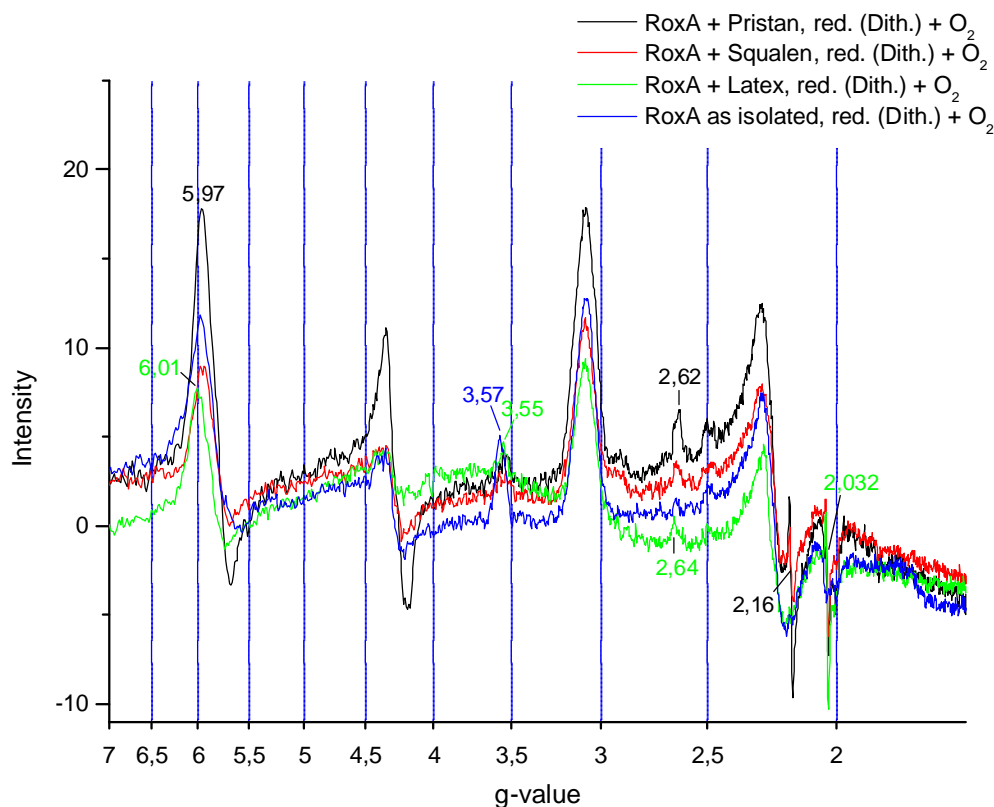


Abb. 3.110: G-Wert-Darstellung des Overlays von EPR-Spektren von (rek.) RoxA nach Reduktion (Dithionit) unter N₂-Atmosphäre bei Ab- und Anwesenheit der Substrate Pristan (1 mM), Squalen (2 mM) und Polyisopren-Latex (0,5 %) und vollständiger Reoxidation an Luft (> 3 h) [vgl. auch Abb. 3.103, Abb. 3.104, Abb. 108]. Wie auch bei RoxA "as isolated" entstanden mit dem RoxA-Substrat und den substratähnlichen Verbindungen starke *high-spin*-Spezies und erneut ein bei "as isolated" vorhandenes *low-spin* um $g=3,55$, welches aber gegenüber demjenigen im reoxidierten Ansatz ohne Substrate (blau, $g=3,57$) intensitätsschwächer und ggf. leicht verändert war. Mit Squalen und Pristan zeigte sich ein klares Signal bei $g=2,16$, das mit Latex nur ansatzweise auftrat, ohne Substrate aber nicht zu sehen war. Im Ansatz mit Latex waren die g -Werte einiger Signale leicht unterschiedlich zu den Substrat-Analoga (grün).

Es fiel jedoch auf, dass in dem in Abb. 3.108 dargestellten Experiment von RoxA mit Latex und Imidazol selbst nach zweistündiger Inkubation mit einer hohen Imidazol-Konzentration (10 mM) noch immer ein Teil dieser *high-spin*-Spezies im EPR-Spektrum sichtbar war (blaue Kurve). Bei entsprechenden Versuchen ohne Anwesenheit von Latex hatte dies stets zum vollständigen Verlust der *high-spin*-Signale geführt. Es stellte sich daher die Frage, ob durch die Anwesenheit von Latex der Zugang externer Hämliganden zur freien Fe-Koordinationstelle erschwert sein könnte. Im Versuch mit Squalen konnte Pyridin trotz Anwesenheit des Substratanalogons offensichtlich an das Häm-Fe binden und die durch Squalen verursachten Veränderungen vollständig umkehren, sowie zum Verlust einer wenn auch zuvor nur schwach ausgeprägten *high-spin*-Komponente führen. Künftig noch besser studieren ließen sich die Auswirkungen von Hämliganden in entsprechenden Versuchen nach Reduktion und Reoxidation bei Anwesenheit substratähnlicher Verbindungen, bei welchen deutlich stärkere *high-spin*-Signale zu erwarten wären.

In einem weiteren Experiment war nach sechstägiger Inkubation einer konzentrierten RoxA-Lösung (ca. 5 mg/ml) gegenüber dem Ansatz ohne Substrat im Ansatz mit Latex ein intensiveres *high-spin*-Signal entstanden und ein schwaches *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ zurückgegangen (vgl. Abb. 3.98). Zu beiden Ansätzen wurde nun Pyridin zugegeben und über Nacht bei 4°C gehalten. Das EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" mit Pyridin zeigte erwartungsgemäß das Verschwinden der *high-spin*-Spezies und eines *low-spin*-Signals bei $g=3,57$ bzw. dessen Pyridin-typische Verschiebung nach $g=3,33$. Im Ansatz mit Latex war das Signal bei $g=3,57$ bereits ohne Pyridin zurückgegangen, eine Verschiebung nach $g=3,33$ nach Zugabe von Pyridin war aber nur ansatzweise zu erkennen. Mehr noch blieb das *high-spin*-Signal bei $g=6$ selbst nach Inkubation über Nacht in kaum verminderter Intensität erhalten (Abb. 3.111). Normalerweise aber verläuft die Reaktion von RoxA mit Pyridin sehr schnell wie auch schon UV-Vis-Spektren bewiesen (s. Kap. 3.9.6.2). Auch wenn das *high-spin*-Signal im Ansatz ohne Latex vor der Pyridinzugabe nicht so intensiv war wie im Parallelansatz mit Latex (s. Abb. 3.98) und beide Ansätze somit nicht direkt hinsichtlich des Rückgangs der *high-spin*-Spezies vergleichbar waren, so bleibt die Aussagekraft der Stabilität des *high-spin*-Signals im Ansatz mit Latex und Pyridin (Abb. 3.111) davon unberührt.

Da die Bindung von Pyridin an einem Hämzentrum im *high-spin*-Zustand als erwiesen anzusehen ist (s. Kap. 4.9.1), kann man daraus schlussfolgern, dass die Koordinierung von Hämliganden geringer Größe durch die Präsenz von Poly(*cis*-1,4-isopren) verhindert oder zumindest deutlich erschwert ist. Dieser Befund ist ein weiteres starkes Indiz für die Lokalisierung des RoxA-Substrates in der direkten Umgebung des entsprechenden Hämzentrums. Möglicherweise werden durch Interaktion mit dem Substrat strukturelle Veränderungen um die Hämgruppe hervorgerufen, die bei fortdauernder Anwesenheit des Substrates nur langsam rückgängig zu machen sind, oder durch Bindung des Substrates könnte schlicht der Zugang zum Häm-Fe erschwert sein. Übereinstimmend unterblieb auch in einem anschließenden Versuch nach Reduktion und Reoxidation im Ansatz mit RoxA und

Pyridin alleine die Entstehung des *high-spin*-Signals, im Ansatz mit Pyridin und Latex war noch eine schwache *high-spin*-Spezies bei $g=6,0$ auszumachen (ohne Abb.).

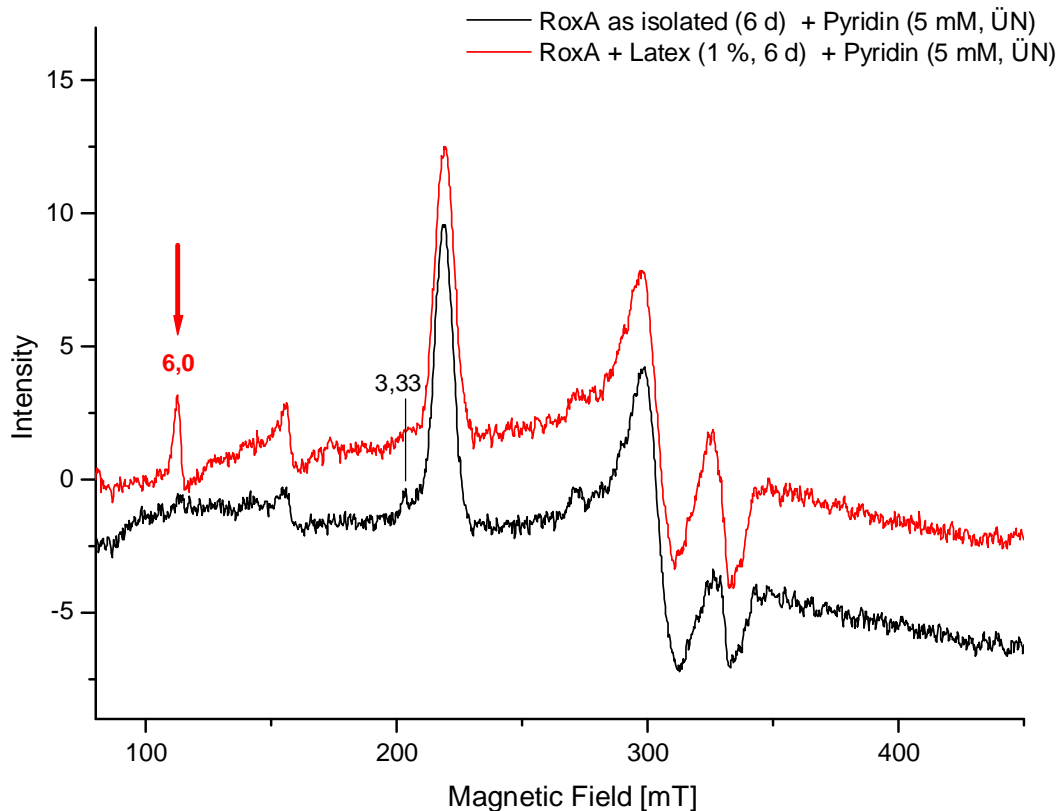


Abb. 3.111: EPR-Spektren von RoxA "as isolated" (6 d) bzw. RoxA mit Latex (1 %) nach Inkubation mit Pyridin (5 mM) über Nacht bei 4°C. Zum Vergleich der Spektren vor der Pyridinzugabe siehe Abb. 3.98. Trotz langer Inkubation mit Pyridin blieb das *high-spin*-Signal bei $g=6$ im Ansatz mit Latex weitgehend erhalten (roter Pfeil). Ein für eine Bindung von Pyridin bei RoxA typisches *low-spin*-Signal bei $g=3,33$ war in beiden Ansätzen nur ansatzweise, etwas deutlicher aber im Ansatz ohne Latex zu erkennen.

Diskussion

Teil I

4.1 Überexpression und Reinigung von RoxA

4.1.1 Überexpression von RoxA

Die Überexpression von RoxA ist eine der wichtigsten Voraussetzungen zur Aufklärung der Wirkungsweise des Kautschuk spaltenden Enzyms. Um eine erleichterte und schnellere Reinigung zu erreichen und Mutagenese-Experimente durchführen zu können, waren Versuche zur Überexpression in verschiedenen Organismen unternommen worden. Doch weder konnte eine erfolgreiche Expression in Stämmen von *E. coli* oder *Pseudomonas putida* bzw. *P. fluorescens* mit verschiedenen Expressionssystemen zusammen mit dem zusätzlichen Plasmid pEC86, welches eine konstitutive Expression von Cytochrom-*c*-Reifungsgenen (*ccm*) gewährleistet (Thöny-Meyer, 1997; Arslan *et al.*, 1998), noch im Gram-positiven *Bacillus subtilis* WB800 gelingen. Die Versuche der Expression in *E. coli* konnten zwar die Bildung geringer Mengen an RoxA belegen, auch lagen Hinweise auf den Einbau der Hämgruppen vor, das Protein wurde aber nicht sekretiert, sondern wurde zusammen mit Membranbestandteilen nachgewiesen und erwies sich unter den Versuchsbedingungen als unlöslich (s. Kap. 3.1.1.2). Mit dem di-Häm *c*-Typ-Cytochrom Dhc2 aus *G. sulfurreducens* hingegen konnte eine Überexpression unter den gleichen Bedingungen im gleichen Stamm, sowie eine Teilreinigung erfolgreich durchgeführt werden. Es erschien somit nicht lohnenswert, die Bemühungen um eine heterologe Überexpression von RoxA ohne genauere Kenntnis der Ursache für die Schwierigkeiten fortzusetzen.

Da die Funktionalität der Promotoren, sowie eine Expression des Apoproteins mit veränderter Signalsequenz in *E. coli* Rosetta gezeigt werden konnte, könnte der Grund vorrangig bei der Sekretion, aber auch dem Einbau der beiden Hämgruppen liegen. Dass das gebildete RoxA in *E. coli* anders als in *Xanthomonas* sp. 35Y nicht sekretiert wurde und zudem unlöslich mit Membrankomponenten gefunden wurde, könnte auf das Blockieren von Transportkanälen hindeuten, was zudem die Wachstumshemmung erklären würde. Die Vermutung liegt somit nahe, dass der RoxA-Export in *Xanthomonas* sp. offenbar anders erfolgt als er in *E. coli* möglich ist bzw. dieser die N-terminale Signalsequenz nicht erkennt oder zu einem ungeeigneten Exporter fehlerhaft ist. Cytochrome werden in *E. coli* normalerweise über den SEC-Weg ins Periplasma exportiert, wo der Einbau der Hämgruppen erfolgt. Wie dies genau im entsprechenden *Xanthomonas*-Stamm verläuft, ist bislang nicht bekannt. Am wahrscheinlichsten muss gelten, dass der Hämeinbau im Periplasma stattfindet, wobei im Falle des für Gram-negative Bakterien typischen Typ I-Systems des Hämeinbaus der Export

des ungefalteten Polypeptids über den SEC-Weg erfolgte. Wie in diesem Falle aber die Sekretion ins extrazelluläre Medium vonstatten ginge, ist ebenso unklar. In *Xanthomonas* sp. könnte sogar ein spezielles Exportsystem existieren, welches *E. coli* fehlt, und theoretisch seine Funktion eigens für RoxA erfüllen könnte. Da die Sekretion von rekombinantem RoxA nach Rhamnose-Induktion gleichermaßen funktionierte, ist die Anwesenheit von Latex zum Export von RoxA nicht notwendig, denn. Das einzige weitere Kautschuk spaltende Enzym, Lcp aus *Streptomyces* K30 wird über TAT-Exporter sekretiert (Yikmis *et al.*, 2008). Allerdings besitzt dieses keine Hämgruppen, deren Einbau bei Gram-negativen Bakterien gewöhnlich im Periplasma erfolgt. Die theoretische Möglichkeit der Notwendigkeit von beim Transport bzw. Export beteiligten Proteinen, die nur bei Anwesenheit von Poly(*cis*-1,4-isopren) oder Spaltprodukten gebildet werden könnten, wurde durch die erfolgreiche homologe Überexpression vom Rhamnose-Promotor auf p4782.1::*roxA* entkräftet. Dennoch gelang dies nur, falls das Expressionsplasmid in den Genlokus von *roxA* integrierte. Somit sollte die Möglichkeit bedacht werden, dass dabei die Expression von weiter *downstream* gelegenen Genen im Zuge der Expression von *roxA* eine Rolle spielen könnte, auch wenn der bekannte Bereich von nur ca. 3 kb keine dafür offensichtlich in Frage kommenden Gene enthält (s. Kap. 3.8.1; vgl. Abb. in Braaz, 2005 b).

Eine erfolgreiche Expression von rekombinantem RoxA gelang schließlich homolog in *Xanthomonas* sp. 35Y nach Transformation des Expressionsvektors p4782.1::*roxA* mit *roxA* unter Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors (Hambusch *et al.*, 2010). Wie sich gezeigt hatte, basierte die Integration und damit die erfolgreiche Expression von RoxA auf einem zufälligen Ereignis. Durch spezifische PCR-Reaktionen und einen Southern-Blot mit einer DIG-*roxA*-Sonde wurde schließlich die Integration des Expressionsplasmids über homologe Rekombination mit dem chromosomalen *roxA* nachgewiesen (Birke, 2010; pers. Information N. Hambusch). Infolgedessen liegen im funktionellen Expressionsstamm zwei Hybrid-*roxA*-Gene gleicher Sequenz, eines unter Kontrolle des natürlichen Promotors und eines unter Rhamnose-Kontrolle, am eigentlichen Genlokus vor (vgl. Birke, 2010, Abb. 20). Gewissheit über die tatsächliche Ursache besteht bisher nicht. Auf der Hand liegt, dass die höhere Kopienzahl bei Persistenz des Expressionsplasmids in der Zelle gegenüber nur einer Kopie nach Integration des Plasmides im Chromosom eine wesentliche Rolle bei der Wachstumsinhibierung der Stämme spielen könnte (s. auch Birke, 2010). Da von J. Birke durchgeführte Versuche mit Stämmen, bei denen das Plasmid nachweisbar war, besseres Wachstum bei Einsatz nur minimaler Rhamnose-Mengen zeigten, könnte eine übermäßig starke RoxA-Produktion die Reifungs- bzw. Exportmechanismen überlasten oder hohe Konzentrationen innerhalb der Zelle die Zellphysiologie empfindlich stören.

Zusammen genommen zeigten die zahlreichen Versuche der Überexpression von RoxA in verschiedenen Systemen große Schwierigkeiten auf, die nur unter erheblichem Zeitaufwand zu lösen sind. Daher war abzusehen, dass parallel und vorrangig die weitere biochemische und spektroskopische Charakterisierung des unveränderten Enzyms aus dem

Wildstamm voran getrieben werden musste, um einen Fortschritt des Verständnisses dieser neuartigen Dioxygenase im vorgesehenen Rahmen dieser Arbeit zu erreichen. Unlängst gelang schließlich im Rahmen weiter führender Arbeiten die Konstruktion einer *roxA*-Deletionsmutante durch Integration der Attachmentsite (*attB*) des Phagen PhiC31 anstelle von *roxA*, sowie die gezielte Integration des *roxA*-Expressionsplasmids, mithilfe der darauf enthaltenen Attachmentsite *attP* und der PhiC31-Integrase, in den Genlocus von *roxA* (unveröffentlichte Ergebnisse N. Hamsch). Das Gelingen dieser Arbeiten ermöglicht nun die Durchführung einer RoxA-Mutagenese.

4.1.2 Expression und Reinigung von RoxA

Die notwendige Voraussetzung für eine biochemische Charakterisierung von RoxA war die Reinigung des Enzyms aus dem *Xanthomonas*-Kulturüberstand. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Reinigung aus Minimalmedium mit Latex bei Raumtemperatur in zwei bis drei chromatographischen Schritten entwickelt. Trotz der durch Anwesenheit von Latexmilch entstehenden Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung und des Verlustes von Enzym durch Adhäsion am Substrat konnte diese Vorgehensweise, in Abhängigkeit der verwendeten Latices, RoxA in Ausbeuten von etwa 1–4 mg/L in hoher Reinheit aus dem *Xanthomonas*-Wildtyp liefern (s. Kap. 3.2.2; Hamsch *et al.*, 2010). Die Steigerung des Enzymertrags gegenüber einem von R. Braaz für 4°C entwickelten Protokoll mit einer Ausbeute von ca. 0,5 mg/ml wurde nicht zuletzt dadurch möglich, dass aufgrund der offenbar fehlenden Katabolitrepression Gluconat als zusätzliche C-Quelle eingesetzt werden konnte (s. Kap. 3.2.1). Ein großes Problem waren die starke Adhäsion zwischen Enzym und Substrat und die damit verbundene Abtrennung erheblicher RoxA-Mengen. Da die Expression der Rubber Oxygenase im *Xanthomonas*-Wildtyp aber die Anwesenheit von Latexmilch im Kultivierungsmedium erfordert, die Verwendung unterschiedlicher Latices mit abweichenden physikalischen Eigenschaften aber große Schwierigkeiten zur Erzielung hoher Ausbeuten mit sich brachte, wurde die homologe Überexpression nach deren Realisierung bevorzugt. Darüber hinaus erlaubte das rekombinante RoxA die Untersuchung des RoxA-Zustandes vor möglicherweise eintretenden Veränderungen nach Kontakt zum Substrat.

Mit rekombinant exprimiertem RoxA aus *Xanthomonas* sp. -Kulturen in LB-/NB-Medium konnten unter Verwendung eines ähnlichen, vom Prinzip her gleichen Reinigungsprotokolls RoxA-Ausbeuten von bis zu 10 mg/L Kulturüberstand nach knapp dreitägiger Expression und anschließender Reinigung erhalten werden (s. Kap. 3.2.3). Der Vergleich der Enzym-Präparationen aus dem Wildtyp sowie rekombinant exprimiertem RoxA bezüglich Aktivität und UV-Vis-spektroskopischer Eigenschaften ergab keine signifikanten Unterschiede. Zudem wurde mittels CD-Spektroskopie Übereinstimmung beider RoxA-Isolate festgestellt (s. Kap. 3.10.1), so dass mit RoxA aus Latexkultur begonnene

spektroskopische Untersuchungen mit rekombinantem RoxA fortgesetzt und unter Beachtung der Unterschiede bei der Kultivierung verglichen werden konnten.

Als günstig für die Expression und vorteilhaft für die anschließende Reinigung kann die Kultivierung von *Xanthomonas* sp. in LB-Medium mit einem Bruchteil der Menge an Hefeextrakt (ca. 5 %) und die Induktion mit 0,1 % Rhamnose in der exponentiellen Wachstumsphase, etwa 24 h nach dem Animpfen empfohlen werden. Durch diese Kombination lassen sich ebenso hohe Ausbeuten wie in LB-Vollmedium und der Rhamnose-Induktion von Beginn an erzielen, doch wird so die Menge an stark absorbierenden farbigen Substanzen reduziert und gewährleistet, dass die produzierten RoxA-Moleküle möglichst wenig altersbedingte Veränderungen durchlaufen. Als wichtig muss zudem die Vermeidung längeren Wachstums in der stationären Phase angesehen werden, da hierdurch die Freisetzung intrazellulärer Proteine durch Zellyse minimiert werden kann. Von Nachteil sind dabei insbesondere weitere, die RoxA-Absorption überlagernde Cytochrome, und auch den RoxA-Abbau fördernde intrazelluläre Proteasen.

Es stellte sich heraus, dass ein anfänglicher Chromatographie-Schritt an Q-Sepharose bei pH 7,7 zwar einen Großteil der stark bindenden, farbigen Bestandteile des Mediums abtrennen konnte, dennoch aufgrund des großen Probenvolumens mehrere Läufe bei pH 8,5 erforderlich waren. Die Abtrennung der stark bindenden Bestandteile konnte auch allein innerhalb dieser Läufe erfolgen, ohne die RoxA-Reinheit zu mindern. Daher kann empfohlen werden, auf den Lauf bei pH 7,7 zu verzichten und mehrere Läufe bei pH 8,5 durchzuführen, wobei darauf zu achten ist, das Auftragevolumen von etwa $\frac{2}{3}$ des Säulenvolumens nicht zu überschreiten, oder aber das Probenvolumen durch Ultrafiltration zuvor auf ein entsprechend geringes Volumen einzuengen, so dass ein einzelner Lauf ausreicht. Hinsichtlich der hohen Reinheit des nach Hydroxyapatit-Chromatographie erhaltenen RoxA ist keine Optimierung der Reinigung durch weitere Schritte erforderlich. Mit Blick auf die Möglichkeit, künftig routinemäßig RoxA-Mutanten zu reinigen und zu charakterisieren, wäre ein getaggetes Protein hilfreich, um die Prozedur zu beschleunigen und einen Einfluss eines möglicherweise veränderten Bindungsverhaltens an das Säulenmaterial auf die Reinigung auszuschließen.

Die Feststellung geringer ODTD-produzierender Aktivität in "nicht-RoxA-typischen" Q-Sepharose-Fractionen ist angesichts der Reinigungsmethode mit hohem Auftragevolumen nicht überraschend und muss nicht zwingend eine inhomogene Population des zu reinigenden Enzyms oder gar eines weiteren Latex spaltenden Enzyms bedeuten. Unklar wäre zudem, ob ein solches zur spezifischen Generierung von ODTD beitrüge, auf dessen Detektion der Aktivitätstest beruht (vgl. Kap. 4.13). Auch die zunächst inhomogen erscheinende RoxA-Elution von Hydroxyapatit-Säulen (Abb. 3.14) kann mit Faktoren erklärt werden, die vom Säulenmaterial und der Elutionsmethode abhängen (s. Kap. 3.2.3). Angesichts mancher z. T. abweichender bzw. nicht konstant reproduzierbarer Ergebnisse der UV-Vis- und auch EPR-Spektroskopie kann jedoch die Möglichkeit einer gewissen, vermutlich präparations-abhängigen Inhomogenität nicht ausgeschlossen werden. Vorstellbar wäre dies mit Blick auf

das unterschiedliche Alter von RoxA-Molekülen, insbesondere innerhalb von Präparationen aus Latexkultur, zumal in einigen Präparationen im EPR-Spektrum intensitätsschwache *low-spin*-Signale mit für RoxA "as isolated" untypischen *g*-Werten ($g \approx 2,8$; $g \approx 2,5$) auftraten.

Teil II

4.2 Allgemeine Untersuchungen

4.2.1 Induktion der RoxA-Expression

Über die Regulation der RoxA-Expression war zum Beginn dieser Arbeit bis auf die Substratinduzierbarkeit wenig bekannt. Verschiedene Versuche wurden unternommen, diese besser zu verstehen. Da es anfänglich nicht gelang, RoxA in verschiedenen Systemen heterolog (s. Kap. 3.1.1) oder homolog in *Xanthomonas* sp. plasmidcodiert zu exprimieren, war die Notwendigkeit einer Substratinduktion von weiteren, an der Faltung bzw. dem Transport beteiligten Proteinen vermutet worden. Schließlich zeigte die erfolgreiche Realisierung der homologen Überexpression andere Ursachen für die Schwierigkeiten auf (s. Kap. 4.1.1) und belegte, dass die Prozessierung und der Transport von RoxA vermutlich nicht von Latex-induzierbaren Proteinen abhängen (Hamsch, 2008).

Bei der Verwertung vieler Substrate wird häufig eine Katabolitrepression der dafür notwendigen Enzyme bei Verfügbarkeit einer besser verwertbaren C-Quelle beobachtet. Bei den meisten Kautschuk abbauenden Aktinomyceten hemmt die Anwesenheit von Glucose, Succinat oder anderen löslichen C-Quellen die Expression der zum Latexabbau benötigten Enzyme, wobei jedoch je nach Substrat Unterschiede im Ausmaß der Aufklarungszonenbildung beobachtet wurden (Jendrossek *et al.*, 1997). Eine solche Hemmung wurde bei *Xanthomonas* sp. nicht festgestellt. Mit allen getesteten Medien bildete *Xanthomonas* sp. noch immer Aufklarungszonen auf Latex-Overlay-Agar (Fahrbach, 2007). Auch die Bildung von RoxA in Flüssigkultur zusammen mit Latex wurde durch die Anwesenheit verschiedener C-Quellen nicht gehemmt, lediglich die Kultivierung in Vollmedien wie NB oder LB verhinderte die Expression des Latex spaltenden Enzyms (s. Kap. 3.4.1). Diese Beobachtungen lassen auf eine unterschiedliche Regulierung der Expression der für die Latexspaltung genutzten Enzyme schließen. Bei *Xanthomonas* sp. kann offensichtlich die Anwesenheit einer besser verwertbaren C-Quelle alleine die RoxA-Bildung nicht inhibieren. Gleichwohl zeigt die Hemmung in Vollmedien, dass eine vom Nährstoffangebot abhängige Regulierung der Kautschukverwertung existieren muss.

Die zur RoxA-Induktion durchgeführten Versuche konnten eine Beteiligung der primären Latex-Spaltprodukte an der Induktion von RoxA aufzeigen (s. Kap. 3.4.2). Gleichmaßen lassen sie eine Beteiligung von polymeren Poly(*cis*-1,4-isopren)-Molekülen durch mögliche Erkennung an der Zelloberfläche unwahrscheinlich erscheinen. Dies wird zusätzlich zur nachgewiesenen Induktion durch ODTD zum einen auch an der Beobachtung einer Zeitspanne bis zur Detektierbarkeit der RoxA-Produktion von etwa 4–5 Tagen nach Latexzugabe zu einer *Xanthomonas*-Kultur deutlich. Nach Zugabe der extrahierten Spaltprodukte ist dies bereits spätestens nach Über-Nacht-Expression der Fall. Zum anderen lässt sich ausschließen, dass im Extrakt der Spaltprodukte möglicherweise vorhandene Polymerrückstände die erkennbare Induktion bewirkten, denn Extrakte der Latex-Suspension (ohne RoxA) wie auch die in verschiedenen Enzym-Mediator-Systemen unspezifisch gespaltene Latex hatten im gleichen Zeitraum keine induzierende Wirkung. Auch Versuche mit "Spent Medium" aus *Xanthomonas*-Latex-Kultur nach Entfernung des Substrates aus dem Kulturüberstand, hatten keine RoxA-Induktion anzeigen können (Fahrbach, 2007). Durch HPLC war im Kultivierungsmedium kein ODTD mehr nachweisbar, was die Notwendigkeit der Anwesenheit von spezifischen Spaltprodukten unterstützt, sowie eine Induktion durch andere sekretierte Faktoren ausschließt. Zudem führten verschiedene Verbindungen mit gewissen Ähnlichkeiten zu ODTD wie Methylverzweigungen bzw. endständige Aldehyd- oder Ketogruppen nicht zur Expression von RoxA. Die festgestellte Wachstumshemmung mit vielen dieser Verbindungen wie auch in höherer Dosierung von ODTD bestätigte die Toxizität von Aldehyd- bzw. Ketogruppen gegenüber *Xanthomonas* sp.. Es ist anzunehmen, dass beim Wachstum auf Latex keine hohe ODTD-Konzentration anfällt, da ODTD aufgenommen und verstoffwechselt wird.

Indem die Induktion der RoxA-Expression allein mit isoliertem ODTD gelang, belegen die Versuchsergebnisse insgesamt, dass für die Induktion von RoxA spezifisch dessen Latex-Spaltprodukte verantwortlich sind unspezifisch generierte Latex-Spaltprodukte oder andere sekretierte Faktoren. Ob eher die Größe des potentiellen Induktors oder aber die Endgruppen (Keto- und Aldehydende) von Bedeutung sind, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht entscheiden. Da jedoch bei den Versuchen mit Enzym-Mediator-Systemen zu erwarten ist, dass Latex-Abbauprodukte mit entsprechenden Enden wie die RoxA-Spaltungsprodukte, jedoch aufgrund der unspezifischen Spaltung von sehr variabler Größe vorliegen müssen (Enoki *et al.*, 2003), spielt wahrscheinlich die Anzahl der Isopreneinheiten bei der Funktion als Induktor eine wesentliche Rolle. Als wahrscheinlich muss derzeit die Induktion durch ODTD gelten, das den weitaus größten Anteil (ca. 90 %) an den Spaltprodukten ausmacht (Braaz *et al.*, 2004). Doch befanden sich vermutlich noch weitere geringfügig in der Zahl der Isopreneinheiten abweichende Spaltprodukte in der Extraktionsphase, die diese Funktion ebenso erfüllen könnten.

Wie es häufig bei der Erschließung extrazellulärer Substrate zu sehen ist, kann somit indirekt auf eine eine basale Grundexpression von RoxA geschlossen werden, die eine

Bereitstellung von ODTD zur Anschaltung einer stärkeren Expression gewährleistete. Diese müsste sich jedoch auf einem mit den gängigen Methoden nicht nachweisbaren Niveau bewegen. Denn weder mit SDS-PAGE noch im empfindlichen Aktivitätstest war im *Xanthomonas*-Kulturüberstand ohne die Präsenz von Poly(*cis*-1,4-isopren) oder dessen Spaltprodukten RoxA nachzuweisen. Ein weiteres Szenario wäre denkbar, das zur Zeit jedoch rein spekulativ ist. Kap. 4.13 reflektiert die Möglichkeit der Anwesenheit mindestens eines zweiten, die Latex-Stränge an zufälliger Position (Endo-Typ) spaltenden Enzyms im Kulturüberstand bei Gram-negativen und auch Gram-positiven Bakterien. Ein solches könnte alternativ zu RoxA konstitutiv exprimiert werden und die dadurch in geringer Menge anfallenden ODTD-Moleküle die Expression von RoxA anschalten.

Für das bisher einzige weitere bekannte Latex spaltende Enzym Lcp bei Gram-positiven Bakterien konnte bereits eine geringe Grundexpression von *lcp* mit RT-PCR auch bei Abwesenheit von Polyisopren nachgewiesen werden, die auf eine Induktion durch Kautschukspaltprodukte hindeutet (Yikmis *et al.*, 2008). Ein direkter Nachweis der Induktion durch entsprechende Spaltprodukte steht für Lcp noch aus. Im Falle von RoxA konnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine solche Induktion der RoxA-Expression durch die RoxA-generierten Latex-Spaltprodukte (ODTD) zeigen. Angesichts dessen wäre es wünschenswert, wenn zur Untermauerung dieses Befundes, auch ein direkter Nachweis einer RoxA-Grundexpression mittels RT-PCR gelänge. Eine Antikörperdetektion von RoxA aus konzentriertem Kulturüberstand von Latex-frei kultiviertem *Xanthomonas* sp. gelang bisher nicht. Dennoch spricht die Entdeckung einer Basalexpression des die gleiche Reaktion katalysierenden Lcp auch für eine vergleichbare Situation bei *roxA*.

4.2.2 Korrelation zwischen Enzym- und Substratkonzentration

Mit dem Wissen um die spezifische Induktion von RoxA durch Latex-Spaltprodukte schien es lohnenswert, vor der Realisierung der Überexpression größere ODTD-Mengen für die RoxA-Produktion zur Verfügung zu haben, neben dessen Einsatz als Substrat-Modellsubstanz in der Spektroskopie und für Kristallisationsversuche. Bei den in Kap. 3.5 dargestellten Versuchen stand daher die Ergründung einer günstigen Kombination der zur ODTD-Produktion beteiligten Faktoren im Vordergrund, um insbesondere mit minimiertem Aufwand an gereinigtem Enzym zeitsparend eine maximale Ausbeute der Latex-Spaltprodukte zu erhalten. Sie lieferten aber auch viele Informationen zu den bis dahin nur unzureichend charakterisierten Enzym-Substrat-Beziehungen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich diese nicht in einfacher Weise beschreiben lassen und von vielen Faktoren beeinflusst werden.

Für eine entscheidende Bedeutung des Verhältnisses von Enzym- zur Substratkonzentration für die Reaktionsgeschwindigkeit, d. h. die Produktbildungsrate spricht die größere ODTD-Menge bei niedrigen Enzym-Konzentrationen (< 50 µg/ml) und 0,5 % Latex gegenüber der signifikant geringeren Menge der entsprechenden RoxA-Konzentration

mit 5 % Latex (vgl. Abb. 3.19). Anhand der relativen ODTD-Ausbeute (pro Enzymkonzentration), die mit einer Substratkonzentration von 0,5 % bei allen getesteten Enzymkonzentrationen höher war als die entsprechende mit 5 % Latex, lässt sich gleichermaßen erkennen, dass nicht allein das Enzym-/Substrat-Verhältnis, sondern auch die absolute Substratkonzentration bedeutsam sein muss. Bei hoher Latexdichte könnten sich Interaktionseffekte negativ auswirken. Dass die ODTD-Ausbeuten mit hoher Latex-Konzentration (5 %) bei längerer Inkubation (>24 h) verglichen mit drei Stunden gegenüber den entsprechenden Ansätzen mit 0,5 % Latex noch deutlich anstiegen, kann auf die fehlende Substratlimitierung zurückgeführt werden.

Möchte man diese bereits vorliegenden Befunde als Basis zur optimalen Herstellung von ODTD nutzen, kommt es demnach bei der Wahl des Versuchsansatzes auf die limitierenden Faktoren an, sei es Latex- oder RoxA-Menge oder die Zeit. Nimmt man in der Praxis die Verfügbarkeit zum Einsatz von Kautschuklatex als unbegrenzt an und stellt die Zeit kein Problem dar, böten sich zur Herstellung einer möglichst hohen absoluten ODTD-Menge Ansätze mit hoher Latexkonzentration bis zu 5 % und 200 µg RoxA/ml über mindestens 48 Stunden an. Spielte der Zeitfaktor, sowie die aufzuwendende Latex-, insbesondere aber die RoxA-Menge eine Rolle, würden Ansätze mit etwa 40 µg RoxA/ml und geringerer Latexkonzentration (0,5 %) bereits über maximal 24 Stunden zu höheren Produktmengen als vergleichbare Ansätze mit hoher Latexkonzentration im gleichen Zeitraum führen, aber nur etwa knapp ein Drittel der absoluten Produktmenge liefern. Angesichts des hohen Aufwandes der RoxA-Reinigung kommt aber der absoluten Enzymmenge große Bedeutung zu. So wären in einem solchen Inkubationsansatz die relativen ODTD-Ausbeuten pro Enzymkonzentration am höchsten. Diese Annahmen basieren auf der Durchführung bei der für RoxA optimalen Reaktionstemperatur von 40°C. Da Vorversuche bei 30°C unter Inkaufnahme längerer Inkubationszeiten aber höhere Produktausbeuten lieferten (s. Kap. 3.5), ließen sich unter Vernachlässigung des Zeitfaktors günstigere Bedingungen bei Temperaturen unterhalb des Optimums finden. Diese Beobachtung weist außerdem darauf hin, dass die ab spätestens 24stündiger Testdauer bei 40°C festgestellte, verminderte Zunahme der ODTD-Menge auch auf einer temperaturbedingten Enzyminaktivierung beruht.

Die Enzymkinetik von RoxA lässt sich aus Gründen, die aus der Art der Substratspaltung und auch dem verwendeten Testverfahren entstehen, nicht durch eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben. Die hohe Affinität von RoxA zu seinem Substrat erschwert eine Definition durch eine solche einfache Enzymkinetik. Nach Formierung von Enzym-Substrat-Komplexen und Freisetzung der Spaltprodukte bleibt Poly(*cis*-1,4-isopren) aufgrund seiner Eigenschaft als Polymer vermutlich am Enzym gebunden. Aus einem Substratmolekül können außerdem sehr viele Produktmoleküle entstehen. Je nach Art und Weise des Angriffs am Substrat wäre zudem die Bindung mehrerer RoxA-Moleküle an einem Substratstrang möglich, sowie eine Restbindung nicht weiter

spaltbarer Substratreste am Enzym nicht auszuschließen. Auch beeinflusst das Aggregationsverhalten von Kautschuk das Ergebnis. Zudem führt der Auftrieb von Poly(*cis*-1,4-isopren) zu einer inhomogenen Substrat- und wahrscheinlich auch Enzym-Verteilung im ruhenden Reaktionsansatz, die sich schwer definieren lässt (s. dazu Kap. 4.2.3). Die kontinuierliche Verfolgung der Reaktionsgeschwindigkeit ist aufgrund der Methode des RoxA-Aktivitätstests (s. Kap. 2.7.1) nicht möglich und wäre nur durch ständige Probennahme unter erheblichem Aufwand annähernd zu realisieren. Bei regelmäßiger Entnahme aus einem Batchansatz käme das Problem der Änderung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen hinzu, welches für die Bereitstellung von O₂, des für die Reaktion notwendigen zweiten Substrates, eine Rolle spielt. Die Angabe eines K_m-Wertes ist somit nicht ohne Weiteres möglich. Auch lassen sich grundsätzlich molare Konzentrationen von Poly(*cis*-1,4-isopren) nicht ohne Weiteres angeben und variieren in verschiedenen Latex-Proben.

4.2.3 Bewertung des Aktivitätstest-Verfahrens

Prinzipiell ist der Aktivitätstest auf der Basis eines direkten Nachweises der von RoxA gebildeten Latex-Spaltprodukte eine sehr verlässliche Methode. Der Nachweis mittels HPLC ermöglicht eine exakte Quantifizierbarkeit über direkten Vergleich der entsprechenden ODTD-Peakflächen. Für ein aussagekräftiges Ergebnis genügt eine sehr geringe RoxA-Konzentration von weniger als 50 nM. Doch besitzt das Testverfahren einige potentielle Fehlerquellen, deren Auswirkungen bei der Durchführung und Auswertung der Testergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Neben zahlreichen Pipettierschritten als Fehlerquelle ist im Besonderen die Abhängigkeit der gebildeten ODTD-Menge vom Zeitraum der Inkubation zu bedenken. Bei Inhibitorstests stimmte sie in Abhängigkeit der Wirkungsweise einer Substanz zwar in einigen Fällen bei unterschiedlichen Inkubationszeiten überein, kann aber nie unabhängig von der Versuchsdauer betrachtet werden. Diese ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn zum Substrat kompetitive Inhibitoren Verwendung finden (s. Kap. 3.6.1, Tab. 3.2). Angesichts der bei den verwendeten Konzentrationen an Enzym und Substrat nach ÜN-Inkubation kaum noch zunehmenden ODTD-Menge verglichen mit einer Versuchsdauer von drei Stunden sind eher Testergebnisse nach kürzerer Inkubationszeit (3–4 h) als potentiell aussagekräftiger anzusehen. Eine generelle Schwierigkeit ergibt sich aus der Eigenschaft von Poly(*cis*-1,4-isopren), sich in wässriger Lösung aufgrund seiner geringeren Dichte mit der Zeit an der Oberfläche anzusammeln, wodurch sich dort in einem während der Inkubation ruhenden Ansatz allmählich eine höhere lokale Latexkonzentration einstellt. Eine hohe RoxA-Konzentration schien dabei diesen Prozess durch Förderung der Aggregation der Latexpartikel noch zu beschleunigen (s. Kap. 3.6.2). Folgerichtig nimmt dabei auch das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, d. h. der damit verbundene Sauerstoffeintrag Einfluss auf das Testergebnis. Angesichts der in Kap. 3.5 besprochenen Enzym-Substrat-Beziehungen

ist es nicht überraschend, dass in regelmäßig durchmischten Ansätzen, in denen annähernd die anfänglich eingestellte Latexkonzentration von 0,2 % vorlag, eine veränderte Aktivität verzeichnet wurde als in ruhenden Ansätzen. Da sich im Fall dieser gewöhnlich verwendeten Substratkonzentration bei Durchmischung eine verminderte ODTD-Produktion und somit scheinbar geringere Aktivität ergab, ist im ruhenden Testansatz ein etwas günstigeres Enzym-Substratverhältnis an der Oberfläche der Suspension anzunehmen. Als wichtig hatte sich in diesem Zusammenhang die Wahl des Puffers erwiesen, indem eine Beeinflussung der Auftriebseigenschaften des polymeren Substrates festgestellt wurde (s. Kap. 3.6.2; 3.6.3). Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die in organischen Puffern wie Bis-Tris und Tris gegenüber dem ionischen KP-Puffer signifikant geringere Aktivität (s. Tab. 3.6) offenbar durch Verminderung des Auftriebs von Poly(*cis*-1,4-isopren) verursacht wird, was bereits mit bloßem Auge festgestellt werden kann (s. Kap. 3.6.2). Diese Annahme gründet sich auf die tendenzielle Übereinstimmung der Aktivitätswerte mit organischen Puffern (100 mM) mit solchen aus regelmäßig suspendierten Ansätzen mit KPP und gleichermaßen auf die Übereinstimmung von ruhenden KPP-Ansätzen mit solchen einer geringeren Konzentration der organischen Komponente (10 mM) (s. Tab. 3.6).

Diese Umstände gilt es im Besonderen beim Vergleich von Daten unterschiedlicher Testreihen zu bedenken. Dennoch erwiesen sich die sich aus gleichbehandelten Proben ergebenden ODTD-Peakflächen als in relativ exakter Weise reproduzierbar. Wie aber mit Blick auf die unterschiedlichen Testergebnisse in unterschiedlichen Puffern klar wird, erwächst aus dem bestehenden Testverfahren unter Verwendung von Latexmilch als RoxA-Substrat die grundlegende Schwierigkeit, dass Substanzen gleich welcher Art, die Einfluss auf die Aggregation der Latexpartikel und damit verbunden auf deren Auftriebseigenschaften ausüben, ebenfalls die ODTD-Produktion verringern und unter Umständen als falsch positive Inhibitoren identifiziert werden können, auch wenn sie den Mechanismus der Kautschukspaltung durch RoxA nicht beeinträchtigen. Dies wird im anschließenden Kapitel (4.2.4) am Beispiel der in KPP registrierten Hemmung durch Katalase diskutiert.

Bisher gibt es keine Alternative zu diesem Verfahren, da Tests auf Basis einer spektrophotometrischen Absorptionsbestimmung aufgrund der notwendigen Anwesenheit des wasserunlöslichen Substrates bzw. der Spaltprodukte nicht herangezogen werden können. Auch um die im vorherigen Kapitel (4.2.2) angesprochene Reaktionskinetik der Latexspaltung durch RoxA verlässlich zu beschreiben, wäre ein alternatives, schnelles Testverfahren notwendig. Ein solches wäre theoretisch auf Basis einer optischen Detektion der gebildeten Aldehydgruppen durch Schiffs-Reagenz denkbar, brächte jedoch aufgrund der Wasserunlöslichkeit des Substrates und der damit verbundenen Eintrübung kaum lösliche Schwierigkeiten mit sich. Erste darauf abzielende Versuche hatten nicht zu ermutigenden Ergebnissen geführt, standen der Genauigkeit der Quantifizierung des bestehenden Aktivitätstests deutlich nach (pers. Mitteilung N. Hambsch).

4.2.4 Inhibierung der RoxA-Aktivität

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung bei Anwesenheit verschiedenster potentieller Inhibitoren zeigten, dass sowohl Reduktionsmittel als auch Oxidationsmittel, substratähnliche Verbindungen und auch typische Hämliganden die Latexspaltung durch RoxA hemmten (s. Kap. 3.6.1, Tab. 3.2). Für die mögliche Wirkungsweise einiger Substanzen fanden sich Belege durch spektroskopische Methoden, und soll daher in den entsprechenden, folgenden Kapiteln besprochen werden.

Die Hemmung der Kautschukspaltung durch Reduktions- wie auch einige Oxidationsmittel spricht für eine Änderung des Redoxzustandes eines oder beider Hämzentren während eines Zyklus der Latexspaltung. Zu Poly(*cis*-1,4-isopren) ähnliche, kleinere Verbindungen hemmten die Latexspaltung vermutlich in Konkurrenz um die Bindungsstelle mit dem eigentlichen RoxA-Substrat. Dabei ist in jedem Fall eine Strukturähnlichkeit wichtig, wie sich an der Hemmung durch Squalen und Pristan zeigte. β -Carotin und α -Tocopherol könnten zudem als Radikalfänger fungieren. Denn ebenso deutlich hemmte Ascorbinsäure, die einen Radikalfänger, aber kein Substratanalogon zu Polyisopren darstellt. Andere wie Allopurinol und butyliertes Hydroxytoluen (BHT) hatten dagegen kaum Wirkung gezeigt (Braaz, 2005 b, Abb. 2.3.2). Da mögliche im Enzyminneren entstehende Polyisopren-Radikale kurzlebig und relativ unzugänglich wären, widerlegt dies keineswegs deren Entstehung als Zwischenstufen der Latexspaltung.

Bei einigen potentiellen Inhibitoren könnte sich auch die Verteilung im Testansatz auf das Testergebnis auswirken, besonders beim Vergleich der Aktivitäten in unterschiedlichen Puffern. Durch den Substratauftrieb konzentrieren sich die Latexpolymere v. a. in KPP innerhalb kurzer Zeit im oberen Bereich des Testvolumens, während die löslichen Testsubstanzen, aber auch die aufgrund ihrer deutlich geringeren Größe länger emulgiert bleibenden Polyisoprenanaloga im gesamten Testvolumen die ursprünglich eingestellte Konzentration annähernd behalten. Dieser Umstand kann sich besonders auf das Ergebnis mit solchen Inhibitoren auswirken, die mit dem eigentlichen Substrat um eine Bindung konkurrieren. Weshalb in KPP eine höhere Aktivität mit einigen Verbindungen, in Bis-Tris dagegen von R. Braaz (2005 b) eine stärkere Hemmung ermittelt wurde, könnte man mit einem höheren Substrat-/Inhibitor-Verhältnis begründen.

Die Ergebnisse mit Substanzen wie Imidazol, Pyridin und einigen verwandten Verbindungen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Imidazolring des Histidins als Hämliganden fungieren können, zeigen klar, dass diese durch Bindung an einer freien Koordinationsstelle eines Hämzentrums hemmen. Dass es sich dabei um das gleiche Hämzentrum handelt, an welchem die Latexspaltung stattfindet, konnte durch EPR-Experimente gezeigt werden (Kap. 4.5; 4.9; 4.10).

Typische Peroxidase-Inhibitoren mit Ähnlichkeit zum Substrat wie Hydrazin, Phenylhydrazin und Hydroxylamin verhinderten die Latexspaltung effektiv, andere wie Na^+ -

Azid (N_3^-) dagegen kaum. Anionische Hämliganden wie Azid und Fluorid hemmten erst mit höheren Konzentrationen teilweise ($> 10 \text{ mM}$). Eine starke Hemmung durch Cyanid (CN^-) und Kohlenmonoxid (CO) und deren Bindung am Hämzentrum war bereits von R. Braaz (2005 b) beschrieben worden. Ähnlich zu der Situation in RoxA sind bei der Cytochrom *c* Peroxidase aus *P. aeruginosa* für eine sichtbare Reaktion des oxidierten CCP "as isolated" ("resting state") hohe Cyanid- (4 mM) und Azid-Konzentrationen ($> 25 \text{ mM}$) notwendig, dagegen zeigten sogar 2 M Fluorid keinen nennenswerten Effekt. Bei "offener" Konformation der CCP im halbreduzierten Zustand reichten deutlich geringere Konzentrationen aus (Ellfolk *et al.*, 1984). Anders jedoch als bei CCPs sollte bei RoxA "as isolated" die Abschirmung des Hämzentrums durch das Polypeptid nicht der entscheidende Grund für die geringen Effekte mit Azid und Fluorid sein, da das betreffende Hämzentrum auch für größere Hämliganden wie Imidazol offenbar leicht zugänglich ist (s. Kap. 4.9.1). Offenbar ist die Affinität des betreffenden Hämzentrums zu Azid und Fluorid-Ionen bzw. die Stabilität der Verbindung geringer gegenüber anderen Hämliganden wie Cyanid oder Imidazol. Dies kann mit der Hydrophobizität der Hämumgebung und mit sterischen Gründen zusammen hängen, im Wesentlichen aber auch auf eine fehlende Stabilisierung durch Bindungs-Wechselwirkungen zu nahe gelegenen Aminosäuren wie Wasserstoffbrücken bzw. wie im Fall der F^- -Bindung der *P. aeruginosa* CCP gezeigt, auf Elektronen-Donor-Akzeptor-Interaktion mit dem distalen Histidin zurückgehen (Huang & Kassner, 1981). Ein Grund für die komplett fehlende Hemmung durch Azid bei gealtertem RoxA könnten geringfügige Änderungen der Konformation bzw. des Spinzustandes am katalytischen Hämzentrum sein. Hinweise auf derartige Änderungen bei gealtertem RoxA liegen aus EPR-Messungen, sowie CD-Spektroskopie vor (s. Kap. 3.10.1.2). In Übereinstimmung mit der geringen Hemmung hatten Azid und Fluorid das UV-Vis-Spektrum von RoxA "as isolated" kaum verändert. CN^- hatte in hoher Konzentration (10 mM) zu einer langsam eintretenden, aber Bindungs-typischen Veränderung (Abb. 3.60), Hydrazin und Hydroxylamin dagegen zu einer Abnahme der Häm-Absorption (Abb. 3.59) und im EPR-Spektrum zu einem Anstieg des Signals für unspezifisch gebundenes Fe(III) bei $g=4,3$ geführt (s. Kap. 3.9.6.6), was auf eine teilweise Zerstörung des Hämzentrums schließen lässt. Diese Option ist auch für die Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu bedenken. Auf dessen Reaktion mit RoxA wird in Kap. 4.7 näher eingegangen. Die Wirkung von Hydrazin und Phenylhydrazin kann auch auf die Bildung von H_2O_2 bzw. Superoxid-Radikalen durch Reduktion von nicht-koordinierendem O_2 zurückgehen (Avila *et al.*, 2003; Agrawal *et al.*, 2001).

Da die Anwesenheit von Superoxid-Dismutase keine Auswirkungen auf die ODTD-Bildung hatte, kann angenommen werden, dass keine freien Superoxidionen während der Latexspaltung entstehen. Die Freisetzung von für Superoxid-Dismutase verfügbare $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Ionen hätte auch die Bildung von H_2O_2 zur Folge, welches seinerseits zur Hemmung der Latexspaltung beitragen würde. Die Wirkung von vollständig hemmenden H_2O_2 -

Konzentrationen konnte durch die Anwesenheit geringster, partiell hemmender Mengen an Katalase vollständig aufgehoben werden, wobei die resultierende Aktivitätsminderung derjenigen durch Katalase alleine entsprach (s. Tab. 3.4, Kap. 3.6.1). Dies zeigte die Funktionalität der verwendeten Katalase und bewies erneut indirekt den störenden Einfluss von H_2O_2 auf den Spaltungsmechanismus. Die unterschiedlich starke Hemmung der RoxA-vermittelten Latexspaltung durch andere Metalloproteine wie HRP, Lipoxygenase bzw. Cytochrom *c* muss nicht zwangsläufig eine Beteiligung der Metallzentren an der Hemmung bedeuten. Grundsätzlich ist schlicht eine Interaktion mit Latexmolekülen bzw. RoxA selbst oder aber das Abfangen von radikalen Zwischenstufen der Latexspaltung als Ursache denkbar, die im Einzelfall ergründet werden müsste. Eine nähere Betrachtung der Katalase-Hemmung in verschiedenen Puffern hatte eine nicht den Reaktionsmechanismus von RoxA direkt beeinflussende Wirkungsweise aufgezeigt (s. u.). Zunächst hatte die Hemmung der RoxA-Aktivität durch Katalase und andere Metalloenzyme eine Beteiligung einer Peroxid-Zwischenverbindung als Teil des Mechanismus nahe gelegt (Schmitt *et al.*, 2010). Die Feststellung, dass bereits geringste Mengen eine sichtbare Hemmung, aber auch hohe Überschüsse an Katalase keine vollständige Hemmung hervorriefen und in manchen Versuchen nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Restaktivität zwischen substöchiometrischen Mengen und einem Überschuss an Katalase auftraten, ließ eine andere Wirkungsweise der Hemmung vermuten. Die nicht-linear-proportionale Abhängigkeit von der Konzentration und die Unabhängigkeit vom RoxA-/Katalase-Verhältnis widerlegte aber auch eine Wirkung durch Bindung an RoxA (s. Kap. 3.6.1).

Die zunächst unverständlich erscheinende Beobachtung, dass Katalase lediglich im ionischen KPP, nicht aber in Bis-Tris-Puffer hemmte, konnte schließlich entschieden zur Klärung der Inhibierung durch Katalase und möglicherweise auch weiteren Metalloenzymen beitragen. Die in Kap. 3.6.2 bzw. Kap. 4.2.3 erläuterten Ursachen für die unterschiedliche Aktivität in Testansätzen mit organischem bzw. ionischem Puffer von gleichem pH-Wert und gleicher Molarität sind demnach auch zur Erklärung der zunächst unverständlich erscheinenden Testergebnisse mit Katalase entscheidend. So wie die Unterschiede zwischen den Puffern auf eine Beeinflussung der Aggregations- bzw. Auftriebseigenschaften von Latex zurückzuführen waren, so konnten auch die Testergebnisse mit Katalase in diesen Puffern eine solche Beeinflussung durch die Anwesenheit dieses Enzyms belegen (s. Kap. 3.6.3). Um die nicht-linear zunehmende Hemmung bei steigender Katalase-Konzentration in KPP und gleichzeitig die zunehmende Aktivitätssteigerung bei fallender Katalase-Konzentration in Bis-Tris Puffer zu beschreiben (vgl. Tab. 3.7, Kap. 3.6.3), müssen zwei mit Blick auf die Latexspaltung durch RoxA einander entgegen wirkende Effekte angenommen werden. Zum einen ist dies die Förderung der Aggregation der Latexpartikel mit steigender Katalasekonzentration, woraus eine raschere Ansammlung der Latex an der Oberfläche eines Testansatzes folgt und wie in Kap. 3.6.2 beschrieben zu einer erhöhten ODTD-Produktion führt. Zum anderen wirkt sich die sinkende Verfügbarkeit der mit steigender

Katalasekonzentration zunehmend aggregierenden Latexstränge für RoxA negativ auf die ODTD-Bildung aus. Damit lässt sich die Hemmung mit allen getesteten Katalase-Konzentrationen durch die verstärkte Latex-Aggregation beschreiben, wenn man einen ohnehin starken Auftrieb des Substrats in KPP annimmt. In Bis-Tris-Puffer dagegen waren geringe Katalase-Konzentrationen dazu geeignet, die gegenüber KPP durch den geringeren Auftrieb verminderte RoxA-Aktivität annähernd auf das Niveau der Aktivität in KPP anzuheben, während hohe Konzentrationen durch die entsprechend stärkere Aggregation dem positiven Auftriebs-Effekt wiederum entgegen wirkten. Indem durch regelmäßiges Mischen von Ansätzen der Faktor des Substratauftriebs ausgeschaltet wurde, konnten die Auswirkungen der durch Katalase hervorgerufenen Aggregation direkt betrachtet werden. Entsprechend den Erwartungen wurde in KPP eine Addition der aktivitätsmindernden Effekte von Substrataggregation und Durchmischung beobachtet, in Bis-Tris dagegen eine Aufhebung des positiven Effekts niedriger Katalasekonzentrationen auf die ODTD-Produktion (s. Tab. 3.8). Damit unterstützen die in Kap. 3.6.3 erläuterten Ergebnisse sämtliche Aspekte einer unspezifischen Interaktion von Katalase mit dem RoxA-Substrat Latex. Unterschiede in der registrierten Restaktivität mit Katalase zwischen verschiedenen Testreihen könnten auf der Verwendung verschiedener Latex-Lieferungen beruhen. Dies muss aufgrund der großen Unterschiede bei der RoxA-Expression im *Xanthomonas*-Wt bei Verwendung verschiedener Latices in Betracht gezogen werden.

Ob die mit anderen Metallenzymen registrierte RoxA-Aktivitätsminderung ähnliche Ursachen hat, könnte in entsprechender Weise gezeigt oder widerlegt werden. Es ist anzunehmen, dass im Fall der Katalase deren Wirkung auf hydrophober Oberflächen-Interaktion mit den Latexmolekülen basiert und weniger im Vorhandensein von Metallzentren begründet ist. Die Auswirkung einer solchen Interaktion könnte die eigentliche Ursache für die bei Anwesenheit von Katalase beobachtete Hemmung sein und nicht, wie zunächst naheliegend, das Abfangen von während der Latexspaltung entstandenen Peroxid-Zwischenstufen. Trotz allem widerlegt diese Erklärung in keiner Weise, dass die Latexspaltung über ein Peroxid-Zwischenprodukt verlaufen könnte. Denn abgesehen von der Kurzlebigkeit solcher Produkte, ist deren Bindung um das katalytische Zentrum im Enzyminneren anzunehmen, wodurch diese für Katalase nicht verfügbar wären.

4.2.5 Die RoxA-W302L-Mutante

Die bisherigen Versuche der Herstellung von RoxA-Varianten blieben erfolglos, da es sich als notwendig erwies, zunächst eine *roxA*-Knockout-Mutante herzustellen und ein System zur Integration des Expressionsplasmides ins Chromosom zu entwickeln. Ausnahme ist die RoxA-W302L-Mutante, deren Entstehung auf einem zufälligen Rekombinationsereignis nach langer Kultivierung in einem Stamm mit einer weiteren, unveränderten *roxA*-Kopie beruhte (s. Kap. 3.7.3). So sind die bisherigen Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten. Auch wenn

die Korrektheit der Mutation durch Sequenzierung gezeigt wurde, sollte diese Mutante mit der gezielten Integration des entsprechenden Expressionsplasmids ins Genom eines *Xanthomonas*-Stammes mit Deletion der genomischen *roxA*-Kopie erneut untersucht werden. Dies ist allein im Hinblick auf die notwendige Isolierung einer größeren Menge zur Charakterisierung mit EPR- und CD-Spektroskopie, sowie Titrationsen mit Reduktion und Rückoxidation wichtig. Solche können einen Hinweis auf eine Beteiligung bei einer möglichen Elektronenübertragung zwischen den Hämzentren liefern, wie sie für bakterielle Cytochrom *c* Peroxidasen dokumentiert ist. Bei der *Pseudomonas aeruginosa* CCP (PAP) und der *Nitrosomonas europaea* CCP (NEP) gibt es einen in gleicher Weise angeordneten Tryptophan-Rest (Trp₉₄ bzw. Trp₈₂) mit Hinweisen auf eine Beteiligung am für Peroxidasen notwendigen Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen (Fülöp *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 2001). Der Austausch des komplementären Trp-Restes (Trp₉₇) der CCP aus *Rhodobacter capsulatus* (RCP) (de Smet *et al.*, 2006) oder der PAP (Lee *et al.*, 2007) gegen Alanin und andere Aminosäuren hatte zu vollständigem Verlust der Peroxidase-Aktivität geführt.

Die bisherigen Ergebnisse deuten eine vergleichbar hohe Expression gegenüber unverändertem RoxA, aber baldigen Zerfall des Enzyms an. Dies lässt auf eine gewisse strukturelle Instabilität der W302L-Mutante schließen. Eine Fragmentierung des Proteins könnte bereits posttranslational im Zusammenhang mit einer Qualitätskontrolle erfolgen oder, angesichts der Resultate aus UV-Vis-Spektroskopie und SDS-PAGE, erst extrazellulär durch eine verminderte Stabilität aufgrund dieser Punktmutation. Dennoch erwies sich eine Minderheit der gebildeten Moleküle ausreichend stabil, um isoliert zu werden. Diese zeigten noch eine Aktivität von etwa 60 % gegenüber Wt-RoxA (s. Kap. 3.7.3, Abb. 3.27), wogegen der Kulturüberstand nur etwa 20 % der Aktivität des Wt-Überstandes aufwies (s. Abb. 3.25), jedoch keine vollständige Inhibierung wie im Fall der RCP eintrat. Sollten sich diese Ergebnisse tendenziell bestätigen, ließen sie alleine noch keinen Schluss zu, ob die in jedem Fall zu beobachtende Aktivitätsminderung allein auf den W302L-Austausch oder auf dadurch bedingte strukturelle Veränderungen zurückgeht. Der registrierte Aktivitätsverlust unterstützt eine Funktion von Trp₃₀₂, reicht aber nicht aus, um von einer essentiellen Bedeutung für die Latexspaltung zu sprechen. Trotz der homologen Anordnung der Hämzentren und des intermediären Trp₃₀₂ erfüllt RoxA eine verschiedene Funktion zu CCPs und besitzt keine Peroxidase-Aktivität, so dass nicht unbedingt gleiches Ergebnis erwartet werden muss.

Zwischen CCPs und RoxA sind jedoch nicht allein Trp₃₀₂, sondern auch die angrenzenden Aminosäuren (QFWDG) (vgl. Fig. 62 in Hoffmann, 2007) konserviert. Innerhalb RoxA ist Asp₃₀₃ durch eine Salzbrücke mit Arg₄₃₂ verbunden (s. Abb. 4.1). Eine solche Wechselwirkung zwischen dem entsprechenden Asp- und einem Arg-Rest gibt es auch bei anderen CCPs, wie im Falle der Cytochrom *c* Peroxidase aus *G. sulfurreducens* (CcpA) zwischen dem zum intermediären Trp₁₁₆ benachbarten Asp₁₁₇ und Arg₁₀₀. Der Verlust dieser Wechselwirkung durch Austausch von Arg₁₀₀ bewirkt eine Fehlorientierung dieses, den Trp-Rest enthaltenden Loops (Hoffmann *et al.*, 2009) mit ähnlichen Auswirkungen auf Aktivität

und optisches Spektrum wie der Austausch des entsprechenden Tryptophans bei anderen CCPs (de Smet *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass umgekehrt dieser Trp₃₀₂Leu-Austausch in RoxA Auswirkungen auf die Orientierung dieses Loops und die Ausbildung der Asp₃₀₃-Arg₄₃₂-Salzbrücke besitzen könnte. Der Trp₃₀₂-Rest selbst ist über eine Wasserstoffbrücke zum Peptidrückgrat mit Lys₂₈₇ verbunden (s. Abb. 4.1), die ebenso zur Proteinstabilität beitragen kann. Diese Umstände könnten eine mögliche Erklärung für den relativ raschen Zerfall eines Großteils des veränderten RoxA darstellen.

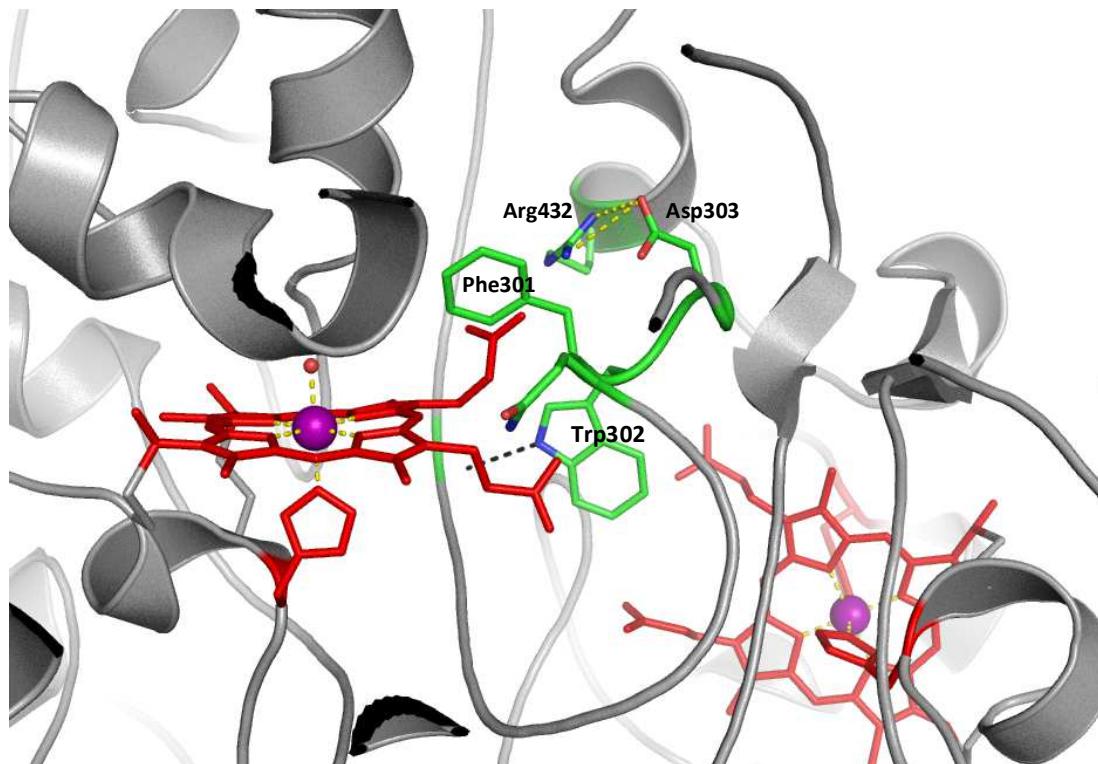


Abb. 4.1: Ausschnitt aus der RoxA-Struktur, der die beiden Hämzentren in RoxA und die Lokalisierung von Trp₃₀₂ zwischen den Hämpropionatgruppen zeigt. Die Hämgruppen und die koordinierenden His-Reste sind rot, das konservierte Motiv "QFWDG" grün (N=blau, O=rot) dargestellt. Die Salzbrücke zwischen Asp₃₀₃ und Arg₄₃₂ ist gelb, die Wasserstoffbrücke von Trp₃₀₂ zum Peptidrückgrat (Lys₂₈₇) als schwarz gestrichelte Linie gezeigt.

Teil III Spektroskopische Charakterisierung von RoxA

Das Hauptanliegen des RoxA-Projektes, den Spaltungsmechanismus aufzuklären, wurde durch eine eingehende spektroskopische Charakterisierung des unveränderten Wildtyp-Enzyms voran getrieben. Dazu dienten insbesondere UV-Vis- und EPR-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance), sowie spektrophotometrische Redox titrationen und CD-Spektroskopie. Einige grundlegende Ergebnisse wurden bereits publiziert (Schmitt *et al.*, 2010), weiter führende Experimente hatten offen gelegt, dass einige Annahmen überdacht werden müssen. Im Folgenden sollen die mit UV-Vis-, CD- bzw. EPR-Spektroskopie erhaltenen Spektren von RoxA "as isolated" übergreifend besprochen werden. Zunächst sollen jedoch einige Charakteristika des RoxA-Spektrums der im Rahmen dieser Arbeit neu eingeführten Methode der CD-Spektroskopie, im Anschluss allgemeine Merkmale des EPR-Spektrums von RoxA separat dargestellt werden.

4.3 Das CD-Spektrum von RoxA

4.3.1 Der Fern-UV-Bereich

Das CD-Spektrum eines Proteins im UV-Bereich ist im Wesentlichen von den Elementen der Sekundärstruktur bestimmt, aber auch von weiteren Chromophoren wie Aromaten beeinflusst. Es stellt somit die charakteristische Signatur eines bestimmten Proteins dar und ist oft nicht direkt mit den CD-UV-Spektren anderer Proteine vergleichbar.

Bei einem α -Helix-Anteil von etwa 34 % und einem zu vernachlässigenden Anteil von 1 % β -Faltblatt-Strukturen zeigt das Fern-UV-Spektrum von RoxA erwartungsgemäß Charakteristika eines von Helix-Strukturen bestimmten Spektrums. Diese weisen negative Banden bei 220–222 nm und 208 nm und eine positive um 190 nm auf (Woody & Dunker in Fasman, 1996). Im RoxA-Spektrum entsprechen diesen Signalen ein Minimum bei 207 nm und ein Maximum bei 191 nm (s. Abb. 3.62, Kap. 3.10.1.1). Letzteres weist aufgrund des Beitrags von negativer Elliptizität durch "random coil"-Strukturen in diesem Bereich in der Summe nur relativ geringe positive Elliptizität auf (vgl. Abb. 2.7, Kap. 2.12.2). Ungewöhnlich ist jedoch das Fehlen eines klaren Helix-Minimums bei 220–222 nm. Der hohe Anteil an "random coil"-Strukturen in RoxA kann aufgrund der geringen Elliptizität im Bereich um 220 nm kaum zu diesem Phänomen beitragen, ist aber verantwortlich für die geringe positive Elliptizität des α -Helix-Maximums bei 191 nm. Ein weiteres auffälliges Merkmal des RoxA-CD-Spektrums ist ein Maximum schwach positiver Elliptizität bei 232 nm. Dieses lässt sich ebenfalls nicht allein durch Addition der Sekundärstrukturanteile in RoxA erklären. Das Fern-UV-CD-Spektrum von RoxA muss folglich zusätzlich zu den Signalen der Peptidbindungen durch Banden von weiteren Chromophoren überlagert sein.

Im fernen UV-Bereich können auch CD-Banden von aromatischen Aminosäuren eine zusätzliche Rolle spielen und sind nur schwer von den CD-Signalen der Peptidbindungen zu trennen. Nach Woody (1994) sind bei manchen Proteinen auftretende positive CD-Banden zwischen 220 und 230 nm auf aromatische Aminosäuren zurückzuführen. Es sind für alle untersuchten Tryptophan-Derivate positive CD-Banden in diesem Bereich belegt, Tyrosin und Phenylalanin ergeben in ihrer Tendenz positive Banden bei 220 nm (Woody, 1994 und darin zitierte Autoren). Die negative Elliptizität von Helix-Signalen bei 220–222 nm kann somit durch die positive Elliptizität durch aromatische Aminosäuren teilweise aufgehoben werden (Venyaminov & Yang in Fasman, 1996) und müsste zur Abschätzung des Helixanteils gegen einen Beitrag der durch Kopplung mit dem Hämzentrum entstehenden aromatischen Elliptizität korrigiert werden (Nicola *et al.*, 1975). Zusätzlich können weitere Nicht-Peptid-Chromophore wie Hämgruppen das CD-Spektrum im Fern-UV-Bereich beeinflussen. Es ist ein positiver Beitrag von Häm zur Elliptizität in diesem Bereich belegt, der sich zum CD-Spektrum der Sekundärstrukturelemente addiert und zu einer Unterschätzung des Helix-Anteils führen kann (Nicola *et al.*, 1975), doch ist dieser Beitrag ggf. schwer zu quantifizieren (Benson *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen begründen das nahezu fehlende Minimum bei 222 nm im RoxA-Spektrum. Da somit auch im Fern-UV-Bereich aromatische Aminosäuren und Häm-Chromophore zur Elliptizität beitragen, kann beispielsweise aus einem Austausch einer aromatischen Seitenkette, eines Hämliganden oder der Deletion einer Hämgruppe nicht direkt auf Änderungen der Sekundärstrukturen geschlossen werden (Nicola *et al.*, 1975). Dies muss bei der Untersuchung mit CD-Spektroskopie entsprechender Mutanten bedacht werden. Zur Klärung solcher Fragestellungen können Modellsimulationen anhand der vorliegenden RoxA-Struktur hilfreich sein.

Dem eher ungewöhnlichen CD-Spektrum von RoxA im fernen und auch nahen UV-Bereich ähneln in ihrem Verlauf beispielsweise die Spektren der Cytochrom *c* Peroxidase aus *S. cerevisiae* und der Lactoperoxidase mit einem nur andeutungsweise vorhandenen Helix-Minimum um 220 nm (Sievers, 1978; 1980), unterscheiden sich aber im Bereich der Soret-Bande deutlich (s. u.). Auffallende Ähnlichkeit besteht zum Verlauf des Fern-UV-Spektrums (<250 nm) der Cytochrom *c* Peroxidase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAP). Das PAP-CD-Spektrum besitzt ähnlich wie RoxA ein Minimum bei 208 nm und wie bei RoxA lediglich eine schwach ausgeprägte Schulter bei 222 nm. Da die Größe und die räumliche Struktur beider Enzyme verschieden sind, trägt dazu vermutlich die Anwesenheit zweier gleich orientierter Hämzentren bei. Insgesamt ist aber die molare Elliptizität pro Aminosäure ($[\theta]/n$) im PAP-Spektrum deutlich größer als im RoxA-Spektrum, am Minimum bei 208 nm etwa -20 gegenüber -10 [$\text{mdeg M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]. Dies erklärt sich anhand der Sekundärstruktur-Zusammensetzung in PAP, die einen höheren α -Helix-Anteil ($\approx 47\%$) und β -Faltblatt-Anteil ($\approx 7\%$) als RoxA (s. o.) und dadurch stärkere optische Aktivität in diesem Bereich besitzt. Diese jeweiligen Werte wurden mithilfe des Programms PyMol (Version 1.1r1) ermittelt und sind vergleichbar. Eine frühere Einschätzung des Helix-Anteils in PAP anhand der Elliptizität

bei 222 nm ergab einen niedrigeren Wert von etwa 34 % (Rönneberg *et al.*, 1979 b), vermutlich aufgrund der Überlagerung der negativen Helix-Elliptizität durch positive Signale der Hämgruppen oder aromatischer Aminosäuren. Die molare Elliptizität pro Aminosäure in RoxA ähnelt derjenigen von Proteinen mit ähnlichem α -Helix-Anteil und ist gegenüber Helixproteinen wie Hämoglobin und Myoglobin deutlich geringer (s. Matsuo, 2004).

Im PAP-CD-Spektrum fehlt das schwach positive RoxA-Signal bei 232 nm (s. Abb. 3.62). Gegenüber PAP besitzt RoxA einen deutlich höheren Anteil an aromatischen Aminosäuren, insbesondere an Tyrosin und Tryptophan (s. Kap. 4.4.1; Kap. 4.11.1). Gerade diese besitzen im Bereich um 220–230 nm einen sehr hohen Absorptionskoeffizienten, während die Absorption der verschiedenen Sekundärstrukturelemente sehr gering ist (vgl. Abb. 7-10 und 7-9 in Cantor & Schimmel, 1980). Dies spricht dafür, dass die hohe optische Aktivität von Tyr und Trp-Resten in RoxA für das ungewöhnliche positive CD-Signal bei 232 nm verantwortlich ist und vermutlich wesentlich zur Maskierung des Helix-Minimums bei 220–222 nm beiträgt. Wie auch bei der *P. aeruginosa* CCP änderte sich das Fern-UV-CD-Spektrum von RoxA nicht nach Reduktion (Abb. 3.67), was Änderungen der Peptidkonformation in RoxA durch Änderung des Oxidationszustandes ausschließt.

4.3.2 Der Nah-UV-Bereich

Die CD-Absorption im Nah-UV-Bereich von 230 bis 300 nm ist generell vom Beitrag aromatischer Aminosäuren dominiert, wird aber auch von auf die Hämzentren zurückgehenden Signalen überlagert (Woody & Dunker in Fasman, 1996). Nach Urry (1967 a) treten optisch aktive Hämübergänge im Bereich von 240–300 nm auf. Oxidiertes Häm-Undecapeptid, welches frei von aromatischen Resten ist, zeigt eine breite, positive Hämbande bei 253 nm, der keine Absorptionsbande im UV-Vis-Spektrum entspricht (Urry, 1967 a). Analog werden starke, breite CD-Banden um 260 nm, z. B. bei Myoglobin-Derivaten (Nicola *et al.*, 1975) oder (Soybean-) Leghämoglobin (Ellfolk & Sievers, 1975) auf die Hämgruppen zurückgeführt. So ist davon auszugehen, dass die beobachtete, positive Elliptizität um 260 nm im Nah-UV-Bereich von RoxA wesentlich von der optischen Aktivität der Hämgruppen mitbestimmt ist.

Die Feinstruktur in diesem Bereich stammt nicht vom Häm, sondern hat ihren Ursprung in Übergängen aromatischer Aminosäuren (Strickland *et al.*, 1971). Die breiten Hämbanden erschweren generell die exakte Zuordnung einzelner Banden zu den aromatischen Aminosäuren. Im RoxA-Spektrum lassen sich lediglich die negative Bande bei 295 nm und die positive bei 290 nm mit Bestimmtheit Tryptophan-Resten zuweisen (s. Abb. 3.66, Kap. 3.10.1.2). Deren komplexes Bandenspektrum lässt sich in sog. L_a und L_b -Übergänge trennen, die um 290 nm auftreten und unterschiedlich gerichtet sein können. In ähnlicher Weise wie in RoxA treten z. B. bei (Soybean-) Leghämoglobin *a* eine positive CD-Bande bei 289 nm (L_b) und eine negative bei 295 nm (L_a) auf (Nicola *et al.*, 1975) oder bei

der *P. aeruginosa* CCP bei 289 nm (L_b) und 299 nm (L_a) (Rönnerberg *et al.*, 1979 b). Dabei wird die Rotverschiebung der L_a -Bande gegenüber deren Position mit L-Tryptophan (ca. 289 nm) einem mit Wasserstoffbrücken gebundenen Tryptophan zugeschrieben, in Abhängigkeit von der Stärke dieser Bindung und Polarität der Umgebung (s. Strickland *et al.*, 1969; Strickland *et al.*, 1971). In RoxA kann demnach die positive Bande bei 290 nm aufgrund des erwarteten Auftretens zwischen 287 und 293 nm und aufgrund ihrer Schärfe (Strickland *et al.*, 1971) einem L_b -Übergang, die knapp 5 nm rotverschobene, negative Bande bei 295 nm einem L_a -Übergang zugewiesen werden. Da aber RoxA im Vergleich zu den erwähnten Proteinen eine hohe Anzahl von 20 Trp-Resten aufweist ist die Analyse der festgestellten Rotverschiebung komplizierter. Da das zwischen den Hämpropionat-Gruppen liegende Trp₃₀₂ über eine Wasserstoffbrücke der Indol-NH-Gruppe zur Peptid-OH-Gruppe von Lys₂₈₇ koppelt, sollte das CD-Spektrum einer RoxA-W302L Mutante somit einen entsprechenden Unterschied im Nah-UV-Bereich zeigen. Weitere Tryptophanbanden sind bei kürzeren Wellenlängen zu erwarten, aber schwer von den Signalen anderer Aminosäuren zu trennen. Zur Bande um 281 nm tragen vermutlich Übergänge von Tryptophan und Tyrosin bei. Die Feinstruktur zwischen 290 und 270 nm geht vermutlich weitgehend auf Tyrosin-Signale zurück, weitere schwächere Signale zwischen 270 und 250 nm auf Phenylalanin (Sutherland & Holmquist (1980). RoxA besitzt ebenso zwei Disulfidbrücken (vgl. Fig. 55 in Hoffmann, 2007), deren schwächeres, breiteres Signal das Spektrum um 260 nm zusätzlich Einfluss nimmt.

Die Analyse des Nah-UV-CD-Spektrums kann zur Charakterisierung von RoxA-Mutanten und vielfältiger Versuchsansätze dienlich sein. Der CD-Beitrag von Aromaten im Nah-UV-Bereich ist sensibel gegenüber geringen Störungen der Struktur in der Umgebung dieser Chromophoren und kann häufig die Interaktion zwischen Proteinen und Liganden anzeigen (Woody & Dunker in Fasman, 1996). Die Amplitude bei 260 nm spiegelt dabei die Stärke der Interaktion der Hämzentren mit dem Apoprotein, die von räumlichen Distanzen abhängt, und damit die Packungsdichte der Hämumgebung wieder (Nicola *et al.*, 1975). Die Ab- oder Zunahme der Intensität dieser positiven Hämbande um 260 nm kann also auf Veränderungen in der Hämumgebung hinweisen. Auch spielt in diesem Bereich der Spin- und Oxidationszustand der Hämgruppen für die Häm-Signale eine wesentliche Rolle (Harrington *et al.*, 1973). So weist beispielsweise die positive CD-Bande der *P. aeruginosa* Cytochrom *c* Peroxidase bei 263 nm die höchste Elliptizität im *low-spin*-Zustand beider Hämzentren auf (Rönnerberg *et al.*, 1979 b). Eine insgesamt deutlich positive CD-Absorption wie bei RoxA findet sich auch bei einigen anderen Hämproteinen, z. B. bei Hämoglobin (Nagai *et al.*, 1969), Myoglobin (Nicola *et al.*, 1975), *S. cerevisiae* Cytochrom *c* Peroxidase (Sievers, 1978) oder *Pseudomonas* Cytochrom *c* 551 (Rönnerberg *et al.*, 1979 b).

4.3.3 Der Soret- und Vis-Bereich

Aufgrund der Symmetrie bzw. Achiralität des Porphyrinrings zeigt die Hämgruppe selbst, die nahezu energiegleiche (entartete) B_x - und B_y -Übergänge aufweist, kein CD-Signal. Dieses wird erst durch die Peptidumgebung in einem Protein induziert durch Erzeugung einer Asymmetrie der elektronischen Konfiguration (Urry, 1965; Hsu & Woody 1971). Daher unterscheiden sich die CD-Spektren von verschiedenen Hämproteinen in ihrer Form, Größenordnung und hinsichtlich positiver oder negativer Elliptizität z. T. erheblich, abhängig von Proteinumgebung, koordinierenden Liganden und des Oxidationszustandes (Benson *et al.*, 1995). So kann beispielsweise das CD-Soret-Signal von Leghämoglobin von negativer zu positiver Elliptizität schlicht durch Änderung des distalen Liganden umschlagen als Folge einer veränderten geometrischen Position der Hämgruppe (Lampe *et al.*, 1972). Das CD-Signal der Soret-Region eines Hämproteins kann somit zur Erkennung von Konformationsänderungen nützlich sein (Mizutani *et al.*, 1994).

Um die Häm-CD-Signale im sichtbaren Bereich zu analysieren, sind zunächst einige allgemeine Überlegungen notwendig. Der Verlauf der CD-Soret-Banden kann Informationen über die Beschaffenheit der Hämbindestelle liefern. Dieser wird von spezifischen Häm-Protein-Interaktionen und Veränderungen der Hämumgebung beeinflusst (Li & Johnson, 1969), die zur Dissymmetrie des Chromophors führen. Von Hsu & Woody (1969) werden für Myoglobin drei Ursachen für die Form der Signale, sog. Cotton-Effekte (s. Kap. 2.12.2, Abb. 2.9) diskutiert, die auch in RoxA von Bedeutung sein könnten. Zum ersten sind dies Abweichungen von der Planarität des Porphyrin-Ebene. Anhand der 3-D-Struktur von RoxA lässt sich erkennen, dass die Porphyrinebenen beider Hämzentren nicht genau planar verlaufen. Desweiteren kann die Beeinflussung durch $d \rightarrow d$ -Übergänge des Eisens einen magnetischen Dipolcharakter im Soret-Übergang bewirken, z. B. nach Reduktion oder Ligandenaustausch. Dieses Argument könnte durch Aufnahme des CD-Spektrums im Infrarotbereich (>700 nm) anhand des Auftretens zusätzlicher CD-Banden näher untersucht werden. Auch gibt es Beispiele von auf $d \rightarrow d$ -Übergänge zurückgehende Banden zwischen 600 und 700 nm (z. B. Ellfolk & Sievers, 1975), doch fehlen dem CD-Spektrum von RoxA in diesem Bereich jegliche Banden. Schließlich ist die Kopplung von Soret (B_x - und B_y -Übergängen mit angeregten Zuständen der Peptidumgebung zu nennen (Hsu & Woody, 1969). Aromatische Reste in der direkten Nähe einer Hämgruppe sind hauptverantwortlich für die Richtung der Rotationsverschiebung des Lichtes durch die Hämgruppe und damit für das Vorzeichen des Cotton-Effekts (Hsu & Woody, 1969; Sievers, 1978). Da aber auch in Häm-Peptiden, die keine Aromaten enthalten, Häm-CD-Signale gefunden werden, sind grundsätzlich auch Interaktionen der Soret-Übergänge mit Amidgruppen des Peptid-Rückgrats, insbesondere des Helixanteils (Stryer, 1961) und Dissymmetrie der Ringebene als weitere Ursachen zu bedenken (Benson *et al.*, 1995 und darin zitierte Referenzen).

Übergänge von aromatischen Aminosäuren bis zu 12 Å Entfernung können die CD-Signale der Hämgruppe beeinflussen ([10]). Bei Hämoglobin und Myoglobin liefert die Kopplung von Oszillator-Interaktionen der Elektronenübergänge des Porphyrins, B_x und B_y , mit $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen von aromatischen Aminosäuren den wichtigsten Beitrag zum CD-Signal der Soret-Bande, kaum dagegen von nicht-aromatischen Peptiden (Woody & Hsu, 1971). Bei *Chironomus* Hämoglobin III bzw. Leghämoglobin *a* wird eine Kopplung der Soret-Übergänge und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge von Aromaten, v. a. der Phenylalanin-Reste, in einer Umkehrung des Vorzeichens des Soret-Cotton-Effekts von positiv zu negativ verantwortlich gemacht (Fleischhauer, & Wollmer, 1972; Ellfolk & Sievers, 1975).

Die RoxA-Struktur zeigt neben den koordinierenden Histidinen (His₁₉₅, His₃₉₄, His₆₄₁) und dem genau zwischen den Hämpropionaten lokalisierten Trp₃₀₂, eine Reihe weiterer aromatischer Seitenketten in der nahen Umgebung der Hämzentren, von denen ein entscheidender Beitrag zur CD-Absorption angenommen werden kann. Dies macht grundsätzlich einen Vergleich der CD-Spektren im sichtbaren Bereich von entsprechenden RoxA-Muteinen interessant. An das C-terminale bis-His-Häm grenzen mit einer Distanz zum Fe-Zentrum von unter 7 Å (bzw. <12 Å) die Reste Tyr₃₆₇, Trp₃₇₃, Tyr₅₀₁, Tyr₅₁₅, Phe₅₁₆, His₅₁₇, Phe₆₄₃ (Tyr₃₉₇, Tyr₆₅₈), an das N-terminale Hämzentrum Phe₁₀₇, Phe₁₀₈, Trp₂₉₁, Phe₃₀₁, Phe₃₁₇ und Phe₃₃₆ (Trp₂₀₉, Phe₃₄₂, Trp₄₄₅, Trp₄₅₀, Trp₄₉₅, Trp₆₀₀, Tyr₆₃₄). Somit liegen vor allem um letzteres Phenylalanin-Reste vor, welche zu einem negativen Cotton-Effekt beitragen könnten.

Das CD-Soret-Signal von RoxA setzt sich aus einer negativen Bande bei längerer Wellenlänge und einer positiven Bande bei kürzerer Wellenlänge als dem Absorptionsmaximum (ca. 406,5 nm) zusammen, bei welchem die Elliptizität Null beträgt (s. Kap. 3.10.1.2, Abb. 3.66). Die CD-Spektren von RoxA im sichtbaren Bereich unterscheiden sich deutlich von denen anderer Hämproteine wie z. B. Hämoglobin oder Myoglobin (z. B. Nagai *et al.*, 1969; Li & Johnson, 1969; Harrington *et al.*, 1973; Nicola *et al.*, 1975), eukaryotischen Peroxidasen wie HRP (Willick *et al.*, 1969) oder der Cytochrom *c* Oxidase (Dyuba *et al.*, 2011). Meist werden im CD-Spektrum einfache, positive Soret-Banden beobachtet (Ellfolk & Sievers, 1975) wie z. B. bei Myoglobinen und Hämoglobinen (Hsu & Woody, 1969; 1971), doch sind mittlerweile auch zahlreiche Beispiele für negative Cotton-Effekte bei Hämproteinen dokumentiert, beispielsweise für Lamprey Hämoglobin (Lampe *et al.*, 1972) und einige bis-His-koordinierte Häm-Modelle (Benson *et al.*, 1995). Ein komplexes CD-Spektrum der Soret-Bande und weiterer Banden zeigen beispielsweise einige Cytochrom *c* Proteine mit nur einem Häm-Chromophor. Die Besonderheit von Cytochrom *c* ist das Auftreten, geteilter Übergänge der Häm-Soret-Bande ("Exciton Splitting") (Vinogradov & Zand, 1968; Myer, 1968; Garber & Margoliash, 1994; Rafferty *et al.*, 1990) mit einem positiven und negativen Cotton-Effekt, so wie es sich auch im RoxA-Spektrum darstellt. Eine gewisse Ähnlichkeit zu RoxA existiert auch im Bereich des Soret-CD-Signals von Zink-Porphyrin-Modellen, wonach CD-Soret-Banden hauptsächlich der Kopplung von

Hämübergängen (B_x , B_y) mit den elektronischen und magnetischen Übergängen der nahen Peptidester entstammen (Mizutani *et al.*, 1994). Ein direkter Vergleich der CD-Spektren verschiedener Proteine ist aber generell schwierig, da neben der unterschiedlichen Anzahl von Chromophoren viele weitere Einflüsse der Umgebung zu berücksichtigen sind.

Die Wellenlängenmaxima von Absorption und Elliptizität sollten für erlaubte Übergänge übereinstimmen (Moffitt & Moscovitz, 1959). Weichen diese voneinander ab, weist dies auf eine Aufspaltung des CD-Spektrums durch Störung der X-Y-Symmetrie des Porphyrins hin. Dadurch können auch in einem Ein-Häm-System wie Cytochrom *c* zwei Übergänge entsprechend der B_x und B_y -Komponenten auftreten (Ellfolk & Sievers, 1975) und in Abhängigkeit der Peptidumgebung zwei entgegengesetzt gerichtete Cotton-Effekte resultieren. Die Ursache liegt im Ursprung der Soret-Bande aus einem doppelt entarteten elektronischen Übergang mit dessen senkrecht zueinander ausgerichteten Dipolmomenten in der Ringebene des Porphyrins. Bleibt die Entartung eines Ein-Häm-Systems in einer asymmetrischen Umgebung erhalten, zeigt sich ein einzelner Übergang im CD-Spektrum. Die Auflösung der Entartung einer solchen doppelt entarteten Bande resultiert in einem sog. "Exciton-Splitting" in zwei unterscheidbare Übergänge (B_x und B_y) mit entgegengesetztem Vorzeichen (Gouterman, 1961; Nicola *et al.*, 1975). Zu einem komplexen Spektrum können noch weitere Faktoren wie Häm-Häm-Interaktionen beitragen (Urry, 1967 b; Urry & Pettegrew, 1967). Eine direkte Interaktion der Hämgruppen in RoxA ist aber aufgrund deren Lage und Entfernung ($\approx 21,5$ Å) nicht denkbar. Anders als im RoxA-Spektrum ergibt beispielsweise die Rotationsstärke der Soret-Cotton-Effekte bei *Chromatium* Cytochrom c_{552} (di-Häm) in der Summe Null und wird auf die Kopplung der Häm- bzw. Häm-Flavin-Übergänge zurückgeführt (Yong & King, 1970). Eine Häm-Häm-Kopplung wurde z. B. in aggregierten Ein-Häm-Peptiden mit Häm-Entfernungen von ca. 10–13 Å (Häm-Undecapeptid: Urry 1967 bb) oder weniger als 7 Å (Häm-Octapeptid: Urry & Pettegrew, 1967) als Hauptursache gezeigt, indem nach Abnahme der Aggregation statt einer entgegengesetzt gerichteten Doppelbande nur noch ein einzelnes Signal auftrat (Blauer *et al.*, 1993). Demgegenüber ist der Beitrag von Häm-Häm-Interaktionen zur CD-Soret-Bande von RoxA als gering einzuschätzen. Das Auftreten von RoxA-Komplexen im Versuch sollte aufgrund des Zusatzes von NaCl zur Verhinderung der Aggregation minimiert worden sein. Allenfalls könnten im RoxA-Monomer die Hämzentren möglicherweise über intermediär lokalisierte aromatische Aminosäuren gekoppelt sein. Da genau zwischen den Hämpropionatgruppen Trp₃₀₂ angeordnet ist, soll diese Möglichkeit erwähnt werden. Die Indol-Ringebene liegt nahezu exakt parallel zur Porphyrinebene des bis-His-Hämzentrums und damit wie dieses senkrecht zur Ebene des zweiten Häms (vgl. Abb. 4.2). Von besonderem Interesse könnte daher die Aufnahme des CD-Spektrums der RoxA-W302L-Mutante im Bereich der Soret- und Q-Banden sein.

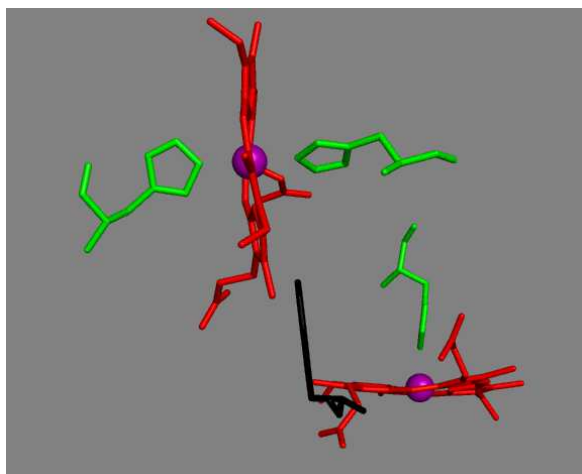


Abb. 4.2: Die annähernd senkrechte Anordnung der Hämzentren (rot) in RoxA mit den koordinierenden His-Resten (grün). Intermediär zwischen den Häm-Propionatgruppen liegt Trp₃₀₂ (schwarz) mit der Indolebene etwa parallel zum bis-His-Hämzentrum in Blickrichtung des Betrachters. (erstellt mit PyMol Version 1.1r1)

Ob diese Möglichkeit einer Häm-Häm-Interaktion in einer RoxA-Lösung, in welcher die Moleküle eine zufällige Raumanordnung aufweisen, zur Erklärung des RoxA-Spektrums eine Rolle spielen kann, ist fraglich. In jedem Fall ist anzunehmen, dass eine Reihe weiterer aromatischer Aminosäure-Reste in direkter Nähe beider Zentren zur Entstehung der jeweiligen Häm-CD-Signale beitragen (s. o.).

4.3.3.1 Das N-terminale Hämzentrum zeigt eine CD-Bandenaufspaltung

In einem Zwei-Häm-System wie in RoxA sind generell verschiedene Szenarien denkbar. Befinden sich beide Hämgruppen in sehr ähnlicher asymmetrischer Umgebung, wäre bei Entartung beider Häme nur eine Bande zu sehen, bei Nicht-Entartung, die zu einem "Exciton-Splitting" führt, zwei Banden, die je einen Beitrag jedes Hämzentrums enthielten. Werden beide Häme durch asymmetrische Proteinumgebungen aber in unterschiedlicher Weise beeinflusst, sind für den entarteten Zustand beider Häme zwei, für einen nicht entarteten Zustand vier Übergänge, bzw. bei Nicht-Entartung nur eines Chromophors drei Übergänge zu erwarten (Yong & King, 1970).

Die Einfachheit des CD-Spektrums in Hämoglobin (4 gleiche Häme) (Woody & Hsu, 1971) lässt darauf schließen, dass die Entartung der Hämgruppen, d. h. die Vierfachsymmetrie der X-Y-Achse, woraus Energiegleichheit der B_x und B_y -Übergänge resultiert, weitgehend erhalten bleibt. Bei Cytochrom *c* dagegen zeugt die komplexere Soret-Bande bei nur einem Chromophor von der Aufhebung der Entartung. Daraus entsteht eine hinsichtlich der B_x - und B_y -Übergänge geteilte Bande. Eine schematische Darstellung des "Exciton Splittings" gibt Fig. 1 aus (Woody & Dunker in Fasman, 1996) wieder. Die Bedeutung nahe liegender aromatischer Aminosäuren für das Soret-CD-Signal zeigen beispielsweise Untersuchungen von Garber & Margoliash (1994) und darin zitierter Autoren. Untersuchungen mit verschiedenen Ein-Häm-*c*-Typ -Cytochromen zeigen, dass ein Chromophor bezüglich der

Wellenlänge leicht verschobene, sowohl positive wie negative Cotton-Effekte verursachen kann. Bei Cytochrom *c* (Ratte) resultieren infolge der Überlappung eines positiven Signals bei 410 nm und eines negativen bei 412 nm ein positives Maximum bei 404 nm und negatives bei 417 nm (Garber & Margoliash, 1994), wobei die positive und negative Soret-Komponente den gleichen Abstand von ca. 13 nm aufweisen wie in RoxA.

Im Vergleich zu einigen Cytochrom *c* -Proteinen mit entgegengesetzt gerichteten Cotton-Effekten von nur einem Hämzentrum besitzt RoxA aber zwei Hämgruppen, deren Effekte sich überlagern. Da im CD-Spektrum der Soret-Region von oxidiertem RoxA prinzipiell zwei CD-Banden mit unterschiedlichem Vorzeichen auftreten, wäre ein ähnliches Szenario angesichts eines positiven Soret-Signals bei 399-400 nm und eines negativen bei 413 nm (s. Abb. 3.66) nur denkbar, wenn ein hinsichtlich der Wellenlängenverschiebung ähnliches "Exciton-Splitting" beider Hämzentren erfolgte. In RoxA erfahren aber beide Hämzentren eine unterschiedliche Beeinflussung durch ihre Aminosäureumgebungen, die keine große Ähnlichkeit aufweisen (s. o.). Wenn sich eines bzw. beide Hämzentren in einem unterschiedlichen, nicht-entarteten Zustand befinden und somit eine erkennbare Aufspaltung der Soret-Übergänge eines oder beider Chromophoren stattfinden, wären theoretisch drei bzw. vier Übergänge der Soret-Banden zu erwarten (Yong & King, 1970). Beim Auftreten von nur zwei Soret-Banden wäre demnach der Ursprung des positiven bzw. negativen CD-Signals von je einer der Hämgruppen, d. h. eine Entartung zweier unterschiedlicher Porphyrinsysteme wahrscheinlicher als ein additiver Beitrag beider Zentren zu beiden Effekten. Wie bei anderen di-Häm-Cytochromen (z. B. Yong & King, 1970), z. B. der *P. aeruginosa* CCP (Rönneberg *et al.*, 1979 b) würde sich dabei der Nullwert der Elliptizität am Absorptionsmaximum ergeben. Eine genauere Betrachtung der gesammelten CD-Spektren belegt jedoch, dass zumindest eine der Hämgruppen in RoxA eine Bandenaufspaltung aufweist – im Gegensatz zur Annahme ungeteilter Übergänge im PAP-Spektrum (s. u.). Die Ungleichmäßigkeit der Signalform im RoxA-Soret-Spektrum und die unterschiedliche Rotationsstärke der intensiveren positiven und weniger intensiven negativen Banden deuten bereits darauf hin.

Einen weiteren Hinweis liefern die Beobachtungen von RoxA zusammen mit Hämliganden. Es kann angenommen werden, dass durch die Bindung von Imidazol bzw. Pyridin nur die CD-Signale dieses Hämzentrums betroffen sind. Auch wenn im absoluten CD-Spektrum v. a. die Verschiebung der negativen CD-Signale auffällt (s. Abb. 3.75, Kap. 3.10.5), zeigt die Differenz des Spektrums mit Ligand minus des ursprünglichen Spektrums eine Zunahme der Elliptizität bei ca. 408 nm, aber auch eine schwache Abnahme bei kürzerer und längerer Wellenlänge (s. Abb. 3.76). Diese Beobachtung kann nicht alleine durch die Veränderung eines rein negativen oder positiven Signals erklärt werden, sondern vielmehr durch die Rotverschiebung eines aufgespaltenen Signals mit sigmoidaler Form mit einer positiven und negativen Komponente. Anschaulicher wird dies anhand des Spektrums von Pyridin-ligiertem RoxA nach Reduktion. Es ergab sich eine Intensivierung sowohl des positiven wie des negativen Cotton-Effektes (s. Abb. 3.76). Entsprechend war auch eine Abnahme beider

Signale nach Reaktion mit H_2O_2 zu beobachten, von dem ebenso nur eine Wirkung auf das N-terminale Häm anzunehmen ist (s. Abb. 3.70, Kap. 3.10.3). Dies belegt die Bandenaufspaltung zumindest des N-terminalen, Pyridin-bindenden Zentrums. Diese Schlussfolgerung erwies sich als hilfreich, um die einer Reduktion ähnelnden Effekte im optischen Spektrum mit externen N-heterozyklischen Hämliganden gegenüber einer tatsächlichen Reduktion zu erklären (s. Kap. 4.9.2.2).

Ob das C-terminale Hämzentrum auch eine Signalaufspaltung zeigt, kann nicht eindeutig entschieden werden. Aufgrund überwiegend positiver Elliptizität in RoxA "as isolated" und der Unterschiede in der Hämumgebung ist anzunehmen, dass dieses Hämzentrum vornehmlich oder ausschließlich zur positiven CD-Soret-Bande beiträgt. Die negative Elliptizität stammt somit hauptsächlich vom N-terminalen Hämzentrum, was auch mit der klaren Veränderung der Minima bei Anwesenheit von Hämliganden im Gegensatz zu den Maxima übereinstimmt. Erklärbar werden diese Annahmen bei Betrachtung der axialen Koordination beider Hämzentren. Eine His-Fe-O₂-Koordination am N-terminalen Häm, für die es gewichtige Hinweise gibt (s. Kap. 4.6), bzw. die Bindung eines schwachen Liganden in sechster Position nach Reduktion würde eine stärkere Störung der Symmetrie des Porphyrin- π -Elektronensystems und damit die Aufhebung der Entartung hervorrufen als eine Koordination durch zwei gleiche His-Reste, wie sie am C-terminalen Häm vorliegt.

4.3.3.2 Vergleich zur Cytochrom *c* Peroxidase aus *P. aeruginosa*

Einen sinnvollen Vergleich mit RoxA bieten CD-Untersuchungen der Cytochrom *c* Peroxidase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAP) (Rönneberg *et al.*, 1979 b), die zu RoxA in gleicher Weise orientierte Hämzentren und zudem in deren Umgebung einige konservierte Aminosäurereste besitzt. Neben dem Fern-UV-Bereich finden sich auch im Soret- und Vis-Bereich des CD-Spektrums auffallende Ähnlichkeiten zum CD-Spektrum von RoxA "as isolated", ferner auch reduziertem RoxA. Im oxidierten Zustand ist die Soret-Bande gleichermaßen in zwei Komponenten mit ähnlichen Minimum bei 411 nm und Maximum bei 400 nm gespalten mit dem Null-Übergang am optischen Absorptionsmaximum bei 407 nm (s. Tab. 4.1). Rönneberg *et al.*, sehen daher beide Hämzentren in PAP in einem entarteten Zustand und schreiben jedem Chromophor eine der Banden zu. Diese Situation unterscheidet sich von derjenigen in RoxA, bei dem eine Aufspaltung der Banden des N-terminalen Hämzentrums vorliegt (s. o.). Dieses ist in PAP im Grundzustand jedoch vermutlich im Gegensatz zu RoxA bis-His-koordiniert und sollte daher höhere Symmetrie aufweisen.

Die H_2O_2 -gebundene Form weist kaum noch negative Elliptizität auf, während die positive Bande unverändert bleibt. Diese wird daher dem C-terminalen *low-spin*-Häm, die negative Bande dem N-terminalen *high-spin*-Hämzentrum zugeschrieben (Rönneberg & Ellfolk, 1979 a). Die negative Elliptizität im RoxA-Spektrum stammt wahrscheinlich ebenso hauptsächlich von diesem Häm, doch zeigt die gleichzeitige Veränderung der positiven Bande einen Beitrag

dieses Häms zu beiden Signalen. Weitere Unterschiede gibt es im Bereich um 370 nm, wo das PAP-Spektrum ein negatives Signal, das RoxA-Spektrum aber positive Elliptizität besitzt, sowie ferner bezüglich einer Schulter negativer Elliptizität bei 435 nm im RoxA-Spektrum, was bereits auf ein komplexeres CD-Spektrum in RoxA "as isolated" hindeutet.

Nach Reduktion von RoxA zeigt das Soret-Spektrum in etwa den gleichen Verlauf der CD-Banden wie bei oxidiertem RoxA, mit zwei intensiven Banden. Die Signalaufspaltung erfolgt bei reduziertem RoxA in nur ca. 8 nm Entfernung gegenüber ca. 13 nm bei oxidiertem RoxA, wobei die Banden wie bei nahezu allen untersuchten Cytochromen eine deutlich stärkere Amplitude als im oxidierten Zustand des Proteins aufweisen. Die geringere Energiedifferenz zwischen den Banden, einhergehend mit der erhöhten Signalintensität, deuten eine symmetrischere Anordnung der Hämebene in der reduzierten Form des Proteins an (Yong & King, 1970). Die beiden Banden besitzen einen vergleichbaren Abstand zu denen im Spektrum von reduzierter *P. aeruginosa* CCP. Das PAP-Spektrum weist aber noch eine dritte deutliche Bande bei 437 nm auf, aus deren Auftreten die Autoren die Aufhebung der Entartung eines der Hämzentren durch die Reduktion schlussfolgern (Rönnerberg *et al.*, 1979 b). Eine solche klare Bande fehlt im RoxA-Spektrum nach Reduktion, doch ist ansatzweise ein Signal um 440 nm im Differenzspektrum gegenüber oxidiertem RoxA zu unterscheiden (s. Abb. 3.68 b). Der Effekt einer Pyridin-Bindung an reduziertem RoxA auf die beiden starken Signale zeigte bereits die Teilung der Soret-Übergänge des N-terminalen Hämzentrums (s. o.). Anhand des Soret-Bandenverlaufs kann eine weniger deutliche Aufspaltung der Banden des C-terminalen Häms nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Das CD-Spektrum von RoxA "as isolated" im Bereich der Q-Banden zeigt lediglich zwei sehr breite, positive Banden, die gut mit denjenigen des PAP-CD-Spektrums übereinstimmen (s. Tab. 4.1) und von $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen der X-Y-Ebene des Porphyrins stammen. Im PAP-Spektrum deckt sich eine CD-Bande bei 525 nm mit einer Bande im optischen Spektrum, was für entartete Übergänge spricht. Im RoxA-Spektrum weichen die Signale voneinander ab, was auf die Abnahme der Entartung der Übergänge mindestens eines Hämzentrums im Einklang mit den oben genannten Annahmen hinweist. Möglich ist in beiden Fällen die Überlagerung mit weiteren Banden. Im PAP-Spektrum existiert noch eine Ladungstransferbande (Ligand \rightarrow Metall) bei 585 nm, die charakteristisch für einen Fe(III)-*high-spin*-Zustand ist. Bei RoxA "as isolated" ist in Übereinstimmung mit fehlenden entsprechenden Banden im optischen Spektrum (s. Kap. 3.9) auch im CD-Spektrum keine solche Bande zu erkennen (z. B. Abb. 3.66; 3.68) und damit kein *high-spin*-Zustand in rekombinantem RoxA "as isolated" anzunehmen (s. Kap. 4.8).

Durch die vollständige Reduktion von RoxA entsteht im Bereich der α - und β -Banden zwischen 500 und 570 nm eine komplexe Feinstruktur von CD-Signalen. Ein ähnlich komplexes Spektrum besitzt auch PAP in diesem Bereich mit sechs aufgelösten Übergängen von stets positiver Elliptizität (s. Tab. 4.1), wobei die Bande bei 557 nm der α -Bande

zugeordnet wird, die fünf weiteren Banden im Bereich der β -Banden liegen. Beim *P. aeruginosa* Cytochrom *c* (1 Häm) finden sich neben der α -Bande noch vier Übergänge im β -Bereich. Das RoxA-Spektrum weist insgesamt mindestens sechs, möglicherweise noch weitere Übergänge auf, was auch im reduzierten Zustand auf ein "Exciton-Splitting" hindeutet. Das Auftreten der Banden ähnelt dem PAP-Spektrum, doch zeigt sich ein klarer Unterschied bezüglich der vorherrschenden Q-Bande, die im RoxA-Spektrum als einzige eine negative Elliptizität (551 nm) aufweist im Gegensatz zum PAP-Spektrum (557 nm), wobei sich deren Maximum mit dem der entsprechenden Bande im optischen Spektrum deckt (Rönnerberg *et al.*, 1979 b). Bei RoxA hingegen entspricht der Null-Schnittpunkt in etwa der ersten α -Bande des optischen Spektrums bei 549 nm. Dies ist ein weiterer Beleg für einen geteilten Übergang des N-terminalen Hämzentrums in zwei Signale, entsprechend der Soret-Übergänge, mit negativem Cotton-Effekt bei höherer Wellenlänge und positivem bei niedrigerer Wellenlänge.

Tab. 4.1: Vergleich der *P. aeruginosa* CCP mit RoxA anhand der Signale in UV-Vis- und CD-Spektroskopie. Eine Schulter bzw. schlecht aufgelöstes Signal ist in Klammern gesetzt; (+) bezeichnet positive, (-) negative CD-Banden; ct: "charge transfer" (vgl. auch *Fig.1* und *Table I* in Rönnerberg *et al.*, (1979); s. Abb. 3.68).

| | | Soret | | Q-Banden | |
|-----------|------|-------------------------------|---------------------------------|---|--|
| | | PAP | RoxA | PAP | RoxA |
| oxidiert | Abs. | 407 | 407 | 525 | 535 |
| | CD | 400 (+) 411 (-) | 400-399 (+) 413 (-) | 486 (+) 525 (+) 585 (+, ct) | 487 (+) 522 (+) |
| reduziert | Abs. | 420 | 418 | 524 (551),557 | 521 549, 553 |
| | CD | 414 (+) 422 (-) 437 (+) | 412 (+) 420 (-) (440 (+)) | 557 (+) 544 (+) 539 (+) 531 (+) 512 (+) 504 (+) | 551 (-) 546 (+) 537 (+) 528 (+) 518 (+) 511,5 (+) (499 (+)) |

Die kovalente Bindung des Protoporphyrin IX durch zwei Cysteine an das Protein bei *c*-Typ-Cytochromen, kann bereits zu komplexeren Ladungstransfer-Übergängen führen (Willick *et al.*, 1969). Da eine ähnliche räumliche Anordnung der beiden Hämgruppen in PAP und RoxA, sowie Übereinstimmungen im Aminosäureumfeld der Zentren existieren, sich aber die Koordination der Hämzentren unterscheidet und die Polypeptide insgesamt sowohl in der Größe als auch ihrer Zusammensetzung sehr verschieden sind, sind Ähnlichkeiten und Unterschiede der CD-Spektren erklärbar und unterstreichen die Bedeutung der Lage der

Hämzentren und der direkten Aminosäureumgebung für die Entstehung von Häm-CD-Signalen.

Die Messung der CD-Häm-Signale stellt ein sensitives Mittel dar, um Änderungen der Hämumgebung anzuzeigen (Nicola *et al.*, 1975). Somit dienen umgekehrt übereinstimmende CD-Spektren im Vis-Bereich als Indiz für die gleiche Orientierung der Aminosäuren um die Hämzentren und somit für eine korrekte Faltung eines Proteins. Durch Mutagenese aromatischer Aminosäurereste in Kontakt zu den Hämzentren könnte durch CD-Spektroskopie der entsprechenden Enzymvarianten deren Beitrag ermittelt bzw. die Korrektheit der Mutanten bestätigt werden. Auch wenn anhand des CD-Spektrums alleine aufgrund der Vielzahl möglicher Kopplungen mit Übergängen naher Aminosäurereste ein Rückschluss auf die exakte Hämumgebung schwer möglich ist (Nicola *et al.*, 1975), ließen sich im Falle von RoxA durch Kenntnis der räumlichen Struktur entsprechende Spektren simulieren. An dieser Stelle können nur grundlegende Erklärungen zur Beschaffenheit der mit RoxA erhaltenen CD-Spektren erfolgen und Ansatzpunkte für künftige Analysen aufgezeigt werden. Eine strukturbezogene, detaillierte Analyse der CD-Spektren wie sie beispielsweise für Cytochrom *c* Oxidase durch Kenntnis der Struktur mithilfe von Modellsimulationen durchgeführt wurde (Dyuba *et al.*, 2011), bietet den Umfang einer eigenständigen Arbeit und kann nicht Teil dieser Arbeit sein.

4.4 Das optische Absorptionsspektrum

4.4.1 Extinktionskoeffizienten von RoxA

Die Eigenschaften des UV-Vis-Spektrums von RoxA wurden bereits von R. Braaz (2004) beschrieben. Sie entsprechen einem typischen Spektrum eines *c*-Typ-Cytochroms mit vergleichbaren Absorptionskoeffizienten. Für das sekretierte, reife RoxA gilt nun ein Molekulargewicht von 71,52 kDa, welches sich aus der erhaltenen RoxA-Struktur und nach erneuter Kalkulation (SignalP-Server) durch Beginn bei Aminosäure 31 ergibt. Danach und infolge eines verbesserten Reinigungserfolges ist eine Korrektur der ursprünglich bestimmten Absorptionskoeffizienten von RoxA notwendig. Der auf Basis einer abgespaltenen 16 aa-Signalsequenz nach (Gill & Hippel, 1989) errechnete molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm von $\epsilon_{280} = 1,5316 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ unterscheidet sich nicht von demjenigen, welcher sich nach Abspaltung einer 30 aa -Signalsequenz ergibt.

Der ursprünglich von Braaz *et al.*, (2004) angegebene molare Extinktionskoeffizient von RoxA bei 406 nm von $\epsilon_{406} = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurde auf der Annahme eines 72,8 kDa-Proteins (Jendrossek & Reinhard, 2003) und eines $\epsilon_{406}/\epsilon_{280}$ -Verhältnisses bei reinem RoxA von 1,17 erstellt (Braaz *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit stimmten durch BCA-Assay

experimentell ermittelte Proteinkonzentrationen von sehr sauberem RoxA sehr gut mit über ϵ_{280} auf Grundlage einer Molmasse von 71,52 kDa errechneten Werten überein. Aus einem reproduzierbar gemessenen Verhältnis der $\epsilon_{406}/\epsilon_{280}$ -Absorption von 1,35 nach Hydroxyapatit-Chromatographie (s. Kap. 3.2.3) resultiert daraus ein neuer Wert für den molaren Extinktionskoeffizienten bei 406 nm von $\epsilon_{406} = 2,067 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In der Praxis erwiesen sich anhand dieses Wertes errechnete RoxA-Konzentrationen gereinigter Proben in Übereinstimmung mit den durch ϵ_{280} und BCA-Assay bestimmten Werten als deutlich genauer gegenüber dem ursprünglich bestimmten Koeffizienten. Diesem Wert ähneln auch entsprechende Extinktionskoeffizienten von Proteinen mit homologer Hämanordnung wie z. B. MauG mit $\epsilon_{405} = 2,076 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2003), Cytochrom *c* Peroxidase aus *G. sulfurreducens* mit $\epsilon_{406,5} = 2,31 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hoffmann *et al.*, 2009), CCP aus *P. aeruginosa* mit $\epsilon_{407} = 2,37 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ellfolk *et al.*, 1983) oder CCP aus *Rhodobacter capsulatus* mit $\epsilon_{406} = 2,40 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (de Smet *et al.*, 2001).

Das experimentell bestimmte Verhältnis der $\epsilon_{406}/\epsilon_{280}$ -Absorption von etwa 1,35 für reines RoxA liegt deutlich niedriger als entsprechende Quotienten anderer *c*-Typ-Cytochrome wie z. B. das *R. capsulatus* Cytochrom c_{550} mit einem Wert von 4,4 (Gilmour *et al.*, 1994), oder die bakterielle CCP aus *P. aeruginosa* mit 4,2 (Foote *et al.*, 1983), CCP aus *R. capsulatus* mit 5,2 (de Smet *et al.*, 2001) oder CCP aus *P. pantrophus* (früher *P. denitrificans*) mit 5,6 (Gilmour *et al.*, 1994). Verglichen mit letzteren besitzt RoxA einen höheren Peptidanteil pro Hämzentrum, was sich in einem niedrigeren Quotienten äußert. Insbesondere der hohe Anteil an Tyrosin- (30x; 4,6 %) und v. a. Tryptophan-Resten (20x; 3,1 %) mit hohen Absorptionskoeffizienten bei 280 nm von etwa $1300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bzw. $5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ trägt im Vergleich zur PAP (Tyr: 7x; 2,2 %; Trp: 3x; 0,9 %) zu einer erhöhten Absorption bei 280 nm bei.

4.4.2 Redoxpotential von RoxA

Die Titration von vollständig reduziertem RoxA mit Ferricyanid hatte gezeigt, dass RoxA in der Lage ist, zwei Elektronen pro Molekül, d. h. ein Elektron pro Hämzentrum aufzunehmen entsprechend der Situation bei CCPs und MauG. Dies ließ sich auch nach mehrmaliger Reduktion und Reoxidation erkennen. Für das mittlere Redoxpotential von RoxA wurden Werte um etwa $E_{0'}^{\text{RoxA}} \approx -135 \text{ mV}$ ermittelt (s. Kap. 3.9.4). Sie stehen somit im Einklang mit von R. Braaz bestimmten Potentialen. Das Standardpotential E_0' eines der Hämzentren wurde dabei auf -65 mV bestimmt, das des zweiten war in ähnlicher Weise wie bei weiteren Cytochromen (z. B. Heitmann & Einsle, 2005; Fritz *et al.*, 2001), nicht klar aufzulösen ($E_0' \approx -145 \text{ mV}$) (Braaz, 2005 b; Schmitt *et al.*, 2010). Eine potentielle Fehlerquelle folgt aus dem mit sämtlichen Titrationsmethoden bestehenden Problem, dass RoxA unter Sauerstoffausschluss langsam einen offenbar teilreduzierten Zustand einnimmt (Kap. 3.9.3). Aber bereits anhand der Eignung nur bestimmter Redoxmediatoren, nicht aber solcher mit höherem oder niedrigerem Potential ließ sich erkennen, dass die Potentiale beider Hämzentren

in diesem Bereich liegen müssen. Dass sich die Einzelpotentiale der Hämgruppen nicht deutlich trennen ließen, steht im Einklang mit den Beobachtungen bei schrittweiser Reduktion des Enzyms, die sich mit allen verwendeten Methoden der Reduktion entsprachen. Zunächst war eine Zunahme der α -Bande bei 549 nm, wenig später die Zunahme der α -Bande bei 553 nm festzustellen (s. Kap. 3.9.1), bei Reoxidation verhielt es sich entsprechend umgekehrt. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme zweier nahe beieinander liegender Redoxpotentiale.

Der Vergleich von RoxA zu bakteriellen Peroxidasen hatte eine hohe Übereinstimmung der räumlichen Anordnung beider Hämgruppen und einiger Aminosäuren in deren Umgebung aufgezeigt (Hoffmann, 2007). Die Redoxpotentiale in RoxA weichen jedoch deutlich von denjenigen in bakteriellen CCPs ab. Letztere unterscheiden sich deutlich um mehr als 600 mV, liegen z. B. bei der *N. europaea* CCP bei +450 mV und –260 mV (Arciero & Hooper, 1994) oder der *P. aeruginosa* CCP bei +320/–330 mV (Fülöp *et al.*, 1995). So besitzen diese ein Ascorbat-reduzierbares (*high-potential*) und ein Dithionit-reduzierbares (*low-potential*) Hämzentrum. Bei RoxA sind beide Potentiale negativ, unterscheiden sich um weniger als 100 mV und sind nicht durch Ascorbat zu reduzieren. Mitentscheidend für diesen Unterschied ist die Met-Koordination an der sechsten Bindungsstelle des C-terminalen Hämzentrums bei CCPs (Met₂₇₅ bei *P. aeruginosa* CCP, Met₂₅₈ bei *N. europaea* CCP), aber Histidin bei RoxA (His₆₄₁), was ein negativeres Potential zur Folge hat. In Modellsystemen lag das Potential von bis-His-koordiniertem Häm um etwa 170 mV unter dem His-Met-Komplex (Reddy & Gibney, 2004). Auch die Stellung der axialen Liganden (parallel, senkrecht) (Walker *et al.*, 1986), aber auch weitere Einflüsse der umliegenden Aminosäuren, wie deren Ladungen, wirken sich auf das Redoxpotential aus (Reddy & Gibney, 2004). Wie der Verlauf der schrittweisen Reduktion veranschaulicht, zeigt ein Hämzentrum in RoxA (*high-potential*) eine etwas größere Bereitschaft, Elektronen aufzunehmen. Dieses ist vermutlich das N-terminale Häm, welches nur von einem Histidin koordiniert im *high-spin*-Zustand vorliegt und dem die Bindung von Liganden zugeschrieben wird (s. Kap. 4.4.3; 4.9), wogegen bei CCPs das C-terminale Häm das deutlich höhere Redoxpotential aufweist. Als sicher gilt, dass die Redoxpotentiale der beiden Hämzentren sehr ähnliche Werte besitzen (s. Kap. 4.4.2), wonach die Begriffe *high-* und *low-potential* Häm im Falle von RoxA nur bedingt sinnvoll sind.

Zur besseren spektroskopischen Trennung der beiden Hämzentren kann ein Austausch des axialen Liganden His₆₄₁ gegen Met hilfreich sein. Dieser sollte ein deutlich höheres Redoxpotential des entsprechenden Hämzentrums zur Folge haben (Mao *et al.*, 2003), wodurch die Signale beider Zentren bei einer Titration besser unterscheidbar, unter Umständen eine den CCPs entsprechende halbreduzierte Form erreichbar sein sollte. Methionin hat die Eigenschaft, Elektronen abzuziehen, was zur Erhöhung des Redoxpotentials führt, wohingegen Histidin als Elektronendonator wirkt (Mao *et al.*, 2003). Übereinstimmend damit hat Histidin eine höhere Affinität zu Fe(III) als zu Fe(II) (Nesset *et*

al., 1996), während sich dies bei Methionin umgekehrt verhält (Tezcan *et al.*, 1998; Reddy & Gibney, 2004). Dieser Umstand könnte möglicherweise zur Erklärung der offenbar teilreduktiven Wirkung einer Bindung von Imidazol am vermutlich N-terminalen oxidierten Hämzentrum in RoxA heran gezogen werden (s. Kap. 4.9.2.2). Da bei einer H641M-Mutante das C-terminale Häm nunmehr ein höheres Potential als das N-terminale und nicht wie im unveränderten Enzym ein wahrscheinlich etwas niedrigeres Potential aufweisen würde, könnte dies Auswirkungen auf einen möglichen Elektronenfluss zwischen den Hämzentren und ggf. auf die Latexspaltung haben. Blicke dieser Aminosäureaustausch ohne Auswirkung auf die RoxA-Aktivität, würde dies einer Beteiligung des C-terminalen Häms an der Latexspaltung widersprechen. Würde man nun aber Peroxidase-Aktivität feststellen, unterstützte dies die Theorie, dass sich RoxA aus einer Peroxidase entwickelt haben könnte. Denn entsprechend führte im umgekehrten Fall allein der Austausch eines Methionins gegen ein Histidin bei der *Rhodobacter capsulatus* CCP zu einem deutlich negativeren Redoxpotential und zum vollständigen Verlust der Peroxidaseaktivität (de Smet *et al.*, 2006) – in Übereinstimmung mit der Situation bei RoxA.

Bei MauG aus *P. denitrificans*, einem weiteren Protein mit vergleichbaren strukturellen Übereinstimmungen zu CCPs und RoxA, wurden Redoxpotentiale von $E_0' = -159$ mV und -244 mV gefunden (Li *et al.*, 2006 a), die beide im negativen Bereich und ähnlich nahe zusammen liegen wie die für RoxA bestimmten Werte. Zunächst wurde für MauG eine Koordination des *high-spin*-Häms durch ein Histidin angenommen, eine bis-His-Koordination des *low-spin*-Hämzentrums (Li *et al.*, 2006 a), später aber nachgewiesen, dass dieses eine untypische His-Tyr-Koordination aufweist, welche die Stabilisierung eines Fe(IV)-Zustandes ermöglicht (Jensen *et al.*, 2010) (vgl. Kap. 4.11.3). Desweiteren funktionieren die beiden Hämzentren von MauG als eine Di-Häm-Einheit, d. h. die festgestellten ähnlichen Redoxpotentiale beziehen sich auf die Ein- bzw. Zwei-Elektronen-Reduktion zweier gleichwertiger Hämzentren. Einen solchen Ausgleich der negativen Ladung zwischen den Fe-Zentren bezeichnet man als negative Kooperativität der Hämzentren (Li *et al.*, 2006 a; Fu *et al.*, 2009). Wie bei RoxA tritt somit bei MauG ein "Mixed-Valence"-Zustand der CCPs nicht auf. Trotz der ähnlichen Redoxpotentiale zu RoxA erscheint es derzeit unwahrscheinlich, dass auch für RoxA ein solches kooperatives Redoxverhalten, wonach keinem der Hämzentren ein eindeutiges Redoxpotential zugewiesen werden kann, in Betracht kommt. Denn anders als bei MauG lassen sich die beiden Hämzentren in RoxA anhand der α -Bande im reduzierten Zustand unterscheiden (s. Kap. 4.4.3). Dadurch wurde deutlich, dass deren Reduktion nicht exakt simultan verläuft wie es für die Hämgruppen in MauG gezeigt wurde. Dass dennoch die Reduktion des zweiten Häms mit niedrigerem Potential bald nach der Reduktion des ersten Häms einsetzt, ist durch die wenig unterschiedlichen Potentiale erklärbar.

4.4.3 RoxA ist ein "Split- α "-Cytochrom

Eine Auffälligkeit des RoxA-UV-Vis-Spektrums ist die Aufspaltung der α -Banden bei 549 nm und 553 nm im reduzierten Zustand, die Unterschiede zwischen den beiden Hämzentren und deren Umgebung widerspiegelt. Theoretisch könnte dabei jedes Signal einem Hämzentrum zugeordnet werden oder bereits die Signale eines oder beider Zentren geteilt sein. Die α -Bande entsteht aus zwei nahezu entarteten (energiegleichen), senkrecht zueinander gerichteten Elektronenübergängen (x, y) (s. Kap. 2.12.1). Eine Aufspaltung dieser Absorptionsbande eines Chromophors kann aus einer Verringerung der Symmetrie durch eine asymmetrische Proteinumgebung resultieren, die prinzipiell zur Aufhebung dieser Zweifach-Entartung führt (z. B. Reddy *et al.*, 1996; Manas *et al.*, 1999) (s. auch Kap. 4.3). Ein Splitting kann bereits bei Raumtemperatur oder häufiger erst bei Tieftemperatur beobachtet werden. Beispielsweise zeigt die α -Bande von Cytochrom *c* (horse) eine Aufspaltung bei Temperaturenniedrigung auf 10 K (Reddy *et al.*, 1996). Bei der *P. aeruginosa* CCP stammt eine Aufspaltung der Q-Banden bei 77 K lediglich vom *high-potential*-Häm mit zwei ungleichen Maxima bei 549 und 555 nm, während das *low-potential*-Häm eine ungeteilte Bande bei 550 nm besitzt (Ellfolk *et al.*, 1983). Die Aufspaltung in zwei deutlich unterscheidbare, gleich intensive α -Banden ist jedoch für ein *c*-Typ-Cytochrom ungewöhnlich. Generell muss man bei Anwesenheit mehrerer Hämgruppen zwischen der soeben beschriebenen Aufspaltung des α -Signals eines Hämzentrums und einer homogenen, aber bei unterschiedlicher Wellenlänge auftretenden α -Bande jedes Hämzentrums unterscheiden. Letztere Situation liegt vermutlich in RoxA vor (s. u.).

Geteilte α -Banden kommen auch bei den sogenannten "Split- α "-*c*-Typ-Cytochromen z. B. aus denitrifizierenden Bakterien (Ambler, 1991) vor, z. B. dem Di-Häm-Cytochrom *c*₅₅₆ aus *P. aeruginosa* mit einem α -Maximum bei 556 nm und einer deutlichen Schulter bei 552 nm (Singh & Wharton, 1973). Diesen Cytochromen wurde zunächst eine Verwandtschaft mit bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen nahe gelegt (Ambler, 1973), das *P. aeruginosa* Cytochrom *c*₅₅₆ schließlich als Peroxidase identifiziert (Rönnberg und Ellfolk 1978) und durch eine α -Bande bei 557 nm und Schulter bei 551 nm beschrieben (Aasa *et al.*, 1981). So findet man besonders bei den zu RoxA im Bereich der Hämgruppen strukturell homologen CCPs ein ähnliches α -Banden-Splitting mit jedoch stets ungleichen Maxima, einem Hauptmaximum um 555–557 nm und einer z. T. nur andeutungsweise zu erkennenden Schulter meist auf der Seite kürzerer Wellenlängen (Goodhew C.F. *et al.*, 1990). Die CCP aus *P. stutzeri* besitzt dagegen ein Maximum bei 550 nm mit einer Schulter auf der langwelligen Seite bei 555 nm (Villalain *et al.*, 1984).

Damit unterscheidet sich diese Aufspaltung zu derjenigen im Spektrum von vollständig reduziertem RoxA, das zwei intensitätsgleiche Banden bei 549 und 553 nm aufweist. Beispielsweise zeigt das optische Spektrum im reduzierten Zustand der CCP aus *R. capsulatus* maximale α -Absorption bei 556 nm mit Schulter bei 552 nm. Dabei zeigt bereits

allein das α -Signal des Ascorbat-reduzierbaren *high-potential*-Häms im *low-spin*-Zustand eine Aufspaltung in ein Signal bei 556 nm und einer Schulter auf der kurzwelligen Seite, wogegen das *low-potential* Häm im *high-spin*-Zustand ein demgegenüber schwächeres, ungeteiltes Signal bei 552 nm beiträgt (Hanlon *et al.*, 1992; de Smet *et al.*, 2001). Die CCP aus *P. pantrophus* (*P. denitrificans*) (Pettigrew, 1991) weist ein Hauptmaximum bei 557 nm und Schulter bei 551 nm in Anwesenheit von Ca^{2+} (*high-spin*) auf bzw. umgekehrt in der Abwesenheit von Ca^{2+} (*low-spin*). Demnach ist die Form der α -Banden vom Spinzustand des *low-potential*, Peroxid-spaltenden, N-terminalen Hämzentrums abhängig (Gilmour *et al.*, 1993). Ein unterschiedlich starker Beitrag des *high-* oder *low-spin*-Zustands zur Intensität der jeweiligen α -Bande könnte auch eine Erklärung für die deutlich stärkere 549 nm-Absorption von reduziertem RoxA mit externen Hämliganden sein (s. Kap. 4.9.4.1; vgl. Abb. 3.55).

Bei CCPs geht in jedem Fall die α -Bande längerer Wellenlänge auf das mit Ascorbat reduzierbare C-terminale *high-potential*-Hämzentrum zurück, welches bereits von Beginn an eine Aufspaltung zeigt. Bei RoxA widerspricht der Entstehungsverlauf der Titrationskurven dem Splitting eines oder beider Hämzentren. Bei schrittweiser Titration von RoxA nimmt zunächst die energiereichere α -Bande bei 549 nm zu, bald gefolgt von einer Zunahme der zweiten α -Bande bei 553 nm im Spektrum von vollständig reduziertem RoxA bis beide etwa die gleiche Intensität aufweisen. Ein Unterschied zu diesen Hämproteinen besteht also vermutlich darin, dass die α -Banden in RoxA auf homogene Banden je eines der beiden Hämzentren zurückgehen, folglich auch das dem *high-potential*-Hämzentrum von Peroxidasen homologe, C-terminale Hämzentrum keine α -Signal-Aufspaltung zeigt. Andernfalls würden zwei ungleiche Signale auftreten. Wiederum könnte die Ursache bei den axialen Hämliganden liegen (vgl. Kap. 4.4.2). Denkbar wäre eine geringfügig dezentrale Position des Fe-Ions bezogen auf die Hämebene durch eine N-Fe-S (His-Met) -Koordination bei CCPs gegenüber einer N-Fe-N (His-His) -Koordination bei RoxA.

Auch eine bei CCPs beobachtete Umkehr von Maximum und Schulter durch Verschiebung der jeweiligen Intensitäten zwischen dem oxidierten "resting state" und dem halbreduzierten "active state" (Gilmour *et al.*, 1993; s. o.), fand im RoxA-Spektrum unter keinen Bedingungen statt. Dieser Umstand kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass bei der Latexspaltung durch RoxA zumindest ein bei den meisten CCPs erforderliches (Ca^{2+} -abhängiges) Aufklappen ("open conformation") und somit eine vergleichbare Konformationsänderung nicht stattfindet (s. auch Kap. 4.11.3). Die anfängliche Zunahme der 549 nm-Bande in RoxA veranschaulicht aber auch, dass im Gegensatz zu CCPs das N-terminale Hämzentrum ein etwas höheres Potential als das C-terminale Häm aufweisen muss. Übereinstimmend stammt jedoch auch in RoxA die α -Bande kürzerer Wellenlänge vom N-terminalen Hämzentrum. Dies zeigten UV-Vis- und EPR-Spektren bei Anwesenheit von Hämliganden zusammen mit der RoxA-Struktur (s. Kap. 4.9.2.). Jedoch tritt dieses erste α -Maximum bei einer ungewöhnlich kurzen Wellenlänge auf und kennzeichnet somit einen etwas energiereicheren Übergang als bei bakteriellen Peroxidasen. Ein Cytochrom mit einem

sehr ähnlichen Erscheinungsbild der α -Banden ist beispielsweise das Di-Häm-Cytochrom $c_{549,554}$ aus dem nitrifizierenden Bakterium *Nitrobacter agilis*, dem noch keine Funktion zugewiesen wurde. Dieses weist annähernd gleich intensive α -Banden bei 549 und 554 nm auf und ist wie RoxA nicht mit Ascorbat reduzierbar (Chaudhry *et al.*, 1981).

Die Häufung des Phänomens des α -Banden-Splittings unter bakteriellen Peroxidasen und möglicherweise verwandten Proteinen lässt vermuten, dass die homologe Anordnung der Hämzentren und konservierter Aminosäuren (vgl. Kap. 1.5.2) für die beschriebene Aufspaltung der sich jedoch unterscheidenden α -Banden eine Rolle spielen könnte. Das optische Spektrum des die gleichen Homologien aufweisenden MauG hingegen zeigt bis zur vollständigen Reduktion nur eine einzelne α -Bande bei 552 nm (Wang *et al.*, 2003). Eine Besonderheit ist jedoch das kooperative Redoxverhalten der beiden Hämzentren, wobei sich ein Gleichgewicht einer Ein- bzw. Zwei-Elektronen-Reduktion zwischen diesen stabilisiert (Li *et al.*, 2006).

4.5 Das EPR-Spektrum von RoxA

Neben der UV-Vis-Spektroskopie kann auch die EPR-Spektroskopie für die Charakterisierung eines Hämproteins ein wichtiges Mittel sein. Sie ermöglicht Aussagen über Oxidations- und Spinzustände, sowie bedingt die Identifizierung der koordinierenden Liganden und die Detektion stabiler Radikale. Die Zusammensetzung des Spektrums von aus Latexkultur isoliertem RoxA wurde bereits von R. Braaz dargestellt (Braaz, 2005 b). Es ergab sich jedoch die Notwendigkeit im Hinblick auf Unterschiede zu rekombinanten RoxA und aufgrund neuer Beobachtungen eine Neuinterpretation bestimmter Signale vorzunehmen.

Wie bereits gezeigt (Braaz, 2005 b, Schmitt *et al.*, 2010) enthält das EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" die Signale zweier Hämgruppen, von denen eines bis-His-koordiniert mit eher parallelen Imidazolebenen der axialen Liganden, mit Signalen bei $g=3,09$, $g=2,23$ und einer schlecht aufzulösenden Komponente bei hoher Feldstärke im *low-spin*-Zustand vorliegt. Das zweite Hämzentrum lieferte ein *low-spin*-Signal bei $g=3,39$ (Abb. 4.3), dem ebenso eine bis-His-Koordination, aber mit eher senkrecht zueinander stehenden Imidazolebenen zugeschrieben wurde. Im Gegensatz zu den Signalen bei $g=3,09 + 2,23$ trat dieses bei RoxA aus Latexkultur präparationsabhängig in variabler Intensität auf, war jedoch bei rekombinantem RoxA in keiner Präparation zu sehen. Stattdessen war bei diesem ein stets nur wenig intensives Signal bei $g=3,57$ zu beobachten (Abb. 4.3). Die Signale bei $g=3,39$ bzw. $g=3,57$ veränderten sich gemeinsam mit *high-spin*-Signalen um $g=6$ bzw. weiterer, gelegentlich auftretender Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$, $g=1,86$ (s. u.) nach Reduktion und Reoxidation (s. Kap. 3.11.2) oder der Zugabe von Hämliganden (s. Kap. 3.11.5) oder

Substraten (s. Kap. 3.11.6, 3.11.7), während die Signale des anderen Hämzentrums etwa konstant blieben. Daraus kann geschlossen werden, dass lediglich eine der beiden Hämgruppen für externe Substanzen wie auch das Substrat zugänglich ist. Die Strukturen von RoxA aus Latexkultur und rekombinantem RoxA zeigen jeweils das C-terminale Hämzentrum bis-His-kodiert, das N-terminale Hämzentrum aber von nur einem Histidin kodiert, wobei die sechste Bindestelle nur von einem kleinen O-enthaltenden Molekül wie z. B. H₂O besetzt ist. Es kann angenommen werden, dass die sich ändernden Signale auf diese Hämgruppe zurückgehen, die konstanten Signale bei $g=3,09 + 2,23$ vom sechsfach koordinierten C-terminalen Zentrum stammen.

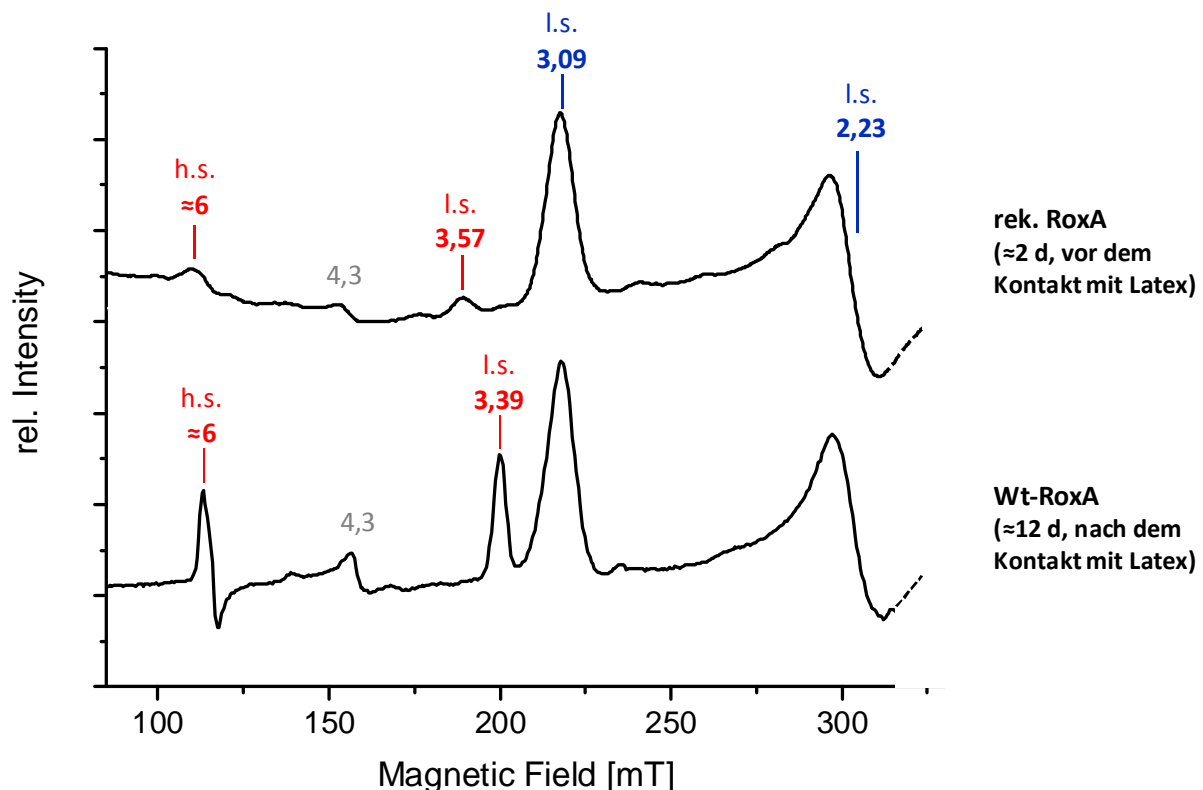


Abb. 4.3: Vergleich der EPR-Spektren (schematisch) von rekombinantem RoxA (oben) und Wt-RoxA (aus Latexkultur) (unten). Zur Klarheit sind Signale bei hohem Feld ausgeblendet und das Signalrauschen entfernt. Relevante Signale des N-terminalen Häms sind rot, solche des C-terminalen Hämzentrums blau eingetragen, ein Signal für unspezifisch gebundenes Fe(III) grau; h.s.= *high-spin*, l.s.= *low-spin*. Diese Darstellung veranschaulicht den Unterschied zwischen typischen EPR-Spektren von RoxA "as isolated" aus Latexkultur, das etwa über 12 Tage in Gegenwart von Latexmilch exprimiert wurde, und rekombinantem RoxA, das etwa 2 Tage in Abwesenheit von Latex exprimiert wurde. Dieses beschreibt den Zustand von RoxA vor dem Kontakt mit dem Substrat und war deutlich geringeren präparationsabhängigen Schwankungen der Signalintensität des N-terminalen Häms (rot) unterworfen als RoxA aus Latexkultur. Signale des C-terminalen Häms entsprachen sich jeweils und änderten sich nicht signifikant.

Literaturwerten zufolge sollte das C-terminale Häm somit eher parallele Imidazolebenen der koordinierenden Histidine aufweisen (Walker, 1999). Die ermittelten RoxA-Strukturen zeigen allerdings einen Winkel der Imidazolebenen von etwa 50° zueinander. Dabei ist zu bedenken, dass die Begriffe "parallel" und "senkrecht" Grenzstrukturen darstellen, die in der Praxis beobachtete Konstellationen nur tendenziell beschreiben und für jeweils deutlich abweichende Konstellationen gelten können. A. Walker grenzte den Übergang zwischen den beiden Typen rhombischer Signale, den "normalen" rhombischen Signalen (g_z , g_y , g_x) mit eher parallelen Imidazolebenen und solchen mit einem starken g_{\max} -Signal mit eher senkrechten Ebenen, auf einen Winkel zwischen 30° und 70° ein (Walker, 2004 und darin angegebene Referenzen). Mit Häm-Modellverbindungen wurden "normale" rhombische Signale bis zu einem Winkel von etwa 57° gefunden, darüber rhombische Signale mit einem g_{\max} -Wert, wobei sich der höchste g -Wert zusammen mit dem Winkel zwischen $90^\circ - 0^\circ$ kontinuierlich ändert (Yatsunyk *et al.*, 2006). Der beispielsweise bei einem Winkel von 53° festgestellte g -Wert von $g_z=3,06$ ähnelt deutlich dem entsprechenden g -Wert der rhombischen *low-spin*-Spezies im RoxA-Spektrum bei $g_z=3,09$. Deren Signale können demzufolge eine Stellung der Ligandenebenen von etwa 50° beschreiben wie sie die RoxA-Struktur zeigt und stützen damit deren Zuordnung zum C-terminalen Hämzentrum.

Die entsprechenden *low-spin*-Signale des N-terminalen Hämzentrums lassen sich nicht mit gleicher Sicherheit zuordnen. Die bei RoxA aus Latexkultur gefundenen g -Werte bei $g=3,33-3,39$ stimmen mit einer bis-His-Koordination mit eher rechtwinklig angeordneten Imidazolebenen überein. Möglich, doch ungewöhnlich wäre eine solche Konstellation auch bei einem g -Wert von $g=3,57$, wie er bei rekombinanten RoxA stattdessen gefunden wird. Signale einer bis-His-Koordination können in Abhängigkeit der Orientierung der Imidazolebenen zueinander und zu den Pyrrol-N-Atomen des Porphyrinrings bis zu einem g -Wert von etwa $g=3,6$ variieren (Walker *et al.*, 1986). Mit sterisch gehinderten Imidazolderivaten wie 2-Methylimidazol sind höhere g -Werte ($g=3,5-3,6$) als in den meisten Fällen beschrieben (Salerno & Leigh, 1984 a; Walker, 1986; Gadsby, 1986). Diese g -Werte stellen eine g_{\max} -Komponente einer rhombischen *low-spin*-Spezies dar, wobei die beiden anderen Komponenten aufgrund ihrer Breite kaum detektierbar sind, wenn die g_z -Komponente größer als etwa $g=3,4$ liegt (Salerno & Leigh, 1984 a, Salerno 1984 b). Solchen sogenannten HALS (*highly anisotropic low-spin*)-Signalen sind axiale Liganden mit tendenziell senkrechten Ebenen zugeordnet (Walker *et al.*, 1986). So könnte der Unterschied im EPR-Spektrum bezüglich des g -Wertes des N-terminalen Hämzentrums zwischen rekombinantem RoxA und solchem aus dem Wildtyp in der Position der Imidazolebenen der axialen Liganden liegen.

Ebenso denkbar wäre auch eine His-Met-Koordination, für welche u. a. hohe g -Werte bei $g_z=3,64$ (Gadsby *et al.*, 1989; Gadsby & Thomson, 1990) oder $g=3,54$ (Cheesman *et al.*, 1998) ermittelt wurden, obgleich im optischen Spektrum von RoxA aber keine Met-typische

Bande bei 695 nm zu sehen ist. Eine solche läge jedoch angesichts der geringen Intensität des Signals nur bei einem geringen Teil der Moleküle vor und könnte nicht erkennbar sein. Bei den RoxA-verwandten Cytochrom *c* Peroxidasen liegen HALS-Signale einer His-Met-Ligation bei der *P. aeruginosa* CCP bei $g=3,26$ (Aasa *et al.*, 1981) und der *N. europaea* CCP bei $g=3,38$ (Arciero & Hooper, 1994). Sie stammen jedoch vom C-terminalen *high-potential*-Häm. Im RoxA-Spektrum wäre eine solche Koordination allenfalls am N-terminalen Häm möglich (s. u.). In Fällen einer bis-His-Koordination mit $g>3,5$, aber auch einer His-Met-Koordination, werden hinsichtlich der g_{\max} -Signalform mit steigendem g -Wert zunehmend Abweichungen von der Gauß-Symmetrie mit steilerem Anstieg auf der Seite niedriger Feldstärke festgestellt (Gadsby und Thomson, 1986; Gadsby *et al.*, 1989; Gadsby und Thomson, 1990). Auf die Signale im Spektrum von rekombinantem RoxA bei $g=3,57$ trifft dies aber nicht zu (vgl. z. B. Abb. 3.81, Kap. 3.11.2). Auch eine Koordination mit der Aminogruppe eines Lysins kann entsprechende g -Werte mit einer Gauß'schen Signalform liefern, wie z. B. bei $g=3,4$ bzw. $g=3,6$ mit Cytochrom *c* (Brautigan *et al.*, 1977) oder bei $g=3,51$ mit Cytochrom *f* (Rigby *et al.*, 1988). Eine Koordination durch einen Lys-Rest in sechster Position des N-terminalen Hämzentrums in RoxA ist aber aufgrund der sterisch ungünstigen Lage von Lysin um dieses Hämzentrum nicht vorstellbar. Auch zeigt die RoxA-Struktur weder einen His-Rest oder eine sonstige, für eine Hämbindung infrage kommende Aminosäure in ausreichender Nähe zur sechsten Koordinationsstelle. Lediglich das in einer α -Helix lokalisierte His₃₁₂ könnte bei einer Längsachsendrehung dieser Helix von mehr als 180° in die Koordinationssphäre des Fe-Ions gelangen. In gleicher Orientierung in dieser Helix benachbart zu His₃₁₂ liegt Met₃₁₅, das bei einer entsprechenden Drehung ebenso für eine Hämbindung infrage käme. Ob und ggf. wie eine solche größere Konformationsänderung aber erfolgen könnte, ist unklar.

Mit EPR-Spektroskopie allein lassen sich die axialen Liganden bei HALS-Signalen mit hohem g -Wert ($>3,3$) nicht zweifelsfrei bestimmen (Gadsby und Thomson, 1986; Zoppellaro *et al.*, 2009). Da die RoxA-Struktur keinen Aufschluss über einen Aminosäureliganden eines *low-spin*-Zustandes gibt, ist die sichere Zuordnung der $g=3,57$ -Spezies zu einer bestimmten Koordination derzeit nicht möglich. Dieser Spezies kommt aufgrund ihrer geringen Intensität in RoxA "as isolated" möglicherweise keine direkte Bedeutung für den Reaktionsmechanismus zu (s. auch Kap. 4.11.5). Grundsätzlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil einer RoxA-Population eine andere Konformation aufweisen könnte als die ermittelte Struktur zeigt bzw. umgekehrt davon abweichende Konformationen keine brauchbaren Kristalle liefern könnten.

Der reproduzierbare Unterschied zwischen rekombinantem RoxA und solchem aus Latexkultur besteht im Wesentlichen in einem unterschiedlichen g -Wert der HALS-Signale bei $g=3,57$ bzw. $g=3,33$ – $3,39$. Die Ursachen dieser Abweichung sind vermutlich in den unterschiedlichen Expressionsbedingungen hinsichtlich des Mediums und des

Kultivierungszeitraums zu suchen. Insbesondere die Abwesenheit des Substrates Poly(*cis*-1,4-isopren) bei der Rhamnose-induzierten Expression von rekombinantem RoxA lässt einen Zusammenhang vermuten. Bereits dieser Umstand, zusammen mit dem fehlenden Einfluss der Expressionsbedingungen auf die Signale des C-terminalen Häms, deutet auf eine Lokalisierung des Substrates in der Umgebung des N-terminalen Hämzentrums hin. Denn das aus Latexkultur isolierte RoxA hatte im Gegensatz zu rekombinantem RoxA bereits vor Beginn der Reinigung aus dem Kulturüberstand Latex-Spaltungsreaktionen katalysiert. Eine vergleichbar lange Inkubation von rekombinantem RoxA in verdünnter oder konzentrierter Lösung mit Latex hatte jedoch nicht zum Auftreten eines $g=3,39$ -Signals geführt. So ist auch eine Kombination mit weiteren Faktoren wie dem Expressionsmedium und der Expressionsdauer möglich. Ebenfalls in Beziehung zu den Expressionsbedingungen zu setzen ist, dass bei rekombinantem RoxA innerhalb eines Zeitraums von zwei Tagen kaum Abweichungen zwischen verschiedenen Präparationen hinsichtlich der Signalintensität auftraten, häufig jedoch bei RoxA aus Latexkultur. Bei diesem führen die um ein Vielfaches längere Kultivierungszeit und die Eigenschaften unterschiedlicher Latices zu einer größeren Inhomogenität der Präparationen untereinander und vermutlich auch innerhalb einer Präparation hinsichtlich des Alters der RoxA-Moleküle (vgl. Abb. 4.3). Auf Unterschiede in der Existenz bzw. der Intensität von *high-spin*-Signalen wird in Kap. 4.8 näher eingegangen.

Neben den konstanten Signalen des C-terminalen Häms bei $g=3,09$, $g=2,23$ traten bei RoxA aus Latexkultur, seltener bei rekombinantem RoxA gelegentlich präparationsabhängig zusätzliche, meist aber nur sehr schwache Signale auf. Dazu zählen beispielsweise Signale bei $g=2,8$ – $2,9$, die nicht eindeutig einem bestimmten Hämzentrum zugeordnet werden können. Sicherlich von Bedeutung sind Signale bei $g=2,62$, $g=2,16$ und $g=1,86$, die bei Anwesenheit von Substrat-ähnlichen Verbindungen auftraten (s. Kap. 3.11.6; Abb. 3.101 – 3.104), in schwacher Ausprägung häufig auch bei RoxA "as isolated" aus Latexkultur (Abb. 3.95, schwarz). Die Zusammengehörigkeit der Signale zu einer rhombischen *low-spin*-Spezies wird am gemeinsamen Auftreten und dem Verlust unter bestimmten Bedingungen deutlich. Die gleichzeitige Änderung dieser Signale, sowie von *high-spin*-Signalen und ggf. eines *low-spin*-Signals bei $g=3,39$ bzw. $g=3,57$ weist auf den Ursprung vom N-terminalen Hämzentrum hin. Da letzteres meist bei pH 7,8, rekombinantes RoxA aber meist bei pH 7,0 betrachtet worden war, könnte auch ein Effekt des pH-Wertes bei deren Entstehung eine Rolle spielen. Zwar zeigten sich diese nicht in jeder Präparation bei RoxA aus Latexkultur bei pH 7,8 und auch nicht in einer solchen von rekombinantem RoxA bei gleichem pH-Wert, jedoch deutet eine frühere Beobachtung auf eine Einflussnahme des pH-Wertes auf diese Signale hin. Das EPR-Spektrum einer Präparation aus Latexkultur wies nach Reinigung über Q-Sepharose (pH 10,5) eine solche rhombische Spezies mit diesen g -Werten auf, nach Hydroxyapatit-Chromatographie (pH 6,8) aber trat diese Spezies nicht auf (unveröffentlichte Beobachtung R. Braaz).

So wurden vielfach rhombische *low-spin*-Signale von gleicher Form und sehr ähnlichen g -Werten wurden als Hydroxy-Fe(III)-Form eines Hämzentrums beschrieben. Diese entsteht nach Deprotonierung eines gebundenen Wassermoleküls bei hohen pH-Werten. Der Protonierungszustand befindet sich in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen der H_2O -Koordination, die gewöhnlich *high-spin* erscheint, und der OH^- -Koordination, die eine rhombische *low-spin*-Spezies mit gut unterscheidbaren g -Werten liefert. Viele Hämproteine zeigen in ihrer "high-pH"-Form (gewöhnlich $> \text{pH } 8$) charakteristische g -Werte mit sehr ähnlicher Signalaufspaltung wie bei RoxA mit $g_z=2,62$, $g_y=2,16$ und $g_x=1,86$. Die Hydroxy-Form von Hämoglobin A weist Signale bei $g_z=2,56$, $g_y=2,18$ und $g_x=1,88$ auf (Peisach *et al.*, 1969; Peisach *et al.*, 1973), diejenige von Myoglobin bei $g_z=2,55$, $g_y=2,17$ und $g_x=1,85$ (z. B. Dickinson & Symons, 1983). Einige eukaryotische Cytochrom *c*-Proteine besitzen eine Imidazol-Fe-OH⁻-Koordination bei hohem pH mit Signalen bei $g_z=2,56$, $g_y=2,18$ und $g_x=1,85$ (Brautigan *et al.*, 1977), die Cytochrom *c* Oxidase bei $g_z=2,59$, $g_y=2,16$ und $g_x=1,86$ (Aasa *et al.*, 1976; van Gelder & Beinert, 1969). Bei der Häm-Oxygenase nimmt mit steigendem pH eine Spezies bei $g_z=2,67$, $g_y=2,21$ und $g_x=1,79$ zu, die His-ligiertes *low-spin*-Häm-Fe mit deprotoniertem H_2O -Molekül an sechster Bindungsposition anzeigen (Takahashi *et al.*, 1994; Sono, 1996). Eine rhombische *low-spin*-Spezies bei $g_z=2,54$, $g_y=2,19$ und $g_x=1,87$ existiert auch im EPR-Spektrum des RoxA-verwandten Proteins MauG bei pH 7,5, welcher die Autoren jedoch keinen Ursprung zuwiesen (Wang *et al.*, 2003). Ähnliche g -Werte ($g=2,56$, 2,24, 1,84) lieferte auch eine Histidin-Thiolat-Koordination bei Metmyoglobin (Gadsby & Thomson, 1990) oder P450 (Tsai *et al.*, 1970), doch befinden sich im RoxA-Molekül keine für eine solche Bindung infrage kommenden Cystein-Reste. Es ist naheliegend, dass die beschriebenen Signale im RoxA-Spektrum eine *low-spin*-His-Fe(III)-OH⁻-Koordination repräsentieren. Dass die Zugabe von Wasserstoffperoxid (s. Kap. 3.11.4) oder der externen Hämliganden Imidazol oder Pyridin (s. Abb. 3.109; 3.108, Kap. 3.11.10) diese Signale vollständig eliminierte, unterstützt die Schlussfolgerung eines koordinierten Hydroxid-Ions, das durch diese Verbindungen verdrängt werden kann.

Im Spektrum von RoxA aus Latexkultur bei pH 10,5 (R. Braaz) waren zusätzlich zu einer His-Fe-OH⁻-Spezies bei $g=2,62$, 2,16 und 1,86 (s. o.) auch weitere Signale bei $g=2,8$, $g=2,19$ und $g \approx 1,7$ mit gleicher Signalform sichtbar, die zu einer weiteren pH-abhängigen *low-spin*-Hämspezies gehören könnten. Sie zeigten sich in einer weiteren Präparation von RoxA aus Latexkultur bei pH 8 zusammen mit der $g=2,62$, 2,16, 1,86 -Spezies erst nach Inkubation unter Sauerstoffausschluss (s. Abb. 3.86) (s. auch Kap. 4.6.1; 4.10) und gingen ebenso nach H_2O_2 -Zugabe vollständig verloren. Da diese Spezies aber bei rekombinantem RoxA unter keinen Versuchsbedingungen auftrat, könnte diese auch mit einer bei RoxA aus Latexkultur auftretenden altersbedingten Inhomogenität zusammenhängen. Ähnliche g -Werte von $g=2,8$, 2,2, 1,71 bzw. $g=2,73$, 2,19, 1,78 wurden bei dem Hämprotein HasA für eine His-Fe-OH⁻-Koordination in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke des H_2O zu einem Tyr-Rest gefunden (Caillet-Saguy *et al.*, 2007).

Bei Hämproteinen kann häufig eine pH-Abhängigkeit von Signalen beobachtet werden, wobei sogar der Austausch eines axialen Liganden eintreten kann. Verschiedene Zustände eines Hämzentrums können im neutralen Bereich auch gleichzeitig in Erscheinung treten und das Gesamtbild komplizieren. Generell nehmen der Protonierungszustand am ^1N eines koordinierten Histidins bzw. Veränderungen in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken Einfluss auf die g -Werte einer Konstellation (Brautigam *et al.*, 1977). Letzteres könnte auch generell beim Auftreten schwacher, von der Norm abweichender EPR-Signale im RoxA-Spektrum aufgrund von Abweichungen des pH-Wertes oder auch der Präparations- oder Versuchsbedingungen eine Rolle spielen. Beispielsweise weist eine solche Histidin-Imidazol $^-$ -Form von Metmyoglobin Signale von $g=2,8, 2,25, 1,67$ auf (Gadsby & Thomson, 1982) oder von $g=2,78, 2,26, 1,72$ im Häm-Modell mit bis-Imidazol-Koordination bei hohem pH-Wert (Peisach *et al.*, 1973). In diesem Zusammenhang bieten sich für künftige EPR-Messungen die Untersuchung der EPR-Spektren von RoxA über einen breiten pH-Bereich an, um die pH-Abhängigkeit der verschiedenen Häm-Spezies zu untersuchen. Der Vergleich der EPR-Signale im sauren und alkalischen Milieu könnte weiteren Aufschluss über die Zuordnung der verschiedenen Spezies geben.

Gegenüber Spektren von RoxA-Präparationen aus Latexkultur zeichnete sich das EPR-Spektrum von rekombinantem RoxA "as isolated" durch eine gute Reproduzierbarkeit mit etwa konstanten Signalintensitäten zueinander aus. Es entspricht im Verlauf am ehesten dem halbreduzierten Zustand von bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen (z. B. Foote *et al.*, 1985). Während dieser im Wesentlichen die Signale des N-terminalen P-Häms (*low-potential*) widerspiegelt, da das C-terminale (*high-potential*) Hämzentrum reduziert vorliegt, wird das Spektrum RoxA "as isolated" vermutlich von Signalen des C-terminalen Häms dominiert. Diesem bis-His-koordinierten Häm werden die *low-spin*-Signale bei $g=3,09$ und $g=2,23$ zugeordnet (s. o.), die einen erheblichen Anteil der gesamten EPR-Intensität ausmachen. Im Spektrum oxidiertes CCP ("as isolated") treten jedoch Signale beider Hämgruppen auf. Dies gibt Anlass zu der Überlegung nach dem Verbleib der Signalintensität des N-terminalen Hämzentrums in RoxA. Da eine Hämbestimmung etwa 1,9 Mol Häm pro Mol RoxA ergab, kann das Fehlen eines Hämzentrums in einer gereinigten RoxA-Population ausgeschlossen werden. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass dieses Hämzentrum bei der Mehrzahl der isolierten RoxA-Moleküle reduziert vorliegt und damit im EPR-Spektrum nicht sichtbar wäre. Einem teilreduzierten Zustand widersprechen aber eindeutig UV-Vis- und CD-Spektren von gereinigtem RoxA. Da auch die Addition von Oxidationsmitteln wie Ferricyanid keine unmittelbare Änderung des Spektrums bewirkte, könnte man von einem oxidierten Zustand der Hämgruppen in RoxA "as isolated" ausgehen. Dennoch deuten Veränderungen mit Oxidationsmitteln auf eine weitere Möglichkeit hin (s. u.; Kap. 4.6.1).

Im Falle eines vollständig oxidierten Zustandes müsste in Betracht gezogen werden, dass sich ein Großteil der Signale beider Hämzentren in der sichtbaren *low-spin*-Spezies bei

$g=3,09$ und $g=2,23$ überlagern könnten. Eine annähernde Übereinstimmung der EPR-Signale beider Hämgruppen setzte aber auch die gleichen koordinierenden Liganden, sowie die gleiche Orientierung der Ligandenebenen zueinander voraus. Im Spektrum von RoxA aus Latexkultur zeigen jedoch intensive Signale bei $g=3,39$ einen davon abweichenden Zustand an (vgl. Abb. 4.3). Eine mögliche bevorzugte Orientierung könnte sich aber gegenüber derjenigen bei rekombinantem RoxA durchaus unterscheiden (s. o.). Im Fall einer Überlagerung der *low-spin*-Signale beider Hämzentren innerhalb der vorherrschenden Signale bei $g=3,09$ und $g=2,23$, müsste deren Intensität abnehmen, wenn *high-spin*-Signale um $g=6$ oder *low-spin*-Signale bei $g=3,57$ bzw. $g=2,62$, $2,16$, $1,86$ neu auftraten bzw. in ihrer Intensität zunahm. Die Beurteilung der quantitativen Intensitätsabnahme dieser Signale ist jedoch im Einzelfall schwierig, da noch andere, in den Versuchsbedingungen oder Messparametern liegende Ursachen infrage kommen. Allein die experimentelle quantitative Bestimmung des in der Signalintensität enthaltenen genauen Hämanteils kann ermitteln, ob die EPR-Signale des N-terminalen Hämzentrums tatsächlich zusammen mit denjenigen des bis-His-kooordinierten C-terminalen Häms auftreten, so dass diese bezüglich des g -Wertes nicht voneinander unterscheidbar wären. Angesichts der auffälligen Zunahme von *high*- und *low-spin*-Signalen bei $g \approx 6$ bzw. $g=3,57$, beispielsweise nach Reduktion und Reoxidation, ohne dass eine nennenswerte Abnahme der $g=3,09$ und $g=2,23$ -Signale stattgefunden hatte (z. B. Abb. 3.81; 3.90; 3.101), erscheint es in vielen Fällen als entstünde diese Signalintensität "aus dem Nichts" (s. Abb. 4.4). Für eine geringfügige Abnahme der Spezies bei $g=3,09 + 2,23$ sind auch Verdünnungsfaktoren und eine generelle Hämzerstörung durch bei der Reoxidation nach Dithionit-Reduktion entstehende O-Radikale (s. Kap. 4.8) zu erwägen. Es drängt sich daher die Überlegung auf, in RoxA "as isolated", vor allem solchem, das zuvor noch keinen Kontakt zu seinem Substrat hatte, könnte eine EPR-unsichtbare, vom Fe(II)-Zustand verschiedene Häm-Konstellation existieren (Kap. 4.6).

4.6 Ist RoxA im Grundzustand oxygeniert?

Um die hohe EPR-Signalintensität zu erklären, die ohne Intensitätsverlust bereits bestehender Signale unter bestimmten Bedingungen neu auftrat, käme eine zuvor bestehende diamagnetische Fe(IV)-Spezies in Betracht. Fe(IV)-Übergangszustände treten häufig bei Oxygenase-Reaktionen und auch während des Reaktionsmechanismus von Peroxidasen in Form einer Fe(IV)=O -Spezies auf, sind jedoch nicht als stabile Zustände beschrieben. Bei dem RoxA-verwandten Protein MauG ist ein über Stunden stabiler Bis-Fe(IV)-Zustand beschrieben, wobei ein bei Hämproteinen bisher einzigartiges Fe(IV)-Zentrum auftritt (Li *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass in MauG eine untypische His-Tyr-Koordination am sechsfach koordinierten C-terminalen Hämzentrum vorliegt, die einen Fe(IV)-Zustand begünstigt ohne die Notwendigkeit eines externen Liganden (Jensen *et al.*, 2010; Tarboush *et*

al., 2010). Dieses Hämzentrum ist jedoch in bakteriellen CCPs His-Met-, in RoxA His-His-koordiniert, wobei der bei MauG-Proteinen konservierte Tyr-Rest (Jensen *et al.*, 2010) fehlt. Dies widerspricht einem möglichen Auftreten eines stabilen Fe(IV)-Zustandes an diesem Hämzentrum. Existiert eine EPR-unsichtbare Hämspezies im Grundzustand von RoxA "as isolated", so müsste diese jedoch wesentlich stabiler sein, da sich die Spektren über Tage nicht signifikant veränderten.

Eine plausiblere Möglichkeit ist die Bindung eines Disauerstoff-Moleküls an einem der Hämzentren in RoxA "as isolated". Eine O₂-Bindung am reduzierten Fe-Ion resultiert in der Entstehung der beiden Resonanzformen Fe(II)-Disauerstoff (Fe²⁺-O₂) oder Fe(III)-Superoxid (Fe³⁺-O₂^{•-}) (Weiss, 1964; Perera *et al.*, 2007). Beide Formen sind diamagnetisch und somit im EPR-Spektrum nicht sichtbar, da der Gesamtspin S=0 ist (Peisach *et al.*, 1968; Sono, 1996). Auch wenn sich nicht aussagen lässt, dass ein vollständiger Elektronentransfer von Fe(II) zu O₂ erfolgt, so beschreibt ein Fe(III)-Superoxo-Komplex diesen Zustand am ehesten (Momenteau & Reed, 1994; Jensen & Ryde, 2004). Das optische Spektrum entspricht folglich einem oxidierten Zustand, was sich mit der Situation bei RoxA deckt (s. Kap. 4.6.1). In diesem Fall würde die in bestimmten Versuchsansätzen erkennbare Intensitätszunahme von EPR-Signalen der N-terminalen Hämgruppe nach Entfernung des O₂ und Oxidation zu Fe(III) auftreten. Am deutlichsten zeigte sich eine Signalzunahme in Experimenten, bei denen isoliertes RoxA vollständig reduziert und anschließend reoxidiert wurde. Nach Reduktion unter Sauerstoffausschluss wäre die Bindestelle von O₂ befreit und eine Reoxidation durch Ferricyanid-Zugabe könnte indirekt durch Aufnahme eines Elektrons vom Fe(II)-Zentrum erfolgen. Die stets nach Reoxidation auftretenden intensiven *high*- und *low-spin*-Signale lassen sich durch ein nunmehr oxidiert vorliegendes Hämzentrum erklären. Diese Befunde wurden auch bei Reoxidation durch Luftsauerstoff erhalten. Falls aber eine Reoxidation an Luft nur durch erneute Bindung von O₂ eintritt, müsste dies – im Widerspruch zu den Beobachtungen im EPR-Spektrum – wiederum zu einem nicht sichtbaren Zustand führen, oder unmittelbar zur Autoxidation nach Dissoziierung zu Fe(III) und O₂^{•-} führen, was aber einer stabilen O₂-Bindung im Grundzustand widerspräche. In diesen entsprechenden Experimenten war jedoch ein Überschuss an Dithionit (≈10x) eingesetzt worden, um eine vollständige Reduktion zu gewährleisten. Bei noch vorhandener Reduktionskraft könnte koordinierter O₂ aber weiter zum Hydroperoxid (-OOH) reduziert werden und zu Fe(III) und H₂O₂ dissoziieren (Avila *et al.*, 2003). Das oxidierte Hämzentrum wäre nun im EPR-Spektrum sichtbar und läge in einem Fe(III)-*high-spin*-Zustand oder aber ferner im *low-spin*-Zustand durch einen Aminosäureliganden koordiniert vor, was die deutlichen *high*- und *low-spin*-Signale auch nach Reoxidation an Luft erklärte (s. Kap. 4.5). Diese Veränderung veranschaulicht Abb. 4.4 (vgl. Abb. 3.81, Kap. 3.11.2). Die nach Reoxidation zusätzlich entstehende Signalintensität (rot) wäre nach diesen Überlegungen dem N-terminalen Hämzentrum zuzuschreiben, von welchem ein Häm-koordiniertes O₂-Molekül entfernt worden ist.

Bei RoxA aus Latexkultur waren die dem N-terminalen Hämzentrum angehörnden Signale ($g \approx 6$ und $g = 3,39$) deutlich stärker als die gewöhnlich nur schwach ausgeprägten, bisweilen fehlenden entsprechenden Signale von rekombinantem RoxA ($g \approx 6$ und $g = 3,57$) (vgl. Abb. 4.3). Unter Annahme einer O_2 -Bindung im Grundzustand von RoxA überrascht dies nicht, da nach Reaktion mit Latex im Expressionsmedium bereits vor der Reinigung Spaltungsreaktionen am entsprechenden Hämzentrum abgelaufen sein mussten bzw. eine altersbedingte Oxidation stattgefunden haben könnte. Mit dieser Vorstellung ließen sich die Unterschiede im EPR-Spektrum zwischen RoxA aus Latexkultur und rekombinantem RoxA (s. Kap. 4.5) zutreffend erklären.

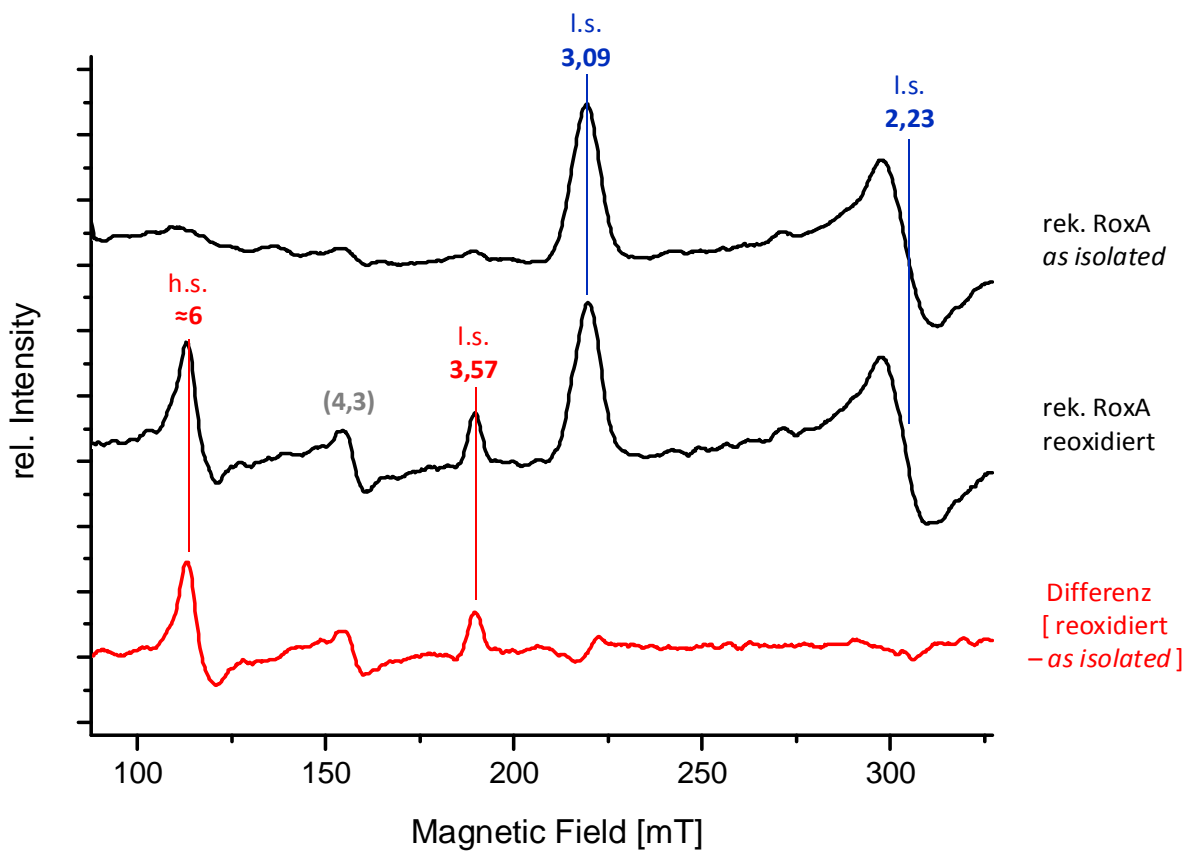


Abb. 4.4: Der Effekt von Reduktion und Reoxidation auf RoxA (vgl. Abb. 3.81). Nach Reduktion von (rek.) RoxA "as isolated" (oben), das hauptsächlich *low-spin* (l.s.)-Signale des C-terminalen Hämzentrums (blau) liefert (vgl. Abb. 4.3), und anschließender Reoxidation mit Ferricyanid oder O_2 (bei Überschuss an Dithionit) entsteht zusätzliche Signalintensität der *high-spin*- (h.s.) und *low-spin*-Signale (mitte), die der N-terminalen Hämgruppe zugeordnet werden (s. Kap. 4.9.1). Dies veranschaulicht das Differenzspektrum von RoxA "as isolated" und dem reoxidierten Zustand (unten).

Eine O_2 -Koordination, die bei einem erheblichen Anteil der RoxA-Moleküle einer Präparation von rekombinantem RoxA vorliegen könnte, beweisen diese Überlegungen noch nicht. Aufklärung über den Verbleib der Signale des N-terminalen Hämzentrums verspricht nur eine exakte quantitative Intensitätsbestimmung der EPR-Signale in den entsprechenden

Versuchsansätzen, die zur Zeit in Zusammenarbeit mit der AG O. Einsle (Freiburg) durchgeführt wird. Weitere Indizien für eine solche Bindung lassen sich jedoch aus UV-Vis-Spektren ableiten (s. Kap. 4.6.1). Einen wichtigen Hinweis darauf gaben auch EPR-Spektren von RoxA bei Anwesenheit externer Hämliganden, insbesondere solche nach Bindung von Pyridin, da diesem ein *low-spin*-Signal bei $g=3,33$ zukommt, das von den Signalen des Spektrums von rekombinantem RoxA unterscheidbar ist (s. Kap. 4.9.4.2).

4.6.1 RoxA unter Sauerstoffausschluss

Die vielfältigen Veränderungen im optischen Spektrum von RoxA nach Sauerstoffentzug überraschten und gaben zunächst Rätsel auf. Es erscheint sinnvoll, die Betrachtung der spektralen Veränderungen auf einen Zeitraum von etwa 24 h bei Raumtemperatur zu beschränken (s. Kap. 3.9.3). Dabei sind im Wesentlichen noch zwei Phänomene zu erklären: zum einen die Zunahme von Signalen der Soret- und Q-Banden, die einer partiellen Reduktion entsprechen (Abb. 3.35; 3.36), zum anderen eine spätere Abnahme dieser anfänglichen Veränderungen bis zu einer etwas verminderten Intensität des ursprünglichen Zustandes im Spektrum von RoxA "as isolated" (Abb. 3.38; 3.39). Die erneute Zunahme von einer Reduktion ähnelnden Signalen nach erfolgter "Abrundung" der Q-Banden erscheint jedoch unplausibel. Die mehrtägige Inkubationsdauer und damit verbundene Möglichkeit geringer Protein-Präzipitation oder gar minimalem, nicht sichtbarem bakteriellem Wachstum während dieser Zeit, wirft Zweifel an einer physiologischen Grundlage bzw. einer tatsächlichen Bedeutung solcher Effekte für den Wirkungsmechanismus von RoxA auf. Diese sollen daher für die folgende Interpretation nicht berücksichtigt werden.

Das Auftreten einer α -Bande bei 549 nm nach O₂-Entzug belegt, dass die Veränderungen an demjenigen Hämzentrum erfolgten, an welchem auch Hämliganden wie Imidazol Effekte hervorriefen. Dieses ist das N-terminale Hämzentrum (s. dazu Kap. 4.9.1). Dabei machte es keinen prinzipiellen Unterschied, ob RoxA unter N₂- oder Argon-Atmosphäre oder nach Anlegen eines Vakuums betrachtet wurde. Allein die Entfernung des O₂ bzw. Verringerung des O₂-Partialdrucks kann für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden. Es ist davon auszugehen, dass die anaerob eintretenden Effekte von der Vollständigkeit der Anaerobisierung abhängen, d. h. Reste von Luftsauerstoff entsprechende Veränderungen verzögerten oder verhinderten. Gelegentlich auftretende Unterschiede zwischen einzelnen Proben unter N₂-Atmosphäre und Vakuum (≈ 1 mbar), wie auch das Ausmaß der Veränderungen, waren nicht reproduzierbar und könnten im Einzelfall schlicht auf den besseren Ausschluss von O₂ nach Entgasung und Begasung mit N₂ zurückgehen (s. Kap. 3.9.3). Die spektralen Veränderungen unter anoxischen Bedingungen waren nach O₂-Zufuhr reversibel und demnach allein auf die Entfernung von Sauerstoff zurückzuführen. Dies wirft erneut die Frage auf, ob im augenscheinlich oxidierten Grundzustand von isoliertem RoxA bereits ein O₂-Molekül an einer freien Koordinationsstelle gebunden sein könnte (s. o.,

4.6). Die Beobachtung eines für einen *high-spin*-Zustand typischen Signals bei etwa 670 nm in manchen Ansätzen unter Vakuum (Abb. 3.36) unterstützt diese Theorie. Demnach könnte durch Erniedrigung des Sauerstoff-Partialdrucks die Bindestelle frei werden und zur Entstehung des *high-spins* führen. Entsprechendes ist für O₂-Transportproteine wie Hämoglobin und z. B. für die oxygenierte Form der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) beschrieben (s. auch Kap. 4.11.2). Nach Evakuierung von O₂ entstanden charakteristische Signale für den reduzierten Zustand der IDO (Hirata *et al.*, 1977). Auch die anfänglichen Veränderungen im RoxA-Spektrum, wie die Zunahme der 549 nm α -Bande (s. Abb. 3.35; 3.36), weisen auf die Reduktion eines Fe-Zentrums bei einem Teil der RoxA-Moleküle hin. Dies kann als weiteres Indiz für eine Bindung von O₂ zumindest bei einem Teil der RoxA-Moleküle von (rekombinantem) RoxA "as isolated" verstanden werden. Um die einer partiellen Reduktion gleichenden Effekte zu erklären, müsste das Ablösen eines gebundenen O₂-Moleküls ein Fe(II)-Zentrum zurücklassen, wenn dieses als O₂ dissoziierte. In vielen Versuchen wurde anschließend eine Abnahme dieser Banden beobachtet, die nur durch Übergang in den oxidierten Zustand der entsprechenden Zentren zu erklären ist. Ob eine bestimmte Reaktion dabei eine Rolle spielt, ist unklar, doch könnte angesichts der langsamen Kinetik dieser Veränderungen eher eine unspezifische Elektronenverschiebung ausgehend vom Hämzentrum erfolgen. Auch eine spontane Autoxidation zu Fe(III) nach Dissoziation von Superoxid kommt in Betracht (Mouget & Reed, 1994).

Auch mit Pyrogallol, sowie H₂O₂ und Ferricyanid waren sehr ähnliche spektrale Veränderungen der Q-Banden eingetreten (s. Kap. 3.9.2). Da Pyrogallol jedoch ein Reduktionsmittel, FeCy und H₂O₂ Oxidationsmittel sind, liegt der ähnlichen Wirkung auf das optische Spektrum eine von diesen Eigenschaften verschiedene Ursache zugrunde. Entsprechend der Ähnlichkeit zu Spektren nach O₂-Entzug könnte die Gemeinsamkeit in der Entfernung eines Häm-kordinierten O₂-Moleküls liegen, was durch Oxidationsmittel aber auch Pyrogallol bewirkt werden kann. Der beschriebene Fe(III)-Zustand zeichnete sich durch eine geringe Abnahme der Absorption um 539–540 nm und 572–573 nm bzw. einer "Abrundung" der Q-Banden aus (s. Abb. 3.39; Abb. 3.72; vgl. Abb. 3.40), ohne dass zuvor ein nennenswerter teilreduktiver Effekt aufgetreten wäre. Mit Pyrogallol wurde dieser stets deutlich schneller erreicht als durch Exposition unter O₂-freier Atmosphäre alleine. Da eine Häm-O₂-Koordination am ehesten einem Fe(III)-O₂^{•-}-Zustand entspricht, könnte diese Beobachtung durch die Fähigkeit des Pyrogallol-Rings erklärt werden, effektiv Superoxidradikale abzufangen (Furuno *et al.*, 2002), wonach Fe(III) zurückbleiben würde. Die Autoxidation von Pyrogallol bzw. der O₂-Entzug aus einer Lösung erfolgt zwar bei neutralem pH-Wert nur langsam, dessen Zugang zur entsprechenden Hämbindestelle ist angesichts der Effekte größenähnlicher N-heterozyklischer Verbindungen vorstellbar, eine direkte Bindung aber eher unwahrscheinlich. Bei langandauernder Inkubation unter Sauerstoffausschluss spielt möglicherweise eine geringfügige Präzipitation des RoxA bei der

zu beobachtenden generellen Absorptionsabnahme eine Rolle. Bei Anwesenheit von Pyrogallol und O_2 dagegen ist ein Häm-Absorptionsverlust durch Schädigung des Porphyrins infolge der Autoxidation von Pyrogallol und dabei entstehender reaktiver Sauerstoffspezies in ähnlicher Weise wie durch H_2O_2 (s. Kap. 4.7) anzunehmen. Unter anaeroben Bedingungen ergibt sich ein vergleichbares Maß der Veränderungen mit und ohne Pyrogallol (s. Abb. 3.40; vgl. Abb. 3.38, Abb. 3.39).

Auch infolge der Reoxidation mit Ferricyanid ergaben sich nach einer vorherigen Reduktion vergleichbare Effekte an den Q-Banden (s. Abb. 3.34 b; 3.43, grau) wie sie mit Pyrogallol oder häufig bereits allein unter Sauerstoffausschluss beobachtet werden. Die Intensität der Soret-Bande verminderte sich hingegen nicht. Eine Hämschädigung ist daher bei diesem Effekt nicht beteiligt. Diese Wirkung war auch nach Bindung von Hämliganden wie Imidazol oder Pyridin und anschließender FeCy-Zugabe unter aeroben wie anaeroben Bedingungen erkennbar (s. Abb. 3.57, 3.58, Kap. 3.9.6.4; s. dazu Kap. 4.9.4.2). Die Zugabe von FeCy im Überschuss zu RoxA "as isolated" hatte allerdings erst nach langem Kontakt (ÜN) zum gleichen Effekt auf das RoxA-Spektrum geführt (s. Kap. 3.9.2). FeCy kann das Hämzentrum im reduzierten Zustand, d. h. nach Auflösung einer in RoxA "as isolated" bestehenden Koordination, offenbar deutlich rascher oxidieren. Man muss damit von einem formellen Fe(III)-Zustand am N-terminalen Hämzentrum in RoxA "as isolated" ausgehen, der nur von einer $Fe(III)-O_2^{\bullet-}$ -Koordination stammen könnte, sollte sich die Nicht-Sichtbarkeit der EPR-Signale des N-terminalen Häms bestätigen. Da Ferricyanid theoretisch aber in der Lage ist, einen $Fe(III)-O_2^{\bullet-}$ -Zustand zu oxidieren und die Fe–O-Bindung unter Freisetzung von O_2 aufzulösen (Weiss, 1964), spricht die langsame Reaktion im Grundzustand von RoxA gegen eine direkte Anwesenheit von FeCy in der Häm-Cavity, im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid, das durch Verdrängung des gebundenen O_2 direkt mit dem Häm-Fe reagieren kann. So könnte die Oxidation eines $Fe(III)-O_2^{\bullet-}$ -Zustandes durch Ferricyanid aufgrund der formell weniger negativen Ladung am Fe-Ion erschwert sein, d. h. angesichts dessen langsamer Reaktion offenbar weniger bereitwillig als von einem unligierten Fe(II)-Zentrum. Ein Hämliganden-kordiniertes Fe(II)-Zentrum könnte ein Elektron durch indirekten Elektronentransfer unter Beibehaltung der Liganden-Koordination abgeben (s. dazu Kap. 4.9.4.2).

Diese Überlegungen stützen, dass die unter Sauerstoffausschluss bzw. mit Oxidationsmitteln eintretenden Effekte auf die Entfernung eines O_2 -Moleküls von der distalen Bindestelle des N-terminalen Hämzentrums zurückgehen könnten, zumal nur eines der Hämzentren bei vermutlich nur einem Teil der Moleküle betroffen wäre. Die etwaige Übereinstimmung der optischen Banden des Fe(III)- und des $Fe(III)-O_2^{\bullet-}$ -Zustands in RoxA wäre eine notwendige Voraussetzung, um diese Möglichkeit in Betracht ziehen zu können. Aus einem nach O_2 -Bindung formell als Fe(III) vorliegenden Häm ergibt sich im UV-Vis-Spektrum ein dem oxidierten Zustand entsprechendes, ähnliches Spektrum (z. B. Wittenberg *et al.*, 1970), was im Einklang zu dem Spektrum von RoxA "as isolated" steht. Das Spektrum

von oxygenierten Hämproteinen wird im Vis-Bereich von einer deutlichen α -Bande um 575 nm und einer β -Bande um 540 nm bestimmt (Momenteau & Reed, 1994; Avila *et al.*, 2003). Bei Hämoglobin wird das Spektrum der Oxy-Form als *low-spin*-Fe(III)-ähnlich beschrieben, es unterscheidet sich jedoch von dieser durch eine stärkere Intensität der Q-Banden (Wittenberg *et al.*, 1970). Dies erinnert an die Beobachtungen mit RoxA, bei dem das N-terminale Hämzentrum im oxygenierten Zustand ähnliche Signale bei 539–540 und 572–573 nm liefern würde (s. Abb. 3.40, 3.41). Diese Werte unterstützen einen Übergang von einer Fe(II)-O₂- zu einer desoxy-Fe(III)-Form in RoxA "as isolated" nach anaerober Inkubation mit Pyrogallol oder der Reaktion mit Oxidationsmitteln nach einer Reduktion. Dieser Zustand am N-terminalen Häm könnte der geringeren Intensität der Fe(III)-Form von Desoxyhämoglobin entsprechen. O₂-gebundenes Fe nimmt einen *low-spin*-Zustand ein, wobei das Fe-Ion stärker zentriert in der Hämebene liegt (Momenteau & Reed, 1994). Dass in einem solchen die Intensität der Q-Banden stärker als im *high-spin*-Zustand ist (Brill & Williams, 1961; vgl. Kap. 4.9.4.1), könnte auch eine Erklärung für die geringere Intensität der Q-Banden nach Entfernung des Disauerstoffs vom N-terminalen Hämzentrum anbieten. Die damit verbundene Absorptionsabnahme bei 539–540 und 572–573 nm gegenüber (rekombinantem) RoxA "as isolated" entspreche im Umkehrschluss den Maxima im Spektrum des N-terminalen Hämzentrums im "as isolated"-Zustand. Das Differenzspektrum von isoliertem RoxA und der mutmaßlichen Fe(III)-(Desoxy-)Form könnte somit (näherungsweise) das Spektrum der oxygenierten Form des N-terminalen Hämzentrums in RoxA angeben (vgl. Abb. 3.41). Dieses ähnelt im Bereich der Q-Banden mit einer gut unterscheidbaren α - und β -Bande tatsächlich demjenigen eines O₂-gebundenen Hämproteins wie Hämoglobin (z. B. Wittenberg *et al.*, 1970, Fig. 2), Myoglobin (Yamazaki *et al.*, 1964; Fig. 2), beispielsweise auch dem O₂-Addukt der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (Hirata *et al.*, 1977; Fig. 1) oder der Tryptophan-Dioxygenase in Gegenwart des Substrates L-Trp (Batabyal & Yeh, 2009; Fig. 6) (vgl. Abb. 3.40). Im Spektrum oxidiertes CCP tritt eine Schulter bei 572 nm nicht in der Deutlichkeit wie im RoxA-Spektrum auf (vgl. z. B. Fig. 1 in Rönneberg & Ellfolk, 1979), dafür aber ein *high-spin*-Signal bei 630 nm, das im Falle einer O₂-Bindung nicht zu erwarten wäre und bei RoxA fehlte.

Eine mögliche Veränderung der Soret-Bande in diesem Zustand ist aufgrund der starken Absorption zugegebener Substanzen in diesem Bereich schwieriger zu ermitteln, doch gibt es Anhaltspunkte für eine geringe relative Absorptionszunahme bei 416 nm (z. B. Abb. 3.39; Abb. 3.71 b; 3.72 a; Abb. 3.37). Dass ein solcher Zustand keine Reduktion darstellt, veranschaulichten auch CD-Spektren mit H₂O₂ und Pyrogallol (vgl. Abb. 3.70). Bei diesen fehlte ein für eine (partielle) Reduktion typisches CD-Signal, übereinstimmend mit entsprechend fehlenden Veränderungen der Q-Banden im UV-Vis-Spektrum. Die leichte Abnahme der Q-Banden um 539–540 nm und 572–573 nm und Zunahme bei 416 nm könnte somit eine Form von RoxA nach Entfernung gebundenen Disauerstoffs beschreiben.

Diese geschilderten Beobachtungen der UV-Vis- und EPR-Spektroskopie liefern deutliche Hinweise auf eine O₂-Koordination in RoxA "as isolated" und bieten unter dieser Annahme eine Erklärungsmöglichkeit für bisher unverstandene Resultate der UV-Vis-, vor allem aber der EPR-Spektroskopie (s. o.). Würde bei quantitativen Signalbestimmungen die zu erwartende Signalintensität eines Hämzentrums weitgehend fehlen, wäre die plausibelste Erklärung eine diamagnetische, stabile O₂-Koordination der N-terminalen Hämgruppe.

Versuche, die Beobachtungen aus dem optischen Spektrum analog mit EPR-Spektroskopie zu observieren, gelangen nicht. Es traten im betrachteten Zeitraum keine signifikanten Veränderungen zwischen RoxA unter Vakuum, N₂- oder Argon-Atmosphäre ein. Diese Experimente lassen sich aber nicht direkt mit den Ansätzen der UV-Vis-Spektroskopie vergleichen aufgrund möglicherweise unzureichender Inkubationsdauer und der deutlich niedrigeren RoxA-Konzentration. Da im optischen Spektrum aber zunächst häufig eine Reduktion sichtbar war und sich der beschriebene Fe(III)-Zustand erst nach längerer Inkubation einstellte, ließe sich nachvollziehen, dass im EPR-Spektrum keine unmittelbaren Änderungen nach Sauerstoffentfernung auftraten. Denn eine Fe(II)-O₂ ↔ Fe(III)-O₂^{•-}-Koordination wäre ebenso wie ein Fe(II)-Zustand nach Dissoziation von O₂, wie ihn die Zunahme der 549 nm α-Bande nach mehrstündiger Inkubation unter Sauerstoffausschluss anzeigt, diamagnetisch. Mit RoxA aus Latexkultur aber zeigte sich eine schlüssige Veränderung im Spektrum. Erst nach längerer Inkubation (ÜN) unter Sauerstoffausschluss (Argon) war u. a. eine *low-spin*-Spezies bei g=2,62, 2,16 und 1,86 entstanden (s. Abb. 3.86). Sie stimmt mit einer His-Fe-OH⁻-Koordination überein, die nach O₂-Entfernung von der Bindungsstelle und anschließender Bindung eines H₂O-Moleküls entstehen würde (vgl. Kap. 4.5). Auffällig war die (raschere) Entstehung der gleichen Spezies in Gegenwart des Reduktionsmittels NADH/(PMS). Da diese Signale aber oxidierte Zustände beschreiben, könnte in gleicher Weise wie dies nach Reduktion mit Dithionit im Überschuss während der Reoxidation durch Luftsauerstoff geschieht (vgl. Kap. 4.6), auch NADH/(PMS) letztlich zur Entfernung des O₂ und einem Hämzentrum im Fe(III)-Hämzustand führen. Gestützt werden diese Annahmen von der Tatsache, dass die (anaerobe) Addition von Wasserstoffperoxid diese neu entstandenen *low-spin*-Spezies vollständig eliminieren konnte. Denn andere *low-spin*-Koordinationszustände, die auf einen Aminosäure-Liganden an sechster Bindungsposition zurückgehen, waren davon nicht betroffen. Die Ergebnisse zeigen, dass die sechste Bindungsstelle für diese Hämliganden und auch für H₂O₂ leicht zugänglich ist, indem eine Bindung externer Hämliganden am entsprechenden Hämzentrum sämtlicher RoxA-Moleküle einer Lösung als wahrscheinlich anzusehen ist (vgl. Kap. 4.9.2.1). Dies wäre bei Koordination eines starken Aminosäureliganden wie Histidin im Grundzustand kaum anzunehmen, jedoch bei Bindung eines O₂-Moleküls denkbar. Die O₂-Koordination hat im Gegensatz zu einer H₂O-Koordination eher *low-spin*-Charakter (Mometeau & Reed, 1994) und ist EPR-unsichtbar. Sie deckt sich damit gut mit den erhaltenen Daten.

4.7 Die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit RoxA

Die im Vorigen erläuterten Ergebnisse weisen auf eine direkte Interaktion von Wasserstoffperoxid mit dem N-terminalen Hämzentrum hin. Trotz einer auffallenden Ähnlichkeit zu bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen zeigt RoxA keine Peroxidaseaktivität. Das von Peroxidasen als Elektronenakzeptor gewöhnlich verwendete Wasserstoffperoxid erwies sich als starker Inhibitor der Latexspaltung (s. Kap. 3.6.1). Es wird also für die Reaktion von RoxA mit Latex nicht nur nicht benötigt, sondern verhindert diese sogar effektiv. Dass Katalase eine vollständige Inhibierung durch H_2O_2 aufheben kann, beweist zudem, dass dieses bei der Latexspaltung keine Rolle spielt. Zusammen mit der fehlenden Aktivität in Peroxidase-Assays (Kap. 3.6.4) widerlegten diese RoxA-Aktivitätstests, dass die Latexspaltung mittels eines Peroxidase-Mechanismus erfolgen könnte. Der starke Effekt von H_2O_2 auf die Enzymaktivität gibt allerdings zu bedenken, dass dieses mit mindestens einem Hämzentrum in RoxA reagiert. Während bei Peroxidasen zur Bindung von H_2O_2 am N-terminalen P-Häm zunächst eine Konformationsänderung nach Reduktion des C-terminalen Hämzentrums (E-Häm) erfolgen muss, finden sich viele Hinweise auf eine direkte Reaktion mit dem N-terminalen Hämzentrum bereits in RoxA "as isolated". Im Unterschied zur Reaktion mit Luftsauerstoff ist eine Bindung von H_2O_2 prinzipiell auch an der oxidierten Form des Häms möglich.

Auf eine Bindung von H_2O_2 lässt beispielsweise bei CCPs eine Absorptionsabnahme und eine leichte Rotverschiebung des Soret-Maximums im optischen Spektrum schließen (z. B. Arciero & Hooper, 1994). Die Spektren anderer Hämproteine nach Reaktion mit H_2O_2 weisen ebenso einen geringeren Extinktionskoeffizienten und einen etwas rotverschobenen Soret-Peak auf, was beispielsweise mit Cytochrom *c* Oxidase beobachtet wurde (Bickar *et al.*, 1982), mit Formen der *Anabaena*-Peroxidase (Ogola *et al.*, 2010) oder mit der Oxo-Ferryl-Spezies bei Myoglobin (Hayashi, 1999). Dieser Effekt einer Absorptionsabnahme und Rotverschiebung trat mit RoxA ebenfalls ein (vgl. Abb. 3.72, Kap. 3.10.3), jedoch erst mit einem Überschuss an H_2O_2 (s. Kap. 3.9.2).

Mit MauG wurde zunächst auch eine Abnahme der Soret-Absorption und Rotverschiebung von 405 nach 407 nm unmittelbar nach Zugabe (ms) festgestellt, jedoch kehrte das Spektrum im Folgenden wieder zum Ausgangszustand der oxidierten Form zurück (Li *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2009). Entsprechend nahm im EPR-Spektrum eine *low-spin*-Häm-Spezies bei $g=2,54$, 2,19 und 1,87 (s. Kap. 4.5) deutlich ab, danach aber wieder zu (Li *et al.*, 2008). Im Falle von RoxA zeichnete sich ein anderes Bild ab. Die Zugabe von H_2O_2 ($\geq 100 \mu\text{M}$) zu oxidiertem RoxA "as isolated" hatte eine Abnahme der optischen Absorption und eine gelegentlich sichtbare Verbreiterung (Schulter bei 416 nm) des Soret-Signals zur Folge, sowie die Umkehr der spektralen Veränderungen durch Häm-Liganden wie Imidazol. Eine Verdrängung eines schwachen Liganden wie $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ durch H_2O_2 oder andere Sauerstoffspezies ist plausibel,

eine mögliche Wirkungsweise von H_2O_2 und anderen Oxidationsmitteln auf die Bindung von Hämliganden wird in Kap. 4.9.4 diskutiert.

Im EPR-Spektrum führte die Zugabe von H_2O_2 zu einer vollständigen Abnahme einer vermutlich OH^- -koordinierten *low-spin*-Spezies des N-terminalen Häms bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ (Abb. 3.85; s. auch Kap. 4.5; 4.8), die derjenigen von MauG ähnelt (s. o.). Im Gegensatz zur Situation in MauG, blieben diese Änderungen, wie auch die Absorptionsabnahme im optischen Spektrum im Folgenden bestehen. Bei RoxA hat dies die Inhibierung der Latexspaltung zur Folge, MauG jedoch kann, neben O_2 mit Reduktionsäquivalenten, auch H_2O_2 im Bis-Fe(III)-Zustand zur (Mono-)Oxygenierung eines Trp-Restes aus MADH nutzen, benötigt jedoch für diese nur noch ein Sauerstoffatom. Bei der Reaktion von RoxA mit H_2O_2 entstehende Zustände können offenbar nicht zur Reaktion mit Poly(*cis*-1,4-isopren) genutzt werden (s. Kap. 4.11.3) und führen möglicherweise zu einer oxidativen Schädigung des Hämzentrums (s. u.).

Da die EPR-Signale des zweiten, C-terminalen Hämzentrums bei $g=3,09$, $2,23$ durch eine H_2O_2 -Oxidation nicht betroffen waren, hat H_2O_2 keinen Zugang zu diesem Hämzentrum, das auch während der Latex-Spaltung offenbar sechsfach koordiniert bleibt (s. auch Kap. 4.8; 4.11.4). Da H_2O_2 die Latexspaltung hemmt, kann umgekehrt das reagierende, N-terminale Hämzentrum als essentiell für die Latexspaltung angesehen werden. Damit liefern diese Beobachtungen einen weiteren Beweis für eine freie Bindestelle am N-terminalen Häm und somit auf den Ablauf der Spaltungsreaktion an diesem Zentrum. Die in Kap. 4.6 aufgezeigte Möglichkeit einer O_2 -Bindung am N-terminalen Hämzentrum im Grundzustand von RoxA könnte eine Bindung von H_2O_2 ermöglichen. Die "Abrundung" der Q-Banden infolge eines geringen Absorptionsverlusts bei etwa 539 nm und 572 nm deckt sich mit RoxA-Spektren nach Inkubation mit Ferricyanid, sowie nach Sauerstoffentfernung bzw. Inkubation mit Pyrogallol und könnte als Übergang von einer Fe(II)- O_2 - in eine Fe(III)-Form interpretiert werden (s. Kap. 4.6.1).

Auf einen Beitrag zur Zerstörung des Porphyrins deuten die im optischen Spektrum beobachtete Stärke der Häm-Absorptionsabnahme mit höherer Peroxid-Konzentration (1 mM) (s. Abb. 3.70, Kap. 3.10.3; Abb. 3.34 a, Kap. 3.9.2), sowie das Auftreten verstärkter Signale für unspezifisch gebundenes Fe(III) bei $g=4,3$ im EPR-Spektrum (s. Abb. 3.84, 3.85, Kap. 3.11.3) hin. Unterstützt wird dies dadurch, dass eine annähernd vollständige Hemmung zwar mit geringen absoluten H_2O_2 -Konzentrationen, aber erst einem mindestens 100fachen Überschuss zu RoxA auftrat (vgl. Tab. 3.2, Kap. 3.6.3). In stöchiometrischer Menge ist nur ein geringer Aktivitätsverlust ($\approx 10\%$) und keine erkennbaren Veränderungen im UV-Vis-Spektrum festzustellen. Dass sich die Wirkung von 1 mM H_2O_2 aber (zunächst) auf das Porphyrin-System beschränkte, zeigten CD-Spektren anhand eines nahezu unveränderten relativen Spektrums im Nah-UV-Bereich (s. Abb. 3.70) und die unveränderte Proteinabsorption bei 280 nm (s. Abb. 3.34; 3.70). Der Hämabbau durch die Häm-Oxygenase

verläuft durch autokatalytische Hydroxylierung des Porphyrinrings über eine Fe(III)-OOH-Spezies, nicht über eine Oxo-Ferryl-Zwischenstufe. Die Hydroperoxo-Spezies folgt aus der Reaktion von Fe(III) mit H_2O_2 oder mit O_2 und zwei Reduktionsäquivalenten, wobei zunächst α -meso-Hydroxyhäm und in der Folge Verdohäm und Biliverdin entstehen (z. B. Wilks & de Ortiz Montellano, 1993; Sono *et al.*, 1996; Kikuchi *et al.*, 2005). Diese zeichnen sich durch Banden um 670 nm aus. Da bei RoxA solche Banden bei der Reaktion von H_2O_2 bisher nicht beobachtet wurden, ist eine unspezifische Hämschädigung zu vermuten.

Hinweise auf eine einsetzende Schädigung von Hämzentren durch Autoxidationsprozesse bzw. von H_2O_2 stammenden Sauerstoff-Radikalen sind für Hämproteine vielfach dokumentiert (z. B. Bickar *et al.*, 1982; Rice *et al.*, 1983; Roach *et al.*, 2000; Nagababu und Rifkind 2000; Nagababu *et al.*, 2002). Ein Ausbleichen des Häm-Spektrums wurde beispielsweise auch mit dem O_2 -bindenden Myoglobin beobachtet. Eine Minute nach Zugabe von 10 mM H_2O_2 zeigte sich eine starke Abnahme der Hämabsorption, die wahrscheinlich auf eine Zerstörung des Hämzentrums nach Oxo-Ferryl- oder Hydroxyl-Radikal vermittelter Hämoxidation zurückging. Damit war auch eine leichte Rotverschiebung des Maximums verbunden (Roach *et al.*, 2000). Der Vergleich zu Hämoglobin veranschaulicht die Möglichkeiten der Reaktion von H_2O_2 mit dem N-terminalen Hämzentrum in RoxA. Aus der Reaktion von einem Fe(II)- O_2 -Zentrum, ebenso aus Reaktion von Desoxy-Fe(II) mit H_2O_2 entsteht eine Fe(IV)=O -Spezies ("Compound II"). Die Bildung einer Fe(IV)=O Zwischenstufe wäre in RoxA an O_2 -gebundenem Fe(II) möglich. Diese Ferryl-Spezies kann mit einem weiteren H_2O_2 -Molekül zu Fe(III) und einem $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikal und/oder $\bullet\text{OOH}$ reagieren, das die Hämgruppe angreift und zu deren Zerstörung führen kann. Ausgangspunkt ist dabei die Bildung einer rhombischen Fe(III)-*high-spin*-Spezies bei $g=4,3$, die auch bei RoxA beobachtet wurde und letztendlich zur Freisetzung des Eisens und dem Porphyrin-Abbau führt (Nagababu & Rifkind, 2000; Nagababu *et al.*, 2002). Die Reaktion des entstandenen Fe(III) mit einem weiteren H_2O_2 -Molekül bildet $\bullet^+\text{Fe(IV)=O}$ mit einem Porphyrin- oder Proteinradikal ("Compound I"), welches somit stets bei der Reaktion von Hämoglobin mit Wasserstoffperoxid entsteht. Im Rahmen der Katalase-Aktivität von Hämoglobin wird aus dieser $\bullet^+\text{Fe(IV)=O}$ -Spezies durch Reaktion mit H_2O_2 Fe(III) und O_2 regeneriert (Nagababu & Rifkind, 2000; Rifkind *et al.*, 2004). Die Katalase-Aktivität umfasst eine Zwei-Elektronen-Reduktion von $\bullet^+\text{Fe(IV)=O}$ zu Fe(III) und O_2 . Bei HRP ist bei H_2O_2 -Konzentrationen unterhalb 1 mM eine reversible Inaktivierung vorherrschend durch eine Katalase-Aktivität bzw. der Bildung einer relativ stabilen Fe(III)- $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Verbindung aus Fe(IV)=O, mit höheren H_2O_2 -Mengen dominiert eine irreversible Zerstörung des Hämzentrums (Baynton *et al.*, 1994). Gegen eine Katalase-Aktivität von RoxA spricht jedoch die Hemmung mit geringen H_2O_2 -Mengen und die Beobachtung, dass ein Häm-Absorptionsverlust (bei RT) mit einem moderaten Überschuss (10–100 μM) erst nach etwa halbstündiger Inkubation sichtbar wurde, daher zu diesem Zeitpunkt noch immer ein Überschuss an H_2O_2 vorliegen musste (s. auch Kap. 4.11.3).

Ausgehend von der aus Fe(III) entstehenden "Compound I" (s. o.) wird bei der Reaktion mit H₂O₂ und vielen Hämenzymen mit nur einem Häm oder elektrochemisch getrennten Zentren bei Abwesenheit des Substrates oder hohen H₂O₂-Konzentrationen eine Selbstinaktivierung beobachtet (Hiner, 2002; Arnao *et al.*, 1990; Baynton *et al.*, 1994). Ob bei der Reaktion von RoxA mit H₂O₂ ein solches "Compound I" entsteht, ist nicht bekannt. Die Ausgangssituation ist am ehesten mit der *N. europaea* CCP zu vergleichen, die auch im oxidierten Fe(III)/Fe(III)-Zustand H₂O₂ binden kann. Denn auch eine anfängliche Fe(II)-O₂-Verbindung in RoxA würde mit H₂O₂ zu Fe(III) reagieren (s. o.). In ähnlicher Weise wie bei eukaryotischen Peroxidasen unterstützen spektroskopische Daten bei der Reaktion von oxidiertem *N. europaea* CCP mit H₂O₂ die Entstehung eines ⁺Fe(IV)=O -Porphyrin-Radikals ("Compound I") (Arciero & Hooper, 1994) (vgl. Kap. 4.11.4). Hier ermöglichen positiv geladene Seitenreste in der Nähe der Häm-Propionat-Gruppen die Stabilisierung des Übergangszustands eines ⁺Fe(IV)=O Porphyrin- oder Tryptophan- π -Kation-Radikals durch Abschirmung der negativen Ladung der Propionat-Gruppen (Guallar, 2003, Barrows & Poulos, 2005). Bei der *N. europaea* CCP interagieren Lys₂₂₉ bzw. Arg₈₅ mit je einer Propionat-Gruppe des P-Häms. Auch bei RoxA existieren solche Ionenbindungen der Propionate des katalytischen Hämzentrums, des einen zu Arg₂₉₄ und Lys₂₉₇, des anderen Propionats zu Arg₄₃₂. Dennoch stellt die Abwesenheit eines als Säure-Base-Katalysator fungierenden Aminosäure-Restes in der Häm-Cavity die H₂O-Abspaltung und Bildung des ⁺Fe(IV)=O -Zustandes im Zuge der Reaktion von oxidiertem RoxA mit H₂O₂ in Frage (s. dazu auch Kap. 4.11.3; 4.11.4). Das *N. europaea* CCP-Spektrum zeigt mit stöchiometrischer H₂O₂-Menge eine Soret-Absorptionsabnahme, die der Bildung des oben genannten "Compound I" zugeschrieben wird (Arciero & Hooper, 1994). Bei RoxA jedoch tritt mit gleichen H₂O₂-Mengen kein erkennbarer Effekt ein. Die Auswirkungen der H₂O₂-Bindung auf das optische Spektrum der meisten bakteriellen CCPs lassen sich nicht direkt mit denjenigen auf das RoxA-Spektrum vergleichen, da dieses vermutlich am ehesten einen Fe(II)-O₂/Fe(III)-Zustand widerspiegelt (s. Kap. 4.6), bei den meisten CCPs aber H₂O₂ erst in der halbreduzierten Fe(III)/Fe(II)-Form am oxidierten N-terminalen (*low-potential*, Fe(III)-) Hämzentrum bindet (s. Kap. 1.5.2; vgl. Kap. 4.11.3). Diese Reaktion ist mit stöchiometrischer H₂O₂-Menge bei der *M. capsulatus* CCP mit einer deutlichen Absorptionsabnahme und Rotverschiebung der gesamten Soret-Bande gegenüber dem oxidierten Spektrum verbunden (Zahn *et al.*, 1997).

Für MauG wurde gezeigt, dass der Verlust von enzymatischer Aktivität durch wiederholte Zugabe eines Äquivalents an H₂O₂ bei Abwesenheit des Substrates ohne eine Häm-Inaktivierung auftreten kann, indem zuerst eine kritische aromatische Aminosäure oxidiert wird und erst nach vollständigem Verlust der katalytischen Aktivität eine Schädigung der Hämgruppe eintritt. Zudem kann es zur Bildung von MauG-Aggregaten durch kovalente Quervernetzung kommen (Shin *et al.*, 2009). Ob diese Möglichkeiten auch für RoxA in

Betracht kommen, bedarf einer eingehenderen Untersuchung der Restaktivitäten in Bezug zur Häm-Absorptionsabnahme (s. u.).

Welche der Mechanismen zur Verminderung eines Hämabbaus durch oxidative Schädigung im RoxA-Molekül zum Tragen kommen bzw. ob das zweite Hämzentrum zur Vermeidung der Entstehung von Porphyrinradikalen eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Da erst ein mehr als 10facher Überschuss zur RoxA-Menge eine deutliche Hemmung der Latexspaltung erzeugt, könnten derartige Mechanismen existieren, wonach die Hemmung im Überschuss an H_2O_2 auf eine Hämschädigung analog zum Häm-Absorptionsverlust zurückgeführt werden müsste. In jedem Fall ist eine Schädigung des Porphyrins durch reaktive Sauerstoff-Spezies anzunehmen, zumal ein neu entstandenes Radikalsignal bei $g=2,005$ im EPR-Spektrum auf ein $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikal (Rifkind *et al.*, 2004) hinweist (s. u., Kap. 4.8), aber auch ein Porphyrinradikal (Matera *et al.*, 1996; Sono *et al.*, 1996) darstellen könnte. Dieses und ein rhombisches *high-spin*-Signal bei $g=4,3$ traten mit höherer H_2O_2 -Konzentration verstärkt auf und unterstützen somit eine Schädigung am N-terminalen Hämzentrum infolge entstehender Radikale.

Eine dem Aktivitätstest vorhergehende Inkubation von RoxA (Latexkultur) mit H_2O_2 hatte nicht zu einer geringeren ODTD-Produktion im anschließenden Test geführt (s. Tab. 3.3). Es hatte sich dabei bis zu einer H_2O_2 -Konzentration von 1 mM allein die im Testansatz vorliegende Konzentration als entscheidend für die produzierte ODTD-Menge erwiesen. Dies würde aber der Annahme widersprechen, dass die mit H_2O_2 beobachtete Hemmung der Latexspaltung allein auf die Schädigung eines Häm-Fe-Zentrums in RoxA zurückgehen könnte, und darauf hinweisen, dass H_2O_2 seine hemmende Wirkung zumindest in geringen Konzentrationen eher durch eine Störung der Latex-Spaltungsreaktion als durch eine Zerstörung des Fe-Zentrums ausüben könnte. Bedacht werden muss aber, dass diese Befunde mit RoxA aus *Latexkultur* erhalten wurden, bei welchem EPR-Spektren einen höheren Anteil des reagierenden N-terminalen Hämzentrums in einer vermutlich stabilen Aminosäure-Koordination anzeigten ($g=3,39$) als bei *rekombinantem* RoxA ($g=3,57$) (s. Kap. 4.5). Eine solche Spezies könnte u. U. nicht mit H_2O_2 reagieren, jedoch in Gegenwart von Latex zur Kautschukspaltung fähig sein. Die festgestellte Restaktivität nach einer dem Test vorhergehenden Inkubation mit H_2O_2 könnte somit teilweise auf Aminosäure-koordinierte Fe(III)-Spezies zurückgehen, die möglicherweise erst in Gegenwart von Latex gelöst würde. Denn nach Inkubation von RoxA aus Latexkultur mit H_2O_2 (10 mM) war ein $g=3,39$ -Signal noch vorhanden (s. Abb. 3.85). Daher ist ein abweichendes Ergebnis mit rekombinantem RoxA vorstellbar, wenn nicht wahrscheinlich. Der Aktivitätsverlust sollte sich unabhängig von der Anwesenheit von Latex einstellen und sich Aktivitätsverluste vor und während der Inkubation mit Latex aufaddieren. Denn der Blick auf die anhand der klaren Absorptionsabnahme erkennbare Schädigung des katalytischen Hämzentrums mit Konzentrationen über etwa 100 μM H_2O_2 verheißt einen zusätzlichen Aktivitätsverlust bei

rekombinantem RoxA durch eine dem Test vorhergehende Inkubation. Eine abschließende Betrachtung bedarf einer näheren Untersuchung der Abhängigkeit der Absorptionsabnahme und Hämschädigung von der H_2O_2 -Konzentration im Vergleich zur Abhängigkeit der Restaktivität von der H_2O_2 -Konzentration. Bei der Beurteilung der ermittelten Restaktivitäten ist auch generell eine Einflussnahme der Testdauer auf das Ergebnis zu bedenken (s. Kap. 4.2.3).

Eine mit der H_2O_2 -Konzentration korrelierende Zunahme des Signals bei $g=4,3$, welches im Einklang mit dessen hoher Intensität aus einer vorherigen, EPR-unsichtbaren O_2 -Koordination stammen könnte, sowie eines Radikals um $g=2,005$ (s. Abb. 3.85), ebenso der nur mit höheren H_2O_2 -Konzentrationen zunehmend festzustellende Häm-Absorptionsverlust im UV-Vis-Spektrum weisen deutlich darauf hin, dass eine Schädigung des katalytischen Hämzentrums zumindest bei H_2O_2 in einem Überschuss eine Rolle spielt. Eine Häm-Absorptionsabnahme war auch mit Pyrogallol in Gegenwart von Luftsauerstoff zu beobachten. Dies weist auf eine oxidative Häm-Schädigung hin. Pyrogallol autoxidiert in wässriger Lösung umso rascher, je höher der pH-Wert, wobei $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 und ferner OH^{\cdot} gebildet werden. Die Autoxidation ist ($< \text{pH } 9,5$) in diesem Bereich von Superoxid-Anion-Radikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) als Zwischenstufen abhängig. Dabei reichert sich H_2O_2 als Produkt der Autoxidation von Pyrogallol an (Marklund & Marklund, 1974). So erklärt sich die Häm-Absorptionsabnahme mit Pyrogallol unter aeroben Bedingungen (pH 7) über die zerstörerische Wirkung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen und der Reaktion des Hämzentrums mit H_2O_2 (Agrawal *et al.*, 2001).

Neben einer mit steigender H_2O_2 -Konzentration zunehmenden Häm-Schädigung lässt sich ein störender Eingriff in den Latexspaltungs-Zyklus durch Oxidation des Fe-Ions annehmen, der insbesondere bei niedrigen, μ -molaren Konzentrationen vorherrschen könnte. Fe(IV)-Zwischenstufen sind für Monooxygenase-Metallenzyme charakteristisch und können wie oben beschrieben eine oxidative Schädigung an Proteinen nach sich ziehen (Kapetanaki & Varotsis, 2000). Es muss bedacht werden, dass bei der Reaktion des N-terminalen Häms mit H_2O_2 entstehende Zwischenprodukte nicht zur Spaltung eines unveränderten Polymerstrangs im Zuge der Dioxygenasereaktion führen (s. auch Kap. 4.11.3). Die Reaktion von RoxA mit H_2O_2 kann somit als "Sackgasse" betrachtet werden. Treffen diese auf den vorliegenden spektroskopischen Daten basierenden Annahmen zu, ließen sich auch entsprechende Zwischenstufen bei der Latexspaltung ausschließen. Um zu verstehen, was genau am N-terminalen Hämzentrum von RoxA bei der Reaktion mit H_2O_2 , aber auch nach Reduktion und Bindung von O_2 abläuft, ist eine genauere Untersuchung notwendig.

4.8 *High-spin-Zustände in RoxA*

Die Beobachtungen mit Wasserstoffperoxid belegen bereits, dass in RoxA "as isolated" eines der Hämzentren für H₂O₂ zugänglich sein muss. Die Funktion von RoxA als Dioxygenase legt die Bindung eines Substrates, Poly(*cis*-1,4-isopren) oder O₂, an einem der Hämzentren nahe. Dazu ist eine freie sechste Fe-Bindungsstelle erforderlich, was zu einem *high-spin*-Zustand des Hämzentrums führt. Die Kristallstrukturen von RoxA "as isolated" aus Latexkultur und von rekombinantem RoxA zeigen das N-terminale Hämzentrum mit einer für Substrate verfügbaren Bindestelle. Im optischen Spektrum von RoxA "as isolated" lassen sich jedoch keine typischen *high-spin*-Banden erkennen. Bei CCPs treten jedoch auch im oxidierten Zustand *high-spin*-Banden um 630 nm auf. Hingegen weist die M278H Mutante der CCP aus *R. capsulatus*, die der bis-His-Koordination des homologen Häms in RoxA entspricht, nicht nur ähnliche Redoxpotentiale (−215 mV, −105 mV) im Bereich derjenigen von MauG oder RoxA auf (vgl. Kap. 4.4.2), sie zeigt im oxidierten Zustand ebenso wie RoxA keine *high-spin*-Banden bei 380 nm und 630 nm. Dies wurde als Hinweis darauf verstanden, dass das *high-spin*-/*low-spin*-Gleichgewicht bei CCPs "as isolated" vom C-terminalen His-Met-koordinierten Hämzentrum stammt (de Smet *et al.*, 2006). Für Cytochrom *c* wurde gezeigt, dass die Met-Bindung durch Anwesenheit von Imidazol gelöst werden kann (Schejter & Aviram, 1969), eine Fe(III)-His-Koordination dagegen stabiler ist. Das Fehlen solcher Banden deckt sich somit mit der His-His-Koordination in RoxA.

Im EPR-Spektrum von rekombinantem RoxA konnten meist ebenso nur intensitätsschwache *high-spin*-Signale bei $g=6$ beobachtet werden. Ein konstant anderes Bild ergab sich nach Reduktion und anschließender Reoxidation von RoxA. Stets traten starke und stabile *high-spin*-Zustände bei $g=5,95$ auf, auch verstärkte sich meist ein anfangs wenig intensives *low-spin*-Signal bei $g=3,57$. Daraus kann ein Ursprung beider Signale vom N-terminalen Hämzentrum mit einer (partiell) freien Fe-Koordinationsstelle geschlossen werden (vgl. Kap. 4.5). Die Beobachtung von *high-spin*-Zuständen im EPR-Spektrum insbesondere nach einer Reduktion stimmt mit dem Auftreten typischer *high-spin*-Banden bei 635 bzw. 670 nm im UV-Vis-Spektrum überein (vgl. Abb. 3.33). Vor allem ein Signal bei 635 nm wurde gelegentlich beobachtet, jedoch nicht regelmäßig bei reduziertem RoxA (s. Kap. 3.9.1). Dieses könnte einen Fe(II)-*high-spin*-Zustand anzeigen und bedeuten, dass ein zuvor gebundener Ligand durch die erzwungene Reduktion entfernt wurde. Möglicherweise könnten die Signale bei 635 bzw. 670 nm auch *high-spin*-Signalen je einer der Hämzentren zuzuordnen sein.

Im EPR-Spektrum war ganz zu Beginn der Reoxidation nach vollständiger Reduktion noch ein zweites, ebenso intensitätsstarkes *high-spin*-Signal bei $g=6,13$ zu beobachten, das zusammen mit dem Signal bei $g=5,95$ z. T. weitaus intensiver als die in diesem Stadium sichtbaren *low-spin*-Signale war, aber rasch wieder zurückging, sobald diese weiter zunahmen. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich nicht entscheiden, ob die beiden sichtbaren *high-*

spin-Signale bei $g=5,95$ und $g=6,13$ zu einer rhombischen Spezies des N-terminalen Häms gehören, die rasch in eine axiale Spezies mit einem Hauptsignal bei $g\approx 6$ und einer nicht sichtbaren minimalen Komponente um $g\approx 2$ übergeht, oder sich in jeweils beiden Signalen nahe beieinander liegende Komponenten einer rhombischen Spezies zu einem Signal überlagern, oder diese jeweils die Hauptkomponenten eines axialen Signals darstellen. Zusätzlich bleibt die Frage offen, ob diese Signale zusammen mit schwächeren Signalen bei $g=6,6$ und $g=5,66$ lediglich verschiedene Zustände des N-terminalen Häms wiedergeben oder aber von beiden Hämzentren stammen. Als sicher gilt aber, dass die phasenweise zusammen sichtbaren Signale bei $g=6,6$; $6,13$; $5,95$ und $5,66$ nicht von einem einzigen Hämzustand stammen können. Das Auftreten dieser unterschiedlichen, sich schnell ändernden *high-spin*-Zustände könnte auf Veränderungen der Hämsymmetrie aufgrund struktureller Änderungen im Umfeld eines Hämzentrums (Peisach *et al.*, 1971; Peisach *et al.*, 1973) oder aber auf einen zumindest kurzzeitigen Übergang beider Hämzentren in den fünffach koordinierten *high-spin*-Zustand durch eine Reduktion hinweisen.

Unwahrscheinlich wäre aber der Ursprung des kurzlebigen Signals bei $g=6,13$ vom laut RoxA-Struktur bis-His-koordinierten C-terminalen Zentrum, welches nach Reoxidation ein stark auf der Seite eines sechsfach koordinierten *low-spin*-Zustands liegendes *high-spin/low-spin*-Gleichgewicht aufweisen würde. Denn diese Hämgruppe wird ebenso in der Struktur von reduziertem (rek.) RoxA in bis-His-Koordination vorgefunden (unveröffentlichte Ergebnisse, AG O. Einsle). Folglich ist auch eine Bindung von Imidazol oder Pyridin am C-terminalen Hämzentrum nach dessen Reduktion auszuschließen. So trat auch im optischen Spektrum im vollständig reduzierten Zustand in Gegenwart externer Hämliganden keine Absorptionzunahme bei 553 nm ein, wie die vom N-terminalen Hämzentrum stammende bei 549 bzw. 550 nm (s. Abb. 3.55, Kap. 3.9.6.4). Sämtliche *high-spin*-Signale müsste man somit dem N-terminalen Hämzentrum zuschreiben, wenn man annimmt, dass deren Entstehung bei Anwesenheit von Imidazol unterblieb, dieses aber nur am N-terminalen Häm bindet. Daraus lässt sich schließen, dass die C-terminale Hämgruppe nicht den Ort der Latexspaltung darstellt (vgl. Kap. 4.11.4). Da nach vollständiger Reduktion von RoxA "as isolated" aber beide α -Banden gleich intensiv sind, müssten sich die Absorptionskoeffizienten des N-terminalen (*high-spin*-Fe(II))- und des C-terminalen (*low-spin*-Fe(II))-Hämzentrums etwa entsprechen bzw. die N-terminale Hämgruppe nach Ligandenbindung einen etwas höheren Absorptionskoeffizienten aufweisen als die C-terminale (s. Kap. 4.9.4).

Signale bei $g=5,6$ in Häm-Modellen (Mazumdar *et al.*, 1988) oder $g=6,8$ bei Cytochrom b_{559} wurden z. B. auch als Teil einer rhombischen *high-spin*-Spezies mit $\text{H}_2\text{O-Fe-OH}^-$ -Koordination beschrieben, andere bei 5,6 dagegen nicht (Fiege *et al.*, 1995). *High-spin*-Signale mit g -Werten von $g=6,6$ und 5,6 wurden z. B. auch für das *high-spin*-Fe(III)-Porphyrin in Cytochrom P450 gefunden, welches einen axialen S-enthaltenden Liganden aufweist (z. B. Tsai *et al.*, 1970; Jefcoate & Gaylor, 1969). Denkbar wäre eine Bindung von aus Dithionit stammenden S-Verbindungen (SO_2^- , SO_3^{2-}), die im Falle der Sirohäm-Nitrit-

Reduktase jedoch EPR-unsichtbar blieben (Young & Siegel, 1988). Bei der Reoxidation mit Ferricyanid unter O_2 -Ausschluss kommen Dithionit-Zerfallsprodukte als Liganden der *high-spin*-Zustände aber kaum in Frage. Nach Dissoziation von $S_2O_2^{2-}$ entstehen SO_2^- -Radikale, die im EPR-Spektrum proteinunabhängige Radikalsignale bei $g \approx 2,005$ hervorrufen (Rinker *et al.*, 1959; Burlamacchi *et al.*, 1969; Yu *et al.*, 2010). Bei vollständig reduziertem RoxA unter anaeroben Bedingungen traten allenfalls schwache Radikalsignale auf, doch waren nur vergleichsweise geringe Dithionitmengen eingesetzt worden. Die Entstehung der beobachteten Radikalsignale bei $g \approx 2,005$ war insbesondere von der anschließenden Sauerstoffzufuhr abhängig. Aus der Reaktion von Dithionit-Zerfallsprodukten mit Luftsauerstoff entstehen Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$) und weitere (Burlamacchi *et al.*, 1969; Tao *et al.*, 2008; Rinker *et al.*, 1960), die wahrscheinlicher für die höhere Intensität der Radikalsignale verantwortlich sein könnten. Folgerichtig traten bei der Reoxidation durch Ferricyanid bei Abwesenheit von O_2 nur vergleichsweise geringere Radikale bei $g \approx 2,005$ auf. Allerdings wurde ein Radikal bei 2,033 beobachtet, das an die Anwesenheit von Ferricyanid gebunden war und auch im Kontrollansatz mit Ferricyanid ohne RoxA auftrat. Da diese Radikalsignale mit der Zeit zurückgingen und in vollständig oxidierten Dithionitlösungen keine Radikale auftraten (Rinker *et al.*, 1959), kann angenommen werden, dass noch Dithionit-Restmengen im Röhrchen vorlagen, solange diese Radikale bestanden.

Beim aeroben Abbau von Dithionit ist desweiteren die Bildung von H_2O_2 beschrieben, das in wässriger Umgebung durch Disproportionierung aus Superoxid entsteht. Insgesamt reduziert je ein Dithionit-Molekül O_2 zu H_2O_2 (Rinker *et al.*, 1960; Dixon, 1971), das mit dem Hämzentrum weiter reagieren kann (s. Kap. 4.7). Bei der Reaktion von RoxA mit H_2O_2 waren im EPR-Spektrum ebenso Radikale bei $g \approx 2,005$ aufgetreten, nicht aber in Kontrollansätzen von H_2O_2 ohne Enzym. Dies spricht für die Entstehung solcher Radikale durch Reaktion von H_2O_2 mit einem Hämzentrum. Solche reaktiven O-Verbindungen könnten für eine Schädigung des Hämzentrums und für einen bei hohem Überschuss an Dithionit möglichen geringen Häm-Absorptionsverlust nach Reoxidation verantwortlich sein, in entsprechender Weise wie die starke Absorptionsabnahme durch H_2O_2 im optischen Spektrum durch Zerstörung des Häm-Fe-Zentrums verursacht sein könnte. Ein solcher, einer Dithionit-Reduktion von Cytochrom P450 gegenläufiger Effekt wurde auf die Produktion von H_2O_2 bei Anwesenheit von O_2 zurückgeführt (Johnston *et al.*, 2011). Folglich könnte auch die festgestellte Aktivitätsminderung durch Dithionit im aeroben Aktivitätstest teilweise auf die Entstehung von H_2O_2 und reaktiver Sauerstoff-Spezies zurückgehen. Zwischenprodukte der Hämzerstörung wie Verdohäm und das Fe-freie Biliverdin zeigen Banden um 670 nm infolge einer Reaktion mit H_2O_2 (Avila *et al.*, 2003). Die Entstehung einer Bande bei etwa 670 nm im UV-Vis-Spektrum wäre somit auch infolge einer Hämzerstörung denkbar wie sie gewöhnlich beim Abbau der Hämgruppe durch die Häm-Oxygenase bei Anwesenheit von O_2 und Reduktionskraft (NADPH) auftritt (Zhu *et al.*, 2000). Dem widerspricht jedoch, dass in

Versuchen mit H₂O₂ keine derartige Bande im optischen Spektrum beobachtet wurde (vgl. Kap. 4.7).

Prinzipiell entspricht das – wenn auch nicht regelmäßige – Auftreten potentieller *high-spin*-Banden im UV-Vis-Spektrum nach einer Reduktion den Beobachtungen durch EPR-Spektroskopie. Denn bei rekombinantem RoxA "as isolated" waren nur sehr schwache, nach Reduktion und Reoxidation dagegen stets sehr deutliche *high-spin*-Signale zu sehen. Ein Wechsel zu einem *high-spin*-Zustand nach Reduktion des Fe(III)-Ions am katalytischen Zentrum muss hinsichtlich des Reaktionsmechanismus von RoxA plausibel erscheinen, da eine freie Koordinationsstelle zur O₂-Bindung und Latexspaltung erforderlich ist. Bei einigen Hämproteinen ist der Austausch bzw. die Dislokation von Liganden an einem sechsfach koordinierten Hämzentrum infolge einer Reduktion bekannt (Reddy & Gibney, 2004). Bei RoxA besteht die Möglichkeit, dass die sichtbar werdenden *high-spin*-Zustände nach Reduktion bereits aus einer vorherigen Fe(II)-O₂-Koordination hervorgehen (s. Kap. 4.6.1). Für MauG wird angenommen, dass eine Reduktion durch Ablösen eines schwachen Liganden am *high-spin*-Hämzentrum zu einer unbesetzten Bindestelle führt (Li *et al.*, 2006). Die Entstehung von *high-spin*-Signalen bei RoxA, beispielsweise nach Reduktion, oder deren Abnahme bei Anwesenheit von Hämliganden erscheint schlüssig und unterstützt, dass eine Temperatur-erniedrigung der wässrigen RoxA-Proben auf 10 K vermutlich keine grundsätzliche Änderung des Spinzustandes bewirkt, im Gegensatz zu CCPs (z. B. Foote *et al.*, 1985; Zahn *et al.*, 1997). So gibt es auch Beispiele von Hämproteinen, bei denen ein solches Einfrieren nicht zu einer Spinänderung führt, wie bei der Myeloperoxidase (Wever & Bakkenist, 1980) oder der Eosinophil-Peroxidase (Bolscher *et al.*, 1984).

4.9 Die Wirkung von Häm-Liganden auf RoxA

4.9.1 N-Heterozyklen binden am N-terminalen Hämzentrum

Imidazol und ähnliche Verbindungen finden in Modellversuchen häufig als typische Hämliganden Verwendung. So können die beobachteten starken Effekte als Resultat einer direkten Interaktion mit dem Häm-Fe angesehen werden, wie es aufgrund der Ähnlichkeit zur Aminosäure Histidin zu erwarten wäre, die sehr häufig einen axialen Liganden des Häm-Eisens bildet. EPR-Messungen wie auch die RoxA-Struktur zeigen, dass eines der Hämzentren in RoxA mit einer für externe Liganden verfügbaren Bindestelle im *high-spin*-Zustand vorliegen kann (s. Kap. 3.11.1; Kap. 4.5). Diese Voraussetzungen bieten die Möglichkeit, dass typische Hämliganden wie Imidazol an diesem Hämzentrum gebunden werden können.

Die Identifizierung bestimmter Imidazol-ähnlicher Liganden mit Effekten auf das optische Spektrum und die Aktivität von RoxA legte nahe, dass diese Verbindungen ihre Wirkung durch Bindung an der freien Bindestelle des N-terminalen Hämzentrums entfalten. Denn nur Verbindungen mit einem freien N-Elektronenpaar, das nicht Teil des Ring- π -Systems ist, zeigen eine klare Reaktion (s. Kap. 3.9.6.2; Abb. 3.52). Dass entsprechende Derivate mit hindernden Seitengruppen zum bindenden N-Atom keine oder nur geringe Effekte ergeben, unterstützt diese Annahme (vgl. Tab. 5.1). Übereinstimmend zeigen zwei unterscheidbare Soret-Maxima mit Imidazol und 1-Methylimidazol, sowie die Zunahme nur einer der beiden α -Banden, dass nur die Signale einer Hämgruppe durch Hämliganden beeinflusst werden, während die zweite unverändert im oxidierten "as isolated"-Zustand verbleibt. Weiterhin lässt sich daraus ableiten, dass die α -Bande bei 549 nm dem N-terminalen Hämzentrum zuzuordnen ist. Da während einer stufenweisen Reduktion zunächst nur diese α -Bande zunimmt, kann man dem N-terminalen Häm auch das etwas höhere Redoxpotential zuordnen (s. Kap. 4.4.2).

Dass die spektralen Veränderungen nach Sättigung der freien Bindestellen auch nach Entfernung der Substanzen aus dem Puffer durch Gelfiltration unvermindert erhalten blieben, belegt zudem die stabile Bindung eines Liganden am Hämzentrum. Wahrscheinlich aber kann die Anwesenheit des Substrates in Abhängigkeit der Stärke der Ligandenbindung zum Lösen der Häm-Koordination führen, denn unter Anwesenheit von Polyisopren im anschließenden Aktivitätstest wurden meist unverminderte Aktivitäten festgestellt. Dies bereits spricht für die Lokalisierung eines polymeren Substratmoleküls in der direkten Umgebung des entsprechenden Hämzentrums. Hält man die betreffenden Substanzen im Puffer des Aktivitätstests bereit, so könnten diese mit dem eigentlichen Substrat in Konkurrenz um die freie Bindestelle treten oder die Umsetzung am katalytischen Zentrum behindern. EPR-Experimente bei gleichzeitiger Anwesenheit von Latex und Hämliganden festigten und präzisierten diese Vermutung (s. Kap. 3.11.10; s. u.). Für diesen Umstand spricht auch, dass die ODTD-Produktion bei längerer Inkubation (15 h) in Gegenwart von Imidazol noch weiter fortschreiten konnte und eine höhere Restaktivität registriert wurde als nach drei Stunden (s. o.). Bei der Angabe der Aktivität bleibt somit generell zu beachten, wie lange der Test durchgeführt wurde (vgl. Kap. 4.2.3). Die Diskrepanz zwischen den Werten für die Restaktivität von RoxA bei der Durchführung des Tests über drei bzw. 15 Stunden könnte durch eine Konkurrenz um die Bindestelle zwischen Substrat und Imidazol und eine dadurch verlangsamte, aber noch fortschreitende Reaktion der Latexspaltung erklärt werden. Bei kurzer Testdauer verhält sich generell die festgestellte Restaktivität umgekehrt proportional zur Schnelligkeit, mit welcher der Reaktionsendpunkt erreicht wird, da zuvor noch unbesetzte Hämzentren für das Substrat verfügbar sind. So lässt sich erklären, warum kaum eine Substanz die Latexspaltung vollständig hemmte, am stärksten schnell reagierende Substanzen. Mit Pyridin beispielsweise erreichten die optischen Effekte praktisch unmittelbar nach Zugabe ihren Endpunkt, womit sich die nahezu fehlende RoxA-Aktivität nach drei Stunden

begründen lässt. Auf die vielfältigen Ursachen der unterschiedlichen Reaktionsschnelligkeit zwischen den N-heterozyklischen Verbindungen wird weiter unten näher eingegangen.

Den Beweis für eine Häm-Bindung lieferten EPR-Experimente. Bestehende *high-spin*-Signale bei $g \approx 6$ nahmen nach Zugabe von Imidazol oder Pyridin in ihrer Intensität ab (s. Abb. 3.87 – 3.90) bis zu deren vollständigem Verlust oder entstanden nach Dithionit-Reduktion der Probe bei anschließender Reoxidation nicht neu im Gegensatz zu RoxA "as isolated" (Abb. 3.89). Die Effekte traten hinsichtlich ihrer Schnelligkeit in entsprechender Weise wie bei der UV-Vis-Spektroskopie ein, mit Pyridin deutlich schneller als mit Imidazol (s. Tab. 5.1). Dies zeigt, dass eine Hämbindung an einer unbesetzten oder von einem schwachen Liganden wie H₂O koordinierten sechsten Bindestelle des N-terminalen Hämzentrums stattfindet. Darüber hinaus wurde jedoch auch die Veränderung von *low-spin*-Signalen beobachtet. Mit Imidazol nahmen Signale bei $g=3,57$ (rek. RoxA) (Abb. 3.88; 3.89) bzw. bei $g=3,39$ (RoxA aus Latexkultur) ab (Abb. 3.87). Eine klare Neuentstehung einer anderen *low-spin*-Spezies, wie sie in diesem Fall zu erwarten wäre, wurde nicht beobachtet. Denkbar wäre die Entstehung eines schwachen, verbreiterten Signals an etwa gleicher Stelle bei $g=3,57$ oder ferner eine Überlagerung mit dem intensiven *low-spin*-Signal bei $g=3,09$. Aufgrund der meist geringen Intensität der betroffenen *low-spin*-Spezies bei $g=3,57$ ist die Bestätigung dessen anhand einer entsprechenden Zunahme bei $g=3,09$ kaum möglich. Mit Pyridin ließ sich dagegen die vollständige Verschiebung des betroffenen *low-spin*-Signals von $g=3,57$ nach $g=3,33$ bei rekombinantem RoxA gut verfolgen (s. Abb. 3.90). Dadurch wurde gezeigt, dass die sich ändernden *low-spin*- und *high-spin*-Komponenten vom gleichen, dem N-terminalen Hämzentrum stammen.

Bis zur Aufklärung der exakten quantitativen Verteilung der EPR-Signale beider Hämzentren ist angesichts der geringen Intensitäten der entsprechenden Signale in RoxA "as isolated" zu bezweifeln, dass sich die gesamte Signalintensität des betreffenden N-terminalen Hämzentrums in den erwähnten *high*- und *low-spin*-Signalen wiederfindet (s. dazu Kap. 4.5.). Da im optischen Spektrum die Signalveränderungen – allem Anschein nach präparationsunabhängig – stets gleich intensiv waren, kann eine Bindung des Liganden an (nahezu) sämtlichen RoxA-Molekülen angenommen werden, worauf auch CD-Spektren hinwiesen (s. Kap. 4.9.2.1). Die EPR-Spektren weisen jedoch auf eine komplexere Situation hin. Die im Falle von Pyridin neu entstehende *low-spin*-Komponente bei $g=3,33$ war stets etwa gleich intensiv wie die zuvor sichtbare und nun aufgelöste Komponente bei $g=3,57$, unabhängig von deren Intensität. Stellt aber das Signal bei $g=3,33$ den Pyridin-koordinierten Fe(III)-*low-spin*-Zustand dar, so stünde dessen geringe Intensität im Widerspruch zur Reaktion nahezu aller RoxA-Moleküle mit Pyridin. Gleiches gilt für die Möglichkeit, dass sich ein Teil der von diesem Häm stammenden Signale mit denen des C-terminalen Häms in der *low-spin*-Spezies bei $g=3,09 + 2,23$ überlagern und sich auch nach Ligandenzugabe nicht ändern würde. Da man aufgrund einer Signalähnlichkeit auch eine ähnliche, vermutlich

stabile bis-His-Koordination annehmen könnte, wäre dies zwar nachvollziehbar, würde aber voraussetzen, dass nur derjenige Teil der Hämzentren, welcher das schwache und präparationsabhängig variierende $g=3,57$ -Signal liefert, mit dem Hämliganden reagierte. Dies schließt jedoch die Konstanz und Stärke der Veränderungen im UV-Vis-Spektrum aus und damit auch eine in der $g=3,09 + 2,23$ -Spezies verborgene Fe-His₃₁₂-Koordination (vgl. Kap. 4.5). Dabei stellt sich erneut die Frage nach dem sechsten Liganden des $g=3,57$ -Zustandes, der offenbar leicht von einem externen N-heterozyklischen Liganden verdrängt werden kann. Denkbar wäre die Bindung durch einen vom Protein stammenden Liganden mit schwächerer Affinität zum Hämzentrum wie z. B. Methionin, deren Koordination unter bestimmten Umständen ein *high-spin/low-spin*-Gleichgewicht wie bei CCPs im Ruhezustand am C-terminalen Hämzentrum (de Smet *et al.*, 2006; s. Kap. 4.6) bewirken würde. Wie in Kap. 4.5 aufgezeigt, wäre allenfalls eine Koordination mit Met₃₁₅ entfernt vorstellbar. Obwohl die Hämgruppe in Cytochrom *c* im nativen Zustand sechsfach koordiniert (His-Fe-Met) ist, wurde gezeigt, dass die Bindung von Imidazol unter Verdrängung des Met-Liganden möglich ist (Schejter & Aviram, 1969). So könnte die Verdrängung eines Aminosäureliganden wie Met₃₁₅ durch externe N-heterozyklische Liganden erfolgen. Dies gaben die EPR-Spektren zu bedenken, indem die Entstehung eines solchen *low-spins* nach einer Reduktion nicht nur unterblieb, wenn die Liganden bereits anwesend waren (Abb. 3.89), sondern sich auch dessen g -Wert änderte, wenn die Zugabe erst nach Reoxidation erfolgte und der ursprüngliche *low-spin*-Zustand wieder bestand (Abb. 3.90). Zwar zeigten UV-Vis-Spektren keine für eine Met-Koordination charakteristische Bande bei 695 nm, doch betrug die EPR-Intensität des entsprechenden *low-spin*-Signals nur einen Bruchteil an der Gesamtintensität.

Insgesamt widersprechen die Beobachtungen aus der Spektroskopie auch einer gegenüber der Bindung eines externen Liganden resistenten (His₃₁₂- oder anderweitigen) Koordination an sechster Position. Denn es ist unwahrscheinlich, dass ein Großteil der EPR-Intensität des N-terminalen Häms mit der sich nicht verändernden Intensität des C-terminalen Häms bei $g=3,09 + 2,23$ zusammen fällt (s. o.; s. Kap. 4.5). Gleichzeitig ist die Bindung der Liganden an sämtlichen RoxA-Molekülen zu vermuten (s. o.). So ist die geringe Intensität des sich verschiebenden Signals bei $g=3,57$ nicht vereinbar mit der Intensität der Veränderungen im optischen Spektrum (s. Kap. 4.9.4). Erneut kommt dabei die Frage nach dem Verbleib der EPR-Intensität des N-terminalen Hämzentrums auf – in diesem Fall nicht des Zustandes in RoxA "as isolated", sondern nach Koordination dieser Hämgruppe durch Imidazol bzw. Pyridin. So bietet auch hierbei die Möglichkeit einer O₂-Bindung bei einem erheblichen Teil der RoxA-Moleküle, die eine EPR-unsichtbare Fe(II)-O₂ \leftrightarrow Fe(III)-O₂^{•-}-Spezies ergeben würde (s. Kap. 4.6), eine weitere Erklärung an, die sich auf den offenbar teilreduktiven Effekt im optischen Spektrum gründet. Zunächst soll auf die möglichen Ursachen eingegangen werden (Kap. 4.9.2).

4.9.2 Die reduzierende Wirkung auf das optische Spektrum

Alle *c*-Typ-Cytochrome weisen sehr ähnliche, charakteristische optische Spektren auf, die dennoch bezüglich ihrer Maxima voneinander abweichen. Da die Umgebung der Hämzentren und deren Koordination die spektroskopischen Eigenschaften mit bestimmen, ist es nachvollziehbar, dass sich die beobachteten Banden mit verschiedenen Substanzen unterscheiden. Woher aber stammen die starken Veränderungen im Spektrum, die vor allem im Bereich der Q-Banden offensichtlich eine Zunahme bei für den reduzierten Zustand der N-terminalen Hämgruppe typischen Wellenlängen zeigen?

In Häm-Modell-Komplexen wurde kein einer Reduktion ähnelnder Zustand der Q-Banden beobachtet, allenfalls eine Rotverschiebung der Soret-Bande durch Bindung von Imidazol und eine Intensitätszunahme der Fe(III)-Q-Banden infolge des Übergangs in die *low-spin*-Form (Benson *et al.*, 1995). Die Reaktion von Cytochrom *c* mit Imidazol wurde einer vom Protonierungszustand abhängigen Bindung am Häm-Fe zugeschrieben (Schejter & Aviram, 1969). Die Änderungen im UV-Vis-Spektrum weichen jedoch von denen in RoxA ab, da keine einer Teilreduktion entsprechenden Banden beobachtet wurden. Auch bei CCPs treten keine vergleichbaren Veränderungen des optischen Spektrums ein. Die Effekte beschränken sich bei der *N. europaea* CCP auf eine vom Liganden abhängige Rotverschiebung der Soret-Bande und eine Intensivierung der Q-Banden von oxidiertem Häm, die allein durch einen Wechsel des Spinzustandes zur *low-spin*-Form erklärt werden kann (Arciero & Hooper, 1994). Nach Brill & Williams (1961) verschiebt sich die Soret-Bande zu längeren Wellenlängen je geringer der Spin, zudem ist die Intensität der Q-Banden im *low-spin*- größer als im *high-spin*-Zustand (s. u.). So könnten sich die Unterschiede der Soret-Banden zwischen den Verbindungen unter anderem auf eine von dem jeweiligen Liganden abhängige Rotverschiebung nach Spinänderung zurückführen lassen. Eine solche Rotverschiebung wurde in einem Kontrollexperiment auch mit Hämoglobin, das über freie Bindestellen verfügt, beobachtet (s. Kap. 3.9.6.4). Die Situation in RoxA umfasst mit einer teilreduzierenden Wirkung der Liganden aber einen Effekt, der mit Hämoglobin nicht auftrat. Die Entstehung dieser Effekte infolge einer Bindung der Hämliganden an einem *oxidierten* Hämzentrum wäre sehr ungewöhnlich, denn in peptidfreien Häm-Fe(III)-Modellen treten nach bis-Imidazol-Koordination nur für oxidiertes Häm typische Q-Banden auf (z. B. Huy *et al.*, 2002). Angesichts der am Ende des vorigen Kapitels (4.9.1) angesprochenen Problematik im Zusammenhang mit der EPR-Intensität des N-terminalen Häms erscheint die Möglichkeit einer Ligandenbindung an einem *reduzierten* Hämzentrum wahrscheinlicher. Denn EPR- und UV-Vis-Spektren geben deutliche Hinweise auf eine O₂-Koordination an der betreffenden Bindestelle in RoxA "as isolated" (s. Kap. 4.6.1). Nach Dissoziation des O₂ in Gegenwart eines Hämliganden könnte das Hämzentrum als Fe(II) vorliegen, wenn die Bindung des Liganden eintritt und die O₂-Bindung reversibel wäre. Die durch Imidazol und ähnliche Verbindungen im UV-Vis-Spektrum hervorgerufenen Veränderungen widersprechen dennoch

der Annahme, dass das Hämzentrum nach deren Bindung (vollständig) reduziert vorliegt. Sie entsprechen augenscheinlich einer partiellen Reduktion (s. Abb. 3.46 ff; vgl. Abb. 3.55) und deuten vielmehr auf mit der Bindung der N-Heterozyklen zusammen hängende Effekte als Ursache hin. Dafür spricht, dass diese auch unter aeroben Bedingungen zu beobachten waren, die zu einer vollständigen Reoxidation nach einer Reduktion von RoxA "as isolated" ausreichen. Auch die Soret-Banden im CD-Spektrum mit Hämliganden entsprechen in ihrer Intensität dem Spektrum von RoxA "as isolated" gegenüber der deutlich stärkeren Intensität reduzierter Zustände (vgl. Abb. 3.75 mit 3.68; 3.76). Die Annahme einer zwischen Fe-Ion und Liganden stabilisierten negativen Ladung deckt sich mit einer vorherigen Fe(II)-O₂-Bindung in RoxA "as isolated", deren negative Ladung nach Ligandenbindung erhalten bliebe.

4.9.2.1 Hinweise aus dem CD-Spektrum

Anders als im optischen Spektrum zeigt das CD-Spektrum von RoxA mit Hämliganden den Unterschied zu im Verlauf einer schrittweisen Reduktion auftretenden Zuständen besonders deutlich. Dies veranschaulichte ein Vergleich von Imidazol- bzw. Pyridin-gebundenem RoxA mit einem nach Reoxidation noch partiell reduziertem Zustand des Enzyms (s. Abb. 3.75; Kap. 3.10.5). Die CD-Soret-Banden mit den Hämliganden wiesen ein mit Imidazol bzw. Pyridin unterschiedlich stark verschobenes Minimum gegenüber RoxA "as isolated" auf. Die teilreduzierte Probe zeigte dagegen zwei Signale: ein dem oxidierten Zustand und ein dem reduzierten Zustand entsprechendes Minimum. Die durch die Bindung N-heterozyklischer Liganden hervorgerufenen Effekte unterscheiden sich daher von einer vollständigen Reduktion des entsprechenden Hämzentrums und schließen aus, dass nur ein Teil der RoxA-Moleküle diese Hämliganden bindet und reduziert werden könnte. Die RoxA-Struktur und die Ergebnisse der UV-Vis-Spektroskopie belegen auch, dass eine Bindung dieser Hämliganden am zweiten, C-terminalen Hämzentrum in RoxA, wie auch eine Elektronenverschiebung zu diesem infolge der Bindung dieser Liganden ausgeschlossen werden kann (vgl. auch Kap. 4.11.4).

Warum die CD-Spektren von RoxA mit einem Hämliganden nicht dennoch ein Minimum bei der für oxidiertes RoxA "as isolated" charakteristischen Wellenlänge von 413 nm aufweisen (vgl. Abb. 3.75), wenn man annimmt, dass nur eines der beiden Hämzentren von der Bindung betroffen ist, stellt die grundlegende Frage nach dem Beitrag jedes der beiden Hämzentren zur Soret-Bande, die bereits in Kap. 4.3.3 betrachtet wurde. So veranschaulichen die gesammelten CD-Spektren, dass das N-terminale Hämzentrum, an dem die externen Liganden eine Bindung eingehen, geteilte Soret-Übergänge aufweist, und die negative Elliptizität der Soret-Bande hauptsächlich von diesem Zentrum stammt. Dies erklärt ein symmetrisches Minimum bei Anwesenheit von Pyridin oder Imidazol gegenüber zwei unterscheidbaren Minima bei Teil-Reduktion von RoxA. Gleichzeitig erfordert dies die Ligandenbindung an den entsprechenden Hämgruppen nahezu sämtlicher RoxA-Moleküle

einer Population, da andernfalls noch ein zweites Minimum bei 413 nm auftreten müsste. Darin besteht ein grundlegender Unterschied zur partiellen Reduktion einer RoxA-Population. Denn in diesem Fall besitzt nur ein Teil aller RoxA-Moleküle in einer Lösung ein reduziertes Hämzentrum. Im Prozess einer Reduktion kann dieses nur oxidiert (Fe^{3+}) oder reduziert (Fe^{2+}) und nicht etwa jedes einzelne der Eisen-Zentren partiell reduziert vorliegen. So erklärt sich die Beobachtung zweier Minima als vom N-terminalen Hämzentrum stammend, indem ein oxidiertes Zustand ein Signal bei 413 nm, ein reduzierter Zustand bei einem Teil der RoxA-Population ein Signal bei 420 nm liefert (Abb. 3.68). Solange der Endpunkt der Reaktion aller RoxA-Moleküle mit dem Hämliganden noch nicht erreicht ist, sollte folglich noch ein Minimum bei 413 nm sichtbar sein (vgl. Abb. 3.69). Anhand dieses Vergleichs wird der Unterschied einer partiellen Reduktion zu einer Ladungsverschiebung vom Fe-Zentrum zum Hämliganden oder umgekehrt, infolge der Liganden-Bindung deutlich, welche zumindest einen erheblichen Teil der RoxA-Moleküle betreffen muss.

Im CD-Spektrum auftretende breite Banden um 350 nm sind grundsätzlich von der Intensität der Häm-Soret-Absorption beeinflusst und ändern sich nach Bindung von Liganden (Hsu & Woody, 1971; Harrington *et al.*, 1973). Übereinstimmend mit einer Bindung treten im CD-Spektrum von RoxA mit Imidazol bzw. Pyridin breite, nach 338 nm bzw. 329 nm verschobene Banden auf (s. Abb. 3.75, Kap. 3.10.5).

Das Nah-UV-Spektrum von RoxA mit Hämliganden gab keine Hinweise auf mögliche Konformationsänderungen nach Ligandenbindung. Änderungen der Form der Soret-CD-Bande können durch Bindung bestimmter Liganden auftreten, wenn diese die Orientierung der Porphyrin-Übergänge beeinflussen, und zeigen nicht zwangsläufig auch Konformationsänderungen an (Hsu & Woody, 1971). Diese lassen sich an einer Änderung des Verhältnisses der Summe der CD-Rotationsstärke zur Summe der Intensität der optischen Absorption der jeweiligen Banden erkennen (Nicola *et al.*, 1975). Dieses Verhältnis entspricht im Falle einer Ligandenbindung etwa demjenigen in RoxA "as isolated".

4.9.2.2 Eine Ladungsverschiebung als Ursache

Im UV-Vis-Spektrum war auffällig, dass der Grad der Veränderung nur eine der α -Banden betrifft und die Intensität der Veränderung über diejenige hinausgeht, ab welcher im Verlauf einer Reduktion auch eine Zunahme der zweiten α -Bande und damit eine Reduktion des zweiten Häms eintritt. Dies bedeutet auch, dass eine Ladungs- oder Elektronenverschiebung zum zweiten Hämzentrum infolge der Bindung dieser Liganden nicht stattfindet. Die Intensität der 549 nm- α -Bande umfasst jedoch nur einen Teil derjenigen, die nach Reduktion dieses Hämzentrums zu erwarten wäre (s. Kap. 3.9.6). Gleichzeitig ist anzunehmen, dass am Punkt maximaler Ausprägung des "Imidazol-Effektes" die freien Bindestellen sämtlicher RoxA-Moleküle koordiniert vorliegen (s. Kap. 4.9.2.1). Dies zeigt, dass keine vollständige Reduktion eines Fe(III) zu Fe(II), sondern eher eine Ladungsverschiebung stattgefunden hat.

Die Differenzspektren im Bereich der Soret-Bande veranschaulichen zudem eine geringere Abnahme der für oxidiertes Häm-Fe typischen Wellenlänge bei 406 nm als es bei einer Reduktion von vergleichbarer Intensität der Fall wäre (vgl. Abb. 3.31 und Abb. 3.46 b). Wie UV-Vis- und CD-Spektren gleichermaßen belegen, stellt der Zustand nach Ligandenbindung weder eine tatsächliche Reduktion noch Oxidation des N-terminalen-Hämzentrums dar.

Während die Veränderung der Q-Banden nur die für einen reduzierten Zustand typische Wellenlänge *eines* Hämzentrums betrifft und allen getesteten Liganden in etwa gleich intensiv ist, unterscheiden sich die Änderungen der Soret-Bande deutlich in ihrer Wellenlänge und Intensität. Die unterschiedlichen Soret-Änderungen lassen sich durch die unterschiedliche elektronische Struktur des jeweiligen Liganden begründen, die auf die Art der Bindung, die Bindungslänge und -stärke Einfluss nimmt. Das Verhältnis der α -Banden- zur Soret-Absorptionsveränderung ergibt einen charakteristischen Wert für die Reaktion jeder dieser Verbindungen mit RoxA. Ein niedrigeres Verhältnis und somit eine stärkere Soret-Veränderung wurden bei N-Heterozyklen mit Fünfring-System erhalten, ein höheres Verhältnis bei solchen mit Sechsring-System und ein weiterhin höheres bei Anwesenheit mehrerer N-Atome im Ringsystem (s. Kap. 3.9.6.2, Abb. 3.51, Tab. 5.1). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Elektronendichte am bindenden N-Atom bzw. die Energie der π -Orbitale für diese Effekte entscheidend sind.

Wie in Kap. 4.9.1 angesprochen, ist die Frage, ob nun nach Bindung der N-Hämliganden eine Ladungsverschiebung zum Fe(III) oder vom Fe(II) zum Liganden stattfindet, eng an die Frage gekoppelt, ob in RoxA "as isolated" eine O₂-Bindung und nach O₂-Entfernung dieses noch reduziert oder oxidiert vorliegt. Zur Erklärung der Hämliganden-Effekte sind theoretisch beide Möglichkeiten einer Ladungsverschiebung, von Fe(II) zum Liganden oder vom Liganden zu Fe(III), vorstellbar. Die Begründung der Effekte über die Elektronendonator- bzw. -akzeptoreigenschaften der Verbindungen bliebe in jedem Fall zutreffend. Jedoch erklärt eine stabile Fe(II)-O₂-Koordination im Grundzustand von RoxA die insgesamt erhaltenen Ergebnisse am besten (s. Kap. 4.6).

Umgekehrt wie bei einem *Fe(III)*-Porphyrin die π -Donor-Eigenschaften eines Imidazol-Liganden einen Ligand-zu-Metall- π -Elektrontransfer bzw. eine Überlappung der Fe(III)-Orbitale begünstigen (Johnson *et al.*, 1991 und darin zitierte Referenzen), so ist in diesem Fall bei einem *Fe(II)*-Zentrum ein π -Ladungstransfer vom Metall zum Liganden denkbar, in Abhängigkeit von dessen Eigenschaften als π -Akzeptor. Pyrazin und Pyridin interagieren als gute π -Akzeptoren stärker mit Fe(II) als Imidazol (Johnson & Shepherd, 1983; Uno *et al.*, 1991). So könnte sich die Schnelligkeit der Reaktion mit Pyridin durch das Vorhandensein eines reduzierten Hämzentrums erklären, doch sind dafür noch zahlreiche weitere Aspekte relevant (s. Kap. u.). Imidazol dagegen ist ein stärkerer π -Donor (Eicher & Hauptmann, 2003), d. h. zum Fe(III) ein stärkerer Elektronen spendender Ligand als andere heterozyklische N-Verbindungen (Ašperger & Cetina-Čižmek, 1996). Unter Annahme der Bindung dieser Substanzen an einem Fe(II)-Zentrum bei einem Großteil der RoxA-Moleküle

könnten die in der Reihenfolge Pyrazin, Pyridin und Imidazol abnehmenden π -Akzeptor-Eigenschaften die in dieser Reihenfolge zunehmenden Soret-Veränderungen und somit die Relationen der α -Banden-/Soret -Änderungen von 0,5, 0,3 bzw. 0,18 (vgl. Tab. 5.1) begründen. Je höher die Bereitschaft zur Aufnahme von π -Elektronendichte, umso geringer könnte die einer Reduktion entsprechende Veränderung der Soret-Bande sein (s. Abb 3.51 b). Somit können die N-heterozyklischen Verbindungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die π -Orbitale des Fe-Ions bzw. indirekt der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge des Porphyrins ausüben, aus denen die charakteristischen Häm-Banden im UV-Vis-Spektrum entstehen. Die geringfügigen Unterschiede der α -Banden mit Hämliganden zwischen 549 nm beispielsweise mit Pyridin und 550 nm mit Imidazol können auch mit deren elektronischen Eigenschaften erklärt werden unter Annahme der Verschiebung einer negativen Ladung entlang der Fe-Liganden-Bindung. Bei Fe(II)-*low-spin*-Zuständen ist die Rotverschiebung der α - und β -Banden deutlicher, je höher die π -Donor-Eigenschaften des Liganden (Brill & Williams, 1961).

Die Ergebnisse der UV-Vis-Spektroskopie zeigen anhand der deutlichen Soret-Veränderungen, dass eine negative Ladung vermutlich entlang der Bindung zwischen Fe-Ion und dem N-Liganden infolge des Transfers von π -Elektronendichte stabilisiert ist und die Substanz-spezifischen Veränderungen des optischen Spektrums bewirkt, die einer partiellen Reduktion gleichen. Die π -Akzeptor-/Donor-Eigenschaften des Liganden erklären die Intensität der spektralen Veränderungen bei Annahme einer Ligandenbindung an einem Fe(II)-Zentrum, indem stärkere π -Akzeptoren schwächere Fe(II)-Banden lieferten. Insgesamt weisen die Beobachtungen aus der Spektroskopie mit RoxA auf den Fall einer reversiblen Bindung eines O₂-Moleküls an gleicher Bindestelle des Hämzentrums im Grundzustand hin (s. Kap. 4.6). Eine genauere Betrachtung der EPR-Spektren bei Anwesenheit von Hämliganden unterstützt den Verbleib eines Elektrons aus einer Fe(II)-O₂-Koordination am Liganden-kooordinierten Zustand. Die Frage, ob die soeben diskutierten Veränderungen im optischen Spektrum eher einem Fe(II) oder Fe(III)-Oxidationszustand am Hämzentrum entsprechen, ist für die Betrachtung der EPR-Spektren nach Reaktion von RoxA mit einem N-heterozyklischen Hämliganden wichtig. Denn nur ein oxidiertes Fe-Zentrum liefert EPR-Signale und liegt im Pyridin-gebundenen Zustand bei $g=3,33$ vor. Dieser macht aber nur einen geringen Teil der zu erwartenden Signale nach Ligandenbindung an einem Fe(III)-Zentrum aus. Wie bereits in (Kap. 4.9.2.1) erläutert, würde eine beim größeren Teil der RoxA-Moleküle vorliegende Häm-Koordination, die nicht mit den externen Hämliganden reagierte, Widersprüche aufwerfen. Nimmt man aber an, dass der Pyridin- oder Imidazol-ligierte Zustand, der im optischen Spektrum eine partiell negative Ladung am Fe-Zentrum anzeigt, im EPR-Spektrum einem Fe(II)-Zentrum gleichkäme, wäre dieser Zustand im EPR-Spektrum nicht zu sehen. Gleichzeitig heißt dies, dass die entsprechende Hämspezies auch vor der Ligandenzugabe EPR-unsichtbar sein müsste. Möglich wäre dies durch Bindung von O₂ an der entsprechenden Bindestelle im Grundzustand von RoxA "as isolated" (s. Kap. 4.6).

Da die Ergebnisse für eine stabile und reversible Bindung von O₂ sprechen, würde das Fe-Ion nach Dissoziation von O₂ im reduzierten Zustand verbleiben und somit weiterhin einen EPR-unsichtbaren Zustand ergeben. In diesem Fall könnte sich dieser Effekt durch Bindung des Hämliganden an Fe(II) mit einer möglichen Ladungsverschiebung zum Liganden in Abhängigkeit von dessen Eigenschaften als Elektronenakzeptor erklären (s. o.). Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand muss dies als die plausibelste Erklärung erscheinen und würde diesem ungewöhnlichen Enzym eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft einer stabilen O₂-Bindung hinzufügen.

Umgekehrt geht mit dieser Interpretation einher, dass ein geringer Teil der RoxA-Moleküle einer RoxA-Population nach Isolierung des Enzyms in einem Aminosäure-, möglicherweise Fe(III)-Met- koordinierten Zustand vorliegt, der ebenfalls durch den externen Hämliganden verdrängt werden kann, aber im UV-Vis-Spektrum nicht zu den reduktionstypischen Veränderungen beiträgt und EPR-sichtbar ist (s. o.). Befindet sich stets nur ein kaum variierender Anteil der Hämzentren in diesem Zustand, wäre es vorstellbar, dass geringe Abweichungen zwischen verschiedenen Präparationen nicht registriert wurden. Ob und inwieweit eine Ladungsverschiebung vom Fe-Ion zum Liganden zur Erklärung der Intensität des "Reduktions-Effektes" herangezogen werden muss, ist abhängig vom Anteil dieser Spezies. Erneut wird dadurch die Bedeutung einer genauen Quantifizierung der EPR-Signale zur Erklärung der Ligandeneffekte deutlich. Weiteren Aufschluss über den Ursprung dieser Effekte lieferten Experimente nach Reduktion und Reoxidation durch Ferricyanid von RoxA nach Ligandenbindung (s. Kap. 4.9.4).

4.9.3 Die Geschwindigkeit der Veränderungen

Auf der Grundlage der Schlussfolgerungen aus UV-Vis- und EPR-Spektren kann angenommen werden, dass ein wesentlicher Teil der RoxA-Moleküle am N-terminalen Hämzentrum in RoxA "as isolated" O₂-koordiniert (nicht sichtbar) vorliegt, zudem ein geringer Anteil einen Aminosäure-Liganden (*low-spin*) besitzt. Diese Liganden können offenbar leicht von einem starken externen Liganden wie N-heterozyklischen Verbindungen mit einem freien N-Elektronenpaar verdrängt werden. Die geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren sind jedoch vielfältig und lassen sich in ihrer Gesamtheit auch auf die Reaktionsschnelligkeit der Ligandenbindung zu einem Fe(III)-Zentrum anwenden.

Eine Bindung als Ursache erklärt eine generelle Konzentrationsabhängigkeit der Schnelligkeit der Reaktionen und das Erreichen eines Endpunktes, wobei dessen spektrale Intensität je nach Substanz spezifisch ist. Vergleicht man aber gleiche absolute Konzentrationen der Liganden bei gleichem pH-Wert, ist auch deren pK_S-Wert zu berücksichtigen, der Auskunft über den Protonierungszustand der Verbindung beim vorherrschenden pH-Wert gibt. So muss beim Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten vielmehr die bei pH 7 effektive Konzentration der deprotonierten, zur Bindung fähigen Form

des jeweiligen Liganden in Abhängigkeit der jeweiligen pK_S -Werte betrachtet werden. Entsprechend erreichten die Reaktionen mit Pyridin ($pK_S \approx 5,2$), Pyrazol ($pK_S \approx 2,5$) und Pyrazin ($pK_S \approx 1,0$), die bei pH 7 größtenteils deprotoniert vorliegen, sehr schnell den Endpunkt, während sich die vergleichbaren Effekte mit Imidazol und 1-Methylimidazol mit pK_S -Werten um 7 langsamer einstellten (vgl. Tab. 5.1). Unter Berücksichtigung der pK_S -Werte relativieren sich somit die Unterschiede zwischen den Substanzen. So ist es weiterhin denkbar, dass bei dem nur minimalen Effekt von 2-Methylimidazol oder 1,2-Dimethylimidazol mit pK_S -Werten von etwa 8 nicht nur die störende(n) Methylgruppe(n), sondern auch die Protonierung eine Rolle spielt. Denn mit 1-Methylimidazol-Carboxaldehyd, das statt einer Methyl- eine Aldehydgruppe am C-2-Atom und einen pK_S von 5,2 besitzt, wurde eine langsam eintretende Reaktion beobachtet. Mit 2-Methylimidazol sollten aber bei pH 7 statistisch noch immer 10 % der Moleküle deprotoniert vorliegen und damit bei höheren Konzentrationen (> 1 mM) ausreichend viele, um eine entsprechend langsamer eintretende Reaktion hervorzurufen. Jedoch selbst nach ÜN-Inkubation ergab sich das gleiche Bild. Dies zeigt, dass hindernde sterische Effekte zumindest mitverantwortlich sind für die fehlende Reaktion mit diesen oder anderen Verbindungen, die dem bindenden N-Atom benachbarte Seitengruppen aufweisen.

Noch ein weiterer Faktor spielt eine vermutlich ebenso entscheidende Rolle. Dass bisher keine Hinweise auf eine Konformationsänderung im Reaktionsmechanismus vorliegen, gibt Anlass zu der Überlegung, dass der Zugang zum Hämzentrum für das Substrat und externe Liganden durch eine Art hydrophoben Kanal möglich sein könnte (s. auch Kap. 4.11.1, Abb. 4.5), in jedem Fall aber durch die Hydrophobizität der Häm-Cavity die Bindung hydrophober Moleküle bevorzugt werden könnte. Beispielsweise weist die Schnelligkeit der Reaktion mit Pyridin, das aufgrund nur eines N-Atoms hydrophober ist als Imidazol, auf eine Beteiligung dieser Eigenschaften hin. Vergleicht man die Schnelligkeit der Reaktionen mit der Hydrophobizität der Verbindungen, so stellt man eine positive Korrelation fest. N-heterozyklische Verbindungen mit Sechsring sind hydrophober als solche mit Fünfring und zeigten auch im Allgemeinen eine schnellere Reaktion. Eine Bedeutung der hydrophoben Eigenschaften könnte die unerwartet schwache Reaktion von 1,2,4-Triazol erklären. Trotz zweier N-Atome mit zur Bindung verfügbaren freien Elektronenpaaren und einem niedrigen pK_S -Wert von 2,2 war die Beeinflussung des optischen Spektrums und der Aktivität von RoxA sehr gering. Triazol ist aber durch drei N-Atome im Fünfring weit weniger hydrophob als beispielsweise Imidazol, wodurch der Zugang zur freien Hämbindestelle im Enzyminneren erschwert sein könnte. Zwar könnte man eine geringe Absorptionsänderung durch die starke Bereitschaft, Elektronen von einem Fe(II)-Ion abzuziehen erklären, doch spricht die fehlende Hemmung mit Triazol eher dafür, dass dieses aufgrund seiner Hydrophobizität nur schwer zum Hämzentrum gelangt, somit auch nur wenige Moleküle eine Bindung eingehen. Diese Überlegungen können zur Lösung der Frage nach dem Zugang des RoxA-Substrates zum betreffenden Hämzentrum beitragen (s. Kap. 4.11.1).

Für die Fragestellungen dieser Arbeit ist es nicht entscheidend, an dieser Stelle die Effekte jeder einzelnen dieser Verbindungen im Detail aufzulösen. Von primärer Bedeutung ist die Feststellung, dass externe Hämliganden mit Ähnlichkeit zur Aminosäure Histidin in der Lage sind, mit einem der Hämzentren zu interagieren und dies nur tun, wenn ein freies Elektronenpaar zur Bindung zur Verfügung steht. Die Ergebnisse der Spektroskopie mit RoxA belegen somit, dass eine Bindung am N-terminalen Hämzentrum die Ursache für die spektralen Effekte und die Aktivitätsbeeinträchtigung darstellt. So ließ sich zum einen nachweisen, dass das N-terminale, dem P-Häm von CCPs homologe Hämzentrum eine Bindestelle zur Bindung des/der Substrate zur Verfügung hat und somit der Ort der Latexspaltung sein kann (s. auch Kap. 4.10), zum anderen, dass auch im Zustand des Enzyms "as isolated" ein Hämzentrum für größere Liganden zugänglich ist und dazu keine Konformationsänderung wie bei den meisten CCPs erforderlich ist. Die *N. europaea* CCP, die bereits eine offene Konformation aufweist, ist in der Lage, Imidazol am entsprechenden Häm zu binden (Arciero & Hooper, 1994). Die Kombination der Anwesenheit dieser Liganden mit der Anwesenheit des RoxA-Substrates oder anderer Bedingungen hatte weitere wichtige Erkenntnisse zum Ort der Spaltungsreaktion gebracht (s. Kap. 4.5; Kap. 4.11.1).

4.9.4 Reduktion und Oxidation von RoxA nach Bindung externer Liganden

4.9.4.1 Reduktion

Zur Erklärung des einer Teil-Reduktion ähnelnden Effektes im optischen Spektrum kann nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand von einer Bindung der externen Hämliganden an einem Fe(II)-Hämzentrum, sowie einer Ladungsverschiebung vom *reduzierten* Fe-Zentrum zum Liganden ausgegangen werden. Nach vollständiger Reduktion dieser Form von RoxA bleibt die entsprechende Bande nicht etwa gleich, sondern führt zu einer intensiveren α -Bande bei 549 bzw. 550 nm als sie nach vollständiger Reduktion von RoxA "as isolated" erhalten wird (s. Kap. 3.9.6.4, Abb. 3.55).

Würde man eine Ladungsverschiebung vom Liganden zu einem *oxidiert* vorliegenden Fe-Zentrum annehmen, könnte man nach Zugabe eines Reduktionsmittels eine Ergänzung zum vollständig reduzierten Spektrum erwarten. So würde aufgrund des niedrigen Oxidationszustands von Fe(II) kein π -Ladungstransfer vom Liganden stattfinden (Johnson *et al.*, 1991). Grundsätzlich kommt aber in Betracht, dass die reduzierte, Imidazol- oder-Pyridinligierte (*low-spin*)-Form dieses Hämzentrums von RoxA einen höheren Absorptionskoeffizienten als die reduzierte Form in RoxA "as isolated" (vgl. Abb. 3.55, Abb. 3.77) aufweisen könnte. Es wäre ein Zusammenhang mit dem Spin-Zustand dieses Hämzentrums denkbar. Aus EPR- und UV-Vis-Spektren liegen Hinweise vor, dass nach Reduktion der Hämzentren zumindest eines, eben dieses N-terminale Häm, an welchem die Bindung externer Liganden erfolgt (s. Kap. 4.9.1; Kap. 4.10), im *high-spin*-Zustand vorliegt.

Grundsätzlich zu erwarten ist dies, um ein O₂-Molekül (erneut) am reduzierten Häm-Fe binden zu können. Nach Bindung von Hämliganden ist die entsprechende sechste Koordinationsstelle aber offensichtlich auch nach vollständiger Reduktion des Enzyms besetzt. Daraus resultiert ein *low-spin*-Zustand, der für die höhere Absorption von Imidazol- oder Pyridin-ligiertem RoxA nach Reduktion gegenüber dem entsprechenden *high-spin*-Zustand verantwortlich sein könnte. Dass der Wechsel des Spinzustandes von *high-spin* zu *low-spin* eine Intensivierung der α - und β -Banden bewirkt, ist bekannt (z. B. Brill & Williams, 1961). Eine solche Spin-Änderung hatte in Häm-Peptid-Modellen zudem zu einer starken Intensivierung der Fe(II)-Soret-Bande geführt, beispielsweise durch Austausch eines koordinierten H₂O-Moleküls gegen Pyridin (Vashi & Marques, 2004) oder durch Bindung anderer starker Liganden wie N-Acetylmethionin (Tezcan *et al.*, 1998). Bei der CCP aus *P. pantrophus* (*P. denitrificans*) zeigt der *low-spin*-Zustand der Ca²⁺-freien Form eine schmalere und intensivere Bande als der *high-spin*-Zustand nach Bindung von Ca²⁺ (vgl. Fig. 4 b, Gilmour *et al.*, 1993) (s. auch Kap. 4.4.3). Gleiches veranschaulicht auch das Spektrum des *low-potential* Häms (*high-spin*) der *P. aeruginosa* CCP verglichen mit dem *high-potential* Häm (*low-spin*) (vgl. Fig. 1, Ellfolk *et al.*, 1983).

Nimmt man jedoch – im Einklang mit einer Fe(II)-O₂-Form in RoxA vor der Ligandenzugabe – an, dass bereits eine vom Häzentrum stammende negative Ladung am Liganden-koordinierten Zentrum vorliegt, stellt sich eine andere Situation dar. Das Imidazol- oder Pyridin-ligierte Häzentrum kann möglicherweise weiter reduziert werden. Der Verlauf dieses Vorgangs bzw. das Schicksal des bereits vorhandenen Elektrons ist nicht bekannt. Die Erklärung der hohen Banden-Intensität der reduzierten, Liganden-koordinierten Form des N-terminalen Häzentrums ist vermutlich komplex, da in einer RoxA-Präparation vor Zugabe des Liganden nicht sämtliche RoxA-Moleküle in dieser Form vorliegen. Denn EPR-Spektren weisen darauf hin, dass ein kleiner Teil der RoxA-Moleküle Aminosäure-ligiert im Fe(III)-Zustand vorliegt und nach Ligandenbindung eine EPR-sichtbare Spezies mit verändertem g-Wert ausbildet (vgl. Kap. 4.9.2.2). Dieser Umstand, sowie CD-Spektren (s. Kap. 4.9.2.1) hatten jedoch gezeigt, dass eine Reaktion sämtlicher RoxA-Moleküle mit dem jeweiligen Hämliganden anzunehmen ist. Da die Fe(III)-Spezies nur einen kleinen Anteil der vorhandenen RoxA-Moleküle repräsentiert, muss der wesentliche Teil eine im EPR-Spektrum nicht sichtbare Fe(II)-Liganden-Koordination aufweisen. Diese ist für die im optischen Spektrum angezeigte Teilreduktion verantwortlich, vermutlich aber nicht die Fe(III)-Liganden-Spezies. Eine Erklärung der Bandenintensität nach Ligandenbindung in RoxA "as isolated" bzw. nach Reduktion dieses Zustandes müsste stets die Summe der Effekte dieser unterschiedlichen Spezies enthalten. Eine genaue Aussage wäre daher nur mit dem Wissen des Anteils der jeweiligen Spezies in einer RoxA-Präparation möglich. Die Beobachtungen aus der CD-Spektroskopie (s. Kap. 4.9.2.1) und die geringe Intensität der Fe(III)-Liganden-Spezies im EPR-Spektrum widersprechen aber einem hohen Anteil einer Fe(III)-Spezies in RoxA "as isolated". Dies entkräftet auch die Möglichkeit, dass sich die Intensität der Fe(II)-

Liganden-Spezies, die gegenüber einem tatsächlichen Fe(II)-Zustand vermutlich aufgrund einer Ladungsverschiebung geringer ausfällt, nach Zugabe von Reduktionsmitteln nicht verändern und die festzustellende Mehr-Absorption auf einen höheren Absorptionskoeffizienten eines Fe(III)-Liganden-Zustandes (s. o.) zurückgehen könnte. Zur Vereinfachung kann man sich daher auf die Erklärung einer höheren Absorption eines Fe(II)-Liganden-Zustandes nach dessen Reduktion beschränken.

So könnte eine vom Fe(II)-Ion entlang der Ligandenbindung delokalisierte negative Ladung an den vormals O₂-ligierten RoxA-Molekülen eine Erklärung liefern. Dieser Zustand könnte eine weitere Reduktion des Fe-Ions ermöglichen, wenn die zwischen Häm-Fe und dem Liganden stabilisierte negative Ladung nunmehr am Hämliganden lokalisiert wäre. In diesem Fall wäre nach einer vollständigen Reduktion von RoxA durch Dithionit ein Liganden-Anion (Imidazolat-) am Hämzentrum gebunden.

Die Intensität der Imidazol-Effekte unterscheidet sich in keiner Weise bei An- oder Abwesenheit von Luftsauerstoff. Auch zeigen die optischen Spektren nach Zufuhr von O₂ eindeutig die Rückführung der Signalintensität von vollständig reduziertem, Imidazol- bzw. Pyridin-ligiertem RoxA auf das Niveau der Effekte vor der Reduktion unter Beibehaltung der Sechsfach-Koordination des N-terminalen Hämzentrums (vgl. Abb. 3.55). Da diese Ligandenkoordinierte Form noch eine aus einer vorherigen Fe(II)-O₂-Koordination stammende negative Ladung besitzt, müsste eine Fe(II)-Liganden-Spezies durch Zugabe von Dithionit eine (zusätzliche) Reduktion erfahren. Nach Reoxidation des Hämzentrums könnte das möglicherweise am Liganden-Anion befindliche Elektron wieder zum Fe(III)-Ion zurückkehren und sich die ursprüngliche Ladungsverteilung einstellen.

Angesichts der Tatsache, dass O₂ die vollständige Umkehrung einer Reduktion von RoxA "as isolated" bewirkt, zeigt die Rückführung auf die Signalintensität des Ligandenkoordinierten RoxA vor der Reduktion, dass O₂ offenbar nicht in der Lage ist, eine nach Reduktion bestehende Ligandenbindung aufzulösen. Diese Beobachtung unterstützt zudem, dass O₂ zur Latexspaltung am gleichen Hämzentrum gebunden wird wie externe Hämliganden welche die freie Bindestelle blockieren. Demnach ist die Bindungsstelle im reduzierten wie auch oxidierten Zustand vom Hämliganden besetzt und eine dauerhafte Bindung eines O₂-Moleküls findet bei Anwesenheit des externen Hämliganden nicht statt. Wie aber die Herstellung des vor der Reduktion präsenten Häm-ligierten Zustands infolge der Reoxidation durch Luftsauerstoff verlaufen könnte (vgl. Abb. 3.55), ist unklar. Denn für eine Oxidation durch Luftsauerstoff ist dessen Bindung am Hämzentrum notwendig, weshalb auch (Ferro)-Cytochrom *c*, welches sechsfach koordiniert vorliegt, nicht durch O₂ oxidiert wird (Wang, 1970). Weiterhin unklar ist auch die Reoxidation des C-terminalen Hämzentrums in RoxA "as isolated" (s. auch Kap. 4.11.1). Die ermittelte RoxA-Struktur, sowie die spektroskopischen Daten liefern keinen Hinweis auf einen Wechsel der sechsfachen Koordination des C-terminalen bis-His-Hämzentrums, so dass nach Bindung der externen

Hämliganden am N-terminalen Hämzentrum keine frei verfügbare Bindestelle für O₂ angenommen werden kann.

4.9.4.2 Reoxidation durch Oxidationsmittel

Die durch externe Hämliganden hervorgerufenen Veränderungen im UV-Vis-Spektrum ließen sich nicht durch O₂, jedoch durch die Zugabe von Oxidationsmitteln wie H₂O₂ oder Ferricyanid wieder allmählich umkehren. Diese können somit die vermutlich bei einem Großteil der RoxA-Moleküle nach Liganden-Bindung vorliegende negative Ladung aufnehmen, was zur Aufhebung der Dipoleigenschaften der Fe-N-Bindung führt. Dies weist darauf hin, dass der Vorgang der Reoxidation anders als mit O₂ verläuft. O₂ kann nur mit einer freien Bindestelle an reduziertem Häm-Fe reagieren, während H₂O₂ auch an oxidiertem Häm-Fe binden, ggf. auch mit gebundenen Liganden um die Bindung konkurrieren könnte. Im Falle von H₂O₂ muss die Verdrängung des Imidazols vom Häm-Fe und die Schädigung der Hämgruppe bedacht werden, da sich die Effekte bei An- und Abwesenheit von Hämliganden glichen und eine Abnahme der Hämabsorption eintrat (s. Abb. 3.56; Kap. 4.7). Dass Ferricyanid ungehindert in die Häm-Cavity gelangen könnte, ist fraglich, weshalb das Oxidationsmittel die negative Ladung durch eine indirekte Elektronenaufnahme kompensieren könnte. Es wurde ebenfalls eine Umkehr der spektralen Veränderungen erreicht, aber keine generelle Häm-Absorptionsabnahme wie mit H₂O₂ festgestellt. Darauf wiesen die Beobachtungen aus der UV-Vis-Spektroskopie hin, indem eine nur langsame Umkehr der reduktiven Effekte eintrat bis zum Erreichen eines Zustandes, der sich durch eine leichte "Abrundung" der Q-Banden unter geringem Absorptionsverlust auszeichnete (s. Abb. 3.34), in ähnlicher Weise wie nach Pyrogallol-Zugabe bzw. einer Sauerstoffentfernung. Dieser Zustand könnte im Einklang mit einer ursprünglichen O₂-Bindung als Desoxy-Fe(III)-Form beschrieben werden (s. Kap. 4.6.1).

Ein Überschuss an FeCy (1 mM) zu RoxA konnte die durch Pyridin oder Imidazol bewirkten Veränderungen vollständig beheben, deutlich langsamer (ÜN) jedoch auch ein geringer Überschuss an FeCy zum Häm in RoxA. Eine Reaktion des Ferricyanid mit den in Lösung im Überschuss vorliegenden Hämliganden lässt sich indessen ausschließen, da eine mehrstündige Inkubation von Ferricyanid mit einem Hämliganden vor Zugabe von RoxA die Entstehung dieser Effekte nicht verhinderte und auch Kontrollexperimente ohne RoxA keine signifikante Veränderung der FeCy-Absorption und damit auch keine Reduktion zu Ferrocyanid angezeigt hatten (s. Kap. 3.9.6.4.). Die Abstrahierung eines Elektrons vom freien Imidazol lässt sich danach ausschließen. Vielmehr muss eine Oxidation des betreffenden Hämzustandes in RoxA erfolgen. Darauf verweisen auch die in Bezug zur Ligandenkonzentration geringeren FeCy-Konzentrationen, mit denen eine langsame Behebung der Effekte erreicht wurde (s. Abb. 3.57, 3.58) und die geeignet sind, eine Reoxidation von reduziertem RoxA in schnellerer Weise zu erzielen. Möglicherweise verläuft

die Abstrahierung eines entlang der Fe-Liganden-Bindung stabilisierten Elektrons nur langsam, da dieser Zustand nicht mit einem tatsächlichen Fe(II)-Zustand gleichzusetzen ist. Weniger bereitwillig könnte demnach ein Elektron von einem Fe(II)-O₂ \leftrightarrow Fe(III)-O₂^{•-}-Zustand abgezogen werden. Denn die beschriebene "Abrundung" der Q-Banden durch Absorptionsabnahme bei etwa 539 nm und 572 nm, die sich auch nach Reoxidation (FeCy) der Liganden-kooordinierten Zustände einstellte, war in RoxA "as isolated" erst nach langer Inkubation (ÜN) mit einem FeCy-Überschuss zu RoxA sichtbar.

Diese Veränderungen beschreiben vermutlich einen desoxygenierten Fe(III)-Zustand (s. Kap. 4.6.1). In diesem Fall dürfte nach Entfernung dieses Elektrons vom N-terminalen Hämzentrum, beispielsweise durch FeCy-Zugabe, die anschließende Zugabe eines Hämliganden keine reduktions-typischen spektralen Veränderungen mehr hervorrufen. Ein entsprechender Versuchsansatz deutet bereits auf die Richtigkeit dieser Annahme hin. Denn die Zugabe von Pyridin zu einer über Nacht mit Ferricyanid anaerob inkubierten RoxA-Probe hatte deutlich geringere Veränderungen bewirkt als bei RoxA "as isolated" oder bei gleichzeitiger Zugabe von FeCy und Pyridin (s. Kap. 3.9.6.4). Die Durchführung weiterer, einfacher Experimente kann Klarheit schaffen, ob tatsächlich eine Ladungsverschiebung von Fe(II) zum Liganden und nicht umgekehrt erfolgt. Wird eine RoxA-Probe unter Sauerstoffausschluss vollständig reduziert und anschließend mit stöchiometrischer Menge Ferricyanid reoxidiert, sollte dies im Falle einer O₂-Bindung in RoxA "as isolated" zum Lösen der O₂-Koordination führen und Fe(III) zurücklassen, was anhand der beschriebenen "Abrundung" der Q-Banden erkennbar wäre. Alternativ bietet sich ein Experiment mit Pyrogallol unter Sauerstoffausschluss an, da dies zu vergleichbaren spektralen Veränderungen geführt hatte. Führt nach Entfernung der zugesetzten Substanzen aus dem Puffer das Hinzufügen eines externen Hämliganden nun nicht mehr zur Teilreduktion im optischen Spektrum, bewiese dies indirekt eine Ladungsverschiebung von Fe(II) zum Liganden und weiterhin die in Kap. 4.6 postulierte O₂-Bindung an gleicher Bindestelle in RoxA "as isolated", die über eine negative Ladung verfügt, aber deren optisches Spektrum einen oxidierten Zustand anzeigt. Weiterhin würde dies die Verwirklichung einer ungewöhnlich stabilen O₂-Bindung gegenüber einer spontanen Autoxidation in RoxA "as isolated" bedeuten (s. auch Kap. 4.11.2).

Auch EPR-Experimente können zur Klärung dieser Umstände hilfreich sein. EPR-Spektren deuteten zunächst auf eine Ablösung des gebundenen Imidazols vom Hämzentrum hin, indem ein *low-spin*-Signal bei $g=3,57$ infolge der Imidazol-Zugabe abgeschwächt und verbreitert erschien, aber nach Zugabe von Ferricyanid wieder deutlich zunahm (s. Abb. 3.91). Das neu entstehende Signal entsprach jedoch nicht dem ursprünglichen, sondern war weiterhin verbreitert und etwas intensiver (s. Abb. 3.91). Dass es sich nicht um das ursprüngliche Signal bei $g=3,57$ handeln konnte, zeigte ein Versuch mit Pyridin, indem sich das für Pyridin typische, intensitätsgleiche Signal bei $g=3,33$ nach FeCy-Zugabe nicht wieder nach $g=3,57$ veränderte, sondern an Intensität zunahm (s. Kap. 3.11.5). Es muss daher angenommen werden, dass die Hämliganden auch nach Inkubation mit Ferricyanid weiterhin

gebunden waren. Dies erklärt auch, warum nach Oxidation durch Ferricyanid-Zugabe keine *high-spin*-Signale entstanden waren (s. Abb. 3.91). Die wichtigste Erkenntnis aus diesen Beobachtungen aber ist, dass während der Inkubation mit Ferricyanid eine Pyridin- bzw. Imidazol-koordinierte *Fe(III)*-Spezies zunimmt, im Einklang mit der Aufhebung einer Teilreduktion im optischen Spektrum von Liganden-koordiniertem RoxA. Unter Gewährleistung einer vollständigen Reoxidation kann dieses Experiment letztendlich indirekt beweisen, dass ein der neu entstandenen *Fe(III)*-Spezies entsprechender Anteil der Signale des N-terminalen Hämzentrums im EPR-Spektrum von RoxA "as isolated" fehlt. Dieser Umstand bewiese schließlich im Umkehrschluss die Existenz der oben beschriebenen, vermutlich aus einer O₂-Koordination entstehenden, EPR-unsichtbaren *Fe(II)*-Hämliganden-Spezies.

4.10 Der Ort der Latexspaltung ist das N-terminale Hämzentrum

Die Untersuchungen mit externen Hämliganden hatten deutlich gezeigt, dass ein Zugang zum N-terminalen Hämzentrum in RoxA "as isolated" ohne eine dafür notwendige Konformationsänderung möglich ist. Die Zugabe des RoxA-Substrates Poly(*cis*-1,4-isopren) rief jedoch keine vergleichbaren Veränderungen hervor. Insbesondere nach längerer Inkubationszeit unter Sauerstoffausschluss waren dennoch Veränderungen im EPR-Spektrum erkennbar, welche die Annahme einer Lokalisierung des Substrates in der unmittelbaren Umgebung des N-terminalen Hämzentrums rechtfertigen, eine direkte Hämbindung wie im Falle externer Hämliganden aber klar ausschließen.

Letzteres wird daran deutlich, dass *high-spin*-Signale bei Anwesenheit von Substraten bestehen bleiben, im Gegensatz zu deren vollständiger Abnahme durch externe Hämliganden. Auch nach vollständiger Reduktion einer RoxA-Probe in Gegenwart von Latex oder substratähnlicher niedermolekularer Verbindungen wie β -Carotin, α -Tocopherol, Squalen oder Pristan entstehen nach Reoxidation *high-spin*-Spezies in mindestens ebenso starker Weise wie mit RoxA ohne Substrate (vgl. Abb. 3.101 – 3.104). Gleichwohl beeinflussen diese Substanzen *low-spin*-Signale, die vom gleichen Hämzentrum stammen. Auch mit RoxA aus Latexkultur änderte sich ein bestehendes *low-spin*-Signal bei $g=3,39$ nach Inkubation mit Latex bzw. nach Zugabe von α -Tocopherol im g -Wert nach $g=3,33$ (z. B. Abb. 3.95), ebenso nach Latexzugabe (Abb. 3.96; 3.97). Die Signale des C-terminalen, bis-His-Hämzentrums hatten sich dabei weitgehend unverändert gezeigt. Dies belegt die Beeinflussung ausschließlich der Signale des N-terminalen Hämzentrums nach Substratbindung. Die Änderung des g -Wertes lässt auf eine Beeinflussung der Ligandenposition oder nahestehender Aminosäurereste schließen, die vermutlich durch Lokalisierung des Substrates in der nahen Umgebung der sechsten Koordinationsstelle ausgelöst worden ist. Diese Befunde widersprechen einer direkten Bindung der Substrate am N-terminalen Hämzentrum und legen gleichermaßen eine räumliche Nähe zur sechsten Koordinationsstelle nahe. Denn nach

Reduktion und Reoxidation bei Abwesenheit von Substraten tritt gewöhnlich eine *low-spin*-Spezies bei $g=3,57$ stärker in Erscheinung als im Spektrum von RoxA "as isolated" (s. Abb. 3.81), während diese in Gegenwart eines Substrates eher an Intensität verlor bzw. sich leicht im g -Wert änderte (vgl. z. B. Abb. 3.102; 3.110). Die Ausbildung einer Aminosäure-Koordination ist offenbar nach Bindung des Substrates erschwert, woraus auf eine sterische Hinderung durch räumliche Nähe des Substrates geschlossen werden kann.

Im Besonderen aber ergeben sich diese Schlussfolgerungen aus der Entstehung einer zuvor meist fehlenden rhombischen *low-spin*-Spezies mit den g -Werten $g_z=2,62$, $g_y=2,16$ und $g_x=1,86$. Diese trat mit allen untersuchten substratähnlichen Stoffen auf (Abb. 3.94, 3.95; 3.101 – 3.104). Mit Poly(*cis*-1,4-isopren) selbst entstanden diese Signale nicht oder in einer deutlich weniger ausgeprägten Weise, zeigten sich am ehesten mit RoxA aus Latexkultur in Gegenwart von Latex (s. Kap. 3.11.7) (Abb. 3.96; 3.97). Diese neue Hämspezies kann mit hoher Wahrscheinlichkeit einer His-Fe(III)-OH⁻-Koordination zugewiesen werden (s. Kap. 4.5). Sie beschreibt einen weiteren, von Substraten beeinflussten Zustand des N-terminalen Hämzentrums, von welchem auch die *high-spin*-Signale bei $g=6$ und die *low-spin*-Komponenten bei $g=3,57$ (rek. RoxA) bzw. $g=3,39$ (Latexkultur) herrühren. Darauf weisen parallel zu beobachtende Veränderungen hin, während eine weitere, vom zweiten Hämzentrum stammende *low-spin*-Spezies mit g -Werten bei $g=3,09$ und $2,23$ unverändert blieb.

Der Ursprung der Signalintensität bei $g=2,62$, $2,16$ und $1,86$ lässt sich anhand der vorliegenden Spektren von RoxA "as isolated" in Gegenwart von Substratanaloga nicht mit Sicherheit bestimmen. Die hohe Intensität der Signale lässt jedoch fraglich erscheinen, ob diese Spezies aus einer sichtbaren Fe(III)-Spezies eines der Hämzentren entstanden sein könnte. Das Auftreten "zusätzlicher" EPR-Intensität dieser Spezies wurde besonders deutlich durch β -Carotin-Zugabe *nach* Reduktion und Reoxidation (Abb. 3.102). Wie bereits in Kap. 4.6.1 diskutiert könnten diese neu auftretenden Signale aus einer vorherigen, EPR-unsichtbaren Fe(II)-O₂-Koordination nach Entfernung des O₂ und Bindung eines H₂O-Moleküls entstehen. Im Einklang damit steht das Auftreten dieser Spezies auch bei Abwesenheit von Substraten unter Bedingungen, die einen Wechsel dieser Koordination ermöglichen, wie die Inkubation nach Sauerstoffentfernung oder einer partiellen Reduktion (NADH/PMS) unter anaeroben Bedingungen (Abb. 3.86). Auffälligerweise war dies ausschließlich mit RoxA aus Latexkultur der Fall, welches bereits vor der Enzymreinigung aus dem Latex-Kulturüberstand Kautschukmoleküle gebunden und gespalten haben muss. Nur bei diesem traten bisweilen bereits im "as isolated"-Zustand diese Hämsignale auf. Bei rekombinantem RoxA dagegen konnte diese *low-spin*-Spezies nur in Anwesenheit von Latex oder ähnlichen Verbindungen beobachtet werden. Dies stellt einen wichtigen Hinweis dar, dass zumindest bei einem Teil der RoxA-Moleküle aus Latexkultur präparationsabhängig noch Polymerfragmente gebunden sein könnten oder aber nach der Latexspaltung bestimmte konformelle Unterschiede im Bereich der entsprechenden Koordinationsstelle bestehen

könnten. Es ist zu bedenken, dass diese RoxA-Moleküle im Kristallisationsversuch möglicherweise keine für eine Strukturaufklärung nutzbaren Kristalle liefern. Das offenbar Substrat-abhängige Auftreten der His-Fe-OH⁻-Spezies verweist gleichzeitig auf eine entscheidende Rolle dieser Substrate bei deren Entstehung (bei pH 7).

Bei der Indolamin-2,3-Dioxygenase, bei der das Substrat L-Trp ebenso wie wahrscheinlich Latex bei RoxA in der Nähe, aber nicht direkt am Hämzentrum bindet, entsteht nach dessen Bindung eine neue EPR-Spezies bei $g=2,53$, $g=2,18$, $g=1,86$, die eine His-Fe-OH⁻-Form des Hämzentrums repräsentiert (Sono & Dawson, 1984). Dabei bewirkt L-Trp über die Indol-NH-Gruppe eine partielle Deprotonierung des H₂O-Liganden zum Hydroxid (Terentis 2002; Batabyal & Yeh, 2009). Ob ein ähnlicher Mechanismus bei RoxA in Betracht kommt, ist aufgrund des deutlichen Unterschieds zwischen beiden Substraten fraglich.

Liegt vor Kontakt mit Polyisopren eine O₂-Koordination vor, müsste dafür zunächst ein Austausch gegen ein H₂O-Molekül erfolgen. Bei dieser Fragestellung hilft eine Betrachtung der Spektren nach Reduktion und anschließender Reoxidation in Gegenwart von substratähnlichen Verbindungen weiter (s. u.). Angesichts einer möglichen Entstehung dieser neuen *low-spin*-Spezies aus einer EPR-unsichtbaren Fe(II)-O₂-Koordination bei Anwesenheit von Substrat-ähnlichen Verbindungen soll zunächst die Möglichkeit angesprochen werden, dass diese Spezies direkt aus dem koordinierten O₂ infolge einer Reaktion mit einer substratähnlichen Verbindung hervorgehen könnte. Wenn diese mit einem koordinierten O₂-Molekül interagieren und mit dem Häm-Fe über eine Sauerstoff-Spezies in Verbindung stehen würde, ohne aber weiter reagieren zu können, müsste dieser Zustand stabil sein und elektronische Eigenschaften ähnlich einer OH⁻-Koordination aufweisen, um die damit übereinstimmenden g -Werte zu erklären. Für *low-spin*-Fe(III)-Peroxid-Komplexe sind beispielsweise Signale bei $g \approx 2,3$, $2,2$ und $1,94$ (Balagopalakrishna *et al.*, 1996) bzw. Fe(III)-OOH *low-spin*-Spezies mit $g=2,26$, $g=2,17$, $g=1,94$ (Girerd *et al.*, 2000) beschrieben. Die g -Werte der *low-spin*-Spezies bei $g=2,62$, $g=2,16$, $g=1,86$ entsprechen aber deutlich eher einer OH⁻-Koordination. Auch tritt solchen Spekulationen entgegen, dass nach Reoxidation einer reduzierten RoxA-Probe in Anwesenheit von Substrat-Analoga ebenso starke *high-spin*-Signale neu auftraten wie mit RoxA "as isolated", ohne dass andere Signale sichtbar an Intensität verloren. Dies widerspräche der Annahme, dass ein gebundenes substratähnliches Molekül mit einer zuvor nicht sichtbaren O₂-Koordination zu einer *low-spin*-Spezies bei $g=2,62$, $2,16$, $1,86$ reagierte. Als wahrscheinlich kann die Zuordnung dieser Signale zu einer His-Fe(III)-OH⁻-Koordination gelten (s. Kap. 4.5). Da auch RoxA "as isolated" bei gleichem pH-Wert (pH 7) nach Reoxidation ein ebenso deutliches *high-spin*-Signal, aber keine Spezies bei $g=2,62$, $2,16$, $1,86$ entstanden war, begünstigt offenbar die Anwesenheit der Substrat-ähnlichen Substanzen die Deprotonierung von Häm-koordiniertem H₂O, so dass an diesem Hämzentrum ein zur *low-spin*-Hydroxy-Form verschobenes *high-spin/low-spin*-Gleichgewicht einer H₂O/OH⁻-Koordination vorliegt. Dies ist ein weiteres Indiz für die

räumliche Nähe der Substrate. Diese Spezies entstand mit allen bisher untersuchten methylverzweigten Kohlenwasserstoffen mit Strukturähnlichkeit zu Poly(*cis*-1,4-isopren) unabhängig von der Präsenz von π -Doppelbindungen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher jedoch unklar.

Eine H₂O-Ligation im Grundzustand von RoxA "as isolated" vor der Substratzugabe käme aber nur bei einem vermutlich geringen Teil der Moleküle infrage, da zahlreiche Hinweise auf eine Fe(II)-O₂-Koordination existieren (s. dazu Kap. 4.6; Kap. 4.11.2). Denn auch bei neutralem pH sollte sich eine H₂O-Koordination theoretisch in einem vom Protonierungszustand abhängigen Gleichgewicht zwischen *high*- und *low-spin*-Zustand befinden. Bei rekombinantem RoxA war jedoch stets nur ein schwaches *high-spin*-Signal bei $g=6$ (z. B. Abb. 3.79, 3.80) und selbst bei pH 8 keine für die deprotonierte Form typische, rhombische *low-spin*-Spezies ($g=2,62, 2,16, 1,86$) zu sehen. Gegen eine nennenswerte H₂O-Bindung im Grundzustand von RoxA spricht im Einklang mit einer O₂-Bindung, dass im UV-Vis-Spektrum von RoxA "as isolated" kein *high-spin*-Signal zu sehen ist wie z. B. beim H₂O-ligierten P-Häm der *N. europaea* CCP ("as isolated") (vgl. Kap. 4.8). Dass sich nach Zugabe der substratähnlichen Verbindungen ein bestehendes *high-spin*-Signal nicht veränderte, spricht gegen eine Zuordnung des Signals bei $g\approx 5,95$ zu einer H₂O-Koordination, die mit der neu entstandenen *low-spin*-OH⁻-Spezies im Gleichgewicht stünde. Andernfalls müssten diese Substanzen bei einem (der *high-spin*-Spezies entsprechenden) Anteil der RoxA-Moleküle keinen Zugang zum Hämzentrum haben. Aufgrund der hohen Intensität des *high-spin*-Zustandes nach Reduktion und anschließender Reoxidation, aber der stark hemmenden Wirkung von β -Carotin und α -Tocopherol (s. Tab. 3.2), kann dies als unwahrscheinlich erachtet werden. Stattdessen könnte die Bindestelle unkoordiniert vorliegen. Die Bindung eines H₂O-Moleküls nach Entfernung gebundenen Disauerstoffs infolge einer Reduktion (s. Kap. 4.8) könnte auch aufgrund der unpolaren Hämumgebung (s. Kap. 4.11.3) und gleichzeitiger Anwesenheit eines Substratmoleküls in der Häm-Cavity erschwert sein. Mit dieser Überlegung deckt sich auch die Beobachtung, dass eine in Gegenwart eines Substrat-Analogons entstehende *low-spin*-Spezies bei $g=2,62, 2,16, 1,86$, nach Reduktion und Reoxidation erneut in etwa der gleichen Intensität auftrat, wie sie vor der Reduktion bestand (vgl. Abb. 3.101, Abb. 3.104), zusätzlich aber auch ein intensives *high-spin*-Signal bei $g\approx 5,95$, das zuvor fehlte. Anhand quantitativer Signalbestimmungen lässt sich entscheiden, ob die auftretende Signalintensität der vermuteten Fe(III)-OH⁻-Spezies nur bei einem Teil der zuvor O₂-ligierten RoxA-Moleküle nach Bindung eines H₂O-Moleküls eintreten würde oder aber deren Intensität aus einer anderen, im "as isolated"-Spektrum sichtbaren *low-spin*-Spezies entstammen könnte. Die Intensitätsgleichheit der *low-spin*-Hydroxid-Signale könnte damit zusammen hängen, dass die bereits vor der Reduktion erfolgte Lokalisierung des Substrat-Analogons in der Hämumgebung die Bindung eines H₂O-Moleküls an einer frei werdenden Bindestelle verhindert und eine OH⁻-Spezies nach Reoxidation nur an solchen Zentren erneut sichtbar werden kann, an denen sich auch vor der Reduktion ein H₂O bzw.

OH^- befand. Der Unterschied einer Zugabe des Substrat-Analogons erst nach der Reoxidation wurde bisher nicht hinreichend untersucht. Ein Versuchsansatz, bei dem die Zugabe von β -Carotin zu einem Zeitpunkt erfolgt war, an welchem noch zwei unterscheidbare *high-spin*-Signale bei $g=6,14$ und $5,95$ bestanden, zeigte aber eine insgesamt bzw. im Verhältnis zu *high-spin*-Signalen intensivere Hydroxid-Spezies als sie nach Addition von β -Carotin zu RoxA "as isolated" oder nach Reduktion/Oxidation eines solchen Ansatzes erhalten wurde (s. Abb. 3.102). Unter der Annahme, dass bei Abwesenheit von β -Carotin die Koordination eines H_2O -Moleküls nach Entfernung gebundenen Disauerstoffs nach Reduktion/Oxidation möglich ist, erschien diese Beobachtung nachvollziehbar. Die Betrachtung des in Abb. 3.102 dargestellten Spektrums lässt gar die Vermutung aufkommen, dass das *high-spin*-Signal bei $g=6,14$ eine wenig stabile H_2O -Koordination repräsentieren könnte, die sich bei Anwesenheit von Substrat-Analoga zu einer *low-spin*- OH^- -Spezies umwandeln, sich bei RoxA "as isolated" aber möglicherweise zugunsten einer Zunahme des $g=5,95$ -Signals auflösen könnte. Beim gegenwärtigen Kenntnisstand bleibt dies rein spekulativ, zumal noch andere Möglichkeiten der Entstehung mehrerer *high-spin*-Signale existieren (s. Kap. 4.8).

Nach einer Dithionit-Reduktion in Anwesenheit von Latex fielen zwei Radikalsignale bei $g \approx 2,032$ – $2,035$ und $g \approx 2,005$ auf, von denen ersteres nur zeitweise auftrat (s. Kap. 3.11.9; Abb. 3.105). Denkbar wäre der Ursprung von frei vorliegendem oder gebundenem Polyisopren nach Reaktion mit Dithionit. Diese g -Werte ähneln auch denen eines Trp-Kation-Radikals ("Compound I") bei $g=2,037$, $g=2,006$ bzw. $2,004$ (Barrows & Poulos, 2005; Lee *et al.*, 2008). Da dieser Zustand bisher nur nach Dithionit-Reduktion beobachtet wurde, könnte dieser durch überschüssiges Dithionit hervorgerufen werden und nicht physiologisch relevant sein. Nicht ausschließen kann man die Möglichkeit, dass ein solcher dennoch als Teil des Spaltungsmechanismus auftritt, aber nur kurzlebig und somit für eine Detektion im EPR-Spektrum nicht stabil genug ist.

Zum vollständigen Verständnis dieser Resultate sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Bestimmung des Hämanteils, der sich in den einzelnen Signalen wiederfindet, könnte bereits viele Unklarheiten ausräumen. Um eine Häm-kooordinierte Sauerstoffspezies zu bestimmen, eignet sich die Resonanz-Raman-Spektroskopie, mit deren Hilfe sich verschiedene koordinierte O-Spezies unterscheiden lassen. Die wichtigste Schlussfolgerung, die sich mit einiger Sicherheit aus den geschilderten spektralen Veränderungen ziehen lässt, ist die Lokalisierung von Poly(*cis*-1,4-isopren) bzw. der substratähnlichen Verbindungen in der nahen Umgebung der sechsten Koordinationsstelle gegenüber des proximalen His_{195} , in einer Weise, die den Kontakt zu einem Häm-kooordinierten kleinen Molekül wie H_2O oder O_2 ermöglicht, nicht aber direkt am Häm-Fe. Weitere Beobachtungen untermauern diese Interpretation. Dazu zählt die signifikante Zunahme eines *high-spin*-Signals bei $g \approx 6$ in Gegenwart von Latex, jedoch nur unter Sauerstoffausschluss (s. Abb. 3.99). Diese Zunahme zeigt nicht nur das Freiwerden einer Koordinationsstelle am N-terminalen Hämzentrum, das

somit als katalytisches Zentrum in Betracht kommt, sondern auch, dass diese Hämpezies nur entsteht, wenn Sauerstoff nicht mehr nachgeliefert werden kann. Denn weder die Inkubation mit Latex unter aeroben Bedingungen, noch die anaerobe Exposition ohne Latex hatten im betrachteten Zeitraum einen vergleichbaren Effekt. Gleichzeitig weist dieser Befund, sowie die Zunahme der *high-spin*-Spezies ohne sichtbare Abnahme bestehender *low-spin*-Signale, auf eine ursprüngliche, EPR-unsichtbare O₂-Koordination hin. Bei Abwesenheit von Sauerstoff und nach Verbrauch des gebundenen und möglicherweise noch gelösten Restsauerstoffs im Zuge der Polyisoprenspaltung würde somit eine fünffach koordinierte *high-spin*-Spezies bei $g \approx 5,95$ entstehen. Weiterhin wird diese Schlussfolgerung dadurch gestützt, dass die Zugabe des O₂-abfangenden Pyrogallols unter anaeroben Bedingungen eine weitere Steigerung der *high-spin*-Signalintensität zur Folge hatte (s. Abb. 3.100). Entsprechende Annahmen, die auf der Grundlage weiterer EPR-Spektren und der UV-Vis-Spektroskopie gemacht wurden (s. Kap. 4.6.1) finden sich damit bestätigt.

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen kann mit großer Sicherheit angenommen werden, dass die Latexspaltung am N-terminalen Hämzentrum stattfindet. Die Versuchsergebnisse liefern wichtige Hinweise auf eine O₂-Bindung an der sechsten Hämbindestelle und zweifelsfrei auf die Lokalisierung von Poly(*cis*-1,4-isopren) oder strukturähnlicher niedermolekularer Substanzen in der direkten Nähe dieser Bindestelle. Darauf verweist auch nachdrücklich der erschwerte Zugang externer N-heterozyklischer Hämliganden wie Imidazol zur entsprechenden Koordinationsstelle nach Bindung von Latex (s. Kap. 3.11.10, vgl. Abb. 3.111). Denn ein in Gegenwart von Latex bestehendes *high-spin*-Signal blieb nach Zugabe eines Hämliganden noch innerhalb eines Zeitraums größtenteils erhalten, in welchem das *high-spin* vollständig verloren ging, wenn das RoxA-Substrat fehlte.

Teil IV Reaktionsmechanismus und Ausblick

4.11 Mechanismus der Kautschukspaltung durch RoxA

4.11.1 Ergebnis-basierte Überlegungen zum Reaktionsmechanismus

Die durchgeführte spektroskopische Untersuchung von RoxA "as isolated" liefert wichtige Erkenntnisse, die zum Verständnis dieses ungewöhnlichen, Kautschuk spaltenden Enzyms beitragen. Gleichwohl bleiben noch viele Fragen offen, die beantwortet werden müssen, um den biochemischen Mechanismus der Spaltungsreaktion aufzulösen. Im Folgenden sollen wichtige, im Rahmen dieser Arbeit gewonnene Schlussfolgerungen auf die Latex-Spaltungsreaktion angewendet und ein möglicher Verlauf vorgeschlagen werden. Zur Vereinfachung sollen an dieser Stelle im Wesentlichen die EPR-Spektren von rekombinantem RoxA herangezogen werden, da diese eine hohe Konstanz zwischen verschiedenen

Präparationen aufwiesen. Der offenbar zu einer homogeneren RoxA-Population beitragende kurze Expressionszeitraum und der fehlende Kontakt zur Kautschuklatex vor der Enzymreinigung machen diese Präparationen zu einem geeigneten Material, um den Grundzustand des Latex spaltenden Enzyms zu studieren.

Um eine fundierte Hypothese aufstellen zu können, ist es von großem Vorteil, über die Kristallstruktur von RoxA verfügen zu können. Diese konnte in Kooperation mit der AG O. Einsle (Freiburg) bis zu einer Auflösung von 1,8 Å gelöst werden (unveröffentlichte Ergebnisse), wobei sich die ermittelten Strukturen von RoxA aus Latexkultur und von rekombinantem RoxA, ebenso solchem nach Reduktion gleichen (mündl. Mitteilung O. Einsle). Die EPR-Spektren zeigen Signale eines konstant sechsfach koordinierten *low-spin*-Hämzentrums und eines sowohl *low-* als auch *high-spin*-Signale liefernden Häms. Sie entsprechen damit den Erwartungen aus der ermittelten RoxA-Struktur. Diese zeigt das C-terminale Hämzentrum bis-His-koordiniert, das N-terminale Häm His-Fe-"O" -koordiniert, wobei das koordinierte Sauerstoffatom anhand der Strukturdaten entweder zu einem H₂O- oder O₂-Molekül gehören könnte. Es ist anzunehmen, dass die *high-* und *low-spin*-Signale, die in rekombinantem RoxA "as isolated" kaum zu sehen waren und sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen veränderten, von diesem Hämzentrum stammen. Dazu zählen u. a. *high-spin*-Signale bei $g_z \approx 5,95$ – $6,0$, sowie eine *low-spin*-Spezies bei $g_z = 2,62$, $g_y = 2,16$, $g_x = 1,86$. Die konstant auftretenden *low-spin*-Signale bei $g_z = 3,09$ und $g_y = 2,23$ machen einen Großteil der EPR-Intensität im Spektrum von isoliertem RoxA aus und erwiesen sich als weitgehend unabhängig von den Versuchsbedingungen. Sie können dem bis-His-koordinierten C-terminalen Hämzentrum zugeschrieben werden, da sich dessen Sechsfach-Koordination auch in der Kristallstruktur nach Reduktion beider Hämgruppen nicht veränderte (s. u.). Für die Hämgruppen in RoxA wurden zwei nahe zusammen liegende Redoxpotentiale von etwa $E_0 \approx -145$ mV und $E_0 \approx -65$ mV ermittelt. Zwei getrennte, jeweils von einer Hämgruppe stammende α -Banden bei 549 nm und 553 nm im optischen Spektrum von reduziertem RoxA ermöglichen die Unterscheidung der Redoxzustände beider Hämgruppen. Mit deren Hilfe lässt sich feststellen, dass die Reduktion und Reoxidation der Hämgruppen in RoxA nicht simultan verläuft, wie dies für MauG gezeigt wurde (Li *et al.*, 2006 b).

Die Bindung externer N-heterozyklischer Hämliganden wie Imidazol beeinflusste bei allen verwendeten spektroskopischen Methoden, sowohl im oxidierten wie reduzierten Zustand von RoxA, ausschließlich die Signale desjenigen Hämzentrums, von welchem die α -Bande bei 549 nm stammt. Da auch im zeitlichen Verlauf einer Reduktion diese α -Bande zuerst entstand, kann diesem Häm das etwas positivere Redoxpotential bei etwa -65 mV zugeschrieben werden. Anhand der Struktur lässt sich aussagen, dass es sich dabei um das N-terminale, mit einem "O"-Liganden auftretende Hämzentrum handelt. Denn nur an diesem ist eine Bindung externer Liganden oder Substrate vorstellbar, zumal sich die bis-His-Koordination an der C-terminalen Hämgruppe unter keinen Versuchsbedingungen änderte. Denn auch die Zugabe von Latex oder ähnlichen Verbindungen hatte nicht zu sichtbaren

Veränderungen der EPR-Signale dieses Häms geführt. Diese Ergebnisse schließen somit das C-terminale Hämzentrum als Ort der Latexspaltung aus. Daher muss es auch als unwahrscheinlich gelten, dass ein zeitweise auftretendes *high-spin*-Signal bei $g \approx 6,14$ von einem kurzlebigen fünffach koordinierten Zustand dieser Hämgruppe stammen könnte. Da es aber möglich ist, eine komplette Reoxidation beider Hämzentren in RoxA allein durch Exposition an Luft zu erreichen, kann folglich angenommen werden, dass die Reoxidation von vollständig reduziertem RoxA am wahrscheinlichsten durch O₂-Bindung an der freien Bindestelle des N-terminalen Hämzentrums verläuft. Infolgedessen könnte ein Elektron vom C-terminalen Häm möglicherweise über das zwischen beiden Hämzentren liegende Tryptophan abgezogen werden, da O₂ zur Aufnahme von zwei bzw. vier Elektronen fähig ist (s. auch Kap. 4.9.4.2).

Neben dem Ausschluss des bis-His-Hämzentrums erlauben die Ergebnisse gleichzeitig die Identifizierung des N-terminalen Hämzentrums als katalytisches Zentrum. Sie weisen auf die Notwendigkeit der Lokalisierung des polymeren Substrates in räumlicher Nähe zur freien Bindestelle hin und widerlegen eine direkte Bindung am Häm-Fe. So nehmen bestehende *high-spin*-Signale nicht an Intensität ab, unter Sauerstoffausschluss sogar deutlich zu (s. u.). Auch HALS (*highly anisotropic low-spin*)-Signale dieser Hämgruppe verändern sich in Gegenwart von Kautschuklatex oder substratähnlichen Verbindungen und es kommt mit letzteren zur Entstehung einer *low-spin*-Spezies bei $g_z=2,62$, $g_y=2,16$, $g_x=1,86$, die vermutlich von einer H₂O-Bindung nach Deprotonierung stammt (s. Kap. 4.5). Diese kann durch Zugabe von Wasserstoffperoxid eliminiert werden, was den freien Zugang kleiner Moleküle zur sechsten Koordinationsstelle belegt. Ähnliches bewirkt auch die Zugabe eines externen Hämliganden wie Pyridin, dessen Zugang zur Bindestelle jedoch bei Anwesenheit von Latex eingeschränkt zu sein scheint (Abb. 3.111). Umgekehrt kann die Latexspaltung nicht stattfinden, wenn die sechste Koordinationsstelle dieses Hämzentrums mit einem starken Liganden besetzt ist, worauf bereits Aktivitätstests hinwiesen (vgl. Tab. 5.1). Da bei gleichzeitiger Zugabe von Latex und eines externen Hämliganden eine von der Schnelligkeit der Reaktion mit dem Liganden abhängige Aktivitätsminderung eintritt (s. Kap. 4.9.3), lässt sich argumentieren, dass externe Hämliganden mit Latex in Konkurrenz um den Zugang zum katalytischen Hämzentrum stehen. Die Substratspaltung findet offenbar nicht statt, sobald die sechste Bindestelle belegt ist. Entsprechend hatten EPR-Messungen im Falle einer späteren Zugabe des Hämliganden zu Latex-gebundenem RoxA gezeigt, dass ein bestehendes *high-spin*-Signal durch Bindung der Substanzen nur sehr langsam zurückging, ganz im Gegensatz zur Situation bei Abwesenheit von Latex. Daher lässt sich die Umgebung der sechsten Koordinationsstelle am N-terminalen Hämzentrum als Ort der Latexspaltung annehmen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, auf welchem Wege die polymere Kautschuklatex das N-terminale *high-spin*-Hämzentrum erreicht. Die RoxA-Struktur veranschaulicht, dass die beiden Hämgruppen im Enzyminneren vorliegen und keinen

Kontakt zur Enzymoberfläche aufweisen. Daher kommt grundsätzlich zweierlei in Betracht. Eine Möglichkeit wäre die "Öffnung" des Enzyms mittels einer umfassenden Konformationsänderung, eine andere der Zugang zur Spaltungsstelle durch einen möglicherweise engen hydrophoben Kanal. Theoretisch könnte eine Konformationsänderung durch Elektronentransfer von einem an der RoxA-Oberfläche bindenden Substratmolekül zu einem Hämzentrum eingeleitet werden, wie es in ähnlicher Weise bei den meisten bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen nach Reduktion oder Substratzugabe geschieht. Beim Vergleich mit CCPs fällt der ungewöhnlich hohe Anteil aromatischer Aminosäuren (11,4 %), insbesondere Tryptophan-Resten (3,1 %) in RoxA auf (Tab. 4.2). Diese könnten bei einem solchen Elektronentransfer eine Rolle spielen indem sie Elektronentransportketten durch das Enzym ausbilden.

Tab. 4.2: Aromatische Aminosäuren (Phe, Trp, Tyr) im reifen RoxA und den strukturell verwandten Proteinen *P. aeruginosa* CCP (PAP), *N. europaea* CCP (NEP), *G. sulfurreducens* CCP und MauG aus *P. denitrificans* (mature). Der Anteil an Trp-, aber auch Tyr-Resten in RoxA (fett) übersteigt denjenigen von CCPs und MauG deutlich. n = Anzahl.

| Protein | Phe | | Trp | | Tyr | | gesamt % |
|-------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-------------|
| | n | % | n | % | n | % | |
| RoxA | 24 | 3,7 | 20 | 3,1 | 30 | 4,6 | 11,4 |
| PAP | 17 | 5,3 | 3 | 0,9 | 7 | 2,2 | 8,4 |
| NEP | 15 | 4,9 | 3 | 1,0 | 7 | 2,3 | 8,1 |
| CcpA | 17 | 5,3 | 3 | 0,9 | 8 | 2,5 | 8,7 |
| MauG | 18 | 4,9 | 3 | 0,8 | 11 | 3,0 | 8,7 |

Für eine solche oder auch eine andere Funktion der zahlreich vorhandenen Tryptophane und anderer Aromaten liegen bisher keine experimentellen Hinweise vor. Eine Aussage über eine mögliche Bedeutung für den Latex-Spaltungsmechanismus kann daher zur Zeit nicht getroffen werden. Künftige Mutagenese-Versuche sollen sich mit dieser Fragestellung befassen. Auch lieferte die spektroskopische Untersuchung keinerlei Hinweise auf eine eintretende Umlagerung in RoxA wie bei CCPs. Die Kristallstruktur von reduziertem RoxA entspricht derjenigen von RoxA "as isolated". Gegen eine Konformationsänderung spricht weiterhin der Austausch des koordinierenden Methionins gegen Histidin am C-terminalen Häm gegenüber CCPs. Bei diesen ist die initiale Reduktion dieses Zentrums mit dem deutlich höheren Redoxpotential ("mixed-valence state") für das Aufklappen des Loops verantwortlich, der das N-terminale P-Häm im oxidierten Zustand ("resting state") vom Medium trennt. Erst anschließend kann eine Bindung des Substrates H₂O₂ erfolgen. Bei RoxA liegt jedoch das etwas positivere Potential beim N-terminalen Hämzentrum, welches zuerst reduziert wird. Die Untersuchungen mit Hämliganden wie Imidazol zeigen, dass deren Bindung am N-terminalen Zentrum, dem Homolog zum P-Häm von Peroxidasen, im Zustand

von RoxA "as isolated" erfolgen kann. Dies gilt gleichermaßen für Latex-induziertes RoxA wie auch rekombinantes RoxA, welches zuvor noch keinen Kontakt zum Substrat hatte. Entsprechend der Funktion von RoxA wäre eine mögliche Öffnung des Enzyms aber nur bei Anwesenheit des Substrates sinnvoll. Dies zeigt, dass die entsprechende Bindestelle auch bei Abwesenheit von Latex für externe Liganden erreichbar ist und stellt ein weiteres Indiz gegen eine Umlagerung und im Umkehrschluss für einen hydrophoben Kanal dar. Dafür spricht im Besonderen, dass die Anwesenheit von Latex die Bindung externer Hämliganden erschwerte, obwohl dieses nicht direkt am Fe-Ion koordiniert ist. Am ehesten ist dies im Falle einer Blockierung eines Kanals durch einen Polymerstrang vorstellbar. Über einen möglichen Verlauf eines solchen Kanals kann derzeit aber nur spekuliert werden. Aufgrund der engen Raumverhältnisse könnte die Freisetzung der Spaltprodukte schwerlich an gleicher Stelle wie der Zugang des Substrates erfolgen, weshalb ein durchgehender Kanal mit einem Eingang für das Substratmolekül und einem Ausgang für die Spaltprodukte anzunehmen wäre. Ein solcher Kanal müsste sich plausiblerweise im Teil des Enzyms oberhalb der freien Bindestelle der katalytischen N-terminalen Hämgruppe befinden. Dieser Teil ist hinsichtlich der Oberflächenladungen hydrophober als derjenige Teil unterhalb der Hämgruppen (vgl. Fig. 56 in Hoffmann, 2007) und könnte damit die Voraussetzung für eine erleichterte Interaktion mit dem hydrophoben Substrat erfüllen (s. Abb. 4.5). Dieser Bereich fehlt zudem in CCPs, was als Argument für einen Zusammenhang mit der spezifischen Dioxygenase-Funktion von RoxA gelten kann.

Da die Lokalisierung des Substrates in der nahen Umgebung, nicht aber direkt am Häm-Fe angenommen werden kann, ist die Bindung und Aktivierung des für die Spaltungsreaktion notwendigen Disauerstoffs an der freien Bindestelle des katalytischen Hämzentrums naheliegend. O₂ kann aber nur an Fe(II), nicht aber Fe(III) binden. Daraus ergibt sich eine Kernfrage zur Lösung des Reaktionsmechanismus von RoxA. Liegt das Enzym vor der Latexzugabe vollständig oxidiert vor, ist zunächst eine Reduktion des katalytischen Hämzentrums erforderlich, um die Bindung von O₂ zu ermöglichen. Da für die Latexspaltung neben RoxA lediglich das Substrat und die Verfügbarkeit von O₂ notwendig sind, müsste das benötigte Elektron vom Substrat selbst stammen. Die bisher durchgeführte EPR-Untersuchung lieferte jedoch keine Bestätigung für einen möglichen Elektronentransfer vom Polymerstrang zu einem Fe(III)-Zentrum. Es wurden keine Hinweise auf ein entstehendes stabiles organisches (Substrat-)Radikal unter Sauerstoffausschluss erhalten. Entgegen einer früheren Interpretation (Schmitt *et al.*, 2010) weisen die EPR-Spektren bei Anwesenheit von Substraten darauf hin, dass ein Signal bei $g=2,16-2,17$ kein Substratradikal

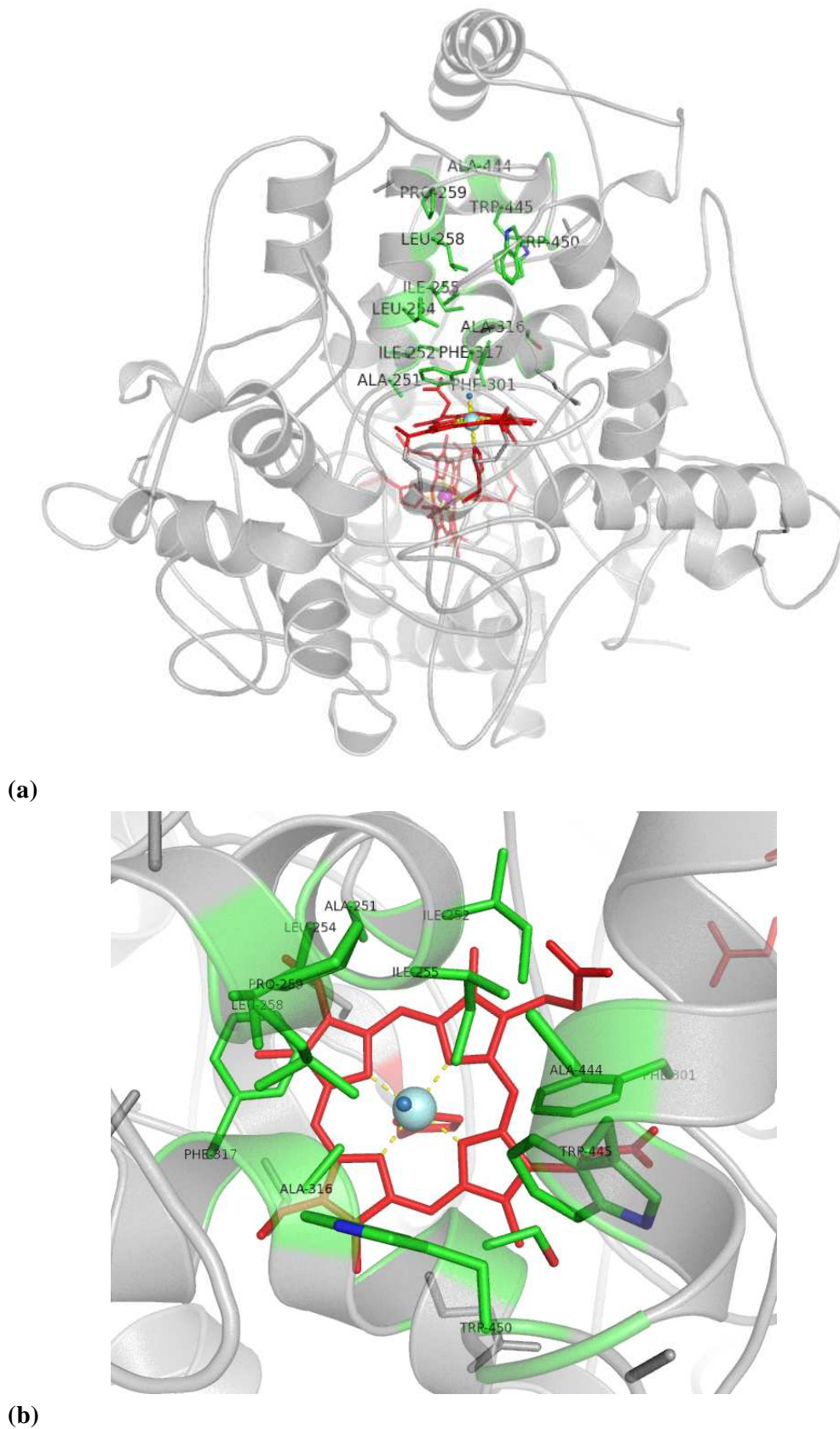


Abb. 4.5: Die Aminosäureumgebung oberhalb der distalen Bindestelle des N-terminalen Hämezenters (rot) in RoxA. (a) Ein möglicher Verlauf eines hydrophoben Kanals in Seitenansicht, (b) Aufsicht auf die distale, von einem "O"-Liganden (O_2 oder H_2O , blau) koordinierte Bindestelle. In dieser Region sind fast ausschließlich hydrophobe Reste zueinander orientiert (C=grün, N=blau, O=rot), die einen hydrophoben Kanal bilden könnten, durch den Poly(*cis*-1,4-isopren) zum Reaktionszentrum gelangt (s. auch Abb. 4.6).

darstellt, sondern Teil (g_y) einer neuen rhombischen *low-spin*-Hämspezies ist (s. Kap. 4.5). Ebenso konnte generell keine signifikante Abnahme bestehender *low-spin*-Signale durch die Anwesenheit des Substrates unter anaeroben Bedingungen festgestellt werden, die infolge einer Reduktion zu erwarten wäre. Da entsprechende Zustände kurzlebig und somit im EPR-Spektrum nicht erkennbar sein könnten, widerlegen diese Beobachtungen nicht zwangsläufig die Möglichkeit eines Elektronentransfers vom Substrat, unterstützen jedoch eine weitere Hypothese, die auf der Grundlage verschiedener Beobachtungen aus der Spektroskopie aufgestellt werden kann. Diese schlägt die Bindung eines O_2 -Moleküls am katalytischen Hämzentrum im Grundzustand von RoxA, also bereits vor der Substratzugabe vor.

4.11.2 Ein oxygeniertes Hämzentrum als Startpunkt der Kautschukspaltung?

Mit der Annahme eines am N-terminalen Hämzentrum koordinierten O_2 -Moleküls stehen Beobachtungen aus der EPR-Spektroskopie im Einklang, wonach von diesem Hämzentrum stammende *high*- und *low-spin*-Signale nach Reduktion und anschließender Reoxidation (z. B. Abb. 3.81; 3.83) deutlich in ihrer Intensität zunahmten oder neu entstanden (s. auch Kap. 4.8). Gleiches gilt für die starke Zunahme eines *high-spin*-Signals nach längerer Inkubation unter Sauerstoffausschluss (N_2) und in Gegenwart von Latex oder Pyrogallol (Abb. 3.99, Abb. 3.100). Dies würde gleichzeitig erklären, warum gegenüber dem Spektrum von RoxA "as isolated" neue EPR-Intensität entstand, während die im Ursprungsspektrum vorherrschende *low-spin*-Spezies bei $g_z=3,09$ und $g_y=2,23$ nicht nennenswert abnahm. Denn das EPR-Spektrum von (rekombinantem) RoxA "as isolated" wird im Wesentlichen von letztgenannter Hämspezies bestimmt, die von der bis-His-Koordination der C-terminalen Hämgruppe stammt. Signale, die der N-terminalen Hämgruppe zugewiesen werden können, machen gewöhnlich nur einen geringen Anteil an der Gesamt-EPR-Intensität aus (vgl. Abb. 4.3). Desweiteren sind unter Bedingungen, die eine O_2 -Häm-Koordination entfernen können, übereinstimmende Veränderungen der Q-Banden im optischen Spektrum (s. Kap. 4.6.1) zu beobachten: Die Anwesenheit von Oxidationsmitteln wie H_2O_2 oder Ferricyanid, die Behandlung mit dem O_2 entziehenden Pyrogallol oder bereits die fortgeschrittene Exposition einer RoxA-Probe unter N_2 -Atmosphäre bzw. geringem Sauerstoffpartialdruck führen in der Regel zu einer leichten Absorptionsabnahme der Q-Banden, einhergehend mit deren "Abrundung". Die Ähnlichkeit der UV-Vis-Spektren nach O_2 -Entfernung aus dem Puffer, sowie Spektren mit Oxidationsmitteln weisen darauf hin, dass eine Oxy- und Desoxy-Form von RoxA im optischen Spektrum unterscheidbar sein könnte. Analog zu den im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Beobachtungen kann die oxygenierte Form der Indolamin-2,3-Dioxygenase ($IDO-O_2^{\bullet-}$) mit Dithionit reduziert und mit H_2O_2 oxidiert werden. Diesem werden somit Eigenschaften des oxidierten wie des reduzierten Zustandes zugeschrieben (Hirata *et al.*, 1977) (s. auch Kap. 4.6.1; Jensen & Ryde, 2004). Das den Absorptionsverlust

wiedergebende Differenzspektrum von RoxA "as isolated" minus des neu erhaltenen Zustandes zeigt zwei klar getrennte Signale bei etwa 539-540 nm und 572-573 nm (Abb. 3.40; 3.41), die an die oxygenierte Form der Sauerstoff-bindenden Proteine Hämoglobin (Wittenberg *et al.*, 1970) und Myoglobin (Yamazaki *et al.*, 1964) oder anderer Häm-Oxygenasen erinnern (s. Kap. 4.6.1).

Weiterhin ist nach Sauerstoffentzug einer RoxA-Probe häufig zunächst eine Zunahme der 549 nm- α -Bande zu beobachten, die den reduzierten Zustand des N-terminalen Hämzentrums anzeigt. Gleiches wurde auch bei anderen oxygenierten Hämproteinen wie der IDO infolge einer O₂-Evakuierung beobachtet (Hirata *et al.*, 1977). Dabei muss eine Dissoziation von O₂, nicht von O₂⁻ wie im Fall einer Autoxidation erfolgen, wonach die O₂-Bindung in RoxA als reversibel anzusehen ist. In gleicher Weise wird dies auch für die IDO (Hirata *et al.*, 1977) und die TDO (Ishimura *et al.*, 1980) angenommen, bei denen ein oxygenierter Zustand jedoch wesentlich weniger stabil ist als dies bei RoxA der Fall sein müsste. Eine O₂-Koordination in RoxA "as isolated" bietet sich auch als Erklärung für die einer Reduktion ähnelnden Veränderungen im optischen Spektrum nach Zugabe externer N-heterozyklischer Liganden an (Kap. 4.9.2). Diese Effekte können am wahrscheinlichsten durch eine vorherige reversible O₂-Bindung am N-terminalen Hämzentrum begründet werden. Zudem weisen EPR-Spektren darauf hin, dass diese Spezies ebenso wie eine Fe(II)-O₂-Spezies, aus der sie in diesem Fall hervorgeht, diamagnetisch ist. Denn beispielsweise ein für eine Pyridinbindung charakteristisches *low-spin*-Signal bei $g \approx 3,3$ entstand lediglich aus einem intensitätsschwachen Signal bei $g = 3,57$, das einen Aminosäure-Liganden statt O₂ in sechster Bindungsposition repräsentiert und nur einen geringen Anteil des vorhandenen RoxA ausmacht (s. Kap. 4.5; 4.10).

Da die Daten auf eine reversible Bindung von O₂ hindeuten, wäre nach dessen Entfernung von der Bindestelle durch das Substrat unter Sauerstoffausschluss ein weiterhin EPR-unsichtbarer Fe(II)-Zustand zu erwarten. Dass aber im EPR-Experiment bei Anwesenheit von Latex langsam ein *high-spin*-Signal zunahm, bezeugt einen allerdings erst nach längerer Inkubation (> 24 h) entstehenden Fe(III)-Zustand. Zieht man jedoch die UV-Vis-Spektren zu Rate, so trat übereinstimmend im weiteren Verlauf ($\approx \ddot{U}N$) ein oxidiertes, einer Desoxy-Form entsprechender Häm-Zustand auf (s. Kap. 3.9.3, Abb. 3.37, 3.38), nachdem unter Sauerstoffausschluss in vielen Versuchsansätzen eine anfängliche Reduktion festzustellen war. Wenn kein O₂ für eine erneute Bindung zur Verfügung stünde, könnte eine langsame, unspezifische Oxidation des Hämzentrums eintreten. Dies widerspricht nicht der Annahme, dass nach O₂-Einbau in das Substrat ein Fe(II)-Zentrum zurückbleibt (s. Abb. 4.7).

Diese zahlreichen, für sich betrachtet zunächst ungewöhnlich erscheinenden Beobachtungen beschreiben insgesamt ein schlüssiges Gesamtbild unter der Annahme einer O₂-Koordination am N-terminalen Hämzentrum im Grundzustand von isoliertem RoxA. Auch ließe die Analyse der RoxA-Strukturdaten statt eines H₂O-Moleküls ein O₂-Molekül als sechstem Liganden zu. Künftige Experimente müssen nun zeigen, ob diese Hypothese auch

die Realität im RoxA-Mechanismus widerspiegelt. Resonanz-Raman-Spektroskopie kann helfen, die Natur eines möglichen O₂-Liganden aufzuklären anhand unterscheidbarer Vibrationsbanden einzelner Sauerstoff-Spezies. Die vergleichende quantitative Bestimmung der Häm-Signale im EPR-Spektrum von RoxA "as isolated", sowie nach Ablösen eines vermutlich gebundenen O₂-Moleküls kann diese These weiterhin stützen (s. auch Kap. 4.6). Nach Bildung des oxygenierten Zustands der IDO ist eine Bindung von Kohlenmonoxid (CO) möglich, welches nur mit einem reduzierten Hämzentrum reagiert (Hirata *et al.*, 1977). Dieses kann O₂ von einem Fe(II)-O₂ \leftrightarrow Fe(III)-O₂^{•-}-Zustand verdrängen. Ähnliches könnte bei der Reaktion von Hämliganden mit einem O₂-gebundenen N-terminalen Häm in RoxA angenommen werden. Eine entsprechende Reaktion von isoliertem RoxA nach CO-Zufuhr könnte eine Oxygenierung in RoxA "as isolated" weiterhin belegen.

Die Entstehung einer Oxy-Form verbindet RoxA mit den anderen bisher beschriebenen Häm-Dioxygenasen, der Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), aber auch Monooxygenasen wie P450-Proteinen, entsprechend deren Funktion. Die bisherigen Ergebnisse unterstützen, dass zumindest bei einem wesentlichen Teil der RoxA-Moleküle einer Präparation noch vor dem Kontakt zu Poly(*cis*-1,4-isopren) eine bei Raumtemperatur sehr stabile Bindung von O₂ vorliegt. Eine solche ist allerdings für ein *c*-Typ-Cytochrom höchst ungewöhnlich. Bisher ist keine Häm-Oxygenase beschrieben, bei welcher eine derart stabile Bindung von O₂ bei Abwesenheit des Substrates verwirklicht wäre. So ist diese Oxy-Form bei P450-Cytochromen (Häm *b*) nicht stabil und führt nach deren Bildung rasch zur Autoxidation des Hämzentrums (Mometeau & Reed, 1994). Die Häm-Dioxygenase TDO bildet eine metastabile O₂-Bindung auch bei Abwesenheit des Substrates L-Trp aus, die innerhalb weniger Sekunden eine Autoxidation von Fe(III) unter Freisetzung von O₂^{•-} nach sich zieht (Batabyal & Yeh, 2009), wohingegen die entsprechende Form der IDO als stabiler (min) beschrieben wurde (Hirata *et al.*, 1977, Fig. 8).

Auch MauG – das neben RoxA bisher einzige weitere *c*-Typ Cytochrom mit einer Oxygenase-Funktion – ist seiner Aufgabe entsprechend in der Lage, Sauerstoff zu binden. Untypischerweise für *c*-Typ-Cytochrome reagieren reduziertes RoxA wie auch MauG direkt mit molekularem Sauerstoff, d. h. diese wechseln allein durch Exposition an Luft wieder in den oxidierten Zustand (Wang *et al.*, 2003). Bei MauG fungieren die beiden *c*-Typ-Hämgruppen jedoch als eine Di-Häm-Einheit zweier gleichwertiger Zentren, wobei nicht eine sukzessive Reduktion beider Hämgruppen stattfindet, sondern jeweils das Elektron in Grenzzuständen zwischen beiden Hämgruppen stabilisiert ist (s. auch Kap. 4.4.2). Daher ist MauG im Unterschied zu RoxA nur in der Lage, im vollständig reduzierten Zustand, O₂ zu binden. Die O₂-bindende Hämgruppe fungiert bei der Reoxidation als Zwei-Elektronen-Überträger auf den gebundenen Disauerstoff, wodurch bei Abwesenheit des Substrates L-Trp der bis-Fe(III)-Zustand regeneriert wird (Li *et al.*, 2006 b). Die O₂-Koordination ist in MauG somit nicht stabil bzw. reversibel. MauG wird wie auch die Dioxygenasen TDO und IDO im vollständig oxidierten Zustand isoliert. Bei letzteren ist ein spontaner Zerfall des Fe(II)-O₂-

zum Fe(III)-Zustand unter aeroben Bedingungen beschrieben. Da dieser Zustand jedoch bereits in RoxA "as isolated" vorläge und sich über Tage nicht nennenswert änderte, müsste dieser ungleich stabiler sein. Die gegenüber der IDO (Hirata *et al.*, 1977) deutlich langsamere Entstehung von Reduktions-Banden im optischen Spektrum nach O₂-Entfernung, könnte die für ein *c*-Typ-Cytochrom ungewöhnliche, bisher beispiellose Stabilität des oxygenierten Zustandes am N-terminalen Hämzentrum in RoxA unterstreichen. Auch wäre bereits die Tatsache ungewöhnlich, dass diese im isolierten Enzym vorläge.

Eine stabile und reversible Bindung von O₂ wird dafür bei klassischen O₂-Bindeproteinen wie Hämoglobin und Myoglobin mit nicht-kovalent an das Polypeptid geknüpften Häm *b*-Zentren gefunden. Um eine solche O₂-Bindung zu ermöglichen, muss die oxygenierte Form gegenüber den Mechanismen der Autoxidation stabilisiert werden (Momenteau & Reed, 1994). Sollten künftige Untersuchungen eine Fe(II)-O₂-Koordination am N-terminalen Hämzentrum im Grundzustand von RoxA beweisen, müssten auch in RoxA ähnliche strukturelle Voraussetzungen vorliegen, wie sie bei den Sauerstofftransportproteinen Hämoglobin und Myoglobin verwirklicht sind. Tatsächlich zeigt der Vergleich zu diesen Hämproteinen Gemeinsamkeiten in der Hämumgebung auf. Bei Hämoglobin und Myoglobin ist die O₂-Bindung u. a. durch die Abwesenheit von Säuren in der Häm-Cavity stabilisiert. Dazu zählt auch Wasser, das auch im *high-spin*-Zustand des Hämzentrums aufgrund der hydrophoben Umgebung nicht gebunden wird (Wang, 1970). Die Abwesenheit von Wasser in der Häm-Cavity während der Substratspaltung ist auch für die Tryptophan-2,3-Dioxygenase belegt (Forouhar *et al.*, 2007). Auch die RoxA-Struktur zeigt eine ausschließlich hydrophobe Umgebung der distalen Häm-Bindestelle, jedoch keinen His-Rest wie bei Globinen (s. Abb. 4.6). Zudem deuten die EPR-Spektren von RoxA "as isolated" eher auf die Abwesenheit einer Fe(III)-H₂O/OH⁻-Bindung im Grundzustand, sowie nach Reduktion und Reoxidation hin (s. dazu Kap. 4.10).

4.11.3 Informationen aus dem Vergleich mit anderen Hämproteinen

Vergleicht man die Hämumgebung anderer Hämproteine fallen deutliche Unterschiede zu RoxA auf. Bei eukaryotischen (Ein-Häm-)Peroxidasen existiert eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Häm-koordinierenden proximalen Histidin und einem Aspartat-Rest (Volkov *et al.*, 2011). Zusammen mit einem distalen Arginin-Rest sorgt dies für eine Polarisierung der O–O-Bindung des an der distalen Hämbindestelle koordinierten H₂O₂. Ein distales Histidin fungiert als Säure-Base-Katalysator und sorgt für die Spaltung der O–O-Bindung. Bei Globinen verweist das Fehlen einer starken proximalen H-Brücke und eines distalen Arg-Restes auf eine reversible O₂-Bindung (z. B. Tanaka *et al.*, 1997, Rydberg *et al.*, 2004; Sugimoto, 2006). Hierin wird ein wesentlicher Unterschied der O₂-Bindungseigenschaften zwischen Globinen und (Ein-Häm-)Peroxidasen gesehen (Jensen & Ryde, 2004). Dass bei der

IDO eine solche proximale H-Brücke existiert (Terentis, 2002), könnte die geringere O₂-Stabilität erklären. Wie bei Globinen fehlen auch bei RoxA diese Interaktionen, was die Möglichkeit einer stabileren und reversiblen O₂-Bindung in RoxA "as isolated" unterstützt. Da RoxA aber im Gegensatz zu diesen Proteinen eine Dioxygenase-Funktion erfüllt, deutet das Fehlen von als Säure-Base-Katalysatoren dienenden Aminosäuren auf einen Mechanismus der O₂-Aktivierung und Spaltung der O–O-Bindung hin, der sich von eukaryotischen, sowie bakteriellen Peroxidasen, MauG oder Monooxygenasen unterscheidet. Deren Reaktionen verlaufen unter Bildung eines ⁺Fe(IV)=O-Intermediats ("Compound I"), das im Verlauf der Dioxygenase-Reaktion von RoxA nicht zu erwarten ist. Ersichtlich wird dieser Umstand beim Vergleich der Struktur um die distale Hämbindestelle. Diese ist bei Peroxidasen im Allgemeinen, sowie bei MauG sehr ähnlich. Im Gegensatz zu RoxA sind bei CCPs an die Peroxid-Bindestelle angrenzende Glutamat-, Glutamin- und Prolin-Reste konserviert (Echalier *et al.*, 2006). Bei der *N. europaea* CCP und der offenen Konformation anderer bakterieller CCPs bilden Glu₁₀₂ und Gln₉₂ bzw. homologe, gleich positionierte Reste Wasserstoffbrücken zu einem koordinierten H₂O-Molekül aus (z. B. Shimizu *et al.*, 2001; Echalier *et al.*, 2006). In gleicher Weise angeordnet sind auch Glu₁₁₃ und Gln₁₀₃ bei MauG (Jensen *et al.*, 2010, Fig. 3c). Der distale Glutamat-Rest erfüllt - statt eines Histidins bei Ein-Häm-Peroxidasen - die katalytische Funktion eines Säure-Base-Katalysators zur Spaltung der O–O-Bindung des Häm-gebundenen Wasserstoffperoxids (Shimizu *et al.*, 2001; Sundaramoorthy *et al.*, 1998), infolge derer die "Compound I" entsteht. Die Prolin-Reste, bei NEP (Pro₉₆) und MauG (Pro₁₀₇), erhalten möglicherweise die Bindung reaktiver Sauerstoffspezies am Fe-Ion (Jensen *et al.*, 2010). Eine solche Aminosäureumgebung erleichtert die O–O-Bindungsspaltung und die Bildung einer Häm-gebundenen "high-valent"-Spezies unter Abspaltung von H₂O. Bei RoxA befinden sich dagegen anstelle dieser Aminosäuren um diese Bindestelle ausschließlich unpolare Reste (Phe₃₀₁, Phe₃₁₇, Ala₂₅₁ Ile₂₅₂) (s. Abb. 4.6; vgl. Abb. 4.5).

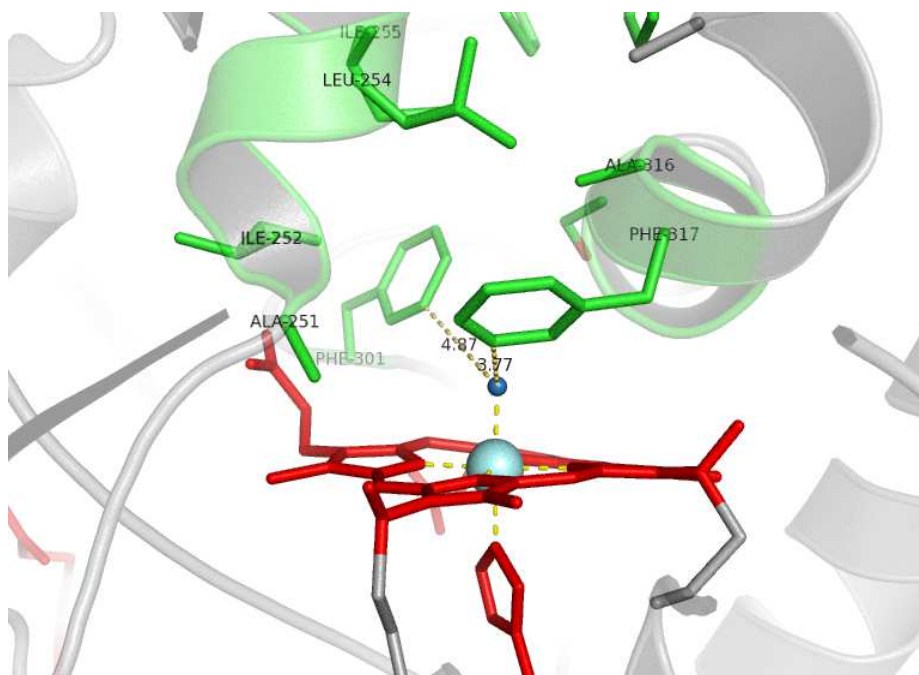


Abb. 4.6: Die Umgebung der distalen Bindestelle des katalytischen N-terminalen Hämzentrums. In der Häm-Cavity fehlen polare Aminosäure-Reste wie bei CCPs oder Monooxygenasen. Dem koordinierten "O"-Atom (O_2 oder H_2O) (blau) liegen Phe₃₀₁ und Phe₃₁₇ am nächsten, die möglicherweise auch eine Rolle für die Stabilität eines oxygenierten Zustandes spielen (Abstände in Å) (s. auch Abb. 4.5). (erstellt mit PyMol Version 1.1r1)

Dieser Umstand unterstützt nachdrücklich die Ergebnisse, die einer Peroxidase-Aktivität von RoxA widersprechen. Auch bei den Häm-Dioxygenasen IDO und TDO ist eine Abstrahierung eines Protons vom Substrat durch eine Aminosäure-Base widerlegt (Efimov *et al.*, 2011). Wie jedoch die Spaltung der O–O-Bindung bei RoxA verläuft, ist bislang vollkommen unklar. Statt einer Häm-basierten Spaltung der O–O-Bindung wurde ursprünglich für Häm-Dioxygenasen der direkte, gleichzeitige Einbau beider O-Atome aus einer Fe(II)- O_2 -Form durch einen ionischen Mechanismus vorgeschlagen (Sono, 1996). Entsprechend der Dioxygenase-Funktion von RoxA kommt dies auch während der Latexspaltung in Betracht. Wie bei den IDO- und TDO-Enzymen ist dafür die geometrische Anordnung des gebundenen O_2 -Moleküls und des Substrates entscheidend für den Mechanismus. Dabei wird die O–O-Bindung vermutlich genau durch die proximale und distale Hämumgebung kontrolliert und es wurde angenommen, dass diese Bindung erst im Zuge des Einbaus beider O-Atome in das Substrat nach Bildung eines Hydroperoxy-Substrat-Adduktes ohne direkte Beteiligung des Hämzentrums gespalten wird (Terentis, 2002; Sugimoto, 2006). Lange galt die Vorstellung des gleichzeitigen Einbaus der O-Atome für Häm-Dioxygenasen im Kontrast zu Monooxygenasen. Sie wird allerdings nach neuerer Betrachtung durch die Annahme abgelöst, dass ein Einbau der O-Atome in zwei Schritten unter Bildung einer Fe(IV)=O-Zwischenstufe ("Compound II") und eines Substrat-Epoxids eher zutrifft (Lewis-Ballester *et al.*, 2009), obwohl in der Umgebung der distalen Bindestelle

keine für die Spaltungsreaktion essentiellen, polaren Aminosäure-Reste vorliegen. Zur Zeit wird eher eine radikalische Addition des O₂ und einer Fe(IV)=O Häm-Spezies (Efimov *et al.*, 2011) als eine elektrophile Addition ohne direkte Beteiligung des Häm-Eisens (Terentis, 2002; Chauhan *et al.*, 2009) vermutet.

Ob diese Möglichkeit des aufeinander folgenden Einbaus der O-Atome angesichts der ähnlichen Funktion dieser Enzyme auch für den RoxA-Mechanismus in Betracht gezogen werden muss, lässt sich an dieser Stelle nicht entscheiden. Hinsichtlich der Spaltung der O–O-Bindung liegen bislang keine experimentellen Hinweise auf den einen oder anderen Mechanismus vor. So gibt es auch einige Unterschiede zur Situation bei den Tryptophan-spaltenden Dioxygenasen. Sie besitzen lediglich ein *b*-Typ Hämzentrum. Bei RoxA ist die Situation aufgrund der Anwesenheit zweier, möglicherweise elektronisch verbundener *c*-Typ Hämzentren komplexer. Wie RoxA nutzen sie ein His-ligiertes Fe(II)-Hämzentrum zur O₂-Bindung, werden jedoch im *high-spin*-Fe(III)-Zustand isoliert und müssen zur O₂-Bindung zunächst reduziert werden. Auch wenn der Redoxpartner der Tryptophan-Dioxygenasen nicht bekannt ist, wird angenommen, dass nur eine initiale Ein-Elektronen-Reduktion erforderlich ist, um die O₂-Bindung zu ermöglichen (Efimov *et al.*, 2011). Es wird ein geordneter Zyklus angenommen, wonach zunächst die Bindung des Substrates L-Trp in der Fe(II)-Form erfolgt und die O₂-Bindung erleichtert (Terentis, 2002; Forouhar *et al.*, 2007). Dies steht der Hypothese gegenüber, die aus den spektroskopischen Daten für RoxA aufgestellt werden kann, wonach O₂ bereits in stabiler Weise am N-terminalen Hämzentrum koordiniert ist, d. h. RoxA, das noch keinen Kontakt zum Substrat hatte, im Fe(II)-O₂/(Fe(III)-Zustand isoliert wird und keinen externen Elektronendonator benötigt. Bestätigen sich die bisherigen Beobachtungen, stellt RoxA eine bisher einzigartige Häm-Dioxygenase dar. Ohnehin ist es bislang das erste sicher als Häm-Dioxygenase eingeordnete Enzym, das nicht die Oxidation von L-Trp zu L-Formylkynurenin oder eine ähnliche Reaktion katalysiert. Aufklärung ist nun darüber nötig, ob RoxA auch im bis-Fe(III)-Zustand nach Entfernung möglicherweise gebundenen Disauerstoffs noch (vergleichbare) Aktivität besitzt bzw. in diesem Fall die Latexspaltung durch Superoxid (O₂^{•-}) erfolgen kann. Denn dieses kann im oxidierten "as isolated"-Zustand der TDO und IDO als Substrat dienen (Hirata & Hayaishi, 1975; Hirata *et al.*, 1977). Dies wurde für RoxA nicht in entsprechender Weise untersucht, doch bleibt die Anwesenheit von Superoxid-Dismutase ohne Auswirkung auf die RoxA-Aktivität.

Für die TDO im Fe(III)-Zustand ist auch die Nutzung von H₂O₂ zur Substratspaltung unter anaeroben Bedingungen beschrieben. Dabei werden zwei Mol H₂O₂ pro Mol L-Trp benötigt, wobei die Spaltung wie bei Peroxidasen in ebenfalls zwei Schritten über eine Ferryl-oxo-Zwischenstufe ("Compound I") unter Abspaltung je eines H₂O-Moleküls verläuft (Fu, 2009). Unter aeroben Bedingungen in Gegenwart des Substrates L-Trp kann H₂O₂ zur Aktivierung des Enzyms aus dem oxidierten Zustand genutzt werden, wobei L-Trp als Reduktant fungiert. Bei Abwesenheit von L-Trp besitzt das Fe(III)-Zentrum der TDO Katalase-Aktivität, indem zwei Moleküle H₂O₂ zu 2 H₂O und O₂ umgesetzt werden (Fu *et al.*,

2011). Eine solche besitzt RoxA vermutlich nicht, wie es die offenbar fehlende Fähigkeit, H_2O_2 umzusetzen, anzeigt (s. auch Kap. 4.7). Die starke Hemmung der Latexspaltung durch H_2O_2 widerspricht zudem dessen Nutzung zur Oxidation von Kautschuk (s. Kap. 3.6.1; vgl. Kap. 4.7). Bis auf Weiteres kann daher angenommen werden, dass durch Reaktion mit H_2O_2 am Hämzentrum entstehende Produkte wie Fe(III)-OOH mit (nicht-aktiviertem) Poly(*cis*-1,4-isopren) nicht bzw. in einer nicht zu dessen Spaltung führenden Weise reagieren (s. Kap. 4.7). Die Fragen nach der biochemischen Wirkungsweise der Hemmung durch H_2O_2 und dem Mechanismus der oxidativen Latexspaltung sind eng verbunden und benötigen weiterer Aufklärung. Während der Kautschukspaltung könnte dennoch ein Hydroperoxid beteiligt sein, das jedoch möglicherweise nicht am Fe(III), sondern bereits am Substrat gebunden ist und ein von diesem stammendes Proton enthält (s. Linos *et al.*, in Koyama & Steinbüchel, (2001), S. 353).

Die unterschiedliche Anzahl und Varianten der prosthetischen Gruppen bei Hämproteinen machen den Vergleich zu RoxA anhand spektroskopischer Daten schwierig. Generell erschwert ist der Vergleich durch die unterschiedlichsten Funktionen dieser Proteine bzw. abweichenden katalytischen Voraussetzungen durch unterschiedliche prosthetische Gruppen bei Enzymen mit ähnlicher Funktion (Dioxygenasen). Bislang ist kein Enzym mit genau gleichen Voraussetzungen wie der Anwesenheit zweier *c*-Typ-Hämgruppen oder dem Fehlen externer Kofaktoren bekannt, das einen optimalen Vergleich bieten könnte. Für ein *c*-Typ-Cytochrom ungewöhnlich ist die Dioxygenase-Funktion von RoxA. Unter den bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen mit homologer Orientierung der katalytischen Zentren zu RoxA (s. Hoffmann, 2007) oder verwandten Enzymen wurde kein Protein mit einer ähnlichen Funktion gefunden. Die dargestellten Ergebnisse widersprechen der Möglichkeit, dass RoxA eine Funktion als Peroxidase erfüllen oder die Latexspaltung über einen Peroxidase-Mechanismus unter Beteiligung von H_2O_2 verlaufen könnte (s. Kap. 4.7). Dies zeigt sich u. a. daran, dass die Zugabe von stöchiometrischen H_2O_2 -Mengen keinen Effekt auf das optische Spektrum von RoxA hat im Gegensatz zur Situation bei MauG (Tarboush *et al.*, 2010) oder CCPs.

Die Latexspaltung kann bei Anwesenheit von H_2O_2 nicht ablaufen und benötigt keine externen Elektronendonoren wie bei der Peroxidase-Reaktion. Lediglich molekularer Sauerstoff und Poly(*cis*-1,4-isopren) sind für die Reaktion erforderlich. Die oxidative Latexspaltung erfordert zur O_2 -Bindung einen Fe(II)-Zustand am katalytischen Hämzentrum, der im Reaktionszyklus der CCPs an diesem nicht vorkommt. Auf eine unterschiedliche Funktionsweise des Latex spaltenden Enzyms weisen bereits die gegenüber CCPs sehr unterschiedlichen Redoxpotentiale der beiden Hämgruppen hin (s. Kap. 1.5.2, Kap. 4.4.2).

Das einzige weitere bisher beschriebene Enzym mit *c*-Typ Hämgruppen, welches eine Oxygenase-Funktion aufweist, ist MauG, dessen Redoxpotentiale denen von RoxA ähnlicher sind als von Peroxidasen. Trotz deutlicher struktureller Ähnlichkeit im Bereich der beiden Hämzentren katalysiert MauG jedoch eine Sechs-Elektronen-Reduktion unter

Monohydroxylierung, sowie kovalenter Verknüpfung zweier Tryptophan-Reste, die sich von der Kautschukspaltung unterscheiden muss. Dieser Umstand macht RoxA zu einem bisher einzigartigen, eine Dioxygenierung katalysierenden Enzym, welches sein Substrat unter Einbau beider O-Atome aus Luftsauerstoff umsetzt. MauG katalysiert nur den Einbau eines O-Atoms. Nachvollziehbar ist somit, dass die Tryptophan-Tryptophylchinon (TTQ)-Formierung im bis-Fe(III)-Zustand sowohl mit O₂ und Reduktionsäquivalenten als auch mit H₂O₂ ablaufen kann. Dabei ist die Frage nach dem eigentlichen Substrat bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt (Yukl *et al.*, 2011). Es tritt ein der "Compound I" von Ein-Häm-Peroxidasen [⁺Fe(IV)=O] bzw. bakteriellen CCPs [Fe(IV)=O/Fe(III)] äquivalenter, ungewöhnlicher Fe(IV)=O/Fe(IV) -Zustand auf (Li *et al.*, 2006 a; Li *et al.*, 2008; Wilmot & Davidson, 2009). Darin unterscheidet sich RoxA von diesen verwandten Enzymen. Bei MauG bleibt das zweite Hämzentrum während des gesamten Reaktionszyklus sechsfach koordiniert, wechselt aber seinen Redoxzustand. Die gesammelten EPR-spektroskopischen Daten weisen ebenso im Fall von RoxA auf eine konstante sechsfache Koordination des C-terminalen Hämzentrums hin. Für einen Wechsel des Redoxzustandes und damit für eine direkte Beteiligung dieses Häms am Kautschuk-Spaltungszyklus gibt es bislang keine Hinweise. Ein bis-Fe(IV)-Intermediat wie bei MauG, welches auch mit H₂O₂ entsteht und zur Oxidation des Substrates in der Lage ist (Li *et al.*, 2008), spielt folglich im Mechanismus von RoxA keine Rolle. Angesichts einer sukzessiven Reduktion der beiden Hämgruppen in RoxA ist auch das Auftreten eines Redoxgleichgewichts zwischen den Hämgruppen, die in MauG als eine Di-Häm-Einheit zur Stabilisierung eines bzw. zweier Elektronen fungieren, auszuschließen.

Wie sich bereits aus dem Vergleich der jeweils unterschiedlichen Redoxpotentiale bei CCPs, MauG und RoxA ableiten lässt, erfüllen diese Enzyme eine jeweils unterschiedliche Aufgabe, auf welche die Potentiale abgestimmt sein müssen. Diese Unterschiede gehen z. T. auf die unterschiedliche Ligation des *low-spin*-Häms – His-His bei RoxA, His-Met bei CCPs und His-Tyr bei MauG – zurück und haben entsprechende Abweichungen der spektroskopischen Eigenschaften zur Folge (s. Kap. 4.4.2., 4.4.3; 4.3.1, 4.3.3.2). Die einzigartigen Redox-eigenschaften von MauG werden im Wesentlichen durch Tyr₂₉₄ als axialem Liganden des C-terminalen Hämzentrums bestimmt. Der Austausch dieses Tyrosins gegen ein Histidin (Y294H) führt zum Verlust der katalytischen Aktivität von MauG (Tarboush *et al.*, 2010).

Ein bedeutender Unterschied zu RoxA ist die ungeordnete Hydroxylierungsreaktion durch MauG. Bei diesem sind die Substrat- und O₂-Bindestellen strikt getrennt, während die Ergebnisse mit RoxA für eine Bindung und Spaltung von Poly(*cis*-1,4-isopren) in unmittelbarer Nähe der O₂-bindenden Hämgruppe sprechen. Bei MauG erfolgt der Einbau eines O-Atoms in das Substrat Methylamin-Dehydrogenase (MADH) nicht am N-terminalen Hämzentrum, welches mit O₂ reagiert, sondern an anderer Stelle. Die Funktion der "high-valent"-bis-Fe(IV)-Spezies besteht darin, durch einen starken Elektronenzug ein Substratradikal zu generieren, wobei vermutlich ein "Long Range"-Elektronentransfer eine

Rolle spielt. Es wird angenommen, dass dieses Radikal spontan mit einem O-Atom aus der wässrigen Umgebung reagiert (Jensen *et al.*, 2010). So sind trotz offenkundiger Verwandtschaft von RoxA, MauG und CCPs jeweils spezifische und grundlegend unterschiedliche Strategien zur Erfüllung einer jeweils unterschiedlichen Funktion realisiert.

4.11.4 Die Rolle des C-terminalen Hämzentrums in RoxA ist unklar

Bei CCPs und MauG spielen beide Hämgruppen eine entscheidende Rolle im Reaktionsmechanismus. Dabei erfolgt ein Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen über einen zwischen den Häm-Propionatgruppen lokalisierten Tryptophan-Rest, welcher auch in RoxA existiert (Trp₃₀₂) (vgl. Abb. 4.1.; s. Kap. 4.2.5). Bei Peroxidasen wird durch diese Elektronenverschiebung die Bildung eines Porphyrin- oder Aminosäure-Kation-Radikals vermieden, indem das zweite Oxidationsäquivalent am zweiten Hämzentrum stabilisiert wird. Bei MauG erfolgt Entsprechendes durch Bildung eines bis-Fe(IV)-Zustandes (s. o.). Auch bei RoxA ist im Verlauf einer Reduktion und Reoxidation eine Elektronenverschiebung zwischen beiden Hämzentren als wahrscheinlich anzusehen. Darauf weist die vollständige Reoxidation von RoxA allein durch Exposition an Luft hin, da die C-terminale Hämgruppe vermutlich nicht direkt mit O₂ interagieren kann. Auch hatte eine erste Beobachtung mit der RoxA-W302L-Mutante während einer schrittweisen Reduktion und Reoxidation eine Abweichung von RoxA "as isolated" aufgezeigt, die mit einem erschwerten Elektronentransfer erklärt werden könnte (s. Kap. 3.7.3).

Aber ist auch im Dioxygenase-Mechanismus von RoxA eine Elektronenverschiebung notwendig? Zwar müssen die bisherigen Ergebnisse des W302L-Austauschs nach Expression von RoxA-W302L in einer *roxA*-Knockout-Mutante überprüft werden (s. Kap. 4.2.5), festzuhalten ist jedoch, dass die bisher nach der Reinigung erhaltenen RoxA-W302L-Moleküle stabil waren und auch einen Großteil der Aktivität von RoxA "as isolated" aufwiesen. Demnach scheint Trp₃₀₂ nicht essentiell für die Kautschukspaltung, doch für die Proteinstabilität wichtig zu sein. In Übereinstimmung mit einem möglicherweise fehlenden Elektronentransfer während der Substratspaltung wurden bisher aus EPR-Messungen keine Hinweise auf einen Wechsel des Redoxzustandes am C-terminalen Hämzentrum erhalten. Zudem widersprechen die Versuchsergebnisse einer Änderung des Spinzustandes und schließen diese Hämgruppe als Ort der Kautschukspaltung aus (s. o.). Sinnvoll dagegen ist eine Reduktion am N-terminalen, katalytischen Hämzentrum zur Bindung des für die Dioxygenase-Reaktion benötigten O₂. Liegt eine solche bereits im Grundzustand vor, ließe sich die Spaltung von Kautschuklatex auch ohne Wechsel des Redoxzustandes und Beteiligung des zweiten Hämzentrums erklären. So besitzen die neben RoxA bisher bekannten Häm-Dioxygenasen, IDO- und TDO-Enzyme bzw. die verwandte PrnB-Dioxygenase (de Laurentis *et al.*, 2007) oder die Lipoxygenase aus *Fusarium oxysporum*

(Matsuda *et al.*, 1978; Nozaki 1979), nur ein einzelnes Hämzentrum, an welchem der Einbau beider O-Atome in die Produkte stattfindet.

Entsprechendes könnte auch auf RoxA zutreffen. Denn es sind Metallenzyme bekannt, die allein der Proteinstabilität dienende Metallzentren enthalten, wie z. B. einen Co^{2+} -Kofaktor bei *F. oxysporum* Lipoxygenase. V. a. aber unterstützt ein Vergleich der *N. europaea* CCP (NEP) zu anderen Di-Häm-Peroxidasen die Hypothese, dass das zweite Hämzentrum in RoxA nicht entscheidend für die Latexspaltung und allein der Enzymstabilität nützen könnte. Der Mechanismus der NEP, die auch im Fe(III)/Fe(III)-Zustand aktiv ist, ähnelt eher demjenigen der eukaryotischen Ein-Häm-Peroxidasen, indem die formelle Fe(V)-Spezies ("Compound I") aus dem bis-Fe(III)-Zustand nach Reaktion mit H_2O_2 allein am N-terminalen (P-) Hämzentrum als $^{*+}\text{Fe(IV)=O}$ auftritt, während das C-terminale (E-) Hämzentrum seinen Fe(III)-Oxidationszustand nicht ändert. Stattdessen ist bei den meisten CCPs zunächst die Reduktion des E-Häms erforderlich, um die notwendige Konformationsänderung zur "Öffnung" der P-Häm-Bindestelle einzuleiten. Nach Reaktion von H_2O_2 mit der nun freien Bindestelle des P-Häms wird dieses Elektron unter Vermeidung eines Porphyrin- oder Protein-Kation-Radikals zum E-Häm transferiert, wonach ein Fe(IV)=O/Fe(III) -Zustand entsteht. Dieser Elektronentransfer ist bei NEP nicht erforderlich. Denn dem Substrat ist der Zugang bereits im bis-Fe(III)-Zustand möglich. Es entsteht statt der Stabilisierung des zweiten Oxidationsäquivalents am E-Häm ein Porphyrin- π -Kation-Radikal am P-Häm (Bradley, 2004; Pettigrew *et al.*, 2006). Da bei der NEP also kein Wechsel des Oxidationszustandes am C-terminalen E-Häm eintritt, ist dieses an der katalytischen Reaktion nicht beteiligt. Gleiches gilt auch für die Y294H-Mutante von MauG, welche die bisher wohl am besten vergleichbare Situation zu RoxA repräsentiert. Es entsprechen sich sowohl die Orientierung der beiden Hämzentren als auch die koordinierenden Liganden, His-Fe-His am C-terminalen und His-Fe- am N-terminalen Hämzentrum. Nach dem Austausch des koordinierenden Tyrosins gegen ein Histidin in MauG-Y294H entsteht statt eines bis-Fe(IV)-Zustandes wie bei Wt-MauG am N-terminalen Hämzentrum ein $^{*+}\text{Fe(IV)=O}$ - π -Kation-Radikal (Tarboush *et al.*, 2010), wie auch bei der Reaktion von NEP mit H_2O_2 . Eine solche Spezies ist bei der Dioxygenase-Reaktion von RoxA nicht zu erwarten. Eher könnte sie bei der Reaktion mit H_2O_2 am Fe(II)- O_2 -koordinierten Hämzentrum auftreten (s. auch Kap. 4.7), was jedoch aufgrund des Fehlens von als Säure-Base-Katalysator fungierenden Aminosäureresten in der Ham-Cavity (s. Kap. 4.11.3) fraglich ist. Die fehlende Beteiligung des C-terminalen Hämzentrums bei NEP und MauG-Y294H offenbart die Möglichkeit, dass ebenso in RoxA die Latexspaltung ohne Beteiligung dieses bis-His-Zentrums verlaufen könnte.

Die strukturellen Gemeinsamkeiten bis hin zu den gleichen Fe-Fe-Distanzen legen nahe, dass sich RoxA oder auch MauG aus einer bakteriellen Di-Häm-Cytochrom *c* Peroxidase oder umgekehrt entwickelt haben könnte. Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein bestimmtes Myoglobin, das keine Homologie zu anderen Globinen aufweist (Suzuki & Takagi, 1992), aus einer Indolamin-2,3-Dioxygenase entstanden ist. Trotz der offenkundigen

Verwandtschaft von RoxA, MauG und CCPs erfüllen diese Enzyme sehr unterschiedliche Aufgaben. So könnte die zweite Hämgruppe nur ein Relikt eines gemeinsamen Ursprungs und zur Stabilisierung notwendig sein. Nimmt man an, RoxA wie auch MauG seien aus bakteriellen CCPs entstanden, könnte der Austausch des koordinierenden Methionins am C-terminalen Hämzentrum gegen ein Histidin bzw. Tyrosin, der zur Erniedrigung des Redoxpotentials und der Annäherung beider Potentiale führt, deren Funktion als Oxygenasen erst ermöglicht haben. Gleichmaßen könnte ein entsprechendes "Aufklappen" des Enzyms wie bei CCPs, das eine initiale Reduktion eben dieses C-terminalen Hämzentrums erfordert, der spezifischen neuen Funktion hinderlich sein.

4.11.5 Ein hypothetisches Schema der Kautschukspaltung

In Anlehnung an ein auf theoretische Überlegungen gestütztes hypothetisches Abbauschema nach (Linos *et al.*, 2001) kann basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten und diskutierten Ergebnissen ein gleichzeitiger Einbau der O-Atome aus O₂ ohne direkte Beteiligung des Häm-Eisens vorgeschlagen werden. Demnach würde ein Poly(*cis*-1,4-isopren)-Hydroperoxid entstehen nach Abstraktion eines Protons vom Substrat und Bindung des Sauerstoff-Intermediats an ein C-Atom der Doppelbindung des Substrates. Aus diesem könnte die Spaltung an der C=C-Doppelbindung nach Bildung eines zyklischen Peroxids durch Umlagerung zum Keton und Aldehyd erfolgen (Abb. 4.7). Da jedoch keine direkten Belege für den molekularen Mechanismus der O–O-Banden-Spaltung vorliegen, bleibt dieser weiterhin spekulativ. Auch ein Mechanismus einer radikalischen Addition in zwei Schritten unter Bildung einer Fe(IV)=O-Zwischenstufe, wie er jüngst für IDO und TDO vorgeschlagen wurde (Efimov *et al.*, 2011), muss bedacht werden. Weder für eine Fe(IV)=O-Spezies noch für das Auftreten eines Substratradikals unter aeroben oder anaeroben Bedingungen im EPR-Spektrum liegen bisher Hinweise vor. Falls zuvor aber eine ebenfalls EPR-unsichtbare Fe(II)-O₂-Koordination vorlag, wäre eine auf einen Fe(IV)=O-Zustand hinweisende Intensitätsabnahme der Signale des N-terminalen Hämzentrums nicht zu erkennen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse gestatten die Festlegung eines Rahmens für den Reaktionsmechanismus von RoxA und bilden die Voraussetzungen für das vorgeschlagene Schema. Sie zeigen die N-terminale Hämgruppe als das katalytische Zentrum, an welchem die Kautschukspaltung stattfindet und liefern Hinweise auf eine Fe(II)-O₂-Koordination im Grundzustand von RoxA "as isolated". Mit dieser Annahme ergibt sich ein gemeinsamer Erklärungsansatz für ungewöhnliche Beobachtungen aus der Spektroskopie (s. Kap. 4.6), der für den Reaktionsmechanismus von RoxA von entscheidender Bedeutung ist. Dieses Modell setzt insbesondere bei rekombinantem RoxA, das noch keinen Kontakt zu Poly(*cis*-1,4-isopren) hatte, eine stabile Bindung von O₂ voraus. Gleichmaßen würde damit ein im EPR-Spektrum meist intensitätsschwaches Signal einer Aminosäure-Koordination an

sechster Bindungsposition des N-terminalen Hämzentrums ein Artefakt darstellen, dem im Reaktionsmechanismus keine Bedeutung zukommt. Desweiteren weisen Ergebnisse bereits darauf hin, dass die Kautschukspaltung allein am N-terminalen Hämzentrum ohne Beteiligung der C-terminalen Hämgruppe ablaufen könnte. Da die Ergebnisse gegen ein Aufklappen des Enzyms sprechen, könnte ein Substrat-Polymerstrang dieses Zentrum über einen unpolaren Kanal erreichen wie es z. B. auch bei einer Carotinoid-Oxygenase der Fall ist (Kloer *et al.*, 2005). Die Beteiligung freier $O_2^{\cdot-}$ -Ionen an der oxidativen Latexspaltung lässt sich ebenso ausschließen wie diejenige von H_2O_2 (s. Kap. 4.7). Dass die Wirkung der Katalase bei der Latexspaltung keine Rolle spielt (s. Kap. 4.2.4), schließt die Beteiligung freigesetzter Peroxide aus, bedeutet jedoch nicht, dass keine koordinierten Peroxide als Zwischenprodukte der Kautschukspaltung auftreten können. Dies spricht, wie auch die definierte Spaltung alle drei Isopreneinheiten, für eine Spaltung am entsprechenden Hämzentrum mit räumlicher Nähe des Substrates. Ebenso ist mit den Versuchsergebnissen vereinbar, dass bei der Latexspaltung durch RoxA ein Wechsel des Oxidationszustandes am katalytischen Zentrum unterbleibt. Grundsätzlich kommt daher eine Spaltung der O–O-Bindung nach Formierung eines Substrat-Dioxetan-Zwischenproduktes in Betracht wie von Linos *et al.*, (in Koyama & Steinbüchel (2001) für die Latexspaltung vorgeschlagen wurde (s. Abb. 4.7). Der genaue Mechanismus dieses Spaltungsvorgangs erfordert jedoch nach wie vor experimentelle Belege.

Zur Absicherung des vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus muss zunächst überprüft werden, ob vollständig oxidiertes RoxA, welches von Häm-gebundenem Sauerstoff befreit worden ist, nach erneuter Exposition an Luft zur Latexspaltung fähig ist. Dass diese ohne die Notwendigkeit einer Reduktase bzw. eines Elektronendonors abläuft, lässt eine stabile O_2 -Ligation im Ruhezustand von RoxA als Ausgangssituation des vorgeschlagenen Spaltungsmechanismus realistisch erscheinen. Wäre jedoch die Kautschukspaltung weiterhin möglich, müsste noch ein weiterer Reaktionsweg ausgehend von desoxygeniertem RoxA existieren. Das zu einer Reduktion des katalytischen Zentrums nötige Elektron müsste in diesem Fall vom Substrat selbst stammen.

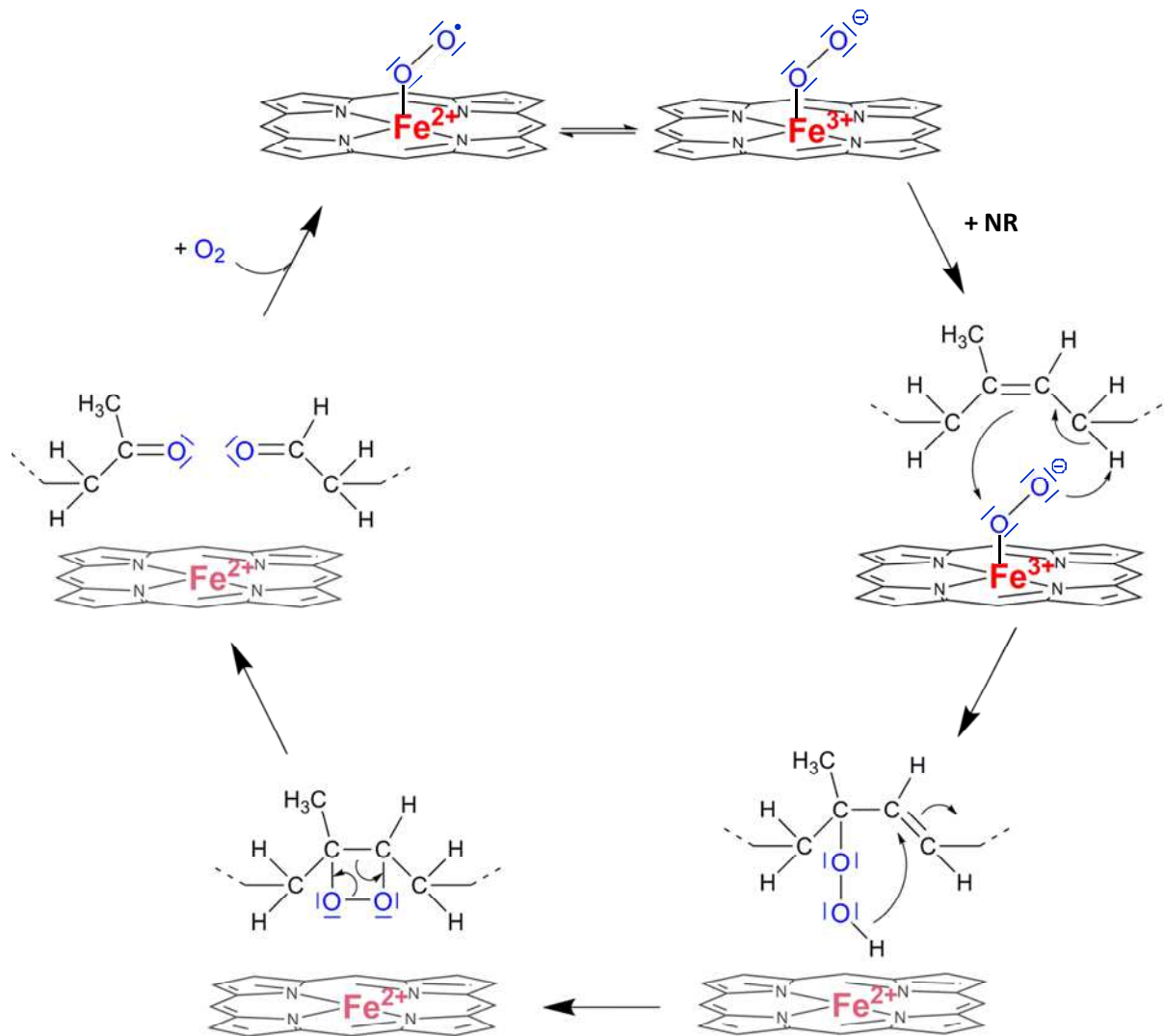


Abb. 4.7: Vorgeschlagener hypothetischer Reaktionsmechanismus der Kautschukspaltung durch RoxA. Das Schema basiert auf der Annahme eines oxygenierten Grundzustandes von RoxA und der Kautschuk-Spaltungsreaktion an nur einem, dem N-terminalen Hämzentrum. Der Mechanismus schlägt die Spaltung über eine Substrat-Hydroperoxo-Zwischenverbindung ohne die Entstehung eines Substratradikals vor. Bei der eigentlichen Spaltung der C=C-Bindung wäre die Hämgruppe selbst nicht beteiligt (symbolisiert durch das blass unterlegte Hämsymbol). Die Hämebene ist nach hinten gekippt dargestellt; NR = Natural Rubber.

4.12 RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y ist kein Unikat

Seit der Identifizierung der Aminosäuresequenz der Rubber Oxygenase durch Jendrossek und Reinhard (2003) wurde regelmäßig nach Proteinen mit hoher Ähnlichkeit gesucht. Aber erst 2009 fanden sich gleich zwei solcher hypothetischen Proteine (Hoch_1661 und Hoch_1446) im halophilen Myxobakterium *Haliangium ochraceum* DSM 14365, Mitte 2011 ein weiteres (LILAB_11505) im halotoleranten *Myxococcus fulvus* HW-1. Keinem dieser Proteine konnte bisher eine Funktion zugewiesen werden. Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass *H. ochraceum* in der Lage ist, als erstes Gram-negatives Bakterium nach *Xanthomonas* sp. 35Y auf Latex-Overlay-Agar, wenn auch nur schwache Aufklarungszonen zu bilden und somit Poly(*cis*-1,4-isopren) zu spalten. Es gelang bisher nicht, diese Fähigkeit in Beziehung zu diesen Proteinen zu setzen, und scheiterte an den gleichen Schwierigkeiten wie sie bei der Überexpression von Mutanten beschrieben wurden (s. Kap. 3.7.2). Dennoch häufen sich durch diese Funde die Hinweise, dass RoxA-Homologe in der Natur vorhanden sind.

Ferner fielen bei der Betrachtung der chromosomalen Umgebung des ersten entdeckten potentiellen RoxA-Homologs Hoch_1661 sogleich Ähnlichkeiten zur Situation in *Xanthomonas* sp. auf. Downstream von *roxA* befinden sich Gene für eine Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase, eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase und eine Aminoglycosid-Phosphotransferase (Braaz, 2005 b), die ebenso in der nahen genomischen Umgebung zu Hoch_1661 in *H. ochraceum* lokalisiert sind. Die Aminosäuresequenzen der beiden letzteren weisen zudem hohe Ähnlichkeit zu dem entsprechenden Protein in *Xanthomonas* sp. auf (s. Abb. 3.28, Kap. 3.8.1). Diese Enzyme spielen bei der β -Oxidation eine wichtige Rolle. Die Nutzung der β -Oxidation zum Abbau von methylverzweigten Alkanen wie z. B. Pristan konnte bereits gezeigt werden (Sakai *et al.*, 2004; Lloyd *et al.*, 2008).

Gene mit wahrscheinlich gleicher Funktion befinden sich ebenso in der chromosomalen Region um LILAB_11505 in *M. fulvus*. Auch wenn die Anordnung der entsprechenden Gene im Genom von *H. ochraceum*, *M. fulvus* und *Xanthomonas* sp. unterschiedlich ist, so erscheint deren Ähnlichkeit, sowie das Auftreten am gleichen Genlocus kaum zufällig. Auf den Chromosomen der beiden Myxobakterien befinden sich zudem noch weitere, aufeinander folgende Gene am gleichen Ort, die im Fettsäure-Stoffwechsel eine entscheidende Rolle spielen und vermutlich für Acyl-CoA-Dehydrogenasen und 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen kodieren (s. Abb. 3.29). Desweiteren findet sich ein Gen für eine Short-Chain Dehydrogenase/ Reduktase (SDR), die NAD(P)H-abhängige Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen katalysiert (Kallberg *et al.*, 2002). Dies ist insofern interessant, da verschiedene Befunde für eine Beteiligung der β -Oxidation an der Weiterverwertung der initialen Latex-Spaltprodukte sprechen. Im Zuge einer Transposon-Mutagenese in *G. polyisoprenivorans* VH2 (Banh *et al.*, 2005) wurden anhand reduzierten Wachstums auf Poly(*cis*-1,4-isopren) u. a. die Gene für eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase (s. o.) und eine Short-Chain Dehydrogenase/ Reduktase identifiziert, die auch in der direkten genomischen

Umgebung von *Hoch_1661* zu finden sind. In *G. polyisoprenivorans* wurde zudem das Gen für eine α -Methylacyl-CoA-Racemase (*mcr*) als notwendig für die Verwertung von Poly(*cis*-1,4-isopren)-Abbauprodukten sowie methylverzweigten Kohlenwasserstoffen beschrieben. Das *mcr*-Gen in *G. polyisoprenivorans* befindet sich aber nicht in einem Gencluster mit den Genen für die Kautschukspaltung (Banh *et al.*, 2005; Arenskötter *et al.*, 2008). Mcr katalysiert die Umwandlung von (2*R*)- zu (2*S*)-Enantiomeren verschiedener Verbindungen bei der β -Oxidation von Isoprenoiden und kann die Umwandlung von α -C-Gruppen in für die β -Oxidation verwertbare β -C-Gruppen bewirken (Hiltunen & Qin, 2000; Lloyd *et al.*, 2008). Zuvor hatten bereits Bode *et al.*, anhand der Inhibition des Wachstums von *S. coelicolor* 1A auf Latex durch Acrylsäure, einem Inhibitor der β -Oxidation, und der Identifizierung von Zwischenprodukten Hinweise auf Beteiligung dieses Abbauweges an der Polyisoprenverwertung erhalten (Bode *et al.*, 2000; Bode *et al.*, 2001, vgl. Abb. 1.5).

Da eine Verstoffwechslung der Latex-Spaltprodukte durch β -Oxidation angenommen wird (Rose & Steichbüchel, 2005), ist die Anordnung von am weiteren Katabolismus beteiligten Genen in einem Cluster nicht abwegig. Auffällig sind die Lokalisierung eines Gens für ein Protein mit hoher Übereinstimmung zu RoxA (*Hoch_1661*) in einem solchen Cluster (s. Abb. 3.29) und gleichermaßen Funde solcher Gene innerhalb der bekannten Genomsequenz um *roxA* im *Xanthomonas*-Chromosom, sowie Ähnlichkeiten der genomischen Regionen um die möglicherweise homologen Gene in *H. ochraceum*, *M. fulvus* und *Xanthomonas* sp.. Leider sind bisher lediglich etwa 7,6 kb des *Xanthomonas*-Genoms um *roxA* sequenziert worden. Zum Vergleich der Situation in *Xanthomonas* sp. ist die Kenntnis eines größeren Bereiches um *roxA* wünschenswert. Diese könnte darüber Aufschluss geben, ob größere Übereinstimmung dieser Region zwischen den beiden Organismen besteht und auch im *Xanthomonas*-Genom ein Cluster von an der β -Oxidation bzw. dem Polyisoprenkatabolismus beteiligten Genen um *roxA* existiert. Da auch *H. ochraceum* offenbar schwache Aufklarungszonen auf Latex-Overlay-Agar bilden kann (s. Kap. 3.8.2), ist es vorstellbar, dass *Hoch_1661* eine ähnliche Funktion wie RoxA einnimmt. Erste Versuche der Überexpression gelangen bisher nicht. Dass *Hoch_1661* ein echtes RoxA-Homolog mit der Funktion, Kautschuklatex zu spalten, darstellt, kann erst nach erfolgreicher Expression und Reinigung des Proteins bewiesen werden. Sollte sich eine ähnliche oder gar gleiche Funktion dieser Proteine wie diejenige von RoxA bestätigen, bietet der Vergleich von konservierten Aminosäuren innerhalb dieser Proteine, zu denen RoxA deutlich höhere Ähnlichkeit als zu CCPs aufweist, weitere Anhaltspunkte für Mutageneseversuche. Ein Alignment zwischen RoxA und den beiden in *H. ochraceum* gefundenen Proteinen *Hoch_1661* und *Hoch_1446* zeigte neben den auch bei CCPs konservierten Bereichen, z. B. der "MauG"-Region, viele konservierte aromatische Aminosäuren, u. a. um Trp₃₀₂ (s. Abb. 3.28), die Ziel künftiger Mutageneseexperimente sein können. Die Übereinstimmung der Positionen vieler Prolin-Reste sowie zum ins Enzyminnere weisenden C-Terminus in RoxA sind Indizien für eine ähnliche räumliche Struktur.

Wenn es experimentell gelingt, eine Kautschuk-spaltende Fähigkeit dieser offenkundig verwandten Proteine nachzuweisen, wäre dies der erste Fund eines *roxA*-Homologs. Die Tatsache, dass es sich bei *H. ochraceum* und auch bei *M. fulvus* um Gram-negative Bakterien handelt, könnte die Theorie stützen, dass Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedliche Enzyme zur Latexspaltung entwickelt haben. Denn bei allen daraufhin untersuchten Gram-positiven Kautschuk abbauenden Bakterien wurden Lcp-Homologe gefunden, mögliche RoxA-Homologe bisher nur bei Gram-negativen.

Unter Umständen muss zusätzlich zwischen Aufklarungszonen und Nicht-Aufklarungszonen-Bildenden unterschieden werden. Die Fähigkeit zur Zersetzung von Kautschuk wurde auch drei Gram-negativen, adhäsiv wachsenden Stämmen zugeschrieben (Linos *et al.*, 2000 b; Bode *et al.*, 2000; Bode *et al.*, 2001), deren Latex-abbauende Enzyme nicht sekretiert werden und sich somit vermutlich von RoxA unterscheiden. Das für die Bildung von Aufklarungszonen notwendige Lcp aus *Streptomyces* sp. K30 (Rose *et al.*, 2005 b) wurde jedoch auch bei adhäsiv wachsenden Stämmen von *Gordonia* nachgewiesen, scheint aber bei diesen für die Kautschukverwertung nicht essentiell zu sein (Bröker *et al.*, 2008 b). Vom evolutionsgeschichtlichen Standpunkt wäre es interessant, ob bei den beschriebenen Gram-negativen, Nicht-Aufklarungszonen bildenden Stämmen ebenfalls RoxA- oder gar Lcp-Homologe oder davon verschiedene Enzyme existieren. Der Fund von Hoch_1661 und Hoch_1446 im Aufklarungszonen bildenden *H. ochraceum* weist auf eine Verbreitung von RoxA unter Gram-negativen, Aufklarungszonen-bildenden Bakterien hin, das Fehlen bei den bisher bekannten Gram-negativen, adhäsiv wachsenden Stämmen eine Beschränkung auf diese Gruppe.

Weniger deutlich als bei Hoch_1661 oder LILAB_11505, doch noch immer von höherer Sequenzähnlichkeit als bakterielle Peroxidasen zu RoxA, sind hypothetische Proteine, die bei auffällig vielen Planktomyceten gefunden wurden. Unter diesen befinden sich interessanterweise viele marine Vertreter, wozu auch die beiden aus marinen Küstenboden isolierten *H. ochraceum* und *M. fulvus* zu zählen sind. Da diese Proteine jedoch im Gegensatz zu den genannten Proteinen aus beiden Myxobakterien stets ein deutlich geringeres Molekulargewicht als RoxA aufweisen, liegt eine andere Funktion, beispielsweise als Peroxidase näher. Die Salztoleranz der meisten dieser Organismen legt eine Überprüfung des Wachstumsverhaltens auf salzhaltigen Medien des noch nicht exakt zugeordneten *Xanthomonas* sp. 35Y nahe. Bis dahin kann über einen Zusammenhang zur Salztoleranz der extrazellulären Rubber Oxygenase A, die bis zu der getesteten Konzentration von 2 M NaCl keinerlei Aktivität einbüßte, NaCl zur Verhinderung einer Präzipitation sogar hilfreich ist, nur spekuliert werden. Der rasante Zuwachs an Sequenzen im Zuge von Genomsequenzierungen der letzten Jahre lässt für die nahe Zukunft weitere Funde erwarten, welche die Beantwortung mancher ungelöster Fragen zum Mechanismus dieses interessanten Enzyms bzw. zu dessen Evolution erleichtern werden.

4.13 Hat RoxA bei seinen Nutzern das Monopol zur Kautschukspaltung?

Für Kautschuk verwertende Mikroorganismen wurde basierend auf einer breiten Molekulargewichtsverteilung der Spaltprodukte eine Endo-Typ-Spaltung des Polymers vermutet (Jendrossek *et al.*, 1997; Bode *et al.*, 2000; Bode *et al.*, 2001), auch für den bisher einzigen Gram-negativen *Xanthomonas* sp. (Tsuchii & Takeda, 1990). Bei Analyse der räumlichen Struktur von RoxA kommt jedoch angesichts der Abschirmung der Hämzentren von der Umgebung die Frage auf, wie eine Endo-Typ-Spaltung des polymeren Kautschuks erfolgen kann, wenn keine größeren strukturellen Umlagerungen stattfinden, stattdessen die "Einfädelerung" eines Polymerstrang an einem Ende zum katalytischen Zentrum in RoxA erfolgte. Dieser Gedanke wirft die Beteiligung eines oder mehrerer weiterer Enzyme am Kautschukabbau durch *Xanthomonas* sp. auf, die durch eine zufällige Spaltung der hochmolekularen Stränge dem eigentlichen, die verwertbaren Spaltprodukte produzierenden Enzym (RoxA) eine größere Anzahl von Substratmolekülen bereitstellen könnten. Diese Überlegungen knüpfen an eine ältere, bereits von Tsuchii & Takeda (1990) vorgeschlagene Hypothese an, wonach der Kautschukabbau durch *Xanthomonas* sp. 35Y in zwei Schritten vorgeschlagen wurde, einem ersten Schritt einer zufälligen Zerlegung der hochmolekularen Polymerstränge in solche von mittlerer Größe und einem zweiten Schritt der definierten Spaltung, hauptsächlich in das aus drei Isopreneinheiten gebildete ODTD (=ADA).

Im Falle der Kautschuk verwertenden Gram-positiven Bakterien wie *Streptomyces* sp. ist die Annahme der Beteiligung weiterer Kautschuk spaltender Enzyme zusätzlich und mit Ähnlichkeit zum "Latex Clearing Protein" Lcp nicht neu. Es wurden bisher bei allen getesteten, sowohl Aufklarungszonen-bildenden als auch adhäsiv wachsenden Gram-positiven Bakterien *lcp*-homologe Gene gefunden, die für Enzyme mit der Fähigkeit zur Latexspaltung kodieren. Da die entsprechenden Genprodukte aber nicht bei allen Stämmen essentiell für das Wachstum auf Kautschuk sind (Bröker *et al.*, 2008 b), lässt sich annehmen, dass dies nicht die einzigen Kautschuk spaltenden Enzyme im Genom der jeweiligen Organismen sind. Offen blieb dabei bisher die Frage, ob diese möglicherweise durch Genduplikation entstandene *lcp*-Homologe darstellen oder davon verschiedene Enzyme existieren.

Auf dem Chromosom von *H. ochraceum*, der im Rahmen dieser Arbeit als bisher einziges Gram-negatives, offensichtlich Kautschuk verwertendes, Aufklarungszonen bildendes Bakterium neben *Xanthomonas* sp. identifiziert wurde (s. Kap. 3.8), gibt es ein zweites Gen mit geringerer, aber signifikanter Aminosäure-Identität ($\approx 36\%$) zu RoxA und zweier Hämbindemotive an einem entfernten Genlocus (Hoch_1446) (s. o.). In gleicher Leserichtung befindet sich im Anschluss ein Gen mit Ähnlichkeit zu Aldehyd- bzw. Keto-Reduktasen (Hoch_1447). Das entsprechende Gen ist somit in gleicher Weise angeordnet wie *oxiAB* downstream von *lcp* in *Streptomyces* sp. K30. Die Oxidoreduktase OxiAB erfüllt eine essentielle Funktion im Kautschukmetabolismus wahrscheinlich als heterodimere Aldehyd-Dehydrogenase, wird nur in Anwesenheit von Poly(*cis*-1,4-isopren) produziert und zusammen

mit *lcp* als polycistronische mRNA abgelesen (Rose *et al.*, 2005 b; Yikmis *et al.*, 2008). Diese Entdeckung ist in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen unterstützt der Fund eines Gens mit hoher Ähnlichkeit zu *RoxA* zusammen mit einem Gen für eine Aldo-/Keto-Reduktase am gleichen Genlocus die Vermutung, dass es weitere Kautschuk spaltende Enzyme in einem Gram-negativen Bakterium geben könnte. Zum anderen unterstützt es den postulierten Abbauweg durch β -Oxidation, indem *Hoch_1447* ein erstes Analog zu *oxiAB* in einem Gram-negativen, Kautschuk verwertenden Bakterium darstellen könnte. Denn dieses Enzym wäre wie *OxiAB* in der Lage, den postulierten ersten Schritt der Weiterverwertung der durch *RoxA* produzierten Spaltprodukte zu katalysieren, nämlich die Oxidation dieser Poly(*cis*-1,4-isopren)-Fragmente mit Keto- und Aldehydenden zu den entsprechenden Alkoholen, um damit einen weiteren Abbau durch β -Oxidation zu ermöglichen.

Um diesen Annahmen eine fundierte Grundlage zu geben, ist es zunächst erforderlich, die Funktionalität von *Hoch_1446* zur Latexspaltung bzw. die Beteiligung von *Hoch_1447* an der Latexverwertung zu beweisen. Theoretisch wäre auch eine Funktion von *Hoch_1446* als Peroxidase vorstellbar. Gleichermäßen könnte die Suche nach weiteren *roxA*-Homologen innerhalb der *Xanthomonas* sp. -Genomsequenz zur Klärung der Frage beitragen, ob in *Xanthomonas* sp. und anderen (potentiellen) Latex-spaltenden Gram-negativen Bakterien weitere zur Kautschukspaltung fähige bzw. benötigte Enzyme existieren, so wie es sich wahrscheinlich auch bei Gram-positiven verhält. Einen Hinweis darauf ließe sich erhalten, indem eine *roxA*-Negativmutante von *Xanthomonas* sp., welcher die Fähigkeit zur Aufklarungszonenbildung fehlt, bei Wachstum auf Latexmilch enthaltendem Medium in gleicher Weise wie z. B. von Bode *et al.*, (2001) durchgeführt, mittels GPC (Gel Permeation Chromatography) auf eine Abnahme des durchschnittlichen Molekulargewichts der Polyisoprenstränge untersucht würde. Der etablierte *RoxA*-Aktivitätstest ist dazu nicht dienlich, da er auf der Identifizierung des 236 Da "kleinen" Hauptspaltproduktes ODTD basiert. Letzteres würde von einem solchen Enzym nur in geringer Menge produziert werden, was über eine undefinierte Latex-spaltende Aktivität hinwegtäuschen würde. Wäre in GPC-Untersuchungen eine klare Abnahme der Durchschnittslänge der Polyisoprenstränge erkennbar, läge die Beteiligung eines oder mehrerer weiterer extrazellulärer Enzyme nahe, die zunächst die hochmolekularen Substratstränge in kleinere Moleküle zerlegten.

Bis darüber Gewissheit besteht, ist eine Weiterführung dieses Gedanken verfrüht. Dennoch soll auf der Grundlage der Ergebnisse der Reinigung von *RoxA* aus dem *Xanthomonas*-Kulturüberstand eine grundlegende Schwierigkeit angesprochen werden. Sollte ein weiteres Enzym vorhanden sein, das die langen Polymerstränge in einer zufälligen Weise spaltet, so müsste dieses ebenso wie *RoxA* sekretiert werden und würde ebenfalls im aufzureinigenden Kulturüberstand vorliegen. Im Falle einer Sequenzähnlichkeit zu *RoxA* bzw. der Anwesenheit zweier Hämgruppen, wie beispielsweise zwischen *Hoch_1446* zu *Hoch_1661*, besteht eine grundlegende Problematik bei der Reinigung von *RoxA* bzw. dieser Enzyme. Sie würden gleichermäßen zur Häm-typischen Absorption bei 406 nm beitragen, mit

deren Hilfe routinemäßig "RoxA-Fractionen" bei der chromatographischen Reinigung identifiziert werden, und könnten ein ähnliches Adsorptionsverhalten aufweisen. Gleiches gilt für mögliche weitere RoxA-Homologe, welche die gleiche spezifische Reaktion wie RoxA katalysierten. Solche könnten zu einer inhomogenen Präparation beitragen und unter Umständen für versuchs- und präparationsabhängige Unterschiede verantwortlich sein. Im Sinne einer verlässlichen Interpretation spektroskopischer Daten über RoxA sollte daher die Suche nach RoxA-Homologen im *Xanthomonas*-Genom voran getrieben werden.

Diese der Vollständigkeit halber angebrachten Überlegungen stellen jedoch keinesfalls die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung in Frage. Ein gewichtiges Argument unterstreicht, dass das gereinigte und charakterisierte RoxA das Genprodukt eines einzelnen Genes ist: Die Expression von rekombinantem RoxA erfolgte durch Induktion mit Rhamnose und ohne das Substrat Latex, dessen Anwesenheit zur Induktion der Expression von RoxA bzw. weiterer möglicher Homologen erforderlich ist bzw. sein muss. Da bei Abwesenheit von Latex im *Xanthomonas*-Kulturüberstand praktisch keine Latex spaltende Aktivität zu verzeichnen ist und bei nicht-stationären Kulturen kein Häm-typisches Absorptionsmaximum bei 406 nm beobachtet werden kann, muss das gereinigte Enzym auf das unter Rhamnose-Kontrolle stehende Gen zurückgehen. Rekombinantes RoxA unterschied sich in Aktivität und spektroskopischen Eigenschaften nicht zu Latex-induziertem RoxA, weshalb das Vorliegen gleicher Proteine anzunehmen ist. Zudem entkräftet dies die Möglichkeit, dass ein weiteres Latex-induziertes Hämprotein zusammen aufgereinigt wurde und die anschließende Charakterisierung von RoxA beeinflusste. Auch entsprachen sich die Vorgehensweise und die Elutionsprofile der chromatographischen Reinigung aus dem Kulturüberstand der Wildtyp-Kultur mit Latex und diejenigen von rekombinantem RoxA aus Vollmedien ohne Latex.

Die in dieser Arbeit vorgetragenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des N-terminalen, fünffach koordinierten Hämzentrums als katalytisches Zentrum in RoxA. Sollten diese beiden Schritte des Latexabbaus von einem Enzym katalysiert werden, so müsste dieses zusätzlich zu einer definierten Spaltung alle drei Isopreneinheiten auch in der Lage sein, die freien Polymerstränge ungehindert an zufälliger Position angreifen zu können. Dies wäre nur möglich, wenn das katalytische Zentrum für die hochmolekularen Polymerstränge von außen frei zugänglich ist. Ob bei einem Enzym mit hoher Sequenz- und vermutlich auch Strukturähnlichkeit zu RoxA oder auch bei RoxA selbst die erforderlichen entsprechenden Umlagerungen stattfinden könnten, ist spekulativ. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand kann eine umfassende Konformationsänderung als Teil des Mechanismus wie bei CCPs aber bezweifelt werden (vgl. Kap. 4.11.1). Für die Kautschukspaltung durch RoxA selbst wurden bisher mittels CD-Spektroskopie keine Belege auf größere konformelle Umlagerungen erhalten. Auch die Kristallstruktur nach vollständiger Reduktion des rekombinanten Enzyms zeigt keine nennenswerten Veränderungen zur Struktur von RoxA aus Latexkultur an (pers. Mitteilung O. Einsle). Daher erscheint es im Falle der Notwendigkeit eines zweiten

extrazellulären, Latex spaltenden Enzyms zum jetzigen Zeitpunkt wahrscheinlicher, dass diese Aufgabe einem weiteren, bisher unbekanntem Enzym zukäme. In diesem Zusammenhang wünschenswert wäre das Gelingen der Kristallisation von RoxA nach Bindung eines Substratanalogons. Zum besseren Verständnis der Kautschukverwertung in *Xanthomonas* sp. 35Y wäre zudem die Kenntnis der vollständigen Genomsequenz hilfreich, welche die Suche nach *roxA*-Homologen bzw. weiteren am Latexabbau beteiligten Genen erleichtern würde.

4.14 Ausblick

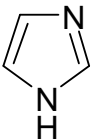
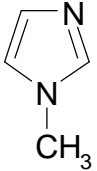
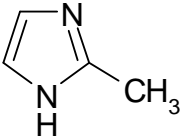
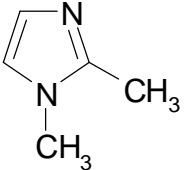
Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen die Interaktion externer Substrate wie H_2O_2 und N-enthaltender Hämliganden mit dem N-terminalen Hämzentrum und liefern deutliche Hinweise auf die Bindung von O_2 an sechster Koordinationsstelle, sowie die Lokalisierung von Poly(*cis*-1,4-isopren) und verwandter Verbindungen in der unmittelbaren Nähe dieses Hämzentrums, welches somit als katalytisches Zentrum des Enzyms identifiziert wurde. Die spektroskopischen Daten bieten eine wichtige Grundlage für einen künftigen Vergleich mit RoxA-Mutanten. Die gesammelten Daten eignen sich anhand des Vergleichs mit strukturell oder funktionell ähnlichen Enzymen, die Möglichkeiten der RoxA-katalysierten Reaktion von Kautschuk mit O_2 einzugrenzen. Der Vergleich zu Proteinen mit den bisher größten strukturellen Übereinstimmungen, bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen und MauG-Proteinen, zeigt in beiden Fällen klare Unterschiede auf und unterstreicht, dass es sich bei RoxA um ein einzigartiges Enzym mit unterschiedlicher Funktionsweise handelt.

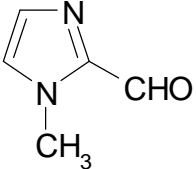
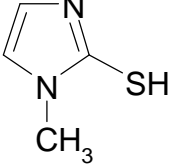
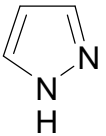
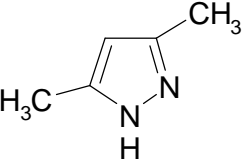
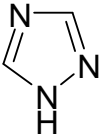
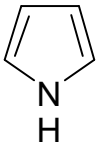
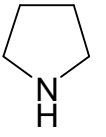
Zum Verständnis des molekularen Reaktionsmechanismus sind die vorliegenden Daten und auch die ermittelte RoxA-Struktur nicht ausreichend. Sie zeigen auch Fragestellungen auf, die aber für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Latexspaltung wichtig sind und einer eingehenderen Betrachtung bedürfen. Dazu zählen beispielsweise die Reaktion mit H_2O_2 angesichts dessen hemmender Wirkung oder das Auftreten einer möglichen Fe- O_2 -Form bei Abwesenheit des Substrates. Quantitative EPR-Messungen können einen Hinweis liefern, ob O_2 bereits in RoxA "as isolated" gebunden ist. Zur Identifizierung koordinierender Sauerstoffspezies eignet sich die Resonanz-Raman-Spektroskopie. Da bisher die Kristallisation von Substrat-gebundenem RoxA nicht gelang, ist weiterhin unklar, auf welchem Wege das polymere Substrat zum Hämzentrum gelangt, an welchem die oxidative Spaltung erfolgt bzw. in welcher Weise die gebildeten Spaltprodukte das katalytische Zentrum wieder verlassen. In Verbindung mit spektroskopischen Methoden kann die Mutagenese von Aminosäuren der Häm-Cavity helfen, die Art und Weise zu ergründen wie gebundener O_2 stabilisiert werden bzw. die Spaltung der O–O-Bindung erfolgen kann und warum der Einbau nur in Poly-*cis*-isopren, aber nicht in das *trans*-Isomer stattfindet. Die Mutagenese umliegender aromatischer Aminosäuren kann Informationen liefern, ob und in welcher Weise solche zur Stabilisierung des Porphyrin-Systems bzw. der elektronischen

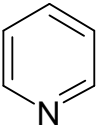
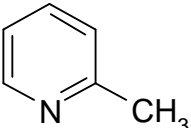
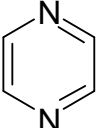
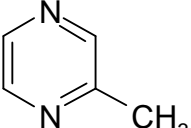
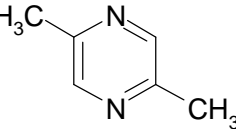
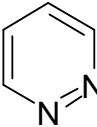
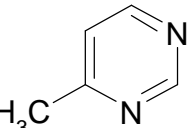
Eigenschaften der Hämgruppen beitragen und bei einer möglichen Elektronenverschiebung zwischen den Hämzentren eine für den Spaltungsmechanismus essentielle Rolle spielen. Ob die überdurchschnittlich hohe Zahl an aromatischen Aminosäuren, v. a. Trp-Resten die Funktion bei einer möglicherweise essentiellen Elektronentransportkette erfüllt oder bei der Stabilisierung des Enzyms eine Rolle spielen, müssen künftige Mutagenese-Experimente zeigen. Auch wenn bisher manches gegen eine direkte Funktion des C-terminalen Hämzentrums im Spaltungsmechanismus spricht, sollte die Frage nach deren genauer Funktion weiterhin im Fokus künftiger Untersuchungen stehen.

Tab. 5.1: Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen mit Imidazol und strukturell ähnlichen Verbindungen durch UV-Vis-Spektroskopie und RoxA-Aktivitätstest mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Liganden. Angegeben sind neben der Strukturformel der Verbindungen die Intensitäten der optischen Veränderungen [mAU] der Soret-Bande am Endpunkt der Reaktion im absoluten UV-Vis-Spektrum, sowie dem Differenzspektrum bei einer RoxA-Konzentration von 2 μM unter aeroben Bedingungen, das Verhältnis der Intensitäten der α -Bande zur Soret-Bande, sowie die Geschwindigkeit der Reaktion. RoxA "as isolated" besitzt ein Absorptionsmaximum bei 407 nm und zeigt nach einer vollständigen Reduktion bei 2 μM eine Absorptionzunahme bei 418 nm von ca. 350 mAU. Die Restaktivitäten beziehen sich auf die Durchführung des Tests in 100 mM KPP (pH 7) für 3 h, sofern nicht anders angegeben.

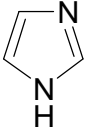
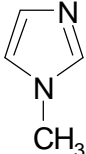
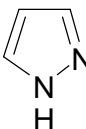
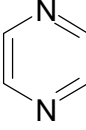
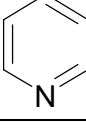
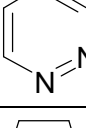
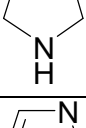
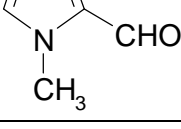
Δ : Absorptionsdifferenz zu RoxA "as isolated"; – : keine Reaktion.

| Substanz | Struktur | Soret-Maximum (UV-Vis absolut) | Soret-Maximum (Differenz zu RoxA "as isolated") | Δ Soret (mAU) | Δ α -Bande / Δ Soret-Bande | Geschwindigkeit | Aktivitätstest [% Restaktivität] | | | |
|----------------------|---|--------------------------------|---|----------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|---------------|-------------------|------------------|
| | | | | | | | 10 mM | 1 mM | 100 μM | 10 μM |
| Imidazol |  | 407 + 417 (Doppelmax.) | 418 | 140 | 0,18 | mittel (Endpkt. ca. 1h) | < 10 | 15 50 (ÜN) | 45 | 85 |
| 1-Methylimidazol |  | 407 + 417 | 418 | 145 | 0,19 | mittel (Endpkt. ca. 1h) | 2 | 7 | 40 | |
| 2-Methylimidazol |  | 407 | (418) | (10) | (0,3) | sehr langsam (sehr gering, ÜN) | 75 | 97 | 93 | |
| 1,2-Dimethylimidazol |  | 407 | (418) | (10) | (0,25) | sehr langsam (sehr gering, ÜN) | 50 | 91 | 96 | |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---------|---------|----------|-------|--------------------------------------|----|------|-----|----|
| 1-Methyl- imidazol- Carboxaldehyd |  | 413 | 415-416 | 90 | 0,3 | langsam, (kontinuierlich →2 h) | | 90 | 109 | |
| Methimidazol |  | 407 | – | (0) | – | – | 96 | >100 | 98 | |
| Pyrazol |  | 412-413 | 416 | 90 | 0,2 | sehr schnell (Endpkt. ca. 2') | 8 | 45 | 90 | |
| (3,5-)Dimethyl- pyrazol |  | 407 | 415-416 | 25 | 0,19 | (langsam) | | | 96 | 90 |
| 1,2,4-Triazol |  | 407 | – | (7) | (0,2) | – | 45 | 92 | 93 | |
| Pyrrol |  | 407 | – | (3) | – | – | | 107 | 110 | |
| Pyrrolidin |  | 411 | 418 | (30)- 85 | 0,28 | langsam (kontinuierlich → ÜN) | | 82 | 89 | |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|----------------------------------|-----|------|--------|---|---|----|----|---|
| Pyridin |  | 413-414 (Schulter bei 407) | 416 | 100 | 0,3 | sehr schnell (Endpkt. ca. 2') | 3 | 6 | 12 | |
| 2-Methyl- pyridin |  | 407 | - | (4) | - | - | | 86 | 91 | |
| Pyrazin |  | 411 | 415 | 70 | 0,5 | sehr schnell (Endpkt. ca. 2') | 8 | 7 | 31 | |
| 2-Methyl- Pyrazin |  | 411 | 415 | 90 | 0,45 | sehr schnell (vgl. Pyrazin) | | 7 | 42 | |
| 2,5-Dimethyl- Pyrazin |  | 407 | 414 | (15) | (0,36) | (sehr langsam → ÜN) | | 87 | 95 | |
| Pyridazin |  | 410 | 415 | 60 | 0,45 | schnell (Endpkt. ca. 30') | | 45 | 89 | |
| 4-Methyl- Pyrimidin |  | 412 | 415 | 100 | 0,33 | mittel (kontinuierlich → ca. 90') | | 8 | 33 | |
| Hydrazin | $\text{H}_2\text{N} - \text{NH}_2$ | 407 (Abs.- abnahme) | 416 | (10) | (0,3) | langsam | 0 | 0 | 0 | 3 |

Tab. 5.2: Übersicht über die Restaktivitäten und optische Veränderungen von RoxA mit einigen Imidazol ähnlichen Verbindungen vor und nach einer Gelfiltration. Die Ansätze wurden zur vollständigen Ausprägung der optischen Effekte 3 h bei RT mit 10 mM der Verbindungen und 3 μ M RoxA inkubiert, anschließend ein Teil umpuffert. Die im UV-Vis-Spektrum sichtbaren Veränderungen blieben auch nach Entfernung dieser Substanzen aus dem Puffer mit Ausnahme von Pyrazol erhalten. Die RoxA-Aktivität war aber nach Durchführung des Tests über 3,5 h wieder vollständig hergestellt, abgesehen von einer gewissen Hemmung mit Imidazol und 1-Methylimidazol. Für den Aktivitätstest wurden 0,3 μ M RoxA, d. h. 1/10 der Konzentration des Batch-Ansatzes eingesetzt bzw. ein entsprechend größeres Volumen nach Gelfiltration. Die Liganden-Konzentration in den nicht umpufferten Ansätzen im Aktivitätstest betrug demnach 1 mM.

| Substanz | Struktur | Optische Veränderung nach Umpufferung* | Aktivitätstest (3,5 h) [% Restaktivität] | |
|--------------------------------|---|--|--|------------------|
| | | | ohne Umpufferung | nach Umpufferung |
| Imidazol |  | + | 7 % | 54 % |
| 1-Methylimidazol |  | + | 3 % | 76 % |
| Pyrazol |  | - | 70 % | 101 % |
| Pyrazin |  | + | 1 % | 104 % |
| Pyridin |  | + | 0 % | 107 % |
| Pyridazin |  | + | 37 % | 91 % |
| Pyrrolidin |  | + | 90 % | 100 % |
| 1-Methylimidazol-Carboxaldehyd |  | + | 77 % | 93 % |

* + : optische Veränderung blieb erhalten, - : optische Veränderung ging verloren

Literaturverzeichnis

- Aasa, R., Albracht, S. P. J., Falk, K.-E., Lanne, B. and Vänngård, T. (1976). EPR signals from cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **422**(2):260–272.
- Aasa, R., Ellfolk, N., Rönnberg, M. and Vänngård, T. (1981). Electron paramagnetic resonance studies of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **670**(2):170–175.
- Tarboush, N., Jensen, L. M. R., Feng, M., Tachikawa, H., Wilmot, C. M. and Davidson, V. L. (2010). Functional importance of tyrosine 294 and the catalytic selectivity for the bis-Fe(IV) state of MauG revealed by replacement of this axial heme ligand with histidine. *Biochemistry* **49**(45):9783–9791.
- Agrawal, R., Sharma, P. K. and Rao, G. S. (2001). Release of iron from ferritin by metabolites of benzene and superoxide radical generating agents. *Toxicology* **168**(3):223–230.
- Alder, A., Holdermann, I., Beyer, P. and Albabili, S. (2008). Carotenoid oxygenases involved in plant branching catalyse a highly specific conserved apocarotenoid cleavage reaction. *Biochemical Journal* **416**(2):289–296.
- Ambler, R. (1991). Sequence variability in bacterial cytochromes *c*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1058**(1):42–47.
- Ambler, R. (1973). Bacterial cytochromes *c* and molecular evolution. *Systematic Biology* **22**(4):554–565.
- Arciero, D. M. and Hooper, A. B. (1994). A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states. *Journal of Biological Chemistry* **269**(16):11878–11886.
- Arenskötter, M., Bröker, D. and Steinbüchel, A. (2004). Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6):3195–3204.
- Arenskötter, Q., Heller, J., Dietz, D., Arenskötter, M. and Steinbüchel, A. (2008). Cloning and characterization of {alpha}-methylacyl coenzyme A racemase from *Gordonia polyisoprenivorans* VH2. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(22):7085–7089.
- Arnao, M., Acosta, M., Delrio, J. and Garcíacanoas, F. (1990). Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1038**(1):85–89.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. and Thöny-Meyer, L. (1998). Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251**(3):744–747.
- Ašperger, S. and Cetina-Čížmek, B. (1996). σ - and π -bonding modes of pyridine and imidazole type ligands in the transition states of their reactions with [CoIII(protoporphyrin IX dimethyl ester)(MeO)(MeOH)] in methanol. *Inorganic Chemistry* **35**(18):5232–5236.
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R. and Klee, H. J. (2006). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. Physiology and metabolism / edited by Eran Pichersky and Krishna Niyogi. *Current Opinion in Plant Biology* **9**(3):315–321.

- Avila, L., Huang, H.-w., Damaso, C. O., Lu, S., Moëne-Loccoz, P. and Rivera, M. (2003). Coupled oxidation vs heme oxygenation: Insights from axial ligand mutants of mitochondrial cytochrome *b5*. *Journal of the American Chemical Society* **125**(14):4103–4110.
- Balogopalakrishna, C., Manoharan, P. T., Abugo, O. O. and Rifkind, J. M. (1996). Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry* **35**(20):6393–6398.
- Banh, Q., Arenskötter, M. and Steinbüchel, A. (2005). Establishment of Tn5096-based transposon mutagenesis in *Gordonia polyisoprenivorans*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(9):5077–5084.
- Barrows, T. P. and Poulos, T. L. (2005). Role of electrostatics and salt bridges in stabilizing the compound I radical in ascorbate peroxidase. *Biochemistry* **44**(43):14062–14068.
- Batabyal, D. and Yeh, S.-R. (2009). Substrate–protein interaction in human tryptophan dioxygenase: The critical role of H76. *Journal of the American Chemical Society* **131**(9):3260–3270.
- Baynton, K., Bewtra, J., Biswas, N. and Taylor, K. (1994). Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1206**(2):272–278.
- Benson, D. R., Hart, B. R., Zhu, X. and Doughty, M. B. (1995). Design, synthesis, and circular dichroism investigation of a peptide-sandwiched mesoheme. *Journal of the American Chemical Society* **117**(33):8502–8510.
- Berekaa, M. M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. and Steinbüchel, A. (2000). Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **184**(2):199–206.
- Bergmeyer, H.U (1994). *Methods of enzymatic analysis* 1. 2nd Edition: Academic Press, New York. p. 495.
- Bickar, D., Bonaventura, J. and Bonaventura, C. (1982). Cytochrome *c* oxidase binding of hydrogen peroxide. *Biochemistry* **21**(11):2661–2666.
- Birke, J. (2010). Überexpression von RoxA (Rubber Oxygenase A) in *E. coli*, *B. subtilis* und im natürlichen Wirt *Xanthomonas* sp. 35Y. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Blankenhorn, G. (1976). Nicotinamide-dependent one-electron and two-electron (Flavin) oxidoreduction. Thermodynamics, kinetics, and mechanism. *European Journal of Biochemistry* **67**(1):67–80.
- Blauer, G., Sreerama, N. and Woody, R. W. (1993). Optical activity of hemoproteins in the solet region. Circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome *c* in aqueous solution. *Biochemistry* **32**:6674–6679.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**(2):93–99.
- Bode, H. B., Kerkhoff, K. and Jendrossek, D. (2001). Bacterial degradation of natural and synthetic Rubber. *Biomacromolecules* **2**(1):295–303.
- Bode, H. B., Zeeck, A., Pluckhahn, K. and Jendrossek, D. (2000). Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Applied and Environmental Microbiology* **66**(9):3680–3685.
- Bolscher, B., Plat, H. and Wever, R. (1984). Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **784**(2-3):177–186

- Boucher, L. J. (1970). Manganese porphyrin complexes. III. Spectroscopy of chloroaquo complexes of several porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **92**(9):2725–2730.
- Braaz, R. (2005 b). Poly(*cis*-1,4-isopren) Oxygenase A (RoxA). Identifizierung, Isolierung, Charakterisierung, Kristallisation und Reaktionsmechanismus einer neuartigen extrazellulären Dioxygenase. Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Braaz, R., Armbruster, W. and Jendrossek, D. (2005 a). Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. cleaves the carbon backbone of poly(*cis*-1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(5):2473–2478.
- Braaz, R., Fischer, P. and Jendrossek, D. (2004). Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12):7388–7395.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2):248–254.
- Bradley, A. L. (2004). A Distinctive electrocatalytic response from the cytochrome *c* peroxidase of *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(14):13297–13300.
- Brautigan, D. L., Feinberg, B. A., Hoffman, B. M., Margoliash, E., Preisach, J. and Blumberg, W. E. (1977). Multiple low spin forms of the cytochrome *c* ferrihemochrome. EPR spectra of various eukaryotic and prokaryotic cytochromes *c*. *Journal of Biological Chemistry* **252**(2):574–582.
- Brill, A. S. and Williams, R. J. P. (1961). The absorption spectra, magnetic moments and the binding of iron in some haemoproteins. *Biochemical Journal* **78**(2):246–253.
- Bröker, D., Arenskötter, M. and Steinbüchel, A. (2008 a). Transfer of megaplasmid pKB1 from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* strain Kb1 to related bacteria and its modification. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**(6):1317–1327.
- Bröker, D., Dietz, D., Arenskötter, M. and Steinbüchel, A. (2008 b). The genomes of the non-clearing-zone-forming and natural rubber degrading species *Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* harbor genes expressing Lcp activity in *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **8**(74):2288–2297.
- Bugg, T. D. H. (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* **59**(36):7075–7101.
- Burlamacchi, L., Guarini, G. and Tiezzi, E. (1969). Mechanism of decomposition of sodium dithionite in aqueous solution. *Transactions of the Faraday Society* **65**:496–502.
- Butler, J. E., Kaufmann, F., Coppi, M. V., Nunez, C. and Lovley, D. R. (2004). MacA, a diheme *c*-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology* **186**(12):4042–4045.
- Caillet-Saguy, C., Turano, P., Piccioli, M., Lukat-Rodgers, G. S., Czjzek, M., Guigliarelli, B., Izadi-Pruneyre, N., Rodgers, K. R., Delepierre, M. and Lecroisey, A. (2007). Deciphering the structural role of histidine 83 for heme binding in hemophore HasA. *Journal of Biological Chemistry* **283**(9):5960–5970.
- Cantor, C.R; Schimmel, P.R. (1980). Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the study of biological structure and function: W. H. Freeman.
- Castiglioni, E., Albertini, P. and Abbate, S. (2010). Evaluation of instrumental errors built in circular dichroism spectrometers. *Chirality* **22**(1E):E142.

- Castillo, F. J., Celardin, F. and Greppin, H. (1984). Peroxidase assay in plants: Interference by ascorbic acid and endogenous inhibitors in *Sedum* and *Pelargonium* enzyme extracts. *Plant Growth Regulation* **2**(2):69–75.
- Chaudhry, G. R., Suzuki, I., Duckworth, H. W. and Lees, H. (1981). Isolation and properties of cytochrome *c*-553, cytochrome *c*-550, and cytochrome *c*-549, 554 from *Nitrobacter agilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **637**(1):18–27.
- Chauhan, N., Thackray, S. J., Rafice, S. A., Eaton, G., Lee, M., Efimov, I., Basran, J., Jenkins, P. R., Mowat, C. G., Chapman, S. K. and Raven, E. L. (2009). Reassessment of the reaction mechanism in the heme dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society* **131**(12):4186–4187.
- Cheesman, M. R., Zumft, W. G. and Thomson, A. J. (1998). The MCD and EPR of the heme centers of nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: Evidence that the enzyme is structurally related to the heme-copper oxidases. *Biochemistry* **37**(11):3994–4000.
- Chung, L. W., Li, X., Sugimoto, H., Shiro, Y. and Morokuma, K. (2008). Density functional theory study on a missing piece in understanding of heme chemistry: The reaction mechanism for Indoleamine-2,3-Dioxygenase and Tryptophan-2,3-Dioxygenase. *Journal of the American Chemical Society* **130**(37):12299–12309.
- Corrêa, D. and Ramos, C. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research* **5**(3):164–173.
- Dixon, M. (1971). The acceptor specificity of flavins and flavoproteins. I. Techniques for anaerobic spectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **226**(2):241–258.
- Duchstein, H.-J., Fenner, H., Hemmerich, P. and Knappe, W.-R. (1979). (Photo)chemistry of 5-Deazaflavin. A clue to the mechanism of flavin-dependent (de)hydrogenation. *European Journal of Biochemistry* **95**(1):167–181.
- Dyuba, A. V., Arutyunyan, A. M., Vygodina, T. V., Azarkina, N. V., Kalinovich, A. V., Sharonov, Y. A. and Konstantinov, A. A. (2011). Circular dichroism spectra of cytochrome *c* oxidase. *Metallomics* **3**(4):417–432.
- Eaton, W. A. and Hochstrasser, R. M. (1968). Single-crystal spectra of ferrimyoglobin complexes in polarized light. *Journal of Chemical Physics* **49**(3):985.
- Echalier, A., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W. and Fülöp, V. (2006). Activation and catalysis of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus pantotrophus*. *Structure* **14**(1):107–117.
- Efimov, I., Basran, J., Thackray, S. J., Handa, S., Mowat, C. G. and Raven, E. L. (2011). Structure and reaction mechanism in the heme dioxygenases. *Biochemistry* **50**(14):2717–2724.
- Eicher, T.; Hauptmann, S. (2003). The chemistry of heterocycles: Structure, reactions, syntheses and applications: WILEY-VCH Verlag.
- Ellfolk, N. and Sievers, G. (1975). Circular dichroism of soybean leghemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **405**(2):213–227.
- Ellfolk, N., Rönnerberg, M., Aasa, R., Andréasson, L.-E. and Vänngård, T. (1983). Properties and function of the two hemes in *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **743**(1):23–30.
- Ellfolk, N., Rönnerberg, M., Aasa, R., Andriasson, L. and Vanngard, T. (1984). Anion binding to resting and half-reduced *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **784**:62–67.
- Enoki, M., Doi, Y. and Iwata, T. (2003). Oxidative degradation of *cis*- and *trans*-1,4-polyisoprenes and vulcanized natural rubber with enzyme-mediator systems. *Biomacromolecules* **4**(2):314–320.

- Fahrbach, N. (2007). Untersuchungen zur Regulation und Expression einer polyisoprenspaltenden Di-Häm-Dioxygenase aus *Xanthomonas* sp. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Fetzner, S. F. (2002). Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**(3):243–257.
- Fiege, R., Schreiber, U., Renger, G., Lubitz, W. and Shuvalov, V. A. (1995). Study of heme Fe(III) ligated by OH⁻ in cytochrome *b559* and its low temperature photochemistry in intact chloroplasts. *FEBS Letters* **377**(3):325–329.
- Fisher, L. H. (1944). The origin and development of synthetic rubbers. In: Symposium on the applications on synthetic rubbers. American Society for Testing Materials (Hrsg.). Philadelphia: The Society.
- Fleischhauer J. and Wollmer A. (1972). The influence of the aromatic amino acid side-chains on the sign of the Soret Cotton effect in chironomus hemoglobin (CTT 3). *Z. Naturforsch. B* **27**(5):530–532.
- Foote, N., Peterson, J., Gadsby, P., Greenwood, C. and Thomson, A. J. (1985). Redox-linked spin-state changes in the di-haem cytochrome *c551* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa* **230**(1):227–237.
- Foote, N., Thompson, A., Barber, D. and Greenwood, C. (1983). *Pseudomonas* cytochrome *c551* peroxidase. A purification procedure and study of CO-binding kinetics. *Biochemical Journal* **209**(3):701–707.
- Forouhar, F., Anderson, J. L. R., Mowat, C. G., Vorobiev, S. M., Hussain, A., Abashidze, M., Bruckmann, C., Thackray, S. J., Seetharaman, J., Tucker, T., Xiao, R., Ma, L.-C., Zhao, L., Acton, T. B., Montelione, G. T., Chapman, S. K. and Tong, L. (2007). Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan-2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(2):473–478.
- Fritz, G., Griesshaber, D., Seth, O. and Kroneck, P. M. H. (2001). Nonheme cytochrome *c*, a new physiological electron acceptor for [Ni,Fe] hydrogenase in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochemistry* **40**(5):1317–1324.
- Fu, R. (2009). Biochemical and spectroscopic characterization of tryptophan oxygenation: Tryptophan-2,3-dioxygenase and MauG. *Chemistry Dissertations. Paper 44*. http://digitalarchive.gsu.edu/chemistry_diss/44.
- Fu, R., Gupta, R., Geng, J., Dornevil, K., Wang, S., Zhang, Y., Hendrich, M. P. and Liu, A. (2011). Enzyme reactivation by hydrogen peroxide in heme-based tryptophan dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **286**(30):26541–26554.
- Fu, R., Liu, F., Davidson, V. L. and Liu, A. (2009). Heme iron nitrosyl complex of MauG reveals an efficient redox equilibrium between hemes with only one heme exclusively binding exogenous ligands. *Biochemistry* **48**(49):11603–11605.
- Fudou, R., Jojima, Y., Iizuka, T. and Yamanaka, S. (2002). *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *Journal of General and Applied Microbiology* **48**(2):109–115.
- Fülöp, V., Ridout, C. J., Greenwood, C. and Hajdu, J. (1995). Crystal structure of the di-haem cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* **3**(11):1225–1233.
- Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. (2002). The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**(1):19–23.

- Gadsby, P. and Thomson, A. (1986). Low-temperature EPR and near-infrared MCD studies of highly anisotropic low-spin ferrihaem complexes. *FEBS Letters* **197**(1-2):253–257.
- Gadsby, P. M. A. and Thomson, A. J. (1990). Assignment of the axial ligands of ferric ion in low-spin hemoproteins by near-infrared magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **112**(13):5003–5011.
- Gadsby, P. M. A., Hartshorn, R. T., Moura, J. J. G., Sinclair-Day, J. D., Sykes, A. G. and Thomson, A. J. (1989). Redox properties of the diheme cytochrome *c*₄ from *Azotobacter vinelandii* and characterisation of the two hemes by NMR, MCD and EPR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **994**(1):37–46.
- Gadsby, P. M. and Thomson, A. J. (1982). Identification of the imidazolate anion as a ligand in metmyoglobin by near-infrared magnetic circular dichroism spectroscopy. *FEBS Letters* **150**(1):59–63.
- Garber, E. and Margoliash, E. (1994). Circular dichroism studies of the binding of mammalian and non-mammalian cytochromes *c* to cytochrome *c* oxidase, cytochrome *c* peroxidase, and polyanions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1187**:289–295.
- Garscha, U. and Oliw, E. H. (2008). Critical amino acids for the 8(R)-dioxygenase activity of linoleate diol synthase. A comparison with cyclooxygenases. *FEBS Letters* **582**(23-24):3547–3551.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* **3**(7):408–414.
- Gill, S. C. and Hippel, P. H. von (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182**(2):319–326.
- Gilmour, R., Goodhew, C., Pettigrew, G., Prazeres, S., Moura, I. and Moura, J. (1993). Spectroscopic characterization of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemical Journal* **294**(745–752).
- Gilmour, R., Goodhew, F., Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Moura, J. J. and Moura, I. (1994). The kinetics of the oxidation of cytochrome *c* by *Paracoccus* cytochrome *c* peroxidase. *Biochemical Journal* **300**:907–914.
- Girerd, J.-J., Banse, F. and Simaan, A. (2000). Characterization and properties of non-heme iron peroxo complexes. Metal-oxo and metal-peroxo species in catalytic oxidations. In: Bernard Meunier (Hg.), Bd. 97: Springer Berlin / Heidelberg (Structure & Bonding):145–177.
- Göker, M., Cleland, D., Saunders, E., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.-F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Pagani, I., Ivanova, N., Mavromatis, K., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C. D., Detter, J. C., Beck, B., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C. and Klenk, H.-P. (2011). Complete genome sequence of *Isosphaera pallida* type strain (IS1BT). *Standards in Genomic Science* **4**(1):63–71.
- Goodhew C.F., Wilson I.B., Hunter D.J. and Pettigrew G.W. (1990). The cellular location and specificity of bacterial cytochrome *c* peroxidases. *Biochemical Journal* **271**(3):707–712.
- Gouterman, M. (1961). Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy* **6**:138–163.
- Gouterman, M. (1979). Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. In: D. Dolphin (Hg.): The Porphyrins Vol. III A: Academic. New York.
- Grassie, Norman; Scott, Gerald (1988). Polymer degradation and stabilisation: Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Greve, H.-H. and Threadingham, D. (2000). Rubber, 1. Survey. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany.
- Guallar, V. (2003). Peripheral heme substituents control the hydrogen-atom abstraction chemistry in cytochromes P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(12):6998–7002.
- Hamberg, M., Leon I. P., Rodriguez M. J. and Castresana C. de (2005). α -Dioxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**(1):169–174.
- Hambusch, N. (2008). Herstellung einer RoxA Knock-out Mutante von *Xanthomonas* sp. 35Y und Rhamnose induzierte Überexpression von RoxA im Wildtyp. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Hambusch, N., Schmitt, G. and Jendrossek, D. (2010). Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Journal of Applied Microbiology* **109**(3):1067–1075.
- Hanlon, S. P., Holt, R. A. and McEwan, A. G. (1992). The 44-kDa *c*-type cytochrome induced in *Rhodobacter capsulatus* during growth with dimethylsulphoxide as an electron acceptor is a cytochrome *c* peroxidase. *FEMS Microbiology Letters* **97**(3):283–287.
- Harrington, J. P., Pandolfelli, E. R. and Herskovits, T. T. (1973). Solution studies on heme proteins: Circular dichroism and optical rotation of *Lumbricus terrestris* and *Glycera dibranchiata* hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **328**(1):61–73.
- Heisey, R. M. and Papadatos, S. (1995). Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(8):3092–3097.
- Heitmann, D. and Einsle, O. (2005). Structural and biochemical characterization of Dhc2, a novel diheme cytochrome *c* from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemistry* **44**(37):12411–12419.
- Hiltunen, J. K. and Qin, Y.-M. (2000). [beta]-Oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1484**(2-3):117–128.
- Hiner, A. N. P. (2002). Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and *Arthromyces ramosus* peroxidase, with hydrogen peroxide. Catalase-like activity, compound III formation, and enzyme inactivation. *Journal of Biological Chemistry* **277**(30):26879–26885.
- Hirata, F. and Hayaishi, O. (1975). Studies on indoleamine-2,3-dioxygenase. I. Superoxide anion as substrate. *Journal of Biological Chemistry* **250**(15):5960–5966.
- Hirata, F., Ohnishi, T. and Hayaishi, O. (1977). Indoleamine-2,3-dioxygenase. Characterization and properties of enzyme. O₂-complex. *Journal of Biological Chemistry* **252**(13):4637–42.
- Hoffmann, M. (2007). Crystallographic studies on diheme cytochrome *c* enzymes. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Hoffmann, M., Braaz, R., Jendrossek, D. and Einsle, O. (2008). Crystallization of the extracellular rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. strain 35Y. *Acta Crystallographica Section F* **64**(2):123–125.
- Hoffmann, M., Seidel, J. and Einsle, O. (2009). CcpA from *Geobacter sulfurreducens* is a basic diheme cytochrome *c* peroxidase. *Journal of Molecular Biology* **393**(4):951–965.
- Hopkins, N. and Williams, C. H. (1995). Lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli* lacking the redox active disulfide: C44S and C49S. Redox properties of the FAD and interactions with pyridine nucleotides. *Biochemistry* **34**(37):11766–11776.

- Hörnsten, L., Su, C., Osbourn, A. E., Garosi, P., Hellman, U., Wernstedt, C. and Oliw, E. H. (1999). Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases. *Journal of Biological Chemistry* **274**(40):28219–28224.
- Hsu, M.-C. and Woody, R. W. (1969). Origin of the rotational strength of heme transitions of myoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **91**(13):3679–3681.
- Hsu, M.-C. and Woody, R. W. (1971). The origin of the heme cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **93**(14):3515–3525.
- Huang, Y. P. and Kassner, R. J. (1981). Fluoride binding to the cytochrome *c* ferric heme octapeptide. A model for anion binding to the active site of high spin ferric heme proteins. *Journal of Biological Chemistry* **256**(11):5327–5331.
- Hurley, P. (1981). History of natural rubber. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **15**(7):1279–1287.
- Huy, N. T., Kamei, K., Yamamoto, T., Kondo, Y., Kanaori, K., Takano, R., Tajima, K. and Hara, S. (2002). Clotrimazole binds to heme and enhances heme-dependent hemolysis. *Journal of Biological Chemistry* **277**(6):4152–4158.
- Ibrahim, E. M. A., Arenskötter, M., Luftmann, H. and Steinbüchel, A. (2006). Identification of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional *lcp* homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(5):3375–3382.
- Ishimura, Y., Makino, R. and Iizuka, T. (1980). Regulatory control and catalytic mechanisms of l-tryptophan-2,3-dioxygenase (pyrrolase). *Advances in Enzyme Regulation* **18**:291–302.
- Ivanova, N., Daum, C., Lang, E., Abt, B., Kopitz, M., Saunders, E., Lapidus, A., Lucas, S., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J.-F., Chen, F., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Mavromatis, K., Pati, A., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C. D., Detter, J. C., Brettin, T., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Markowitz, V., Eisen, J. A., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C. and Klenk, H.-P. (2010). Complete genome sequence of *Haliangium ochraceum* type strain (SMP-2T). *Standards in Genomic Science* **2**(1):96–106.
- Jefcoate, C. R. E. and Gaylor, J. L. (1969). Ligand interactions with hemoprotein P-450. II. Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra. *Biochemistry* **8**(8):3464–3472.
- Jendrossek, D. and Reinhard, S. (2003). Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiology Letters* **224**:61–65.
- Jendrossek, D., Tomasi, G. and Kroppenstedt, R. M. (1997). Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiology Letters* **150**(2):179–188.
- Jensen, K. P. and Ryde, U. (2004). How O₂ binds to heme. *Journal of Biological Chemistry* **279**(15):14561–14569.
- Jensen, L. M. R., Sanishvili, R., Davidson, V. L. and Wilmot, C. M. (2010). In crystallo posttranslational modification within a MauG/pre-methylamine dehydrogenase complex. *Science* **327**(5971):1392–1394.
- Johnson, C. R. and Shepherd, R. E. (1983). Moessbauer study of imidazole and N-heterocyclic complexes of pentacyanoiron(II) and -iron(III). *Inorganic Chemistry* **22**(24):3506–3513.
- Johnson, C. R., Jones, C. M., Asher, S. A. and Abola, J. E. (1991). Evaluation of the pi-bonding ability of imidazole: structure determination and characterization of catena-(H₂O)₂(1-CH₃im)₂ Mg(μ-

- CN)(CN)₄ (1-CH₃im) Fe(III) H₂O (1-CH₃im = 1-methylimidazole). *Inorganic Chemistry* **30**(9):2120–2129.
- Johnston, W. A., Hunter, D. J. B., Noble, C. J., Hanson, G. R., Stok, J. E., Hayes, M. A., Voss, J. J. de and Gillam, E. M. J. (2011). Cytochrome P450 is present in both ferrous and ferric forms in the resting state within intact *Escherichia coli* and hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **286**(47):40750–9.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. and Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European Journal of Biochemistry* **269**(18):4409–4417.
- Kapetanaki, S. and Varotsis, C. (2000). Ferryl–oxo heme intermediate in the antimalarial mode of action of artemisinin. *FEBS Letters* **474**(2–3):238–241.
- Kerkhoff, K. (2001). Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum bakteriellen Naturkautschuk-Abbau, sowie Charakterisierung eines dazu befähigten Bakteriums. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. and Lintig, J. von (2001). Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *Journal of Biological Chemistry* **276**(17):14110–14116.
- Kikuchi, G., Yoshida, T. and Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**(1):558–567.
- Kloer, D. P., Ruch, S., Al-babili, S., Beyer, P. and Schulz, G. E. (2005). The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* **308**(5719):267–269.
- Kovach, M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* (166):175–176.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227):680–685.
- Lampe, J., Rein, H. and Scheler, W. (1972). Ligand-induced reversal of the Soret CD band of lamprey hemoglobin. *FEBS Letters* **23**(2):282–284.
- Lange, S. J. and Que, L. (1998). Oxygen activating nonheme iron enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**(2):159–172.
- Laurentis, W. de, Khim, L., Anderson, J. L. R., Adam, A., Phillips, R. S., Chapman, S. K., van Pee, K.-H. and Naismith, J. H. (2007). The second enzyme in pyrrolo-nitrin biosynthetic pathway is related to the heme-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **46**(43):12393–12404.
- Leang, C., Adams, L. A., Chin, K.-J., Nevin, K. P., Methe, B. A., Webster, J., Sharma, M. L. and Lovley, D. R. (2005). Adaptation to disruption of the electron transfer pathway for Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology* **187**(17):5918–5926.
- Lee, A. Q., Streit, B. R., Zdilla, M. J., Abu-Omar, M. M. and DuBois, J. L. (2008). Mechanism of and exquisite selectivity for O–O bond formation by the heme-dependent chlorite dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(41):15654–15659.
- Lee, Y., Boycheva, S., Brittain, T. and Boyd, P. D. W. (2007). Intramolecular electron transfer in the dihaem cytochrome *c* peroxidase of *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemBioChem* **8**(12):1440–1446.
- Leuenberger, M. G., Engeloeh-Jarret, C. and Woggon, W.-D. (2001). The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of β -carotene to retinal. *Angewandte Chemie International Edition* **40**(14):2613–2617.

- Lewis-Ballester, A., Batabyal, D., Egawa, T., Lu, C., Lin, Y., Marti, M. A., Capece, L., Estrin, D. A. and Yeh, S.-R. (2009). Evidence for a ferryl intermediate in a heme-based dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(41):17371–17376.
- Li, T.-K. and Johnson, B. P. (1969). Optically active heme bands of hemoglobin and methemoglobin derivatives. Correlation with absorption and magnetic properties. *Biochemistry* **8**(9):3638–3643.
- Li, X., Feng, M., Wang, Y., Tachikawa, H. and Davidson, V. L. (2006 a). Evidence for redox cooperativity between *c*-type hemes of MauG which is likely coupled to oxygen activation during tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *Biochemistry* **45**(3):821–828.
- Li, X., Fu, R., Lee, S., Krebs, C., Davidson, V. L. and Liu, A. (2008). A catalytic di-heme bis-Fe(IV) intermediate, alternative to an Fe(IV)=O porphyrin radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(25):8597–8600.
- Li, X., Jones, L. H., Pearson, A. R., Wilmot, C. M. and Davidson, V. L. (2006 b). Mechanistic possibilities in MauG-dependent tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *Biochemistry* **45**(44):13276–13283.
- Li, Z., van Beilen, J. B., Duetz, W. A., Schmid, A., Raadt, A. de, Griengl, H. and Witholt, B. (2002). Oxidative biotransformations using oxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**(2):136–144.
- Li, Z.-F., Li, X., Liu, H., Liu, X., Han, K., Wu, Z.-H., Hu, W., Li, F.-f. and Li, Y.-Z. (2011). Genome sequence of the halotolerant marine bacterium *Myxococcus fulvus* HW-1. *Journal of Bacteriology* **193**(18):5015–5016.
- Linos, A., Berekaa, M. M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H.-C., Kroppenstedt, R. M. and Steinbüchel, A. (2000 a). Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4):1639–1645.
- Linos, A., Berekaa, M. M., Steinbüchel, A., Kim, K. K., Sproer, C. and Kroppenstedt, R. M. (2002). *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4):1133–1139.
- Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. and Steinbüchel, A. (2000 b). A Gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic *cis*-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters* **182**(1):155–161.
- Linos, A., Steinbüchel, A. and Koyama, T. (2001). Biodegradation of natural and synthetic rubbers. In: T. Koyama & A. Steinbüchel (eds.), *Biopolymers*, vol. 2, Polyisoprenoids. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Linos, A., Steinbüchel, A., Spröer, C. and Kroppenstedt, R. M. (1999). *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**(4):1785–1791.
- Lloyd, M. D., Darley, D. J., Wierzbicki, A. S. and Threadgill, M. D. (2008). α -methylacyl-CoA racemase – an ‘obscure’ metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS Journal* **275**(6):1089–1102.
- Lottspeich, F.; Engels, J. W. (2006). *Bioanalytik: Spektrum Akademischer Verlag*.
- Maeng, J. H., Sakai, Y., Ishige, T., Tani, Y. and Kato, N. (1996). Diversity of dioxygenases that catalyze the first step of oxidation of long-chain n-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1. *FEMS Microbiology Letters* **141**(2-3):177–182.
- Maines, M. D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal* **2**(10):2557–2568.

- Manas, E. S., Vanderkooi, J. M. and Sharp, K. A. (1999). The effects of protein environment on the low temperature electronic spectroscopy of cytochrome *c* and microperoxidase-11. *Journal of Physical Chemistry B* **103**(30):6334–6348.
- Mao, J., Hauser, K. and Gunner, M. R. (2003). How cytochromes with different folds control heme redox potentials. *Biochemistry* **42**(33):9829–9840.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**(3):469–474.
- Mason, M. G., Ball, A. S., Reeder, B. J., Silkstone, G., Nicholls, P. and Wilson, M. T. (2001). Extracellular heme peroxidases in actinomycetes: a case of mistaken identity. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10):4512–4519.
- Massey, V., Hemmerich, P., Knappe, W. R., Duchstein, H. J. and Fenner, H. (1978 a). Photoreduction of flavoproteins and other biological compounds catalyzed by deazaflavins. Appendix: photochemical formation of deazaflavin dimers. *Biochemistry* **17**(1):9–17.
- Massey, V., Stankovich, M. and Hemmerich, P. (1978). Light-mediated reduction of flavoproteins with flavins as catalysts. *Biochemistry* **17**(1):1–8.
- Matera, K. M., Takahashi, S., Fujii, H., Zhou, H., Ishikawa, K., Yoshimura, T., Rousseau, D. L., Yoshida, T. and Ikeda-Saito, M. (1996). Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **271**(12):6618–6624.
- Matsuda, M., Beppu, T. and Arima, K. (1978). Crystallization and positional specificity of hydroperoxidation of *Fusarium* lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **530**(3):439–450.
- Matsuo, K. (2004). Secondary-structure analysis of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Journal of Biochemistry* **135**(3):405–411.
- Mazumdar, S., Medhi, O. K. and Mitra, S. (1988). Six-coordinated high-spin models for ferric hemoproteins: NMR and ESR study of the diaquo(protoporphyrinato IX)iron(III) cation and aquohydroxo(protoporphyrinato IX)iron(III) intercalated in aqueous detergent micelles. *Inorganic Chemistry* **27**(14):2541–2543.
- McGinnity, D. F., Devreese, B., Prazeres, S., van Beeumen, J., Moura, I., Moura, J. J. G. and Pettigrew, G. W. (1996). A single histidine is required for activity of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry* **271**(19):11126–11133.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. and Foyer, C. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* (338):203–206.
- Miron, S., Referegiers, M., Gilles, A. and Maurizot, J. (2005). New synchrotron radiation circular dichroism end-station on Disco beamline at soleil synchrotron for biomolecular analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1724**(3):425–431.
- Mizutani, T., Ema, T., Yoshida, T., Renne, T. and Ogoshi, H. (1994). Mechanism of induced circular dichroism of amino acid ester-porphyrin supramolecular systems. Implications to the origin of the circular dichroism of hemoprotein. *Inorganic Chemistry* **33**(16):3558–3566.
- Moffitt, W. and Moscowitz, A. (1959). Optical activity in absorbing media. *Journal of Chemical Physics* **30**(3):648.
- Momenteau, M. and Reed, C. A. (1994). Synthetic heme-dioxygen complexes. *Chemical Reviews* **94**(3):659–698.

- Montellano, P. R. O. de (2010). Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews* **110**(2):932–948.
- Myer, Y. P. (1968). Conformation of cytochromes II. Comparative study of circular dichroism spectra, optical rotatory dispersion, and absorption spectra of horse heart cytochrome *c*. *Journal of Biological Chemistry* **243**(9):2115–2122.
- Nagababu, E. and Rifkind, J. M. (2000). Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry* **39**(40):12503–12511.
- Nagababu, E., Ramasamy, S., Rifkind, J. M., Jia, Y. and Alayash, A. I. (2002). Site-specific cross-linking of human and bovine hemoglobins differentially alters oxygen binding and redox side reactions producing rhombic heme and heme degradation. *Biochemistry* **41**(23):7407–7415.
- Nagai, M., Sugita, Y. and Yoneyama, Y. (1969). Circular dichroism of hemoglobin and its subunits in the Soret region. *Journal of Biological Chemistry* **244**(6):1651–1653.
- Nesset, M. J. M., Shokhirev, N. V., Enemark, P. D., Jacobson, S. E. and Walker, F. A. (1996). Models of the cytochromes. Redox properties and thermodynamic stabilities of complexes of "hindered" iron(III) and iron(II) tetraphenylporphyrinates with substituted pyridines and imidazoles. *Inorganic Chemistry* **35**(18):5188–5200.
- Neu, H. C. and Heppel, L. A. (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **240**(9):3685–92.
- Nicola, N. A., Minasian, E., Appleby, C. A. and Leach, S. J. (1975). Circular dichroism studies of myoglobin and leghemoglobin. *Biochemistry* **14**(23):5141–5149.
- NOVAGEN. pET System Manual 10th ed. **2003**.
- Nozaki, M. (1979). Oxygenases and dioxygenases. Biochemistry. In: Topics in Current Chemistry, Bd. 78: Springer Berlin / Heidelberg:145–186.
- Ogola, H. J. O., Hashimoto, N., Miyabe, S., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H. and Sawa, Y. (2010). Enhancement of hydrogen peroxide stability of a novel *Anabaena* sp. DyP-type peroxidase by site-directed mutagenesis of methionine residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(5):1727–1736.
- Oiki, H. (2004). Characterization of a microorganism having the ability to decompose natural rubber. Praktikumsarbeit. Institut für Mikrobiologie. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Omura, T. and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **239**(7):2370–2378.
- Palmer, G. (2000). Electron Paramagnetic Resonance of metalloproteins. In: L. Que (Hg.): Physical methods in bioinorganic chemistry: spectroscopy and magnetism: University Science Books.
- Palmer, G. Electron Paramagnetic Resonance of hemoproteins. In: Dolphin (Hg.) 1978 – The Porphyrins, Vol. 4:313–354.
- Pearson, A. R., La Mora-Rey, T. de, Graichen, M. E., Wang, Y., Jones, L. H., Marimanikkupam, S., Agger, S. A., Grimsrud, P. A., Davidson, V. L. and Wilmot, C. M. (2004). Further insights into quinone cofactor biogenesis: Probing the role of MauG in methylamine dehydrogenase tryptophan tryptophylquinone formation. *Biochemistry* **43**(18):5494–5502.
- Peisach, J., Blumberg, W. E. and Adler, A. (1973). Electron Paramagnetic Resonance studies of iron porphyrin and chlorin systems. *Annals of the NY Academy of Sciences* **206**(1 The Chemical):310–327.

- Peisach, J., Blumberg, W. E., Ogawa, S., Rachmilewitz, E. A. and Oltzik, R. (1971). The effects of protein conformation on the heme symmetry in high spin ferric heme proteins as studied by Electron Paramagnetic Resonance. *Journal of Biological Chemistry* **246**(10):3342–3355.
- Peisach, J., Blumberg, W. E., Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1968). The electronic structure of protoheme proteins. *Journal of Biological Chemistry* **243**(8):1871–1880.
- Peisach, J., Blumberg, W. E., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B. and Kampa, L. (1969). Hemoglobin A: An Electron Paramagnetic Resonance study of the effects of interchain contacts on the heme symmetry of high-spin and low-spin derivatives of ferric alpha chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **63**(3):934–939.
- Perera, R., Jin, S., Sono, M. and Dawson, J. H. (2007). Cytochrome P450-catalyzed hydroxylations and epoxidations. In: A. Sigel, H. Sigel und R. K. O. Sigel (Hg.): Metal ions in life sciences: John Wiley & Sons Ltd.
- Peterson, J. A., White, R. E., Yasukochi, Y., Coomes, M. L., O'Keeffe, D. H., Ebel, R. E., Masters, B. S., Ballou, D. P. and Coon, M. J. (1977). Evidence that purified liver microsomal cytochrome P-450 is a one-electron acceptor. *Journal of Biological Chemistry* **252**(13):4431–4434.
- Pettigrew, G. (1991). The cytochrome *c* peroxidase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1058**(1):25–27.
- Pettigrew, G. W., Echaliier, A. and Pauleta, S. R. (2006). Structure and mechanism in the bacterial dihaem cytochrome *c* peroxidases. High-valent iron intermediates in biology, high-valent iron intermediates in biology. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**(4):551–567.
- Rafferty, S. P., Pearce, L. L., Barker, P. D., Guillemette, J. G., Kay, C. M., Smith, M. and Mauk, A. G. (1990). Electrochemical, kinetic, and circular dichroic consequences of mutations at position 82 of yeast iso-1-cytochrome *c*. *Biochemistry* **29**(40):9365–9369.
- Reddy, C. J. and Gibney, B. R. (2004). Heme protein assemblies. *Chemical Reviews* **104**:617–649.
- Reddy, K. S., Angiolillo, P. J., Wright, W. W., Laberge, M. and Vanderkooi, J. M. (1996). Spectral splitting in the α (Q0,0) absorption band of ferrous cytochrome *c* and other heme proteins. *Biochemistry* **35**(39):12820–12830.
- Rice, R. H., Lee, Y. M. and Brown, W. D. (1983). Interactions of heme proteins with hydrogen peroxide: protein crosslinking and covalent binding of benzo[a]pyrene and 17[β]-estradiol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **221**(2):417–427.
- Rifkind, J. M., Ramasamy, S., Manoharan, P., Nagababu, E. and Mohanty, J. G. (2004). Redox reactions of hemoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**(3):657–666.
- Rigby, S. E., Moore, G. R., Gray, J. C., Gadsby, P. M., George, S. J. and Thomson, A. J. (1988). N.m.r., e.p.r. and magnetic-c.d. studies of cytochrome *f*. Identity of the haem axial ligands. *Biochemical Journal* **256**(2):571–577.
- Rinker, R. G., Gordon, T. P., Mason, D. M. and Corcoran, W. H. (1959). The presence of the SO₂ radical ion in aqueous solutions of sodium dithionite. *The Journal of Physical Chemistry* **63**(2):302.
- Rinker, R. G., Gordon, T. P., Mason, D. M., Sakaida, R. R. and Corcoran, W. H. (1960). Kinetics and mechanism of the air oxidation of the dithionite ion (S₂O₄) in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry* **64**(5):573–581.
- Roach, M. P., Puspita, W. J. and Watanabe*, Y. (2000). Proximal ligand control of heme iron coordination structure and reactivity with hydrogen peroxide: investigations of the myoglobin cavity mutant H93G with unnatural oxygen donor proximal ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **81**(3):173–182.

- Rodger, A. Nordén B. (1997). Circular dichroism and linear dichroism: Oxford University Press.
- Rönnerberg, M. and Ellfolk, N. (1978). *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase initial delay of the peroxidatic reaction. Electron transfer properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **504**(1):60–66.
- Rönnerberg, M. and Ellfolk, N. (1979 a). Heme-linked properties of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. Evidence for non-equivalence of the hemes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **581**(2):325–333.
- Rönnerberg, M., Ellfolk, N. and Soininen, R. (1979 b). Circular dichroism studies on cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*551 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **578**(2):392–400.
- Rook, J. J. (1955). Microbiological deterioration of vulcanized rubber. *Applied Microbiology* **3**:302–309.
- Rose, K. and Steinbüchel, A. (2005). Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(6):2803–2812.
- Rose, K., Tenberge, K. B. and Steinbüchel, A. (2005 b). Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules* **6**(1):180–188.
- Rydberg, P., Sigfridsson, E. and Ryde, U. (2004). On the role of the axial ligand in heme proteins: a theoretical study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **9**(2):203–223.
- Ryle, M. J. and Hausinger, R. P. (2002). Non-heme iron oxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**(2):193–201.
- Sakai, Y., Takahashi, H., Wakasa, Y., Kotani, T., Yurimoto, H., Miyachi, N., van Veldhoven, P. P. and Kato, N. (2004). Role of {alpha}-methylacyl coenzyme A racemase in the Degradation of methyl-branched alkanes by *Mycobacterium* sp. strain P101. *Journal of Bacteriology* **186**(21):7214–7220.
- Salerno, J. C. (1984 b). Cytochrome electron spin resonance line shapes, ligand fields, and components stoichiometry in ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* **259**(4):2331–2336.
- Salerno, J. C. and Leigh, J. S. (1984 a). Crystal field of atypical low-spin ferriheme complexes. *Journal of the American Chemical Society* **106**(7):2156–2159.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(12):5463–5467.
- Schejter, A. and Aviram, I. (1969). Reaction of cytochrome *c* with imidazole. *Biochemistry* **8**(1):149–153.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. and Schwab, W. (2006). The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **281**(15):9845–9851.
- Schmitt, G., Seiffert, G., Kroneck, P. M. H., Braaz, R. and Jendrossek, D. (2010). Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology* **156**(8):2537–2548.
- Schoenberg, E., Marsh, H. A., Walters, S. J. and Saltman, W. M. (1979). Polyisoprene. *Rubber Chemistry and Technology* **52**(3):526.

- Schulte, C., Arenskötter, M., Berekaa, M. M., Arenskötter, Q., Priefert, H. and Steinbüchel, A. (2008). Possible involvement of an extracellular superoxide dismutase (SodA) as a radical scavenger in poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(24):7643–7653.
- Shimizu, H., Schuller, D. J., Lanzilotta, W. N., Sundaramoorthy, M., Arciero, D. M., Hooper, A. B. and Poulos, T. L. (2001). Crystal structure of *Nitrosomonas europaea* cytochrome *c* peroxidase and the structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidases. *Biochemistry* **40**(45):13483–13490.
- Shin, S., Lee, S. and Davidson, V. L. (2009). Suicide inactivation of MauG during reaction with O₂ or H₂O₂ in the absence of its natural protein substrate. *Biochemistry* **48**(42):10106–10112.
- Sievers, G. (1978). Circular dichroism studies on cytochrome *c* peroxidase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **536**(1):212–225.
- Sievers, G. (1980). Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **624**(1):249–259.
- Singh, J. and Wharton, D. C. (1973). Cytochrome *c*556, a di-heme protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **292**(2):391–401.
- Smet, L. de, Pettigrew, G. W. and van Beeumen, J. J. (2001). Cloning, overproduction and characterization of cytochrome *c* peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *European Journal of Biochemistry* **268**(24):6559–6568.
- Smet, L. de, Savvides, S. N., van Horen, E., Pettigrew, G. and van Beeumen, J. J. (2006). Structural and mutagenesis studies on the cytochrome *c* peroxidase from *Rhodobacter capsulatus* provide new insights into structure-function relationships of bacterial di-heme peroxidases. *Journal of Biological Chemistry* **281**(7):4371–4379.
- Smith, W. L. (2008). Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *TRENDS in Biochemical Sciences* **33**(1):27–37.
- Smith, W. L., Marnett, L. J. and DeWitt, D. L. (1991). Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacology & Therapeutics* **49**(3):153–179.
- Söhngen, N. and Fol, J. (1914). Die Zersetzung des Kautschuks durch Mikroorganismen. *Zbl. Bakt. II. Abt.* **40**:87–98.
- Solomon, E. I., Brunold, T. C., Davis, M. I., Kemsley, J. N., Lee, S.-K., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A. J., Yang, Y.-S. and Zhou, J. (2000). Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chemical Reviews* **100**(1):235–350.
- Sono, M. and Dawson, J. H. (1984). Extensive studies of the heme coordination structure of indoleamine-2,3-dioxygenase and of tryptophan binding with magnetic and natural circular dichroism and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **789**(2):170–187.
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. and Dawson, J. H. (1996). Heme-containing oxygenases. *Chemical Reviews* **96**(7):2841–2888.
- Spence, D. and van Niel, C. B. (1936). Bacterial decomposition of the rubber in *Hevea* latex. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **28**(7):847–850.
- Strickland, E. H., Horwitz, J. and Billups, C. (1969). Fine structure in the near-ultraviolet circular dichroism and absorption spectra of tryptophan derivatives and chymotrypsinogen A at 77°K. *Biochemistry* **8**(8):3205–3213.

- Strickland, E. H., Horwitz, J., Kay, E., Shannon, L. M., Wilchek, M. and Billups, C. (1971). Near-ultraviolet absorption bands of tryptophan. Studies using horseradish peroxidase isoenzymes, bovine and horse heart cytochrome *c*, and N-stearyl-L-tryptophan n-hexyl ester. *Biochemistry* **10**(13):2631–2638.
- Stryer, L. (1961). A conformation-dependent cotton effect in the solet band of hemin: poly-L-lysine. *Biochimica et Biophysica Acta* **95**:395–397.
- Subramaniam, A. (1995). The chemistry of natural rubber latex: Elsevier. In: *Immunology and allergy clinics of North America*:15:1–20.
- Sugimoto, H. (2006). Crystal structure of human indoleamine-2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(8):2611–2616.
- Sundaramoorthy, M., Ternner, J. and Poulos, T. L. (1998). Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chemistry & Biology* **5**(9):461–473.
- Sutherland, J. C. and Holmquist, B. (1980). Magnetic circular dichroism of biological molecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **9**(1):293–326.
- Suzuki, T. and Takagi, T. (1992). A myoglobin evolved from indoleamine-2,3-dioxygenase. *Journal of Molecular Biology* **228**(2):698–700.
- Takahashi, S., Wang, J., Rousseau, D. L., Ishikawa, K., Yoshida, T., Host, J. R. and Ikeda-Saito, M. (1994). Heme-heme oxygenase complex. Structure of the catalytic site and its implication for oxygen activation. *Journal of Biological Chemistry* **269**(2):1010–1014.
- Tanaka, M., Ishimori, K., Mukai, M., Kitagawa, T. and Morishima, I. (1997). Catalytic activities and structural properties of horseradish peroxidase distal His42 → Glu or Gln mutant. *Biochemistry* **36**(32):9889–9898.
- Tanaka, Y., Aik-Hwee, E., Ohya, N., Nishiyama, N., Tangpakdee, J., Kawahara, S. and Wititsuwannakul, R. (1996). Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: Characterization of initiating species by structural analysis. *Phytochemistry* **41**(6):1501–1505.
- Tanaka, Y., Sakdapipanich, J. T., Koyama, T. and Steinbüchel, A. (2001). Chemical structure and occurrence of natural polyisoprenes. In: T. Koyama & A. Steinbüchel (eds.), *Biopolymers*, vol. 2, Polyisoprenoids. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Tanapongpipat, S., Reid, R., Cole, J. A. and Crooke, H. (1998). Transcriptional control and essential roles of the *Escherichia coli ccm* gene products in formate-dependent nitrite reduction and cytochrome *c* synthesis. *Biochemical Journal* **2**(334):355–365.
- Tao, Z., Goodisman, J. and Souid, A.-K. (2008). Oxygen measurement via phosphorescence: reaction of sodium dithionite with dissolved oxygen. *Journal of Physical Chemistry A* **112**(7):1511–1518.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R. (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **244**(23):6388–94.
- Terentis, A. C. (2002). The heme environment of recombinant human indoleamine-2,3-dioxygenase. Structural properties and substrate-ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry* **277**(18):15788–15794.
- Tezcan, F. A., Winkler, J. R. and Gray, H. B. (1998). Effects of ligation and folding on reduction potentials of heme proteins. *Journal of the American Chemical Society* **120**(51):13383–13388.
- Thöny-Meyer, L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(3):337–376.

- Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Künzler, P., Ritz, D. and Hennecke, H. (1995). *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *Journal of Bacteriology* **177**(15):4321–4326.
- Tsai, R., Yu, C. A., Gunsalus, I. C., Peisach, J., Blumberg, W., Orme-Johnson, W. H. and Beinert, H. (1970). Spin-state changes in cytochrome P-450cam on binding of specific substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **66**(4):1157–1163.
- Tsuchii, A. and Takeda, K. (1990). Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(1):269–274.
- Tsuchii, A. and Tokiwa, Y. (1999). Colonization and disintegration of tire rubber by a colonial mutant of *Nocardia*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**(4):542–544.
- Tsuchii, A. and Tokiwa, Y. (2001). Microbial degradation of tyre rubber particles. *Biotechnology Letters* **23**(12):963–969.
- Tsuchii, A., Suzuki, T. and Takeda, K. (1985). Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(4):965–970.
- Tsuchii, A., Takeda, K. and Tokiwa, Y. (1997). Degradation of the rubber in truck tires by a strain of *Nocardia*. *Biodegradation* **7**(5):405–413.
- Uno, T., Hatano, K., Nawa, T., Nakamura, K., Nishimura, Y. and Arata, Y. (1991). Imidazole adducts of (octaethylporphinato) iron(III) methoxide: Resonance Raman evidence for the formation of hydrogen bonds between sterically hindered imidazoles and methoxide. *Inorganic Chemistry* **30**(23):4322–4327.
- Urry, D. W. (1965). Protein-heme interactions in heme-proteins: cytochromec. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **54**(2):640–648.
- Urry, D. W. (1967 a). The heme chromophore in the ultraviolet. *Journal of Biological Chemistry* **242**(19):4441–4448.
- Urry, D. W. (1967 b). Model systems for interacting heme moieties. I. The heme undecapeptide of cytochrome *c*. *Journal of the American Chemical Society* **89**(16):4190–4196.
- Urry, D. W. and Pettegrew, J. W. (1967). Model systems for interacting heme moieties. II. Ferriheme octapeptide of cytochrome *c*. *Journal of the American Chemical Society* **89**(20):5276–5283.
- van der Palen, C. J. N. M., Slotboom, D.-J., Jongejan, L., Reijnders, W. N. M., Harms, N., Duine, J. A. and van Spanning, R. J. M. (1995). Mutational analysis of *mau* genes involved in methylamine metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *European Journal of Biochemistry* **230**(3):860–871.
- van Gelder, B. F. and Beinert, H. (1969). Studies of the heme components of cytochrome *c* oxidase by EPR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **189**(1):1–24.
- Vashi, P. R. and Marques, H. M. (2004). The coordination of imidazole and substituted pyridines by the hemeoctapeptide N-acetyl-ferromicroperoxidase-8 (FeII NAcMP8). *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**(9):1471–1482.
- Venjaminov, S. Y. and Yang, J. T. Determination of protein secondary structure. In: Fasman G. D. (Ed.) (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules: Plenum Press, New York.
- Villalain, J., Moura, I., Liu, M. C., Payne, W. J., LeGall, J., Xavier, A. V. and Moura, J. J. G. (1984). NMR and electron-paramagnetic-resonance studies of a dihaem cytochrome from *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 11607) (cytochrome *c* peroxidase). *European Journal of Biochemistry* **141**(2):305–312.

- Vinogradov, S. and Zand, R. (1968). Circular dichroism studies. I. Cytochrome *c*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**(3):902–910.
- Vogel, J. T., Tan, B.-C., McCarty, D. R. and Klee, H. J. (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *Journal of Biological Chemistry* **283**(17):11364–11373.
- Volkov, A. N., Nicholls, P. and Worrall, J. A. (2011). The complex of cytochrome *c* and cytochrome *c* peroxidase: The end of the road? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1807**(11):1482–1503.
- Wackett, L. P. (2002). Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *Enzyme and Microbial Technology* **31**(5):577–587.
- Walker, F. A. (1999). Magnetic spectroscopic (EPR, ESEEM, Mössbauer, MCD and NMR) studies of low-spin ferriheme centers and their corresponding heme proteins. *Coordination Chemistry Reviews* **185-186**:471–534.
- Walker, F. A. (2004). Models of the bis-histidine-ligated electron-transferring cytochromes. Comparative geometric and electronic structure of low-spin ferro- and ferrihemes. *Chemical Reviews* **104**(2):589–616.
- Walker, F. A., Boi Hanh Huynh, Scheidt, W. R. and Osvath, S. R. (1986). Models of the cytochromes *b*. Effect of axial ligand plane orientation on the EPR and Moessbauer spectra of low-spin ferrihemes. *Journal of the American Chemical Society* **108**(17):5288–5297.
- Wallar, B. J. and Lipscomb, J. D. (1996). Dioxygen activation by enzymes containing binuclear non-heme iron clusters. *Chemical Reviews* **96**(7):2625–2658.
- Wang, J. H. (1970). Synthetic biochemical models. *Accounts of Chemical Research* **3**(3):90–97.
- Wang, Y., Graichen, M. E., Liu, A., Pearson, A. R., Wilmot, C. M. and Davidson, V. L. (2003). MauG, a novel diheme protein required for tryptophan tryptophylquinone biogenesis. *Biochemistry* **42**(24):7318–7325.
- Wariishi, H., Nonaka, D., Johjima, T., Nakamura, N., Naruta, Y., Kubo, S. and Fukuyama, K. (2000). Direct binding of hydroxylamine to the heme Iron of *Arthromyces ramosus* peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* **275**(42):32919–32924.
- Warneke, S., Arenskotter, M., Tenberge, K. B. and Steinbuchel, A. (2007). Bacterial degradation of poly(*trans*-1,4-isoprene) (gutta percha). *Microbiology* **153**(2):347–356.
- Weiss (1964). Nature of the iron-oxygen-bond in oxyhaemoglobin. *Nature* **4927**:83–84.
- Weiss, C., Kobayashi, H. and Gouterman, M. (1965). Spectra of porphyrins. Part III. Self-consistent molecular orbital calculations of porphyrin and related ring systems. *Journal of Molecular Spectroscopy* **16**(2):415–450.
- Wever, R. and Bakkenist, A. (1980). The interaction of myeloperoxidase with ligands as studied by EPR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **612**(1):178–184.
- Whitby, G. S. and Katz, M. (1933). Synthetic rubber. *Industrial & Engineering Chemistry* **25**(12):1338–1348.
- Wilks, A. and Ortiz Montellano, P. R. de (1993). Rat liver heme oxygenase. High level expression of a truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species. *Journal of Biological Chemistry* **268**(30):22357–22362.

- Willick, G. E., Schönbaum, G. R. and Kay, C. M. (1969). Circular dichroism and absorption spectra of horse radish peroxidase and sperm whale myoglobin in the Soret region. *Biochemistry* **8**(9):3729–3734.
- Wilmot, C. M. and Davidson, V. L. (2009). Uncovering novel biochemistry in the mechanism of tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. Analytical techniques/mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**(4):469–474.
- Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A., Peisach, J. and Blumberg, W. E. (1970). On the state of the iron and the nature of the ligand in oxyhemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **67**(4):1846–1853.
- Woggon, W.-D. (2002). Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Pure and Applied Chemistry* **74**(8):1397–1408.
- Woody, R. W. (1994). Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *European Biophysics Journal* **23**(4):253–262.
- Woody, R. W. and Dunker, A. K. Aromatic and cystine side-chain circular dichroism in proteins. In: Fasman G. D. (Ed.) (1996). *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*: Plenum Press, New York.
- Wyss, A. (2004). Carotene oxygenases: A new family of double bond cleavage enzymes. *The Journal of Nutrition* **134**(1):246S-250S.
- Yamazaki, I., Yokota, K.-n. and Shikama, K. (1964). Preparation of crystalline oxymyoglobin from horse heart. *Journal of Biological Chemistry* **239**(12):4151–4153.
- Yatsunyk, L. A., Dawson, A., Carducci, M. D., Nichol, G. S. and Walker, F. A. (2006). Models of the cytochromes: Crystal structures and EPR spectral characterization of low-spin bis-imidazole complexes of (OETPP)FeIII having intermediate ligand plane dihedral angles. *Inorganic Chemistry* **45**(14):5417–5428.
- Yikmis, M., Arenskötter, M., Rose, K., Lange, N., Wernsmann, H., Wiefel, L. and Steinbüchel, A. (2008). Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(17):5373–5382.
- Yong, F. C. and King, T. E. (1970). Optical rotatory dispersion of *Chromatium* cytochrome *c552*. *Journal of Biological Chemistry* **245**(6):1331–1335.
- Young, L. J. and Siegel, L. M. (1988). Superoxidized states of *Escherichia coli* sulfite reductase heme protein subunit. *Biochemistry* **27**(16):5984–5990.
- Yu, M. A., Egawa, T., Yeh, S.-R., Rousseau, D. L. and Gerfen, G. J. (2010). EPR characterization of ascorbyl and sulfur dioxide anion radicals trapped during the reaction of bovine cytochrome *c* oxidase with molecular oxygen. *Journal of Magnetic Resonance* **203**(2):213–219.
- Yukl, E. T., Goblirsch, B. R., Davidson, V. L. and Wilmot, C. M. (2011). Crystal structures of CO and NO adducts of MauG in complex with pre-methylamine dehydrogenase: Implications for the mechanism of dioxygen activation. *Biochemistry* **50**(14):2931–2938.
- Zahn, J. A., Arciero, D. M., Hooper, A. B., Coats, J. R. and DiSpirito, A. A. (1997). Cytochrome *c* peroxidase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *Archives of Microbiology* **168**(5):362–372.
- Zhu, W., Wilks, A. and Stojiljkovic, I. (2000). Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *Journal of Bacteriology* **182**(23):6783–6790.

Zoppellaro, G., Bren, K. L., Ensign, A. A., Harbitz, E., Kaur, R., Hersleth, H.-P., Ryde, U., Hederstedt, L. and Andersson, K. K. (2009). Review: Studies of ferric heme proteins with highly anisotropic/highly axial low spin ($S = 1/2$) electron paramagnetic resonance signals with bis-histidine and histidine-methionine axial iron coordination. *Biopolymers* **91**(12):1064–1082.

Zsila, F. (2011). Circular Dichroism Spectroscopy is a sensitive tool for investigation of bilirubin–enzyme interactions. *Biomacromolecules* **12**(1):221–227.

Internetquellen

- [1] www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm (Stand: 01.12.11)
- [2] www.photophysics.com/cdunits.php (Stand: 01.12.11)
- [3] [www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/folding/CD Spektroskopie-1.pdf](http://www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/folding/CD_Spektroskopie-1.pdf)
- [4] [www.tru3d.com/technology/3d_displays.php?file=What is Circular Polarization?](http://www.tru3d.com/technology/3d_displays.php?file=What%20is%20Circular%20Polarization%20?)
(Stand: 01.12.11)
- [5] www.imb-jena.de/ImgLibDoc/cd/tut1b.html (Stand: 01.12.11)
- [6] <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/7-cd-units-conversions> (Stand: 01.12.11)
- [7] <http://mach7.bluehill.com/proteincd/cdspec.html> (Stand: 01.12.11)
- [8] http://www.uni-ulm.de/physchem-praktikum/media/fp/v_06.pdf
- [9] <http://spectroscopy.lbl.gov/EPR-Robblee/EPR-Robblee.pdf>
(J. Robblee, 2001, Stand 01.12.11)
- [10] <http://chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture1.html> (Stand: 01.12.11)

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Oktober 2006 bis Juli 2010 am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Jendrossek durchgeführt. Am Gelingen dieser Arbeit haben im Folgenden benannte Personen einen wichtigen Anteil.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Prof. Dieter Jendrossek für seine engagierte Betreuung, die ständige Bereitschaft zu intensiven und hilfreichen Diskussionen und seiner Fähigkeit, kontinuierlich Enthusiasmus zu verbreiten, kurzum für seine permanenten, konstruktiven Bemühungen um das Gelingen dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich ihm für die Gelegenheit zur Präsentation von Teilen dieser Arbeit auf den internationalen Tagungen ISBP 2008 in Auckland (Neuseeland) und ISBP 2010 in Stuttgart herzlich danken.

Unserem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Mikrobiologie zu arbeiten, für das Interesse an der Arbeit durch die Rückmeldungen zu den Halbjahresberichten und der Seminarvorträge.

Herrn Prof. Dr. Oliver Einsle danke ich für die Übernahme des Koreferates. Ebenso danke ich ihm und seinen Mitarbeitern Maren Hoffmann, Julian Seidel und Thomas Spatzal in Göttingen und Freiburg besonders für die erfolgreiche Durchführung von Kristallisationsexperimenten, der Aufklärung der RoxA-Struktur, sowie hilfreiche Gespräche zum RoxA-Projekt.

Herrn Prof. Dr. Peter Kroneck und Grazyna Seiffert danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung von EPR-Experimenten an der Universität Konstanz. Auch gilt mein Dank Prof. Kroneck für seine initiale Hilfe bei der Durchführung von Redox-titrationen, seine Gesprächsbereitschaft zum "Mysterium RoxA" und seine konstruktiven Rückmeldungen zur Auswertung der EPR-Daten.

Herrn Prof. Dr. Emil Roduner danke ich für die Möglichkeit, EPR-Messungen am Institut für Physikalische Chemie (Stuttgart) durchzuführen. Besonders danken möchte ich Dr. Herbert Dilger für die kompetente und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Messungen, auch zu späterer Stunde.

Für die Möglichkeit zur Aufnahme von CD-Spektren danke ich der Abteilung für Mikrobiologie von Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn an der Universität Hohenheim, Dennis Gessmann und Dr. Uwe Gercken für ihre Hilfe bei der Durchführung der Messungen. Herrn Prof. Dr. Stephan Nussberger und Dennis Gessmann danke ich herzlich für Denkanstöße zur Auswertung der CD-Daten.

Besonders bedanke ich mich bei Nadja Hamsch und Jakob Birke, meinen Mitstreitern im Kampf mit RoxA bzw. *Xanthomonas*, für die gute Zusammenarbeit, den regen Austausch zu aktuellen Problemen und die ständige Hilfsbereitschaft, sowie Simone Reinhard für die Hilfe bei der Aufarbeitung des Latex-Kulturüberstandes.

Nicht zuletzt danke ich herzlich allen meinen Kollegen aus Labor 2 und 4 und des gesamten Instituts, die mich während meiner Zeit im Labor und darüber hinaus begleitet haben, für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre, für die abwechslungsreiche gemeinsame Zeit im Arbeitsalltag und auch außerhalb.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich von Herzen für die familiäre Unterstützung und die bereichernden Pausen während dieser Zeit.

Lebenslauf

Georg Schmitt

geboren am 13. Mai 1980 in Bingen am Rhein

Ausbildung

- 08/ 1986 - 06/ 1999 Grundschule Kirn
Gymnasium Kirn, Abschluss: Abitur
- 08/ 1999 - 06/ 2000 Zivildienst bei "Ökumenische Sozialstation" in Kirn (Nahe)
- 10/ 2000 - 03/ 2006 Studium der allgemeinen Biologie (Diplom) an der
Technischen Universität Kaiserslautern
- Diplomarbeit in der Abteilung für Mikrobiologie ("Molekulare
Werkzeuge zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen
dem Zweikomponentensystem CiaRH und der Lokalisation des
Penicillinbindeproteins Pbp2x in *Streptococcus pneumoniae*")
- 07/ 2006 - 07/ 2010 Durchführung experimenteller Arbeiten in der AG von Prof.
Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität
Stuttgart im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift
zur Charakterisierung der *Rubber Oxygenase* RoxA aus
Xanthomonas sp. 35Y

Publikationen:

Schmitt, G., Seiffert, G., Kroneck, P. M. H., Braaz, R. & Jendrossek, D. (2010). Spectroscopic properties of Rubber Oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology*, **156**(8):2537–2548.

Hamsch, N., Schmitt, G. & Jendrossek, D. (2010). Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Journal of Applied Microbiology* **109**(3):1067–1075