# Funktionsuntersuchung an artifiziellen [Fe-S]-Cluster bindenden Peptiden

**Inaugural Dissertation** 

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

von

Christina Alessandra Hoppe

aus

Duisburg

April 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2006 bis April 2010 am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Gärtner und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Lubitz.

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

| Referent:                   | Prof. Dr. Wolfgang Gärtner |
|-----------------------------|----------------------------|
| Korreferent:                | Prof. Dr. Jörg Pietruszka  |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 28.04.2010                 |

# Inhaltsverzeichnis

| 1     | Einleitung   | 1  |
|-------|--|----|
| 1.1   | Eisen-Schwefel Cluster   | 1  |
| 1.2   | Elektronentransfer über Eisen-Schwefel-Cluster in Hydrogenasen | 3  |
| 1.3   | Ferredoxine  | 4  |
| 1.3.1 | <i>Desulfovibrio gigas</i> Ferredoxin II                       | 6  |
| 1.4   | Maquettes für Eisen-Schwefel-Cluster                           | 8  |
| 1.5   | Motivation für diese Arbeit                                    | 9  |
| 2     | Themenstellung und Projektplanung                              | 10 |
| 2.1   | Dimethylsulfoxid Reduktase aus Escherichia coli                | 10 |
| 2.2   | Gewinnung von <i>Desulfovibrio gigas</i> Ferredoxin II         | 11 |
| 3     | Grundlagen   | 14 |
| 3.1   | Proteine und Peptide   | 14 |
| 3.1.1 | Peptide  | 15 |
| 3.1.2 | Proteine   | 16 |
| 3.2   | Festphasenpeptidsynthese                                       | 23 |
| 3.3   | Elektronen-Paramagnetische-Resonanz Spektroskopie              | 27 |
| 3.3.1 | EPR von Eisen-Schwefel-Clustern                                | 30 |
| 3.4   | Zyklovoltammetrie  | 32 |
| 4     | Ergebnisse und Diskussion                                      | 37 |
| 4.1   | Identifizierung der synthetisierten Peptide                    | 37 |
| 4.2   | Rekonstitution des Clusters                                    | 38 |
| 4.3   | Rekonstitutionsmechanismus                                     | 44 |
| 4.4   | UV/Vis Spektroskopie   | 46 |
| 4.5   | EPR-Spektroskopie  | 47 |

| 4.6   | Umwandlung des [Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ]-Clusters zum [Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ]-Cluster | 54 |
|-------|---|----|
| 4.7   | Zyklovoltammetrie   | 54 |
| 4.8   | Gewinnung von <i>D. gigas</i> Ferredoxin II   | 58 |
| 4.8.1 | Gewinnung der genomischen DNA   | 58 |
| 4.8.2 | Gewinnung des Plasmids für die Überexpression in <i>E. coli</i>   | 59 |
| 4.8.3 | Überexpression in <i>E. coli</i>  | 59 |
| 4.8.4 | Punktmutationen der Ferredoxin Sequenz  | 63 |
| 4.8.5 | Aufreinigung des Proteins   | 64 |
| 4.8.6 | Rekonstitution des Clusters in das Protein  | 67 |
| 5     | Ausblick  | 69 |
| 6     | Zusammenfassung   | 71 |
| 7     | Summary   | 75 |
| 8     | Material und Methoden   | 78 |
| 8.1   | Geräte  | 78 |
| 8.2   | Chemikalien   | 80 |
| 8.3   | Medien und Lösungen   | 80 |
| 8.3.1 | Medien zur Anzucht von <i>Desulfovibrio gigas</i>   | 81 |
| 8.3.2 | Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>   | 82 |
| 8.4   | Anzucht von <i>Desulfovibrio gigas</i> und Gewinnung de   | S  |
|       | rekombinanten <i>D. gigas</i> Ferredoxin II   | 83 |
| 8.4.1 | Extraktion der genomischen DNA  | 83 |
| 8.4.2 | Agarose – Gelelektrophorese   | 84 |
| 8.4.3 | Polymerase Kettenreaktion (PCR)   | 84 |
| 8.4.4 | Herstellung, Extraktion und Amplifizierung der Plasmid-DNA  | 86 |
| 8.4.5 | Herstellung kompetenter Zellen  | 87 |
| 8.4.6 | Transformation und Überexpression in <i>E. coli</i>   | 88 |
| 8.4.7 | Mutationen  | 88 |

| 8.4.8 | Proteinaufreinigung                                    | 89  |
|-------|--|-----|
| 8.4.9 | Western Blotting                                       | 91  |
| 8.5   | Clusterrekonstitution der Proteine                     | 92  |
| 8.6   | Festphasen Peptidsynthese (SPPS)                       | 92  |
| 8.7   | Aufreinigung und Charakterisierung der Peptide         | 96  |
| 8.8   | Ellman-Test  | 97  |
| 8.9   | Clusterrekonstitution der Peptide                      | 97  |
| 8.10  | Koordinierung eines synthetisch hergestellten Clusters | 98  |
| 8.11  | UV/Vis-Spektroskopie                                   | 99  |
| 8.12  | Elektron-Paramagnetische Resonanz Spektroskopie        | 99  |
| 8.13  | Zyklovoltammetrie                                      | 99  |
| 9     | Literatur  | 101 |
| 10    | Anhang   | 114 |
| 10.1  | Vektor pET-52b(+) 3C/LIC                               | 114 |
| 10.2  | MALDI-TOF MS Spektren der synthetisierten Peptide      | 118 |

IV

# Abbildungsverzeichnis

| Abb. 1.1:  | Struktur der in der Natur am häufigsten vorkommenden Eisen-               |    |
|------------|---|----|
|            | Schwefel-Cluster  | 1  |
| Abb. 1.2:  | Kristallstruktur von <i>D. gigas</i> Ferredoxin II (nach PDB: 1FXD)       | 6  |
| Abb. 3.1:  | Bildung einer Peptidbindung durch Kondensation                            | 15 |
| Abb. 3.2:  | Struktur der Peptidbindung  | 19 |
| Abb. 3.3:  | Struktur einer rechtsgängigen α-Helix                                     | 20 |
| Abb. 3.4:  | Strukturen eines β-Faltblatts   | 21 |
| Abb. 3.5:  | Ramachandran Diagramm   | 21 |
| Abb. 3.6:  | Einige der gängigsten Harz-Linker   | 25 |
| Abb. 3.7:  | Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe unter                       |    |
|            | Einwirkung der Base Piperidin   | 25 |
| Abb. 3.8:  | Kopplung einer Aminosäure an den entschützten N-Terminus                  |    |
|            | eines Peptids mit Hilfe des Kopplungsreagenzes HATU                       | 26 |
| Abb. 3.9:  | Struktur einiger häufig verwendeter Kopplungsreagenzien                   | 27 |
| Abb. 3.10: | Aufspaltung der Energieniveaux eines Elektronenspins S = $\frac{1}{2}$ in |    |
|            | einem Magnetfeld mit der Induktion $B_0$                                  | 28 |
| Abb. 3.11: | Schematische Darstellung einer Apparatur für Zyklovoltammetrie.           | 32 |
| Abb. 3.12: | Graphische Darstellung der an die Arbeitselektrode angelegten             |    |
|            | Dreiecksspannung  | 33 |
| Abb. 3.13: | Typisches Zyklovoltammogramm eines reversiblen                            |    |
|            | Redoxprozesses  | 34 |
| Abb. 3.14: | Typisches Zyklovoltammogramm einer an die Elektrode                       |    |
|            | gebundenen Probe [89]   | 36 |
| Abb. 4.1:  | MALDI-TOF MS Spektrum des Peptids DmsB-P C27S mit einer                   |    |
|            | erwarteten Masse von 3641,2 g/mol   | 37 |
| Abb. 4.2:  | Continuous Wave EPR-Spektren der Eisen-Schwefel-Cluster                   |    |
|            | nach unterschiedlicher Rekonstitutionszeit                                | 40 |
| Abb. 4.3:  | Doppelintegral der Intensität des EPR-Signals, dargestellt als            |    |
|            | eine Funktion der Zeit  | 42 |
| Abb. 4.4:  | UV/Vis-Spektrum der oxidierten und der reduzierten Probe des              |    |
|            | Peptids DmsB-P C27S in 50 mM Tris pH 8,3                                  | 46 |
|            |   |    |

| Abb. 4.5:  | Bindungsmotiv eines [Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ]-Clusters  | 47    |
|------------|---|-------|
| Abb. 4.6:  | EPR-Spektrum des Peptids DmsB-P                                 | 49    |
| Abb. 4.7:  | EPR-Spektren der Peptide DmsB-P C27S (links) und DmsB-P         |       |
|            | C27Y (rechts)   | 51    |
| Abb. 4.8:  | EPR-Spektren der Peptide DmsB-P C27F (links) und DmsB-P         |       |
|            | C27Y (rechts)   | 53    |
| Abb. 4.9:  | Zyklovoltammogramm von DmsB-P C27S in Tris-Puffer bei pH        |       |
|            | 8,3   | 55    |
| Abb. 4.10: | Zyklovoltammogramm von DmsB-P C27S in Lösung bei pH 9           | 56    |
| Abb. 4.11: | Zyklovoltammogramm der zeitabhängigen Rückkehr des              |       |
|            | Clusters in den Ursprungszustand, untersucht anhand des         |       |
|            | Reduktionspotential-Signals von DmsB-P C27S bei pH 8,3          | 57    |
| Abb. 4.12: | Gele der Rohlysate aus Überexpression in BL21-Al und DH5 $lpha$ | 60    |
| Abb. 4.13: | Gele der Rohlysate aus Überexpression in BL21-DE3 und BL21-     |       |
|            | RIL   | 61    |
| Abb. 4.14: | Western Blot der Rohlysate, die aus der Überexpression mit den  |       |
|            | E. coli Stämmen BL21-DE3 und BL21-RIL erhalten wurden           | 62    |
| Abb. 4.15: | Agarose-Gel der Plasmide, die nach den mittels PCR              |       |
|            | durchgeführten Punktmutationen erhalten wurden                  | 64    |
| Abb. 4.16: | Gele der Wasch- und Elutionsfraktionen nach der Aufreinigung    |       |
|            | mit unterschiedlichen Strep-Tactin-Säulen                       | 66    |
| Abb. 4.17: | UV/Vis-Spektrum des <i>D.gigas</i> Ferredoxin II nach der       |       |
|            | Rekonstitution des Clusters                                     | 68    |
| Abb. 8.1:  | Programm, das für die Aufreinigung der Proteine mit Hilfe der   |       |
|            | ÄKTA verwendet wurde  | 90    |
| Abb. 10.1: | Vektorkarte des 5227 Basenpaare umfassenden Vektors             |       |
|            | pET-52b(+) 3C/LIC   | . 117 |
| Abb. 10.2: | MALDI-Spektrum der Peptide DmsB-P Wildtyp (berechnet            |       |
|            | 3657,3 g/mol) und DmsB-P C27W (berechnet 3740,4 g/mol)          | . 118 |
| Abb. 10.3: | MALDI-Spektren der Peptide DmsB-P C27F und DmsB-P C4F           |       |
|            | (berechnet beide 3701,3 g/mol)                                  | . 118 |
| Abb. 10.4: | MALDI-Spektren der Peptide DmsB-P C27Y und DmsB-P C4Y           |       |
|            | (berechnet beide 3717,3 g/mol)                                  | . 119 |

Abb. 10.5: MALDI-Spektren der Peptide DmsB-P C27V (berechnet 3653,3 g/mol) und DmsB-P C27T (berechnet 3652,7 g/mol) ......119

# Tabellenverzeichnis

| Tabelle 3.1:  | In der Arbeit verwendete Schutzgruppen für die reaktiven        |       |
|---------------|---|-------|
|               | Seitenketten der Aminosäuren                                    | 24    |
| Tabelle 4.1:  | Ausbeuten, mit denen die Peptide gewonnen wurden, bezogen       |       |
|               | auf die eingesetzte Menge Harz                                  | 38    |
| Tabelle 4.2:  | Übersicht über die erhaltenen g-Werte für die unterschiedlichen |       |
|               | Rekonstitutionszeiten optimiert anhand des Peptids DmsB-P       |       |
|               | C27S  | 41    |
| Tabelle 4.3:  | Aus den EPR-Spektren der Peptide DmsB-P, DmsB-P C27S,           |       |
|               | DmsB-P C27Y, DmsB-P C4Y und DmsB-P C4F erhaltene g-             |       |
|               | Werte   | 48    |
| Tabelle 8.1:  | Zur Peptidaufreinigung verwendete Gradienten                    | 96    |
| Tabelle 10.1: | Restriktionsstellen des Vektors pET-52b(+) 3C/LIC               | . 114 |

# Abkürzungsverzeichnis

| AA         | Aminosäure (Amino Acid)   |
|------------|---|
| Вос        | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl   |
| BSA        | Bovines Serumalbumin  |
| D          | Diffusionskoeffizient   |
| D. gigas   | Desulfovibrio gigas   |
| DIPEA      | Diisopropylethylamin  |
| DmsB       | Untereinheit B der Dimethylsulfoxidreduktase von E. coli  |
| DmsABC     | Dimethylsulfoxidreduktase von E. coli   |
| DmsB-P     | Peptid auf der Basis der Cluster-Koordinationsstelle der Dimethylsulfoxidreduktase von <i>E. coli</i> |
| DMF        | Dimethylformamid  |
| DMF-DE     | Dimethylformamid mit 10 % Dimethylsulfoxid und 25 %<br>Diethylether                                   |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid  |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP       | Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mischung   |
| DSV-Medium | Desulfovibrio gigas Wachstumsmedium   |
| DTNB       | 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoësäure)  |
| E. coli    | Escherichia coli  |
| EDC        | 1-Ethyl-3-(3'-dimethylpropyl)carbodiimid  |
| EDTA       | Ethylendiamin-tetraessigsäure   |
| EPR        | Elektronen Paramagnetische Resonanz-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance)                   |
| EXAFS      | Röntgenabsorptions Feinstrukturanalyse (Extended X-Ray<br>Absorption Fine Structure)                  |

| F  | Faraday Konstante (9,6485•10 <sup>4</sup> C mol <sup>-1</sup> )  |
|--|--|
| Fd II  | Ferredoxin II  |
| Fmoc   | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl   |
| FNR  | Fumarat-Nitratreduktase-Regulator  |
| HATU   | O-(7-Azobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-   |
|  | hexafluorophosphat   |
| HiPIP  | High Potential Iron Sulfur Protein   |
| HOPG   | Hochorientierter pyrolytischer Graphit   |
| <i>I</i> <sub>P</sub>  | Peak-Strom   |
| IPTG   | Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid   |
| k <sub>B</sub>   | Boltzmannkonstante   |
| LB-Medium  | Lysogeny Broth Medium ( <i>E. coli</i> Wachstumsmedium)  |
| LoPIP  | Low Potential Iron Sulfur Protein  |
| MALDI-TOF MS   | Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight –   |
|  | Mass Spectrometry  |
| MCD  | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)  |
| MCD<br>MES   | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure  |
| MCD<br>MES<br>Min  | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten   |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE   | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode   |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE<br>NHS  | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode<br>N-Hydroxysuccinimid  |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE<br>NHS<br>NMP   | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode<br>N-Hydroxysuccinimid<br>N-Methyl-2-pyrrolidon   |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE<br>NHS<br>NMP<br>PB-Medium                            | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode<br>N-Hydroxysuccinimid<br>N-Methyl-2-pyrrolidon<br>Postgate Medium B ( <i>Desulfovibrio gigas</i> Stammedium)   |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE<br>NHS<br>NMP<br>PB-Medium                            | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode<br>N-Hydroxysuccinimid<br>N-Methyl-2-pyrrolidon<br>Postgate Medium B ( <i>Desulfovibrio gigas</i> Stammmedium)<br>2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl  |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE<br>NHS<br>NMP<br>PB-Medium<br>Pbf                     | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode<br>N-Hydroxysuccinimid<br>N-Methyl-2-pyrrolidon<br>Postgate Medium B ( <i>Desulfovibrio gigas</i> Stammmedium)<br>2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl<br>Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)                                     |
| MCD<br>MES<br>Min<br>NHE<br>NHS<br>NMP<br>PB-Medium<br>Pbf<br>PCR<br>Primer Fw | Mass Spectrometry<br>Magnetischer Zirkulardichroismus (Magnetic Circular Dichroism)<br>2-(N-morpholino)ethansulfonsäure<br>Minuten<br>Normalwasserstoffelektrode<br>N-Hydroxysuccinimid<br>N-Methyl-2-pyrrolidon<br>Postgate Medium B ( <i>Desulfovibrio gigas</i> Stammmedium)<br>2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl<br>Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)<br>Forwärts-Primer (Primer Forward) |

| РуВОР          | (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-<br>hexafluorophosphat   |
|----------------|--|
| R              | Gaskonstante 8,314 J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>   |
| rpm            | Rotationen pro Minute  |
| Rt             | Raumtemperatur   |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)  |
| SOC-Medium     | Super Optimal Catabolite Repression Medium   |
| SPPS           | Festphasen Peptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis)  |
| т              | Temperatur   |
| t-Bu           | <i>tert</i> -Butyl   |
| ТСТИ           | <i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate |
| TFA            | Trifluoressigsäure   |
| T <sub>m</sub> | Schmelztemperatur des jeweiligen Primers   |
| TRIS           | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| Trt            | Trityl   |

# 1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Eisen-Schwefel-Clustern, die ein in vielen Proteinen häufig auftretendes Funktionsprinzip darstellen. Diese Cluster treten in der Natur in verschiedenen stöchiometrischen Zusammensetzungen auf (s.u.), wobei die Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Anordnung die häufigste darstellt. Es sollen in dieser Arbeit die Faktoren untersucht werden, die zur Ausbildung entweder eines [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]- oder eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters führen. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf den Unterschieden innerhalb der Sequenz des Bindungsbereichs. Der hier gewählte Ansatz verwendet unter anderem synthetisch dargestellte Peptide, in denen Sequenzvariationen leicht während der chemischen Synthese durchgeführt werden können. Die Sequenz der Peptide folgt Eisen-Schwefel-Cluster Bindungsmotiven, die in verschiedenen Proteinen gefunden werden. Nach Darstellung werden die Cluster mittels spektroskopischer und elektrochemischer Methoden untersucht. Im Folgenden wird eine Einführung in die Thematik der Arbeit gegeben.

## 1.1 Eisen-Schwefel Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster wurden das erste Mal Anfang der 1960er Jahre in mitochondrialen Membranen und in Ferredoxinen nachgewiesen [1-3]. Sie gehören vermutlich zu den ältesten in der Natur vorkommenden prosthetischen Gruppen [4] und konnten bis heute in allen in der Natur vorkommenden, lebenden Organismen, wie Archaeen, Bakterien und Eukaryoten gefunden werden [5]. Am häufigsten werden in nativen Systemen die drei in Abb. 1.1 dargestellten Cluster-Typen [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>], [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>] und [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] gefunden.



Abb. 1.1: Struktur der in der Natur am häufigsten vorkommenden Eisen-Schwefel-Cluster

Die Koordinierung der Eisen-Schwefel-Cluster an das Protein erfolgt über Cysteine, deren Seitenketten-Schwefelatome an die Eisenatome des Clusters binden. Eine Ausnahme bildet hier der Rieske-Cluster, ein [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]-Cluster, bei dem zwei der vier koordinierenden Cysteine durch Histidine ersetzt sind. Diese Struktur wurde erstmals 1964 im Komplex aus reduziertem Koenzym Q und Cytochrom c Reduktase der Atmungskette nachgewiesen [6, 7]. Des Weiteren sind auch Cluster bekannt, die ihre Struktur innerhalb eines Proteins ändern können. Die Aktivität des Enzyms Aconitase zum Beispiel wird durch die reversible Umwandlung des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters in einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster bestimmt [8], wobei der [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster die inaktive Form darstellt [9].

Die vornehmliche Aufgabe der Eisen-Schwefel-Cluster ist der Elektronentransfer, der auf der Fähigkeit des Eisens beruht, zwischen den Oxidationsstufen +2 und +3 zu wechseln. Aufgrund dieser Funktion ist das Redoxpotential eine der wichtigsten Eigenschaften der Cluster. Das Redoxpotential der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster liegt in einem weiten Bereich von -700 mV bis +450 mV. Aus den drei möglichen Redoxstufen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>3+/2+/1+</sup> des Clusters ergeben sich zwei unterschiedliche Proteintypen, die "high potential iron sulfur proteins" (HiPIP) und die "low potential iron sulfur proteins" (LoPIP). Die [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>3+/2+</sup> HiPIP Proteine werden fast ausschließlich in photosynthetischen Purpurbakterien gefunden und haben ein Potential zwischen +50 und +450 mV [10, 11]. Die Rolle dieser Proteine mit hohem Potential ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch wird vermutet, dass sie für den Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $bc_1$  und dem reaktiven Zentrum zuständig sind [12]. Die [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>2+/1+</sup> LoPIP Proteine sind in der Natur wesentlich weiter verbreitet und kommen in allen photosynthetisch aktiven Organismen vor. Häufig werden die Cluster mit niedrigem Potential in Ferredoxinen gefunden. Des Weiteren wird oft beobachtet, dass zwei oder mehrere Cluster hintereinander dem Elektronentransfer dienen oder als terminaler Elektronenakzeptor fungieren [4, 10, 12]. Aufgrund dieser Eigenschaften spielen Eisen-Schwefel-Cluster eine wichtige Rolle in großen Proteinkomplexen, wie dem Photosystem I [13]. Das Potential dieser LoPIP Cluster liegt in einem Bereich von -280 bis -705 mV.

Welches dieser Redoxpaare (HiPIP oder LoPIP) in einem Protein gefunden wird, ist

von der den Cluster umgebenden Proteinmatrix abhängig. Das Potential innerhalb eines Redoxpaares scheint dagegen von der elektrostatischen Umgebung des Clusters, seiner Zugänglichkeit für das Lösemittel Wasser und den Wasserstoffbrückenbindungen, die das Proteingerüst zu den Schwefelatomen des Clusters ausbildet, beeinflusst zu werden [14-16]. Eine systematische Beschreibung der Rolle dieser "Umgebungsfaktoren" ist bisher nicht vorhanden.

Abgesehen vom Elektronentransfer werden zunehmend auch andere Funktionen entdeckt, die von [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern übernommen werden [4, 5, 17]. So sind mittlerweile einige enzymatische Prozesse bekannt, bei denen der Cluster Teil des aktiven Zentrums ist. Hierbei kann zum Beispiel ein Eisenatom des Clusters als Bindungsstelle für das Substrat (z. B. Citrat) dienen, wie es bei der Aconitase der Fall ist [18]. Des Weiteren sind auch Proteine wie der Fumarat-Nitratreduktase-Regulator (FNR) des Bakteriums *Escherichia coli* bekannt, bei denen die Weiterleitung eines Signals auf der Zerstörung des Clusters beruht. Das Protein dient als Sauerstoffsensor und enthält in seiner aktiven Form einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster. Durch den Zerfall des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters zu einem [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]-Cluster unter Anwesenheit von Sauerstoff wird der FNR inaktiviert. Da dieser die Expression anaerober Gene aktiviert und aerober Gene reprimiert, ermöglicht das Protein die Anpassung der Enzymausstattung an die Verfügbarkeit von Sauerstoff [19, 20].

Im Gegensatz zu  $[Fe_4S_4]$ -Clustern sind  $[Fe_2S_2]$ -Cluster und  $[Fe_3S_4]$ -Cluster fast ausschließlich an Ein-Elektron-Transfer Reaktionen beteiligt. Sie werden häufig in Ferredoxinen gefunden und sind vielfach in Hydrogenasen vertreten, wo sie einzeln oder im Verbund mit  $[Fe_4S_4]$ -Clustern aufeinander folgend angeordnet sind.

#### 1.2 Elektronentransfer über Eisen-Schwefel-Cluster in Hydrogenasen

Eine der häufigsten Funktionen von Eisen-Schwefel-Clustern ist der Elektronentransfer, zum Beispiel in Hydrogenasen. Um genauere Informationen über den Mechanismus des Elektronentransfers zu erhalten, wurden die Kristallstrukturen der Hydrogenasen aus *Desulfovibrio gigas* [21] und *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) im Detail untersucht [22, 23]. Die Kristallstrukturen zeigen, dass der Elektronentransfer vom reaktiven Zentrum aus über drei linear angeordnete Cluster erfolgt. Es handelt sich hierbei um einen proximalen und um einen distalen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster, die über einen mittleren [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster verbunden sind [24].

Um genauer zu verstehen, wie der Elektronentransfer innerhalb der Cluster abläuft, wurden die Redoxpotentiale der *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase mit Hilfe einer Redoxtitration ermittelt. Sie betragen -340 mV, -79 mV und -290 mV [25]. Da der mittlere Cluster, also der [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster, ein deutlich höheres Potential aufweist als der proximale und der distale, ist unklar, ob der Cluster am Elektronentransport beteiligt ist oder ob er nur dazu dient, die Clusterstruktur zu stabilisieren. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass eine vergleichbare Hydrogenase, die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfornicrobium baculatum*, deren Elektronentransfer über eine Kette bestehend aus drei [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern stattfindet [26], keine so hohe Abweichung innerhalb der Clusterpotentiale zeigt.

Um weitere Informationen über den Einfluss des Clustertyps auf den Elektronentransfer zu erhalten, wurden Mutationen an der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* durchgeführt, so dass statt des zentralen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters ein [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster gebildet wurde. Der Einbau des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters senkte das Potential des mittleren Clusters von +65 mV auf -250 mV, jedoch konnte kaum ein Einfluss auf die Enzymaktivität der Hydrogenase beobachtet werden [27]. Die Frage nach der Funktion eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters konnte also noch nicht abschließend beantwortet werden.

## 1.3 Ferredoxine

Ferredoxine gehören zu der Gruppe der einfachen Eisen-Schwefel-Proteine, zu der auch die Rubredoxine, Rieske-Proteine und HiPIP Proteine (vgl. oben) gehören. Die einzige prosthetische Gruppe dieser Proteine besteht aus einem oder mehreren Eisen-Schwefel-Clustern. Abgesehen von der Koordination des Clusters ist ein typisches Merkmal der Ferredoxine die Freisetzung von Schwefelwasserstoff unter Zugabe von Säure.

Eine Vielzahl von Ferredoxinen wurde bereits in den 1950er Jahren entdeckt, jedoch wurde der Begriff Ferredoxin erst ab 1962 von Wharton eingeführt, der diesen Begriff für ein aus *Clostridium pasteurianum* isoliertes nicht-Häm Eisenprotein verwendete. Zu den bereits früher entdeckten und erst später der Gruppe der Ferredoxine zugeordneten Proteinen gehören die von Davenport 1952 und 1960 isolierten Proteine Methämoglobin-reduzierender Faktor [28] und Häm-reduzierender Faktor [29], sowie der 1957 von Arnon isolierte Triphosphopyridinnukleotid-reduzierende Faktor [30]. Ebenfalls der Gruppe der Ferredoxine zugeordnet wurden die 1958 von San Pietro und Lang gefundene photosynthetische Pyridinnukleotid-Reduktase [31] und das 1962 von Gewitz und Völker aus *Chlorella pyronoidosa* isolierte "rote Ferment" [32].

Ferredoxine können sowohl [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]- als auch [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- oder [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster enthalten [33]. Bei Ferredoxinen, die einen [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]-Cluster enthalten, wird zwischen Pflanzen-Typ, Adrenodoxin-Typ und Clostridium-Typ unterschieden, wobei die beiden erstgenannten Ferredoxin-Typen an Ein-Elektron-Transferreaktionen beteiligt sind [34].

Die in Pflanzen und Cyanobakterien vorkommenden Pflanzen-Typ-Ferredoxine sind dafür zuständig, die Elektronen vom Photosystem I aufzunehmen und an den Stoffwechsel, hauptsächlich zur NADPH Produktion, weiterzuleiten [35].

Die Ferredoxine des Adrenodoxin-Typs spielen als Elektronendonoren für die Cytochrom-P450-Monooxygenasen [36-39] oder für bakterielle Hydroxylierungssysteme eine essentielle Rolle [40, 41].

Ein Hauptunterschied zwischen den beiden Ferredoxin-Typen lässt sich anhand der Redoxpotentiale erkennen, die für Pflanzen-Typ Ferredoxine zwischen -310 und -455 mV [42] und für Adrenodoxin-Systeme zwischen -235 und -273 mV liegen [43]. Die Pflanzen-Typ Ferredoxine liegen mit ihrem Potential somit weit unter dem Potential der Adrenodoxin-Ferredoxine.

Die Gruppe der Clostridium-Typ Ferredoxine ist im Gegensatz zu den anderen beiden Ferredoxin-Typen, die ausschließlich dem Elekronentransport dienen, an der

Stickstofffixierung in den Bakterien *Clostridium pasteurianum* [44, 45], *Azotobacter vinelandii* [46] und *Aquifex aeolicus* [47] beteiligt. Es wird vermutet, dass die Unterschiede in der Funktion der Cluster durch die relative Anordnung der Cysteine zueinander beeinflusst wird [47].

Diese Zusammenfassung zeigt, dass Ferredoxine in der Lage sind, die unterschiedlichsten Cluster zu koordinieren und das Redoxpotential dieser Cluster zu variieren. Aus diesem Grund scheint es interessant, Ferredoxine in die Erforschung der Bindungsvoraussetzungen und Eigenschaften der diversen Cluster mit einzubeziehen.

#### 1.3.1 Desulfovibrio gigas Ferredoxin II

Eines der bis heute am besten studierten Ferredoxine ist das Ferredoxin II von *Desulfovibrio gigas (D. gigas*). Das in Abb. 1.2 dargestellte Protein besteht aus 58 Aminosäuren, die einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordinieren. Des Weiteren ist eine Sulfidbrücke zwischen den Cysteinylresten in Position 18 und 42 zu erkennen.



Abb. 1.2: Kristallstruktur von *D. gigas* Ferredoxin II (nach PDB: 1FXD)

Das Ferredoxin fungiert in *D. gigas* als Elektronenüberträger und ist in der Lage, als Mediator beim Elektronentransfer zwischen Cytochrom с3 und dem Sulfitreduktasesystem zu dienen [48]. Da dieses Protein bereits lange Gegenstand der Forschung ist, ist es in seiner Funktion sowie den spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften gut charakterisiert. So sind die UV/Vis-spektroskopischen Eigenschaften durch Moura et al. [49] beschrieben. Die elektrochemischen Eigenschaften wurden von Moreno et al [50] und Macedo et al. [51] umfassend beschrieben. Die Charakterisierung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erfolgte durch Macedo et al. [52, 53]. Ein Vergleich der von Kissinger et al. bestimmten Kristallstruktur [54] mit der Struktur des Proteins in Lösung durch NMR-Spektroskopie wird durch Moura et al. [55] beschrieben. Eine Beschreibung der Analyse mit Hilfe der EPR-Spektroskopie erfolgte durch Cammack et al. [56]. Die Charakterisierung mit Hilfe der Mössbauer-Spektroskopie wurde von Huynh et al. [57] und Papaefthymiou et al. [58] durchgeführt. Die Ergebnisse der Charakterisierung mit magnetischem Zirkulardichroismus (MCD) wurde von Thomson et al. [59] und die Charakterisierung mit Röntgenabsorptions- Feinstrukturanalyse (EXAFS) von Antonio et al. [60] dargestellt. Die Ergebnisse einer Charakterisierung mit Hilfe der gesättigten Magnetisierung wurden durch Day et al. [61] beschrieben, während über die Ergebnisse der Charakterisierung mit Hilfe der Resonanz Raman Spektroskopie von Johnson et al. [62] berichtet wurde.

Da alle diese Informationen bereits zur Verfügung stehen, bietet es sich zum einen an, dieses Ferredoxin als natives Vergleichssystem für künstlich hergestellte Modellpeptide zu verwenden. Zum anderen kann dieses Protein, da es relativ klein ist, selbst als Modell herangezogen werden. Da der Wildtyp bereits ausführlich charakterisiert ist, erleichtert dies den Vergleich des Wildtyps mit selektiv hergestellten Mutanten bezüglich der Clusterbindung, sowie der spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften.

## 1.4 Maquettes für Eisen-Schwefel-Cluster

Unter einem *Maquette* versteht man ein Peptid, das als vereinfachtes Modell für ein komplexes Protein dient. Ein *Maquette* ist meist einfacher und in größerer Ausbeute zu gewinnen. Aufgrund seiner geringen Größe ist es leichter zu handhaben als ein Protein, so dass eine größere Zahl analytischer Methoden für die Charakterisierung eingesetzt werden kann.

Die bereits in der Literatur beschriebenen *Maquettes*, die für die Einbindung von Eisen-Schwefel-Clustern verwendet wurden, beschränken sich auf die wesentlich häufiger vorkommenden und deshalb auch weitaus besser charakterisierten [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster. Auf diesem Gebiet sind besonders die Arbeitsgruppen um Dutten und Gibney aktiv, die eine Reihe von [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordinierenden Modellpeptiden entwickelt haben, um die Basisbedingungen für eine Clusterkoordination zu bestimmen und Faktoren zu identifizieren, die Einfluss auf das Redoxpotential der Cluster ausüben. Die meisten dieser *Maquettes* basieren auf der Struktur der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster enthaltenden Ferredoxine [63-65] oder auf dem Bindungsmotiv der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster des Photosystems I (PS I) [66, 67].

Es zeigte sich, dass nur solche Peptide einen Cluster koordinierten, die auch das native Bindungsmotiv (CysX<sub>2</sub>CysX<sub>2</sub>Cys) enthielten, wobei eine große hydrophobe Seitenkette am Aminosäurerest in der Position nach dem ersten Cystein des Bindungsmotivs die Koordinierung begünstigt [64]. Die Modifikationen an der Peptidsequenz zeigten jedoch kaum Einfluss auf das gemessene Potential des Clusters. Erst die Verwendung eines vier-Helix-Bündels, in das das Bindungsmotiv des PS I Clusters F<sub>x</sub> eingefügt wurde, zeigt ein etwas negativeres Potential als die bis dahin entwickelten Modellpeptide. Es liegt jedoch mit gemessenen -420 mV noch immer ca. 285 mV oberhalb des Potentials des nativen F<sub>x</sub> Clusters von -705 mV [68, 69].

Da bisher noch keine analogen Modellpeptide zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster genauer untersucht werden können, ist kaum etwas über deren Koordinationsvoraussetzungen und Einflüsse auf das Redoxpotential bekannt.

#### 1 Einleitung

## 1.5 Motivation für diese Arbeit

Da es sich bei ca. 90 % der bisher bekannten Eisen-Schwefel-Cluster um [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster handelt [5], sind diese auch am besten charakterisiert. So sind die optischen und magnetischen Eigenschaften bereits bestimmt und übersichtlich von Sweeney *et al.* zusammengefasst [70], während die Arbeit von Mouesca einen Überblick über die Charakterisierung der Cluster mit Hilfe von EPR und ENDOR bietet [71].

Der aktuelle Stand der Forschung stellt momentan keine ausreichenden Informationen darüber zur Verfügung, was genau zur Bildung eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- oder eines [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters führt und worin die Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Cluster-Eigenschaften und -Funktionen liegen. Aus diesem Grund sollten diesbezüglich weitere Untersuchungen erfolgen. So ist es unter anderem notwendig, die Faktoren zu identifizieren, die die Bildung des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- oder [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters begünstigen. Ebenfalls untersucht werden müssen die spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften, sowie der Einfluss, den die Proteinmatrix (Sequenz) auf diese ausübt.

Eine Möglichkeit, diese Informationen zu erhalten, ist die Entwicklung von Modellpeptiden, die den Koordinationsbereich des Clusters imitieren. Ein Vorteil dieser *Maquettes* besteht darin, dass sie zum Beispiel durch Festphasenpeptidsynthese leichter gewonnen werden können als die komplexen nativen Proteine, zu denen auch die Hydrogenasen gehören.

Gegenstand dieser Arbeit ist nun die Entwicklung analoger *Maquettes* für  $[Fe_3S_4]$ -Cluster. Mit Hilfe dieser Peptide soll eine genauere Charakterisierung des  $[Fe_3S_4]$ -Clusters erfolgen. Des Weiteren soll ein Vergleich mit den bereits besser charakterisierten  $[Fe_4S_4]$ -Clustern ermöglicht werden.

# 2 Themenstellung und Projektplanung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Koordinierung eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters durch ein *Maquette* zu erreichen. Unter einem *Maquette* versteht man in diesem Fall ein Peptid, das, einem Teilbereich einer natürlich vorkommenden Proteinsequenz entsprechend, in der Lage ist, einen Cluster zu koordinieren und das deshalb als vereinfachtes Modell für ein komplexeres Protein betrachtet werden kann. Zunächst muss also eine Peptidsequenz gefunden werden, die einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordiniert (siehe 2.1). Die Clusterbildung wird mittels EPR-Spektroskopie überprüft. Da die Signalform für den jeweiligen Cluster indikativ ist, kann mit Hilfe dieser Methode der Typ des gebildeten Clusters identifiziert werden.

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren auf die Stöchiometrie der Clusterbildung zu erkennen, werden "Punktmutationen" während der Synthese in die *Maquette*-Sequenz eingefügt, um Aufschluss über den Einfluss der Sequenz auf die spektroskopischen und insbesondere auf die elektrochemischen Eigenschaften des Clusters zu erhalten. Die spektroskopischen Eigenschaften können mit diversen Methoden (z. B. UV/Vis- oder Resonanz Raman Spektroskopie) bestimmt werden, während die elektrochemischen Eigenschaften mit Hilfe der Zyklovoltammetrie bestimmt werden.

Um ein geeignetes Maquette zu identifizieren und anschließend zu charakterisieren, wurden die beiden folgenden Ansätze verfolgt:

## 2.1 Dimethylsulfoxid Reduktase aus Escherichia coli

Die 205 Aminosäuren umfassende Elektronentransfer-Untereinheit DmsB des Enzyms Dimethylsulfoxid Reduktase (DmsABC) beinhaltet 16 Cystein-Reste, die in vier Gruppen (I-IV) arrangiert sind und als Liganden für jeweils einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster dienen.

Wie bereits in der Literatur durch Rothery et al. beschrieben [72], führt die

Punktmutation des Cysteins an Position 102 (DmsB C102W, C102S, C102F, C102Y) zu der Koordinierung eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters anstelle eines [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters.

Im Rahmen dieses Projektes soll geprüft werden, ob sich der 33 Aminosäuren umfassende Koordinationsbereich (binding site) der DmsB, nachfolgend DmsB-P genannt, der durch die oben erwähnten Punktmutationen einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordiniert hat, als *Maquette* eignet, um in diesem verkürzten Proteinstück die Bindeeigenschaften für Eisen-Schwefel-Cluster zu untersuchen. Hierzu werden zunächst die potentiellen *Maquettes* des Wildtyps (DmsB-P) und dessen Modifikationen mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt. Die Modifikationen entsprechen den Mutationen, die an der DmsB-Sequenz durch gerichtete Mutagenese durchgeführt wurden und betreffen das Cystein 102, das jetzt an Position 27 (C27) der Sequenz DmsB-P liegt. Es werden also die Modifikationen DmsB-P C27W, C27S, C27F und C27Y synthetisiert.

Nach erfolgreicher Synthese soll mittels EPR-Spektroskopie überprüft werden, welche der *Maquettes* geeignet sind, einen Cluster zu inkorporieren, bevor eine Charakterisierung mit Hilfe der spektroskopischen und elektrochemischen Methoden erfolgen kann.

## 2.2 Gewinnung von Desulfovibrio gigas Ferredoxin II

Im zweiten Ansatz soll versucht werden, das Ferredoxin II von *Desulfovibrio gigas* (*D. gigas* FdII) zu gewinnen. Hierbei handelt es sich um ein 58 Aminosäuren umfassendes Protein, das nach Literaturangaben in der Lage ist sowohl einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster, als auch einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu koordinieren [73].

Wie in der Literatur bereits beschrieben [74], müssen zur Gewinnung des Proteins zunächst *D. gigas* Zellen angezüchtet und daraus die DNA isoliert werden, bevor eine anschließende Überexpression in *E. coli* erfolgen kann, um das rekombinante Ferredoxin zu gewinnen. Nach erfolgreicher Gewinnung des rekombinanten Ferredoxin-Wildtypproteins sollen Punktmutationen durchgeführt werden, um die

Faktoren genauer zu definieren, die den Einbau eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- oder eines [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters begünstigen.

Beide Proteine, sowohl Ferredoxin als auch DmsB (vgl. 2.1), haben das gleiche Bindungsmotiv (CysX<sub>2</sub>CysX<sub>2</sub>Cys) für die Koordinierung des Clusters, was einen Vergleich der Ergebnisse des Ferredoxin-Projektes mit den Ergebnissen des DmsB-Projektes ermöglichen sollte. Um diese Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, sollen am Ferredoxin Mutationen vorgenommen werden, die denen im DmsB-P entsprechen. Aus diesem Grund wird, analog der DmsB-P Modifikationen, das zweite Cystein des Bindungsmotivs mutiert.

Dieser Ansatz scheint auch deshalb besonders Erfolg versprechend, da die beiden äußeren Cysteine des Bindungsmotivs den Cluster koordinieren und auf diese Weise die Aminosäure, die die Stelle des mittleren Cysteins einnimmt, in ihrer Position fixieren. Da die Aminosäure deshalb keine Möglichkeit hat, sich von dem Cluster zu entfernen, um eine sterische Wechselwirkung zu vermeiden, ergibt sich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Einflussnahme dieser Aminosäure auf die Clusterrekonstitution.

Aus diesem Grund werden Punktmutationen am mittleren Cystein, das sich an Stelle 12 der Ferredoxin-Sequenz befindet, durchgeführt. Eingefügt werden die bereits im obigen Projekt (siehe 2.1) eingesetzten Aminosäuren Serin, Phenylalanin und Tyrosin. Dieses Vorgehen erlaubt im Vergleich mit den Ergebnissen des DmsB-P und dessen Modifikationen sowie den Ergebnissen der oben genannten Publikationen Rückschlüsse auf die Voraussetzungen, welche für die Koordinierung eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters unabdingbar sind.

Anhand der unterschiedlichen Mutationen sollen Informationen über den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Clusterrekonstitution untersucht werden. Speziell wird die Bedeutung, die die Seitenkettengröße der mutierten Aminosäure auf die Clusterrekonstitution hat, untersucht. Des Weiteren ist es von Interesse, zu prüfen, ob die Polarität der mutierten Aminosäure einen Einfluss auf die Rekonstitution des Clusters

ausübt. Außerdem sollte untersucht werden, ob und wie die elektrochemischen sowie die spektroskopischen Eigenschaften des erhaltenen Clusters durch die oben beschriebenen Mutationen beeinflusst werden.

# 3 Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die für diese Arbeit relevanten Grundlagen kurz erläutert.

## 3.1 Proteine und Peptide

Proteine sind Moleküle, die in nahezu allen biologischen Prozessen von großer Bedeutung sind und eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen erfüllen und Proteine bestehen aus einer Kette kovalent aneinander gebundener Aminosäuren bestehen. Zur Verfügung steht ein Basissatz von 20 biogenen Aminosäuren, aus denen eine Sequenz aufgebaut wird. Durch die unterschiedliche Länge und Aminosäurenkombination entstehen Proteine mit verschiedensten Eigenschaften und Funktionen (vgl.3.1.2).

Alle Aminosäuren bestehen aus einem zentralen Kohlenstoffatom ( $\alpha$ -Kohlenstoff), an das ein Proton (außer bei Prolin), eine Amino- und eine Carboxygruppe und eine variable Seitenkette gebunden sind. Diese bestimmt die chemischen Eigenschaften der verschiedenen Aminosäuren. Bis auf die Aminsäure Glycin, deren Rest aus einem Proton besteht, haben alle Aminosäuren den  $\alpha$ -Kohlenstoff als Chiralitätszentrum, sodass sie sowohl in D- als auch in L-Konfiguration existieren. Proteine, die dem standardmäßigen Biosyntheseweg folgend synthetisiert werden, bestehen jedoch nur aus L-Aminosäuren.

Die Seitenketten der Aminosäuren unterscheiden sich in ihrer Struktur, Größe, Polarität und elektrischen Ladung, sodass die Aminosäuren aufgrund ihrer Seitenketten in die folgenden fünf Klassen eingeteilt werden können (in Klammern ist der jeweilige Einbuchstaben-Code der Aminosäuren mit angegeben) [75]:

 Die Gruppe der unpolaren, aliphatischen Aminosäuren besteht aus den Aminosäuren Alanin (A), Valin (V), Leucin (L) und Isoleucin (I), deren unterschiedlich lange Seitenketten aus Kohlenwasserstoffketten bestehen. Im Fall des Glycins (G) besteht die Seitenkette aus einem Wasserstoffatom, während bei Prolin (P)

eine aliphatische, zyklische Seitenkette vorhanden ist, die sowohl das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom als auch das Stickstoffatom einbezieht.

- Eine weitere Gruppe bilden die Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten: Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W).
- Die Gruppe der polar ungeladen Aminosäuren umfasst die Aminosäuren Serin (S) und Threonin (T), die eine Hydroxygruppe in der Seitenkette haben, Cystein (C) und Methionin (M), deren Seitenketten Schwefelatome enthalten, sowie Asparagin (N) und Glutamin (Q), die eine Amidgruppe enthalten.
- Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) bilden aufgrund einer zweiten Carboxygruppe in der Seitenkette die Gruppe der negativ geladenen, sauren Aminosäuren.
- Zu der Gruppe der positiv geladenen, basischen Aminosäuren gehören Arginin (R), Histidin (H) und Lysin (K).

#### 3.1.1 Peptide

Peptide bestehen aus einer Kette von Aminosäuren, die durch eine "Peptid"-Bindung miteinander verbunden sind. Bei der Bildung einer Peptidbindung handelt es sich um eine Kondensationsreaktion, bei der die  $\alpha$ -Carboxygruppe der einen Aminosäure mit der  $\alpha$ -Aminogruppe einer zweiten Aminosäure reagiert (siehe Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Bildung einer Peptidbindung durch Kondensation

Die Länge der natürlich vorkommenden Peptide variiert von kleinen, zwei bis drei Aminosäuren umfassenden Molekülen über Oligopeptide, die aus bis zu zehn Aminosäuren bestehen, bis hin zu Polypeptiden. Die Grenze zwischen Polypeptiden und Proteinen verläuft fließend, jedoch werden mit Polypeptiden meistens Moleküle bezeichnet, deren molare Masse unter 10000 g/mol liegt. Größere Moleküle werden im Allgemeinen als Proteine bezeichnet. Die Aminosäureeinheiten der Peptidkette werden als Reste bezeichnet. Die meisten Proteine liegen in einem Größenbereich von 100 bis 2000 Aminosäureresten.

Der Rest, der die endständige Aminogruppe enthält, wird N-terminal oder aminoterminal genannt. Der Rest, der die endständige Carboxygruppe enthält, wird Cterminal oder carboxyterminal genannt. Entsprechend der Konvention werden die Aminosäuren in Peptiden und Proteinen immer beginnend vom N-terminalen hin zum C-terminalen Ende der Sequenz aufgeführt.

Bei den meisten biologisch aktiven Molekülen, die aus Aminosäuren aufgebaut sind, handelt es sich um Proteine, jedoch sind auch einige Peptide mit einer biologischen Aktivität bekannt. Eines der bekanntesten biologisch aktiven Peptide, das aus zwei Polypeptidketten besteht, ist das Hormon Insulin. Darüber hinaus besitzen einige Antibiotika eine Peptidstruktur.

### 3.1.2 Proteine

Proteine können aufgrund der Unterschiede in der Länge und Zusammensetzung ihrer Sequenz die verschiedensten biologischen Aufgaben übernehmen. Aus diesem Grund sind sie an fast allen biologischen Prozessen beteiligt.

Proteine werden meist anhand ihrer biologischen Funktion in Gruppen/Klassen eingeteilt [75, 76]. Eine große Gruppe bilden die Enzyme, die die verschiedensten Reaktionen innerhalb einer Zelle katalysieren. Sie zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Effizienz aus. Darüber hinaus stellen Proteine, die kleine Moleküle durch den Organismus oder durch Zellwände transportieren, eine umfangreiche Gruppe dar. Stellvertretend für den Transport von Molekülen ist das Hämoglobin zu

nennen, das Sauerstoffmoleküle in den Erythrozyten bindet und von der Lunge aus durch den Körper transportiert. Für die Aufnahme und Weiterleitung äußerer Reize sind Rezeptorproteine zuständig. Kontraktile oder motile Proteine sind der Hauptbestandteil des Muskelgewebes, wo sie die Muskelkontraktion ermöglichen. Des Weiteren sind sie für Bewegungen im mikroskopischen Bereich, wie der Fortbewegung von Zellen durch Flagellen- und Cilienschlag verantwortlich. Strukturproteine sind Bestandteile der unterschiedlichsten Gewebearten. Sowohl die Haut als auch Sehnen und Knorpel enthalten das Faserprotein Kollagen, das eine hohe Zugfestigkeit besitzt. Fingernägel, Haare und Federn enthalten das Protein Keratin, das sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit auszeichnet. Zur Gruppe der Abwehrproteine gehören die Proteine, die den Körper vor Verletzungen schützen, indem sie die Blutgerinnung induzieren oder als Antikörper eindringende Bakterien, Viren oder Proteine neutralisieren. Regulatorische Proteine steuern eine Reihe zellulärer und physiologischer Vorgänge. Eine Vielzahl der Proteine, die dieser Gruppe zugeordnet werden können, sind Hormone, wie zum Beispiel das den Zuckermetabolismus regulierende Insulin oder die Wachstumshormone der Hypophyse. Es sind aber auch Proteine bekannt, die regulatorisch die Proteinbiosynthese und das Wachstum steuern. Des Weiteren gibt es noch viele andere Proteine, die keiner dieser Klassen zugeordnet werden können. Zu diesen gehören zum Beispiel einige Proteine, die das Gefrieren des Blutes bei in der Arktis lebenden Fischen verhindern.

Welche dieser Funktionen ein Protein übernimmt, wird durch die Sequenz und die daraus folgende dreidimensionale Struktur bestimmt. Zusätzlich zu den Aminosäuren können noch andere Bestandteile zur biologischen Aktivität der Proteine beitragen. Diese werden Kofaktoren genannt. Ist der Kofaktor kovalent an das Protein gebunden, wird er als prosthetische Gruppe bezeichnet. Bei Kofaktoren kann es sich um organische, metallorganische oder anorganische Moleküle oder Ionen handeln. Die spektroskopischen und physikalischen Eigenschaften des Kofaktors sind sowohl von der Proteinumgebung (kovalente oder koordinative Bindung, Wasserstoffbrückenbindungen), als auch von der Umgebung (hydrophil, hydrophob) abhängig.

Sollte mehr als ein Kofaktor vorhanden sein, spielt auch die relative räumliche Ausrichtung der beiden zueinander eine Rolle.

Wie bereits erwähnt spielt die Struktur der Proteine eine entscheidende Rolle, deshalb soll im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden.

Die Struktur von Proteinen lässt sich hierarchisch in vier Ebenen unterteilen.Die Primärstruktur beschreibt die kovalenten Bindungen zwischen den Aminosäuren. Hierzu gehören die bereits erwähnten Peptidbindungen, aber auch Disulfidbindungen, die sich zwischen den Seitenketten der Cysteinreste ausbilden können.

Die Sekundärstruktur beschreibt die Struktur bzw. die relative Anordnung nahe beieinanderliegender Aminosäurereste. Die häufigsten Elemente der Sekundärstruktur sind die in Abb. 3.3 dargestellte α-Helix und das in Abb. 3.4 dargestellte β-Faltblatt, deren Formation durch elektrostatische Wechselwirkungen, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die sterischen Ansprüche der Seitenketten beeinflusst wird. Innerhalb eines Sekundärstrukturelements ist die sterische Abstoßung minimiert und die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen maximiert.

Um die Struktur von Proteinen besser zu verstehen, muss zunächst die Peptidbindung genauer betrachtet werden. Vergleicht man den Abstand des Kohlenstoffs und des Stickstoffs der Amidbindung (132 pm) mit dem Bindungsabstand einer C-N Einfachbindung (149 pm) und einer C=N Doppelbindung (127 pm) [76], zeigt dies, dass die Peptidbindung einen partiellen Doppelbindungscharakter aufweist. Aus diesem Grund ist die Peptidbindung relativ starr und planar, und das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe und das Wasserstoffatom der Aminogruppe liegen fast immer in *trans*-Konfiguration vor. Die Bindung des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms zum Carbonylkohlenstoffatom (C $_{\alpha}$ -C) und die Bindung des Stickstoffatoms zum  $\alpha$ -Kohlenstoffatom (N-C $_{\alpha}$ ) sind reine Einfachbindungen und können daher auch frei rotieren (siehe Abb. 3.2).



#### Abb. 3.2: Struktur der Peptidbindung

Hell hinterlegt ist die planare, starre Peptidbindung und die benachbarten Bindungen mit den Rotationswinkeln  $\phi$  und  $\psi$  (nach Lehninger et al 1994) [75]

Der Winkel, der durch die Rotation um die (N-C<sub> $\alpha$ </sub>)-Bindung entsteht, wird mit  $\phi$  bezeichnet. Der Winkel, der durch die Rotation um die (C<sub> $\alpha$ </sub>-C)-Bindung entsteht, wird  $\psi$  genannt. Liegen beide oben genannten Bindungen des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms in einer Ebene, so wird für beide Winkel  $\phi = \psi = 0^{\circ}$  definiert. Mit Hilfe dieser beiden Winkel lässt sich jede relative Anordnung zueinander und damit jedes Sekundärstrukturelement eindeutig beschreiben. Wie in Abb. 3.3 gezeigt, nehmen die Winkel bei einer  $\alpha$ -helikalen Struktur die Werte von  $\phi = -60^{\circ}$  und  $\psi = -45^{\circ}$  bis -50° an, wobei für jede Windung 3,6 Aminosäuren verwendet werden [75]. Die meisten in der Natur gefundenen Helices sind, wie in der Abbildung dargestellt, rechtsgängig, jedoch sind auch Beispiele linksgängiger Helices bekannt.



**Abb. 3.3:** Struktur einer rechtsgängigen α-Helix

 a) Aufbau der α-Helix, deren Ebenen der starren Peptidbindung parallel zur Längsachse der Helix verlaufen.
b) Schematische Darstellung einer rechtsgängigen α-Helix (nach Lehninger et al 1994) [75]

Im Gegensatz zu der  $\alpha$ -Helix können beim  $\beta$ -Faltblatt nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Resten innerhalb einer Aminosäurekette ausgebildet werden, sondern auch zwischen benachbarten Ketten. Die zwei möglichen Varianten, mit der sich die Aminosäureketten in dieser im "Zickzack" gefalteten Struktur zueinander ausrichten können, sind in Abb. 3.4 dargestellt. Bei der parallelen Struktur verlaufen C- bzw. N-Terminus in dieselbe Richtung, bei der antiparallelen Struktur verlaufen sie in entgegengesetzter Richtung. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  sind für parallel und antiparallel verlaufende Faltblätter etwas unterschiedlich. So liegen die Winkel bei einem parallel verlaufenden Faltblatt im Bereich um c = -139° und  $\psi$  = 113°[77].


#### Abb. 3.4: Strukturen eines β-Faltblatts.

Aufgrund der Seitenketten der Aminosäuren und der daraus resultierenden sterischen Wechselwirkungen, sind bei den sekundären Strukturelementen nicht alle Winkelkombinationen erlaubt. Die möglichen Winkelkombinationen können anhand des von Ramachandran 1962 entwickelten Diagramms ermittelt werden (siehe Abb. 3.5).



#### Abb. 3.5: Ramachandran Diagramm

Theoretisch erlaubte Konformationen von Peptiden, definiert durch die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ . Dunkelblau dargestellt sind die Bereiche der Konformationen, die von allen Aminosäuren eingenommen werden können. Mittelblau sind die Bereiche der Konformationen, die von allen Aminosäuren außer Isoleucin und Valin eingenommen werden können, und hellblau gekennzeichnet sind die Bereiche, die leicht instabil sind, aber in einigen Proteinen vorkommen. Schwarz markiert sind die Bereiche, die dem jeweiligen Strukturelement zugeordnet werden können [75].

Die benachbarten Aminosäurestränge können bezüglich des Amino- bzw. Carboxyterminus entweder parallel (links) oder antiparallel (rechts) verlaufen (nach Lehninger et al 1994) [75]

Die Tertiärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung auch weit voneinander entfernter Aminosäurereste zueinander und gibt ein räumliches Gesamtbild des Peptids oder Proteins wider. Einen Einfluss auf diese Struktur haben nicht nur Disulfidbrücken, Ionenbindungen zwischen geladenen Resten und Wasserstoffbrückenbindungen, sondern auch hydrophobe Wechselwirkungen in wässrigen Lösungen. Indem sich hydrophobe Gruppen zusammenlagern, wird die Grenzfläche zwischen den unpolaren, hydrophoben Gruppen und dem Wasser minimiert, was energetisch bevorzugt ist.

Die Quartärstruktur schließlich beschreibt die Struktur, mit der sich mehrere Proteinketten zusammenlagern. Die Proteinketten, die die Quartärstruktur ausbilden, können gleichartig sein, jedoch ist dies nicht zwingend notwendig. Zum Beispiel wird im Hämoglobin die prosthetische Gruppe (Hämgruppe) von vier Proteinketten koordiniert, von denen jeweils zwei der α- und zwei der ß-Untereinheit zugehören. Die Quartärstruktur wird durch die gleichen Faktoren stabilisiert wie die Tertiärstruktur.

Welche Faktoren allerdings genau die Faltung eines Proteins beeinflussen, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt mehrere Faltungen für ein Protein, die als lokale energetische Minima zu einer stabilen Faltung führen. Jedoch führt nur die native Struktur zu einem ausreichend funktionsfähigen Protein. Um diese zu begünstigen, werden in manchen Fällen von der Natur Hilfsproteine, die Chaperone, eingesetzt, die unter ATP-Verbrauch die korrekte Faltung der Proteine ermöglichen.

Um einen besseren Einblick in die Abläufe des Faltungsprozesses zu erlangen, werden die in zunehmendem Maße zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen von Proteinen untersucht. Von Interesse ist hierbei der Zusammenhang von Proteinsequenz und Sekundärstruktur (Helix, Faltblatt etc.). Auf diese Weise konnte mittlerweile durch verschiedene Methoden herausgefunden werden, dass die Aminosäuren Lysin, Leucin und Glutaminsäure die Bildung einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix aufgrund der sich ausbildenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden polaren Aminosäuren begünstigen. Leucin bildet die hydrophobe Seite der Helix. Die

Aminosäuren Valin, Isoleucin und Prolin finden sich häufig am Ende einer Helix, da die verzweigten Seitenketten des Valins und des Isoleucins sowie die zyklische Seitenkette des Prolins die helikale Struktur stören.

#### 3.2 Festphasenpeptidsynthese

In dieser Arbeit wird die 1959 von Merrifield etablierte Festphasenpeptidsynthese [78] verwendet, um die im Verlaufe der Arbeit benötigten Peptide zu synthetisieren. Für diese inzwischen gut eingeführte Synthese stehen zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Zum einen gibt es die Boc-Methode, zum anderen die Fmoc-Methode. Beide Methoden basieren auf dem Schutz der N-terminalen Aminogruppe. Beim natürlichen Aufbau von Protein- oder Peptidsequenzen in der Zelle erfolgt der Aufbau vom N-Terminus zum C-Terminus. Im Gegensatz dazu wird die Sequenz bei der Festphasenpeptidsynthese vom C-Terminus zum N-Terminus aufgebaut. Für die Synthese wird zunächst der C-Terminus der C-terminalen Amino-säure an ein Harz gebunden. Um die Sequenz weiter aufzubauen, wird der N-Terminus der Aminosäure entschützt (siehe weiter unten), und die daran zu koppelnde Aminosäure mit geschützter Aminogruppe wird zugegeben. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass nur die für den jeweiligen Kopplungsschritt benötigte Aminogruppe der Reaktion zugänglich ist.

Zu den Vorteilen der Boc-Methode zählen die meist höhere Ausbeute während der Synthese und die Vielfalt möglicher Peptidmodifikationen. Es ist jedoch von großem Nachteil, dass für die Gewinnung der Peptide zur Abspaltung vom Syntheseträger Flusssäure verwendet werden muss. Aus diesem Grund wird immer häufiger auf die Fmoc-Methode zurückgegriffen, bei der unter wesentlich milderen Bedingungen gearbeitet wird. Einen guten Überblick über die Grundlagen der Festphasenpeptidsynthese bieten sowohl Stewart und Young [79], als auch Gutte [80], einen Vergleich beider Methoden bieten Lloyd-Williams *et al.* [81]. Einen detaillierten Überblick über Hintergründe und Anwendung der Fmoc-Methode bieten Chan *et al.* [82]. Im Folgenden wird genauer auf die im Verlaufe der Arbeit angewendete Fmoc/*t*-Bu-Methode eingegangen.

Diese Methode beruht auf der Kombination orthogonaler Schutzgruppen. So wird die  $\alpha$ -Aminogruppe mit einer basisch abspaltbaren Fmoc-Gruppe geschützt, während die reaktiven Seitenketten der Aminosäuren mit sauer abspaltbaren Schutzgruppen geschützt werden (siehe Tabelle 3.1), um ungewollte Nebenreaktionen an den Seitenketten zu verhindern.

| Aminosäure  | Schutzgruppe  |   |  |
|---|---|---|--|
| Asparaginsäure<br>Glutaminsäure<br>Serin<br>Threonin<br>Tyrosin | <i>tert</i> -Butyl  | R |  |
| Lysin<br>Tryptophan   | <i>tert</i> -Butoxycarbonyl<br>(Boc)                                | R |  |
| Asparagin<br>Cystein<br>Glutamin<br>Histidin                    | Trityl<br>(Trt)   |   |  |
| Arginin   | 2,2,4,6,7-Pentamethyl-<br>dihydrobenzofuran-5-<br>sulfonyl<br>(Pbf) |   |  |

| <b>T</b> I II <b>A</b> A |                          |                       |                        |                   |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| l abelle 3.1:            | In der Arbeit verwendete | Schutzgruppen für die | reaktiven Seitenketter | 1 der Aminosauren |

Alle nicht in dieser Tabelle enthaltenen Aminosäuren wurden ohne Schutzgruppen eingesetzt.

Die Synthese beginnt mit dem Quellen des Harzes, einer polymeren festen Phase, auf die die Peptidsequenz aufgebaut wird. Durch das Quellen werden die funktionellen Gruppen besser zugänglich. Für die Peptidsynthese stehen unterschiedliche Harze zur Verfügung, die es ermöglichen, Modifikationen am C-Terminus des Peptids einzuführen. Je nach Wahl des Harzes und des Verbindungsstückes zwischen Harz und Peptid, dem sogenannten Linker (vgl. Abb. 3.6), kann der C-Terminus des Peptids als Carbonsäure, Carbamid, Ester oder Thioester gewonnen werden.





Trialkoxybenzylamin (PAL)-Harz Wang-Harz

4-Chlorotritylchlorid-Harz

Abb. 3.6: Einige der gängigsten Harz-Linker

Im Anschluss an das Quellen wird zunächst die Fmoc-Gruppe unter Einwirkung von Piperidin abgespalten (siehe Abb. 3.7). Hierbei erfolgt zunächst die Deprotonierung der Schutzgruppe. Durch Umlagerung und anschließende Decarboxylierung erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppe unter Bildung einer Carbaminsäure. Die N-terminale Aminogruppe wird nun mittels Decarboxylierung freigesetzt.



Abb. 3.7: Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe unter Einwirkung der Base Piperidin

Im Anschluss an die Abspaltung der Fmoc-Gruppe findet die Kopplung der nächsten Aminosäure an den entschützten N-Terminus statt (siehe Abb. 3.8). Bei dieser Reaktion erfolgt zunächst eine Aktivierung der Aminosäure. Die hierfür verwendeten Kopplungsreagenzien, Derivate des Benzotriazols (siehe Abb. 3.9), werden zunächst nukleophil von der Aminosäure angegriffen. Das hierbei gebildete Addukt wird mit Hilfe einer Base deprotoniert, meist Diisopropylethylamin (DIPEA) oder Collidin, bevor es zerfällt [83]. Das gebildete Benzotriazol-N-oxid bildet mit der Aminosäure einen reaktiven Ester, der durch eine Aminogruppe angegriffen wird, sodass die Peptidbindung zustande kommt. Da sich das gebildete Peptid aufgrund seiner Stabilität dem Reaktionsgleichgewicht entzieht, erfolgt die Peptidbildung mit einer über 98 % igen Ausbeute.



Abb. 3.8: Kopplung einer Aminosäure an den entschützten N-Terminus eines Peptids mit Hilfe des Kopplungsreagenzes HATU



O-(7-Azobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

(HATU)



(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat

(PyBOP)



*O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*,*N*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat

(TCTU)

Abb. 3.9: Struktur einiger häufig verwendeter Kopplungsreagenzien

Ist eine Aminosäure an das Harz angekoppelt, erfolgt zunächst die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, bevor die nächste Aminosäure an die Sequenz angehängt wird. Nach Abschluss der Synthese erfolgt unter Einwirkung von Trifluoressigsäure (TFA) die Abspaltung des Peptids vom Harz, sowie die Abspaltung aller Seitenkettenschutzgruppen. Durch Zugabe von Thioanisol und Ethandithiol zur Abspaltlösung werden entstehende Radikale und Carbeniumionen abgefangen, die mit den elektronenreichen Seitengruppen der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Cystein reagieren und diese modifizieren könnten [82]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, oxidiertes Methionin mit Hilfe von Ethandithiol und Chlortrimethylsilan zu reduzieren. Um das synthetisierte Peptid zu stabilisieren, besteht nach der Synthese die Möglichkeit, den freien N-Terminus mit Hilfe von Acetanhydrid zu acetylieren. Dies verhindert die Ausbildung einer positiven Ladung und stabilisiert auf diese Weise die Tertiärstruktur des Peptids.

# 3.3 Elektronen-Paramagnetische-Resonanz Spektroskopie

Die Elektronen-Paramagnetische-Resonanz Spektroskopie (EPR), auch Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) genannt, beschäftigt sich mit der Untersuchung der Wechselwirkung eines Elektronenspins mit seiner Umgebung. Dazu wird die Absorption von Mikrowellen durch induzierte Übergänge zwischen den magnetischen Subzuständen des Spins (S) in einem Magnetfeld gemessen. Voraussetzung für diese Methode ist also die Anwesenheit mindestens eines ungepaarten Elektrons. Die Feldabhängigkeit der Energien der Subzustände mit den magnetischen Quantenzahlen  $m_s + 1/2$  und – 1/2 für eine Elektronenspin S =  $\frac{1}{2}$  in einem externen Magnetfeld ist in Abb. 3.10 graphisch dargestellt. Dabei ist  $B_0$  die magnetische Induktion.



**Abb. 3.10:** Aufspaltung der Energieniveaux eines Elektronenspins S =  $\frac{1}{2}$  in einem Magnetfeld mit der Induktion  $B_0$ 

Die in Abb. 3.10 dargestellte Aufspaltung des Energieniveaus des Grundzustands wird mathematisch in Gleichung 3.1 beschrieben. Diese Aufspaltung wird auch als Elektron-Zeeman-Aufspaltung bezeichnet.

$$\Delta E = g \beta_e B_0$$
 Gleichung 3.1

( $\beta_e$ : Bohrsches Magneton;  $B_0$ : Induktion des externen Magnetfeldes)

Bei g handelt es sich um den sogenannten g-Faktor des Spins, dessen Abweichung vom g-Faktor des freien Elektrons  $g_e$  Informationen über die chemische Umgebung des beobachteten Systems enthält (siehe unten).

Die Population der beiden Energieniveaux wird durch die Boltzmann-Verteilung dargestellt in Gleichung 3.2 beschrieben.

$$\frac{n_{\frac{1}{2}}}{n_{\frac{1}{2}}} = e^{\frac{-g\beta_e B_0}{kT}}$$
Gleichung 3.2

Eine resonante Absorption der resonanten Mikrowellen tritt ein, sobald die Resonanzbedingungen erfüllt sind, also wenn die Quantenenergie der Strahlung gleich der Zeemanaufspaltung  $\Delta E$  ist. Dies tritt unter elektromagnetischer Strahlung der Frequenz  $\nu$  auf, sobald die in Gleichung 3.3 aufgeführte Bedingung erfüllt ist.

$$hv = g\beta_e B_0$$
 Gleichung 3.3

Bei einem äußeren magnetischen Feld von 0,3 Tesla erfolgt die Resonanz, ausgehend von dem g-Faktor eines freien Elektrons ( $g_e$  =2,0023), bei einer Frequenz von etwa 10 GHz, was einer Wellenlänge von 3 cm entspricht. Da dies im Wellenlängenbereich von Mikrowellen liegt, handelt es sich bei der EPR-Spektroskopie um ein Mikrowellenverfahren. Üblicherweise werden EPR-Messungen bei festgelegter, kontinuierlich eingestrahlter Frequenz ausgeführt und das Magnetfeld wird variiert. Für die meisten Systeme wird bei der cw-Spektroskopie (engl.: cw = continuous wave) ein g-Wert im Bereich von  $g_e$  gefunden, für Übergangsmetallkomplexe kann jedoch häufig beobachtet werden, dass der gemessene g-Wert beträchtlich von  $g_e$ abweicht. Für Eisen-Schwefel-Cluster liegen die beobachteten g-Werte in einem Bereich von g = 1,8 bis 2,2.

Der g-Wert ist eine anisotrope Größe, dessen drei Hauptwerte  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$  von der Spin-Bahn-Kopplung und der Lage der Liganden abhängig sind und so Informationen über Symmetrie und elektronische Struktur eines beobachteten Übergangsmetallkomplexes geben können. Die physikalischen Eigenschaften eines wie oben beschriebenen Systems lassen sich quantenmechanisch mit Hilfe des Hamilton-Operators *H* beschreiben. Dieser beinhaltet die relevanten Beiträge zur Energie des EPR Systems. Im Falle der für die relevanten elektronischen Zeeman-Wechselwirkung (EZ) kann ein EPR-Spektrum durch den folgenden Spin-Hamilton Operator beschrieben werden:

$$H_{EZ} = \beta_e \vec{B}_0 \mathbf{g} \vec{S}$$

Gleichung 3.4

Zusätzlich zu der hier genannten Zeeman-Wechselwirkung, können auch noch andere Effekte Einfluss auf den magnetischen Zustand des Systems nehmen. Diese Wechselwirkungen fließen dann wie in Gleichung 3.5 beschrieben mit in den Hamilton Operator ein.

$$H = H_{FZ} + H_{ZES} + H_{HEC} + H_{NZ} + H_{Q}$$
 Gleichung 3.5

Der Hamilton Operator *H* setzt sich aus den fünf Termen für die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung  $H_{EZ}$ , die Nullfeldaufspaltung (engl: zero field splitting)  $H_{ZFS}$ , die Hyperfeinwechselwirkung (engl.: hyper fine coupling)  $H_{HFC}$ , die Kern-Zeeman-Wechselwirkung  $H_{NZ}$  und die Kern-Quadrupolwechselwirkung  $H_Q$  zusammen. Allerdings tritt eine Nullfeldaufspaltung nur für Spins mit S>1/2 auf und die Hyperfeinwechselwirkung setzt die Gegenwart von Atomkernen mit einem Kernspin  $l \neq 0$  in Nachbarschaft zum oder im paramagnetischen Zentrum voraus. Die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung setzt zudem die Gegenwart eines messbaren elektronischen Feldgradienten am Kernort und ein Quadrupolmoment  $Q \neq 0$ , also I>1/2 voraus. Die Kern-Zeeman-Wechselwirkung schließlich ist im Allgemeinen so klein, dass sie für die übliche cw EPR-Spektroskopie keine Rolle spielt.

Da im Verlaufe dieser Arbeit jedoch nur EPR-Messungen durchgeführt wurden, die durch die Elektron-Zeeman Wechselwirkung beeinflusst werden, wird im Folgenden nicht weiter auf die anderen Terme des Hamiltonoperators eingegangen.

#### 3.3.1 EPR von Eisen-Schwefel-Clustern

Wie bereits in Kapitel 1.1 erläutert, kann ein  $[Fe_4S_4]$ -Cluster in den Oxidationsstufen +1, +2 und +3 vorliegen. Da alle Eisenionen in den Clustern vierfach koordiniert sind, liegen sie im jeweiligen high spin Zustand vor. Die Eisen(III)-Ionen haben hierbei einen Spin von S=5/2, die Eisen(II)-Ionen haben einen Spin von S=2.

Der oxidierte [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+3</sup>-Cluster enthält formal drei Eisen(III)-Ionen und ein Eisen(II)-Ion. Der durch Ein-Elektron Reduktion zu erhaltende [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+2</sup>-Cluster enthält formal zwei Fe(II)- und zwei Fe(III)-Ionen. Durch weitere Ein-Elektron Reduktion erhält man den [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+1</sup>-Cluster, der formal drei Eisen(II)-Ionen und ein Eisen(III)-Ion enthält. Mössbauer und EPR-Messungen haben jedoch gezeigt, dass die Eisenzentren von Eisen-Schwefel-Clustern in Wahrheit eine Delokalisation der Valenzelektronen aufweisen, sodass die Cluster besser durch gemischte Valenzzustände beschrieben werden können [84]. Aufgrund von starker Austauschwechselwirkung zwischen den Elektronenspins ergibt sich für den [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+3</sup>-Cluster ein Gesamtspin von S=1/2. Der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+2</sup>-Cluster hat einen Gesamtspin von S=0, weshalb er kein EPR-Spektrum zeigt. Der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+1</sup>-Cluster weist einen Gesamtspin von S=1/2 auf und zeigt im EPR-Spektrum ein typisches rhombisches Signal mit zwei g-Werten unterhalb von 2,0023 [70, 85]. Die Intensität der Signale zeigt eine starke Temperaturabhängigkeit, sodass sie bei Temperaturen oberhalb von 40 K nicht beobachtet werden können. Dies erlaubt eine Abgrenzung zum Signal eines [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+1</sup>-Clusters mit S=1/2, das aufgrund einer langsameren Spinrelaxation eine weitaus geringere Temperaturabhängigkeit zeigt und deshalb auch noch bei höheren Temperaturen beobachtet werden kann [86].

Der oxidierte [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+1</sup>-Cluster enthält drei Fe(III)-Ionen, die einen Gesamtspin von S=1/2 zeigen. Im EPR-Spektrum lässt sich ein fast isotropes Signal bei einem g-Wert von ca. 2,02 beobachten [57]. Der reduzierte [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]<sup>0</sup>- Cluster enthält formal zwei Eisen(III)-lon und ein Eisen(II)-lon und analog zu dem [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster liegt auch hier eine Delokalisierung der Elektronen vor. Der Cluster weist einen Gesamtspin von S=2 auf [56], weshalb er wegen der Nullfeldaufspaltung mit Hilfe der EPR-Spektroskopie oft nicht zu beobachten ist. In einigen Fällen konnte jedoch ein EPR-Signal im Bereich von g=12 beobachtet werden [58]. wenn der Nullfeldparameter D sich im Bereich der X-Band Mikrowellenfrequenz befindet. Ist D, dessen Größe von der Symmetrie des beobachteten Metallzentrums abhängt, größer als die Mikrowellenfrequenz kann kein EPR-Signal beobachtet werden. Hinzu kommt, dass im Hochfeld ganzzahlige Spinsysteme schwer zu beobachten sind, da die Signale von geringer Intensität und großer Signalbreite sind [87].

Der oxidierte [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+2</sup>-Cluster enthält zwei high-spin Eisen(III)-Ionen mit einem Spin S=5/2, die antiferromagnetisch gekoppelte sind, so dass sich ein Gesamtspin von S=0 ergibt. Der Cluster kann somit nicht mit Hilfe der EPR-Spektroskopie untersucht werden. Durch Ein-Elektronen-Reduktion wird der reduzierte Cluster erhalten, der ein Eisen(II)-Ion und ein Eisen(III)-Ion mit einem Spin von S=5/2 enthält. Die beiden Spins koppeln zu einem Gesamtspin von S=1/2, so dass der Cluster paramagnetisch ist und im EPR-Spektrum ein rhombisches Signal ähnlich dem des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters [88] zeigt, das jedoch weniger temperaturabhängig ist (siehe oben).

Die EPR-Spektroskopie ist somit zur Identifizierung des Clusters innerhalb der meisten beobachteten Systeme geeignet.

## 3.4 Zyklovoltammetrie

Die Voltammetrie ist eine elektrochemische Analysemethode, bei der Stromsignale als eine Funktion der angelegten Spannung registriert werden. Anhand dieser Messungen lassen sich Aussagen über die elektrochemischen Eigenschaften einer Probe, wie in dieser Arbeit das elektrochemische Potential, treffen. Heute steht eine Vielzahl voltammetrischer Methoden zur Verfügung. Im Folgenden soll genauer auf die im Verlauf dieser Arbeit angewendete Zyklovoltammetrie eingegangen werden. Mit dieser Methode ist es möglich, zusätzlich zu den Informationen über die Thermodynamik von Redoxprozessen auch Informationen über die Kinetik heterogener Elektronentransferreaktionen zu gewinnen.





Wie in Abb. 3.11 dargestellt, besteht die Apparatur aus drei in einen Elektrolyten eingetauchten Elektroden. Benötigt werden eine Messelektrode, die meist aus Gold, Platin oder Graphit besteht, eine Gegenelektrode und eine Referenzelektrode. Die Referenzelektrode wird genutzt, da es nicht möglich ist, ein Potential absolut zu bestimmen, sondern nur relativ zu einem anderen Potential. Deshalb wird das Potential der Arbeitselektrode, bezogen auf das Potential der Referenzelektrode angegeben. Als Referenzelektrode können zum Beispiel Ag/AgCl oder Kalomel-elektroden verwendet werden.

Bei der Zyklovoltammetrie wird mit Hilfe eines Potentiostaten an der Arbeitselektrode eine Dreiecksspannung angelegt (Abb. 3.12):



Abb. 3.12: Graphische Darstellung der an die Arbeitselektrode angelegten Dreiecksspannung

Bei der angelegten Dreiecksspannung wird zunächst ein Startpotential  $E_s$  angelegt, welches anschließend linear verändert wird. Nachdem das linear veränderte Potential E(t) das Umkehrpotential  $E_u$  erreicht hat, wird es wieder linear zum Startpotential zurückgeführt.

Die Potentialanstiegsgeschwindigkeit v lässt sich dabei mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnen:

$$\upsilon = \frac{dE}{dt}$$
 Gleichung 3.6

Ist die Geschwindigkeit des Potentialanstiegs gering, so ist das zu messende System in der Lage, den Änderungen durch elektrochemische Reaktion der Probe an der Elektrode zu folgen. Steigt die Geschwindigkeit des Potentialanstiegs an oder beobachtet man eine langsame Reaktion, die den Potentialänderungen nicht so schnell folgen kann, so besteht die Möglichkeit, auch kinetische Informationen zu erhalten. Die oben genannten Informationen können dem erhaltenen Zyklovoltammogramm (vgl. Gleichung 3.6) entnommen werden.



Abb. 3.13: Typisches Zyklovoltammogramm eines reversiblen Redoxprozesses

Das in Abb. 3.13 dargestellte Zyklovoltammogramm zeigt in der ersten Hälfte die Oxidation der reduzierten Probe, in der zweiten Hälfte die Umkehrung, also die Reduktion der gerade oxidierten Probe. Die gemessene Differenz der Potentiale P<sub>red</sub> und P<sub>ox</sub> liegt bei 0,059 V/n, wobei n für die Anzahl transferierter Elektronen pro Molekül steht. Das elektrochemische Potential P der gemessenen Probe wird durch den Mittelwert aus den gemessenen Potentialen P<sub>red</sub> und P<sub>ox</sub> bestimmt.

Die Konzentrationen oxidierter und reduzierter Probe an der Elektrode lassen sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Gleichung 3.7) bestimmen.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}}$$
 Gleichung 3.7

(*E*: angelegte Spannung; *R*: Gaskonstante; *T*: Temperatur in K; *F*: Faraday-Konstante)

Das Voltammogramm lässt sich wie folgt erklären: Das anfangs gewählte Potential liegt deutlich unterhalb des Standardpotentials *E*<sup>0</sup> für die Oxidation der reduzierten

Probe. Aus diesem Grund bildet sich zunächst die Helmholtz-Doppelschicht an der Grenze von Elektrode und Elektrolyt, sodass nur kapazitive Ströme fließen. Kommt das Potential im Verlauf der Potentialänderung in den Bereich um  $E^{0}$ , kann ein Stromfluss beobachtet werden, verursacht durch die Oxidation der reduzierten Probe. Je positiver das Potential wird und je näher das Potential  $E^{0}$  kommt, desto mehr reduzierte Probe wird umgesetzt, wodurch die Konzentration der reduzierten Probe an der Elektrode abnimmt. Dies führt zu einer Erhöhung des Konzentrationsgradienten dc<sub>red</sub> / dx zwischen Lösung und Elektrode, weshalb sich der Teilchenfluss in Richtung des Gradienten erhöht. Entsprechend der Gleichung 3.8 führt dies zu einem erhöhten Stromfluss *l*.

$$I = nFAD \frac{dc_{ox}}{dx}$$
 Gleichung 3.8

(A: Elektrodenfläche; D: Diffusionskoeffizient der Probe)

Erreicht das Potential den Wert des Standardpotentials und übersteigt diesen, ist kaum noch reduzierte Probe an der Elektrodenoberfläche vorhanden, sodass die Diffusion der reduzierten Probe aus der Lösung in Richtung Elektrode maximal wird, bevor sie aufgrund mangelnder Konzentration an reduzierter Probe in Elektrodennähe abnimmt. Dies ist im Zyklovoltammogramm anhand eines Peaks zu erkennen. Zum Zeitpunkt, an dem die Spannung umgekehrt wird, um die gerade oxidierte Probe wieder zu reduzieren, liegt noch eine hohe Konzentration oxidierter Probe an der Elektrode vor. Wird nun der Wert des Standardpotentials erreicht, wird die Bildung der reduzierten Probe bevorzugt. Analog zu der gerade beschriebenen Oxidation findet nun die Reduktion statt. Auch hier ist ein Peak im Zyklovoltammogramm zu erkennen, jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen. Handelt es sich um eine vollständig reversible Reaktion, ist der Peakstrom *I*<sub>P</sub> diffusionskontrolliert. Ein solcher Prozess wird durch die Randles-Ševčik-Gleichung (Gleichung 3.9) beschrieben:

$$I_{P} = 0,4463nF \sqrt{\frac{nFD_{0}}{RT}}c_{ox}A$$
 Gleichung 3.9

Bei vollständig reversiblen Prozessen ist  $I_{P}^{Red} = I_{P}^{Ox}$  und somit sind die Peaks für die Oxidation und die Reduktion gleich hoch (vgl. Abb. 3.13).

Zusätzlich zu Messungen in Lösungen besteht auch die Möglichkeit, die Arbeitselektrode zu beschichten und die Probe an die Elektrode zu binden. Da die Probe nun fest an die Elektrode gebunden ist, beruht die Abnahme des Stroms nicht mehr auf der Diffusionsbegrenzung, sondern sie beruht auf der vollständigen Oxidation bzw. Reduktion der Probe. Dies zeigt sich auch in dem in Abb. 3.14 gezeigten, etwas anderen Erscheinungsbild des Zyklovoltammogramms (vgl dazu Abb. 3.13).



Abb. 3.14: Typisches Zyklovoltammogramm einer an die Elektrode gebundenen Probe [89]

Auf den Kurvenverlauf des Zyklovoltammogramms haben diverse Faktoren Einfluss. So spielen zum Beispiel die Art der Elektrode und deren Geometrie ebenso eine Rolle wie das Standardpotential und die Konzentration der Probe. Weiteren Einfluss nehmen die Potentialanstiegsgeschwindigkeit sowie die Kinetik der Elektrodenreaktion und eventuell beteiligte chemische Reaktionen. Für eine detailliertere Beschreibung der theoretischen Grundlagen empfehlen sich die Übersichtsartikel von Mabbott [90], Kissinger [91] und Evans [92] sowie Standardlehrbücher über Instrumentelle Analytik.

# 4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten vorgestellt und diskutiert.

### 4.1 Identifizierung der synthetisierten Peptide

Zunächst wurden die Peptidsequenzen, die als *Maquettes* dienen sollen, mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Um sicherzustellen, dass es sich bei der gewonnen Sequenz um das gewünschte Peptid handelt, wurden nach präparativer HPLC-Aufreinigung MALDI-TOF MS Spektren der jeweiligen Proben angefertigt. Da bei der Peptidsynthese die Aminosäuren kontrolliert nacheinander gekoppelt werden, wird hier davon ausgegangen, dass die korrekte molare Masse des Peptids auch der korrekten Sequenz entspricht. In Abb. 4.1 wird exemplarisch das MALDI-Spektrum des Peptids DmsB-P gezeigt.



Abb. 4.1: MALDI-TOF MS Spektrum des Peptids DmsB-P C27S mit einer erwarteten Masse von 3641,2 g/mol

Zusätzlich zu dem erwarteten Signal, das der berechneten Masse von 3641,2 g/mol des gewünschten Peptids entspricht, ist ein Signal zu erkennen, das der Hälfte des berechneten Molekulargewichtes entspricht. Dies beruht auf

der Darstellung des Spektrums, das nicht die absolute Masse, sondern den Quotienten aus Masse und Ladung des Moleküls wiedergibt. Es handelt sich hierbei also nicht um eine Fehlsequenz, sondern um das gewünschte, durch die Ionisation doppelt positiv geladene Molekül. Die entsprechenden MALDI-Spektren der übrigen Peptide sind im Anhang in Kapitel 10.2 aufgeführt.

Es ist gelungen, die Peptide mit einer Ausbeute zwischen 3 % und 10 % bezogen auf die eingesetzte Menge Harz zu gewinnen. Eine genaue Auflistung der Ausbeute des jeweiligen Peptids ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

 Tabelle 4.1: Ausbeuten, mit denen die Peptide gewonnen wurden, bezogen auf die eingesetzte

 Menge Harz

| DmsB    | DmsB  | DmsB  | DmsB  | DmsB   | DmsB  | DmsB   | DmsB  | DmsB  |
|---------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|
| Wildtyp | C27S  | C27T  | C27Y  | C27 F  | C27 W | C27V   | C4Y   | C4F   |
| 3,5 %   | 6,2 % | 9,6 % | 8,9 % | 2,85 % | 2,9 % | 9,85 % | 5,2 % | 4,2 % |

## 4.2 Rekonstitution des Clusters

Um den Cluster in die synthetisierten Peptide einzubauen, wurde das hier im Hause angewendete, von Hong und Rabinowitz entwickelte [93] und von Moura *et al.* [8] modifizierte Protokoll zur Rekonstitution eines [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters als Basis verwendet. Hierbei wird das Peptid zunächst mit Hilfe von  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert, bevor durch Zugabe von Eisenchlorid- und Natriumsulfid-Lösungen im Überschuss die Rekonstitution initiiert wird (siehe Material und Methoden). Es stellte sich jedoch heraus, dass die laut Protokoll über Nacht dauernde Inkubation der Rekonstitutionslösung in diesem Fall nicht anwendbar war, da immer eine Eisensulfidbildung und die daraus resultierende Fällung anstelle der Clusterrekonstitution zu beobachten war. Um die Fällung zu vermeiden, wurde die Rekonstitutionszeit anhand des Peptids DmsB C27S optimiert. Nach ca. 300 Minuten Rekonstitutionszeit kann das Einsetzen der oben beschriebenen Fällung von Eisenchlorid beobachtet werden. Hatte diese Fällung einmal stattgefunden, konnte kein Cluster mehr aus der Rekonstitutionslösung gewonnen werden. Es ist wahrscheinlich, dass auch die den Cluster bildenden Eisen- und Schwefelatome ausfallen, sobald die Fällung einsetzt. Da die optimale Rekonstitutionszeit in einem Bereich zwischen 0 und 270 Minuten zu liegen scheint, wurden durch Variation der Rekonstitutionszeit in diesem Zeitrahmen die Rekonstitutionsbedingungen optimiert.

Um den Einfluss der Rekonstitutionszeit auf die Menge und auf die Art des gebildeten Clusters zu bestimmen, wurden aus einer Stammlösung nach unterschiedlichen Rekonstitutionszeiten Aliquots entnommen, von denen eine oxidierte und eine mit Dithionit reduzierte Probe erstellt wurden. Welche Rekonstitutionszeit zu einem optimalen Verhältnis von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster führt, wurde mit Hilfe der EPR Spektroskopie durch Vergleich der Sigalintegrale bestimmt.



Abb. 4.2: Continuous Wave EPR-Spektren der Eisen-Schwefel-Cluster nach unterschiedlicher Rekonstitutionszeit

Links: Spektren des rekonstituierten, oxidierten [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]<sup>1+</sup> Clusters. Das Spektrum ist überwiegend isotrop mit einem gav=2,007. Eine zu beobachtende Hochfeld-Komponente bei 1,96 und die Linienform deuten auf eine Variation in der Clusterkonformation hin. Rechts: Spektren der mit Dithionit reduzierten Proben. Das Spektrum ist typisch für einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>1+</sup>-Cluster, mit den g-Werten  $g_z=2,04$ ,  $g_y=1,93$ und gx=1,90. Rekonstitutionsbedingungen: Anaerob, Raumtemperatur, pH 8,3, Rekonstitutionszeit: 0 min (rot), 0 min simuliert (grau gestrichelt), 90 min (grün), 180 min (schwarz) und 270 min (magenta). Experimentelle Parameter: Temperatur 10 K, Mikrowellenfrequenz 9.421 GHz, Modulationsamplitude 1 mT, Mikrowellenleistung 20 mW.

Die Simulation des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters berücksichtigt die Verzerrung der Linienform verursacht durch die Heterogenität des Clusters.

Die experimentell bestimmten g-Werte, die für die Proben mit unterschiedlichen Rekonstitutionszeiten gemessen wurden, sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Werte sind typisch für den jeweiligen Cluster und bestätigen somit eindeutig die Clusterrekonstitution.

|      | 0 N       | ſin      | 90 Min 180 Min |          | 270 Min   |          |           |          |
|------|-----------|----------|----------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
|      | reduziert | oxidiert | reduziert      | oxidiert | reduziert | oxidiert | reduziert | oxidiert |
| g×   | 1,90      |          | 1,90           |          | 1,90      |          | 1,90      |          |
| gу   | 1,93      |          | 1,93           |          | 1,93      |          | 1,93      |          |
| gz   | 2,04      |          | 2,04           |          | 2,04      |          | 2,04      |          |
| Giso | 1,96      | 2,01     | 1,96           | 2,01     | 1,96      | 2,01     | 1,96      | 2,01     |

Tabelle 4.2:Übersichtüberdieerhalteneng-WertefürdieunterschiedlichenRekonstitutionszeiten optimiert anhand des PeptidsDmsB-P C27S

Der [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster ist in seiner oxidierten Form paramagnetisch mit einem Spin S=1/2 und hat die formale Oxidationsstufe +1. Durch Ein-Elektron-Reduktion kann der Cluster in die Oxidationsstufe [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]<sup>0</sup> überführt werden. Diese Oxidationsstufe mit einem Spin S=2 ist ebenfalls paramagnetisch, was mit Hilfe der Mössbauer Spektroskopie und der MCD-Spektroskopie (Magnetic Circular Dichroism) nachgewiesen werden konnte [94]. Diese Oxidationsstufe ist normalerweise mit Hilfe der EPR Spektroskopie nicht detektierbar, jedoch kann manchmal in einem Bereich von g~12 ein Signal beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.3.1).

Das Spektrum des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters in Abb. 4.2 ist vorwiegend isotrop mit einem durchschnittlichen g-Wert von g<sub>av</sub>~2,007. Ein weiteres Signal kann bei einem Wert um g=1,96 beobachtet werden. Dieses Signal deutet zusammen mit der Form des EPR-Signals auf eine Variation in der Clusterkonformation des rekonstituierten [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters hin. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits früher unter anderem für das Ferredoxin II aus *Desulfovibrio gigas* beschrieben. Er wurde der Heterogenität des Clusters zugeschrieben, die auf unterschiedlichen Konformationen oder Ligationen beruhen kann [95]. Zusätzlich wurde eine pH-Wert Abhängigkeit des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster Signals beobachtet [96].

Der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster hat in seiner oxidierten Form die Oxidationsstufe +2 und ist aufgrund des Spins (S = 0) diamagnetisch. Durch eine Ein-Elektron-Reduktion erhält der Cluster einen Spin von S= 1/2, sodass er paramagnetisch ist. Das Spektrum in Abb. 4.2 zeigt die gleichen g-Werte, wie sie für den [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+</sup>-Cluster des PsaC, einer Untereinheit des Photosystems I, gefunden werden [97]. Das beobachtete Spektrum ist somit typisch für Eisen-Schwefel-Cluster Proteine mit niedrigem Potential (LoPIP) (vgl. Kapitel 1.1).

Einen besseren Vergleich der Clusterrekonstitution bei unterschiedlichen Rekonstitutionszeiten ermöglichen die in Abb. 4.3 dargestellten Doppelintegrale der Signalintensitäten der Spektren aus Abb. 4.2. Alle hier und im weiteren Verlauf der Arbeit angegebenen Verhältnisse von rekonstituiertem [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster basieren auf der Simulation der Spektren (vgl. Abb. 4.2) und anschließender Doppelintegration.



Abb. 4.3: Doppelintegral der Intensität des EPR-Signals, dargestellt als eine Funktion der Zeit Der rote Graph zeigt die Stabilität des rekonstituierten [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters im Verlauf der Zeit unter anaeroben Bedingungen bei Raumtemperatur. Der blaue Graph stellt die Entwicklung des Signals der mit Dithionit reduzierten Probe dar, das der Reduktion des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>2+/1+</sup>-Clusters zugeordnet werden kann. Die experimentellen Bedingungen der EPR-Spektren entsprechen denen in Abb. 4.2.

Es ist deutlich zu erkennen, dass es gelungen ist, einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster an das Peptid zu binden. Es wurde beobachtet, dass sich der gebildete [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster mit zunehmender Rekonstitutionszeit zu einem [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster umsetzt. Der letzte Punkt der Messreihe weicht in seinem Verhalten von der vorherigen Entwicklung des Verhältnisses von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>] zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster ab. Es ist zu beobachten, dass die Konzentration des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters steigt, während die Konzentration des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters sinkt. Da dieser Messpunkt bei 270 Minuten kurz vor dem Zeitpunkt liegt, bei dem die vollständige Fällung des in der Lösung vorhandenen Eisensulfids zu beobachten ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fällung bereits einsetzt und einen Einfluss auf die beobachteten Cluster hat. Da eine Fällungsreaktion während der Clusterrekonstitution und der darauf folgenden Messungen vermieden werden soll, sollte die Clusterrekonstitution bei einer Rekonstitutionszeit durchgeführt werden, die unterhalb von 270 Minuten liegt.

Es konnte somit eine deutliche Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster von der Rekonstitutionszeit nachgewiesen werden. Die Integration der EPR-Signale zeigt, dass bei einer Aufarbeitung der Probe direkt nach Zugabe des letzten Rekonstitutionsreagenzes (Rekonstitutionszeit = 0 Min) etwa 57 % [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster und 43 % [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster vorliegen. Bei einer Rekonstitutionszeit von 180 Minuten hat sich das Verhältnis auf etwa 15 % [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu 85 % [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster vorliegen. Der Fehler in der Bestimmung der Konzentrationen liegt bei  $\pm$  5 %.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass ein optimales Verhältnis von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster erhalten wird, wenn die Aufarbeitung der Probe, die etwa 45 Minuten in Anspruch nimmt, sofort nach der Zugabe des letzten Rekonstitutionsreagenzes erfolgt.

Die hier beobachtete Umwandlung des einen Clusters in den anderen kann jedoch nicht nur in den hier verwendeten Peptiden beobachtet werden, sondern sie wird auch von der Natur genutzt. So ist zum Beispiel bekannt, dass die

Aconitase in ihrer aktiven Form einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster bindet, während in der inaktiven Form ein [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster vorliegt. Ähnliches findet man auch für die beiden Ferredoxine FdI und FdII von *Desulfovibrio gigas.* Sie weisen identische Proteinsequenzen auf, unterscheiden sich aber durch den eingebauten Cluster, wobei das FdI einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster und das FdII einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster enthält. Sowohl bei der Aconitase als auch bei den Ferredoxinen ist bekannt, dass sich die Cluster ineinander umwandeln lassen.

### 4.3 Rekonstitutionsmechanismus

Der Rekonstitutionsmechanismus, mit dem die Bildung des Clusters erfolgt, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Am weitesten verbreitet ist die Theorie, dass sich der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster bereits während der Rekonstitution mit dem in der Lösung vorhandenen  $\beta$ -Mercaptoethanol als Liganden bildet. Erst nachdem der Cluster vollständig gebildet vorliegt, soll das  $\beta$ -Mercaptoethanol von dem Protein oder Peptid als Ligand verdrängt werden [98].

Da die Spektren in Kapitel 4.2 eindeutig die Präsenz eines an das Peptid gebundenen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters zeigen, ist dieser Rekonstitutionsmechanismus mit den beobachteten Spektren nicht zu vereinbaren. Es ist davon auszugehen, dass zumindest das vierte Eisenatom des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters erst in den Cluster eingefügt wird, wenn dieser schon an das Peptid gebunden ist. Um diese Vermutung zu untermauern, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Versuche durchgeführt. So war eine Rekonstitution, die entsprechend dem in Kapitel 8.9 beschriebenen Standardprotokolls allerdings ohne Peptidzugabe durchgeführt wurde, nicht erfolgreich, da sofort nach Zugabe des letzten Rekonsitutionsreagenzes die Eisensulfidfällung einsetzt. Geht man jedoch davon aus, dass das Peptid nicht zur Bildung eines Clusters benötigt wird, sollte es möglich sein, eine Clusterrekonstitution auch in Abwesenheit eines Peptids mit Hilfe von UV/Vis- und EPR-Spektroskopie zu beobachten. Auch dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der bisher gängigen Theorie über den Rekonstitutionsmechanismus und unterstützt die Vermutung, dass der Cluster ohne Peptid nicht vollständig gebildet wird.

In einem weiteren Versuch wurde der synthetisch hergestellte Cluster (Et<sub>4</sub>N)<sub>3</sub>[Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>(SEt)<sub>4</sub>] sowohl zu dem Peptid DmsB-P C27Y als auch zu dem Peptid DmsB-P C27F gegeben. Der synthetisierte Cluster wird von Ethanthiol-Liganden koordiniert, die mit Mercaptoethanol vergleichbar sind. Mit beiden Peptiden konnte keine Einbindung des Clusters in das Peptid beobachtet werden. Da bei dem Peptid DmsB-P C27Y durch Clusterrekonstitution in Lösung (vgl. Kapitel 8.9) bestätigt wurde, dass dieses Peptid in der Lage ist, einen Cluster zu binden, muss es einen anderen Grund dafür geben, dass der synthetisierte Cluster nicht an das Peptid gebunden wird. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Peptid nicht in der Lage ist, die anfänglichen Liganden zu verdrängen.

Alle hier aufgeführten Ergebnisse der durchgeführten Versuche deuten darauf hin, dass der bisher favorisierte Mechanismus der Clusterrekonstitution anders abläuft, als bisher vermutet. Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Rekonstitution des Clusters in das Peptid erreicht werden kann. Da das Peptid jedoch wahrscheinlich nicht in der Lage ist, das Mercaptoethanol als Ligand zu verdrängen, scheint die Clusterbildung allein auf der Wechselwirkung zwischen dem Peptid und den Eisenionen in der Lösung zu basieren. Das Peptid scheint dabei zunächst eine stabilisierende Wirkung auf die Lösung auszuüben, da ohne die Gegenwart eines Peptids sofort eine Eisensulfidfällung zu beobachten ist. Diese Stabilisierung könnte auf der Wechselwirkung der Thiolgruppen der Cysteinreste des Peptids mit den Eisenatomen der Rekonstitutionslösung beruhen. Entsprechend dem vorgegebenen Sequenzmotiv (CxxCxxC) bietet sich eine günstige Anordnung, sodass diese Wechselwirkung ebenfalls die Clusterrekonstitution initiieren kann, indem ein Peptid sukzessive mehrere Eisenatome koordiniert und somit die sterischen Voraussetzung für die Bildung eines Clusters mit den in der Lösung vorhandenen Sulfidionen erfüllt. Die Clusterrekonstitution findet somit ohne Beteiligung des in der Lösung vorhandenen β-Mercaptoethanols statt.

## 4.4 UV/Vis Spektroskopie

Nachdem die Konzentration der Probe vor der Rekonstitution mit Hilfe des Ellman-Tests bestimmt und die Rekonstitution des Clusters dem Protokoll entsprechend durchgeführt wurde, konnten UV/Vis-Spektren der Proben aufgenommen werden. Da die Spektren aller Proben nahezu identisch sind, ist in Abb. 4.4 repräsentativ das für DmsB-P C27S aufgenommene Spektrum gezeigt.



Abb. 4.4: UV/Vis-Spektrum der oxidierten und der reduzierten Probe des Peptids DmsB-P C27S in 50 mM Tris pH 8,3

Das UV/Vis-Spektrum der oxidierten Probe in Abb. 4.4 zeigt eine breite Absorptionsbande im Bereich um 420 nm. Es handelt sich hierbei um eine *chargetransfer* Bande zwischen den Schwefel- und den Eisenatomen der Cluster. Die Intensität dieser Bande ist in den Spektren der reduzierten Proben bei 420 nm um etwa 90 % geringer. Dieser Rückgang der Absorption bei 420 nm, entspricht in dieser Form den typischen UV/Vis-Spektren von Eisen-Schwefel-Clustern, wie sie in der Literatur beschrieben sind [66], sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Peptide einen Eisen-Schwefel-Cluster gebunden haben. Der Anstieg der Absorption unterhalb von 400 nm in der reduzierten Probe wird von dem zur Reduktion zugegebenen Dithionit verursacht [65]. Da die UV/Vis Spektren von [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern und [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern fast identisch sind, muss zur weiteren Charakterisierung die EPR-Spektroskopie herangezogen werden.

# 4.5 EPR-Spektroskopie

Um den Einfluss der einzelnen koordinierenden Cysteine auf die Bindung des Clusters zu verdeutlichen, wird in Abb. 4.5 eine Simulation des in dieser Arbeit verwendeten Peptids DmsB-P mit koordiniertem Cluster dargestellt. Zusätzlich zu dem in grau dargestellten Peptid ist in violett die Bindungsregion des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters der *E. coli* Nitratreduktase A gezeigt, welche unter den kristallisierten Proteinen die größte Homologie zu der Sequenz des Peptids DmsB-P zeigt.



#### Abb. 4.5: Bindungsmotiv eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters

Der graue Peptidstrang stellt die Simulation der während dieser Arbeit verwendeten Peptidsequenz DmsB-P dar. Der violette Strang zeigt einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur der *E. coli* Nitratreduktase A (nach PDB: 1Q16), die einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordiniert. Die Nummerierung der Cysteine bezieht sich auf die Position der Aminosäure im Peptid. An Stelle des Cys 27 ist im Protein ein Tryptophan lokalisiert. Die Erstellung des Homologiemodells erfolgte mit Hilfe des Protein Structure Prediction Server (PS<sup>2</sup>), der Vergleich der Strukturen erfolgte mit dem PDB-Viewer.

Ein Vergleich der beiden dargestellten Sequenzen zeigt, dass eine große Ähnlichkeit zwischen den beiden Strukturen besteht. Bei beiden Peptiden wird der Cluster durch die Cysteine 4, 24 und 30 koordiniert, während das nicht koordinierende Cystein in Position 27 auf die potentielle Bindungsstelle eines vierten Eisenatoms ausgerichtet ist. Die Aminosäure in Position 27 scheint somit ein entscheidender Faktor bei der Koordinierung des vierten Eisenatoms während der Clusterbildung zu sein.

In Tabelle 4.3 sind die g-Werte aufgeführt, die zu den in Abb. 4.6, Abb. 4.7 und Abb. 4.8 dargestellten EPR-Spektren der synthetisierten Peptide gehören.

|      | DmsB-P    |          | DmsB-I    | P C27S   | DmsB-P C27Y |          |
|------|-----------|----------|-----------|----------|-------------|----------|
|      | reduziert | oxidiert | reduziert | oxidiert | reduziert   | oxidiert |
| g×   | 1,88      |          | 1,90      |          | 1,89        |          |
| gу   | 1,93      |          | 1,93      |          | 1,93        |          |
| gz   | 2,05      |          | 2,04      |          | 2,04        |          |
| Giso | 1,96      | 2,00     | 1,96      | 2,01     | 1,95        | 2,00     |

Tabelle 4.3:Aus den EPR-Spektren der Peptide DmsB-P, DmsB-P C27S, DmsB-P C27Y,<br/>DmsB-P C4Y und DmsB-P C4F erhaltene g-Werte

|      | DmsB-     | P C4Y    | DmsB-P C4F |          |  |
|------|-----------|----------|------------|----------|--|
|      | reduziert | oxidiert | reduziert  | oxidiert |  |
| g×   | 1,90      |          | 1,91       |          |  |
| gу   | 1,93      |          | 1,94       |          |  |
| 9z   | 2,04      |          | 2,04       |          |  |
| giso | 1,96      | 2,01     | 1,96       | 2,02     |  |

Die ermittelten g-Werte sind typisch für den jeweils beobachteten [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- bzw. [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster, sodass die Signale eindeutig dem entsprechenden Eisen-Schwefel-Cluster zugeordnet werden können (vgl. Kapitel 4.2). Die g-Werte sind für das "Wildtyp"-Peptid und die darauf basierenden Modifikationen nahezu identisch, sodass nur für die Aminosäure in Position 27 ein geringer Einfluss auf die elektronische Struktur des Eisen-Schwefel-Clusters beobachtet werden kann. Der größte Effekt konnte für die Mutation von Cytein 27 zu Serin beobachtet werden. Die Größe der Aminosäuren, sowie deren Polarität und Hydrophilie haben einen Einfluss auf die geometrische Struktur des Clusters, der sich in kleinen Abweichungen der g-Werte äußert. Das in Abb. 4.6 dargestellte EPR-Spektrum zeigt die oxidierte und die Dithionit-reduzierte Probe des Peptids DmsB-P, das keine Mutationen enthält.



#### Abb. 4.6: EPR-Spektrum des Peptids DmsB-P

Der rote Graph stellt das Spektrum der oxidierten Probe dar, der blaue Graph das Spektrum der mit Dithionit reduzierten Probe. Die Messbedingungen entsprechen denen in Abb. 4.2

Anhand des Spektrums ist zu erkennen, dass das Peptid, das das DmsB-Bindungsmotiv ohne Mutationen umfasst. fast ausschließlich den [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster enthält. Das Verhältnis von gebildetem [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster entspricht den Ergebnissen einer Rekonstitution mit einem Modellpeptid für einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster aus PsaC [66]. Der Anteil an [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster ist so gering, dass er als vernachlässigbares Artefakt der Clusterrekonstitution betrachtet wird. Die Bildung des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters entspricht dem Verhalten, das für das DmsB Protein ohne Mutationen beobachtet wird und deutet darauf hin, dass Peptid und Protein ein vergleichbares Verhalten zeigen. Mutationen am Cystein 27 des Bindungsmotivs zeigten, dass der Austausch des Cysteins zu den unpolaren Aminosäuren Phenylalanin, Valin und Tryptophan zum Verlust der Cluster-Rekonstitutionsfähigkeit führt. Das Cystein an dieser Stelle des Bindungsmotivs scheint also eine wichtige Funktion für die Clusterrekonstitution zu haben. Mutationen dieses Cysteins zu Serin, Threonin und Tyrosin ermöglichen allerdings die gewünschte Rekonstitution eines Clusters. Da es sich bei Serin, Threonin und Tyrosin im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Aminosäuren um polare Aminosäuren mit einer Hydroxygruppe in der Seitenkette handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die Hydroxygruppe Voraussetzung für die Rekonstitution des Clusters ist. Der sterische Anspruch der an dieser Position eingeführten Aminosäure dagegen scheint keinen Einfluss auf die Clusterrekonstitution zu haben, da sowohl die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin als auch Threonin und Valin jeweils in ihrer Größe vergleichbar sind. Trotz dieser Vergleichbarkeit sie ein völlig unterschiedliches Rekonstitutionsverhalten weisen auf. wohingegen die Aminosäuren unterschiedlicher Größe, aber vergleichbarer Polarität ein ähnliches Rekonstitutionsverhalten zeigen. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die von Rothery et al. bei den am gesamten Protein DmsB durchgeführten Mutationen gemacht wurden [72]. In diesem Falle fand immer eine Clusterrekonstitution statt, jedoch wurde die Abhängigkeit der Art des gebildeten Clusters von der Größe der eingeführten Aminosäure beobachtet, die Polarität schien keine Rolle zu spielen. Die Abweichung der in der Literatur beschriebenen Effekte von den hier beobachteten Effekten kann durch die unterschiedliche Umgebung des Clusters begründet werden. Da es sich bei DmsB um ein großes, relativ starres Protein handelt, in dem die Bindungsstelle des Clusters vorgeformt ist, ist es wahrscheinlich, dass eine Mutation nicht genug Einfluss auf die Struktur ausüben kann, um die Bindungsstelle so zu verändern, dass kein Cluster eingelagert werden kann. Eine Aminosäure mit großer Seitenkette kann dem Cluster aber auch nicht ausweichen, sodass die Seitenkette die Position des vierten Eisenatoms blockiert und somit die Bildung des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters begünstigt. Die hier verwendeten Peptide sind jedoch so klein, dass sie keine starre Struktur besitzen, in der eine Bindungsstelle für den Cluster vorgeformt ist. Die neu eingeführte Aminosäure hat somit die Möglichkeit, dem Cluster auszuweichen, sodass keine sterische Hinderung durch große Seitenketten entsteht, die die

Bindung des vierten Eisenatoms an den Cluster behindert. Da die Bindungsstelle nicht vorgeformt ist, ist es jedoch offensichtlich notwendig, dass die Aminosäure eine gewisse Polarität aufweist, sodass sie durch Wechselwirkung entweder mit dem Lösemittel oder mit dem Cluster die Clusterbindung ermöglicht. In Abb. 4.7 sind die EPR-Spektren der Peptide DmsB-P C27S, und DmsB-P C27Y nach der Clusterrekonstitution sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand abgebildet.



Abb. 4.7: EPR-Spektren der Peptide DmsB-P C27S (links) und DmsB-P C27Y (rechts)
 Der rote Graph stellt das Spektrum der jeweils oxidierten Probe dar, der blaue Graph das Spektrum der jeweils mit Dithionit reduzierten Probe. Die Messbedingungen entsprechen denen in Abb. 4.2. Das erhöhte Rauschen im rechten Spektrum resultiert aus der vergleichsweise geringeren Konzentration der gemessenen Probe.

Anhand der EPR-Spektren in Abb. 4.7 lässt sich erkennen, dass die Mutationen, mit denen ein Cluster rekonstituiert werden konnte, nur geringe Varianzen im Verhältnis von gebildetem [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster aufweisen. So bildet das Peptid DmsB-P C27S den [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- und den [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster in einem Verhältnis von 57% zu 43 % während das Peptid DmsB-P C27Y die Cluster im Verhältnis 36% zu 64 % bildet. Auch hier wurde die Konzentration mit einem Fehler von  $\pm$  5% bestimmt. Da es sich bei Serin um eine Aminosäure mit einer kleinen Seitenkette handelt, wohingegen Tyrosin eine sterisch anspruchsvolle Seitenkette hat, scheint der sterische Anspruch

kaum Einfluss auf die Clusterrekonstitution zu haben. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass das Peptid so flexibel ist, dass die Aminosäure der sterischen Wechselwirkung mit dem Cluster ausweichen kann und somit den Einbau des vierten Eisenatoms in den Cluster nicht blockiert. Es ist zu beobachten, dass die Mutante DmsB-P C27S, die das Serin enthält und einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordiniert, ein deutlich anderes Rekonstitutionsverhalten zeigt als das Peptid DmsB-P ohne Mutationen, das an dieser Stelle ein Cystein enthält und einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordiniert (s.o.). Da sich die Aminosäuren nur in ihren Seitenketten unterscheiden (eine Hydroxygruppe im Serin und eine Thiolgruppe im Cystein), scheint eine unterschiedliche Affinität der beiden Seitenketten zu dem zu bindenden Eisenatom zu bestehen. Die Bindung des vierten Eisenatoms ist offensichtlich durch eine Thiolgruppe besser begünstigt als durch eine Hydroxygruppe, was in einem langsameren Einbau des vierten Eisenatoms in den Cluster resultiert. Die Integration der EPR-Signale zeigt, dass das Verhältnis von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster für das Peptid DmsB-P C27S bei 57 % zu 43 % liegt, wohingegen unter gleichen Rekonstitutionsbedingungen bei dem Peptid DmsB-P, das Verhältnis von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster bei 4 % zu 96 % liegt. Auch hier liegt der Fehler der bestimmten Konzentrationen bei ± 5 %.

Einen andersartigen Effekt findet man bei Austauschen des Cysteins, das nicht zum Bindungsmotiv, welches drei Cysteine in Folge umfasst, gehört, das jedoch auch der Clusterkoordinierung dient. Dieses Cystein ist in der Sequenz weiter vom Bindungsmotiv entfernt und hat einen etwas geringeren Einfluss auf die Clusterrekonstitution als die Cysteine innerhalb des Bindungsmotivs. Die Clusterrekonstitution der Peptide mit Mutationen des Cysteins in Position 4 zeigen auch dann eine Clusterrekonstitution, wenn das Cystein durch die unpolare Aminosäure Tyrosin ersetzt wird, wie in Abb. 4.8 zu erkennen ist.



Abb. 4.8: EPR-Spektren der Peptide DmsB-P C27F (links) und DmsB-P C27Y (rechts)
 Die roten Graphen stellen das Spektrum der jeweils oxidierten Probe dar, die blauen
 Graphen das Spektrum der jeweiligen mit Dithionit reduzierten Probe. Die Mess bedingungen entsprechen denen in Abb. 4.2 Das erhöhte Rauschen im linken
 Spektrum resultiert aus der vergleichsweise geringeren Konzentration der
 gemessenen Probe.

Die Spektren in Abb. 4.8 zeigen den Einfluss der Mutationen des Cysteins in der Position 4 der Aminosäuresequenz. Es ist zu erkennen, dass weder die Größe der eingeführten Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, noch die unterschiedliche Polarität die Bildung eines Clusters zu verhindern scheinen, wie dies bei der Mutation des Cysteins in Position 27 beobachtet werden konnte. Es ist jedoch zu beachten, dass beide Aminosäuren einen unterschiedlichen Einfluss auf die Art des gebildeten Clusters ausüben. So zeigen die Spektren für das Peptid DmsB-P C27Y einen weitaus höheren Anteil an [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster als dies für das Peptid DmsB-P C27F zu beobachten ist. Da sich die beiden Aminosäuren nur durch die Hydroxygruppe in der Seitenkette unterscheiden, begünstigt offensichtlich die Hydroxygruppe des Tyrosins die Bindung des vierten Eisenatoms in den Cluster.

# 4.6 Umwandlung des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters zum [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster

Da festgestellt werden konnte, dass sich der gewünschte [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster relativ schnell in den [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster umwandelt, sodass auch unter optimalen Aufarbeitungsbedingungen beide Cluster im Gemisch vorliegen, wurde der Versuch unternommen, das vierte Eisenatom nachträglich aus dem Cluster zu entfernen. Dies sollte durch oxidative Schädigung des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters mit Hilfe von K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> erreicht werden, entsprechend einer Methode, die bereits für das Ferredoxin II von Desulfovibrio gigas erfolgreich von Moura et al. angewendet worden war [8]. Hierzu wird das Peptid mit einem fünffachen Überschuss K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> bei 4 °C für 3 Stunden inkubiert. Allerdings wechselte direkt nach Zugabe des Kaliumhexacyanoferrats die Farbe der Lösung von einem intensiven Braun zu einem hellen Gelb, was auf eine komplette Zerstörung des Clusters in Folge der Oxidation hindeutet. Da die Cluster gegenüber Oxidationen sehr empfindlich sind, lässt sich die Stabilität des Clusters im Ferredoxin von Desulfovibrio gigas bei diesem Experiment mit der Clusters durch die 58 Aminosäuren umfassende Abschirmung des Proteinumgebung erklären. Da die hier verwendeten auf DmsB-P basierenden Peptide 33 Aminosäuren umfassen, sind diese offensichtlich nicht in der Lage, den Cluster vor der oxidativen Wirkung des Reagenzes ausreichend abzuschirmen. Dieses Ergebnis zeigt, dass davon ausgegangen werden kann, dass in den untersuchten Maquettes das vierte Eisenatom nicht nachträglich oxidativ aus dem peptidgebundenen Cluster zu abstrahieren ist, ohne diesen vollständig zu zerstören.

## 4.7 Zyklovoltammetrie

Zyklovoltammetrische Messungen erlauben die Bestimmung der elektrochemischen Eigenschaften einer Probe. Entsprechend wurden Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe das Potential der Cluster bestimmt werden sollte. Im Folgenden wird das Zyklovoltammogramm für das Peptid DmsB-P C27S gezeigt, anhand dessen das elektrochemische Potential des Clusters bestimmt wurde.



Abb. 4.9: Zyklovoltammogramm von DmsB-P C27S in Tris-Puffer bei pH 8,3
 Die erste zyklovoltammetrische Messung ist in schwarz, die zweite in rot dargestellt.
 Die Messungen wurden bei 25 °C mit einer Scanrate von 50 mV/s durchgeführt. Der Intensitätssprung in der zweiten Messung ist ein durch das Gerät verursachtes Artefakt, das bei der Interpretation vernachlässigt werden kann.

Das gemessene Reduktionspotential des Clusters unter diesen Messbedingungen (pH 8,3) liegt bei -334 mV. Zu erkennen ist eine deutliche Abweichung des Voltammogramms der ersten Messung gegenüber der zweiten Zum einen ist eine Änderung der Signalintensität Messung. des Reduktionspeaks zu beobachten, zum anderen zeigt eine Integration der Signale im Bereich der Oxidation und der Reduktion, dass das Reduktionssignal bei der zweiten Messung deutlich geringer ist. Dies deutet auf einen zumindest teilweise irreversiblen Prozess hin. Da die Probe gar nicht oder nur unvollständig oxidiert wird, ist die Signalintensität bei der darauf folgenden Reduktion geringer, da weniger Probe zur Reduktion zur Verfügung steht. Die Differenz zwischen dem Signal der Reduktion und der Oxidation liegt mit ca. 200 mV weit außerhalb der für reversible Prozesse beobachteten Differenz von 59 mV für einen Einelektronen-Übergang (siehe Kapitel 3.4). Auch dies bestätigt die Vermutung, dass es sich hier um einen irreversiblen Prozess handelt. Aus diesem Grund wird bei der Bestimmung des Reduktionspotentials

das Signal im Bereich der Oxidation nicht berücksichtigt. Da in der Literatur der Einfluss des pH-Wertes auf die Reversibilität des Prozesses beschrieben ist [99], wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Messungen, die bei pH 8,3 durchgeführt wurden, auch das Verhalten bei pH 9 untersucht (Abb. 4.10).



Abb. 4.10: Zyklovoltammogramm von DmsB-P C27S in Lösung bei pH 9
 Die erste zyklovoltammetrische Messung ist in schwarz, die fünfte in rot dargestellt.
 Die Messungen wurden bei 25 °C mit einer Scanrate von 50 mV/s durchgeführt.

Es ist zu erkennen, dass die Probe ein Reduktionspotential von -439 mV hat. Durch Vergleich der Abb. 4.9 mit Abb. 4.10 lässt sich eine Abhängigkeit des Potentials vom pH-Wert erkennen. Der zu beobachtende Potentialunterschied von 105 mV ist allerdings nicht allein durch die Änderung des pH-Wertes erklärbar, dessen Einfluss im Bereich um 20 mV liegen sollte. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte eine Protonentransferreaktion am Peptid sein, wie sie auch für den [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster des Ferredoxin I von *Azotobacter vinelandii* beschrieben ist [99]. Die dadurch induzierte Veränderung in der Peptidumgebung und eventuell daraus resultierende Konformationsänderungen können zu den großen Potentialunterschieden bei unterschiedlichen pH-Werten führen. Auch in dem Zyklovoltammogramm in Abb. 4.10 ist zu beobachten, dass der Redoxprozess nicht vollständig reversibel stattfindet. Im Gegensatz zu dem in Abb. 4.9 dargestellten Zyklovoltammogramm steigt die Intensität des Reduktionssignals nach jedem Messzyklus an. Auch dies könnte durch eine
mögliche Deprotonierung aufgrund des höheren pH-Wertes erklärt werden, da ein deprotoniertes Peptid eine höhere Affinität zu der Graphit-Oberfläche der Elektrode aufweist. Wird mit zunehmender Zeit immer mehr Peptid an der Elektrodenoberfläche adsorbiert, steigt auch die Signalintensität mit jeder Messung.

Um die Effekte, die durch die Adsorption des Peptids an die Graphitelektrode hervorgerufen werden, zu vermeiden, wurden Messungen durchgeführt, bei denen die Peptide kovalent an die Elektrodenoberfläche gebunden sind.



Abb. 4.11: Zyklovoltammogramm der zeitabhängigen Rückkehr des Clusters in den Ursprungszustand, untersucht anhand des Reduktionspotential-Signals von DmsB-P C27S bei pH 8,3.

Jedes aufgenommene Spektrum des kovalent an die Elektrode gebundenen Peptids besteht aus zwei aufeinander folgenden Messzyklen. Die Intensität des Signals, das nur im ersten Messzyklus zu beobachten ist, hängt von der Inkubationszeit zwischen der Aufnahme der Spektrenzyklen ab.

Die in Abb. 4.11 abgebildeten Zyklovoltammogramme des kovalent an die Elektrode gebundenen Peptids bestätigen die Ergebnisse der Messungen in Lösung, die vermuten ließen, dass es sich um einen irreversiblen Prozess handelt, da keine Signale vorhanden sind, die einer Oxidation zugeordnet werden können. Des Weiteren ist zu erkennen, dass das Reduktionssignal nach einer Messung in einem direkt darauf folgenden zweiten Messzyklus nicht zu beobachten ist. Dieses Verhalten entspricht den Beobachtungen, die bei den Messungen des Peptids bei pH 8,3 in Lösung gemacht wurden. Wartet man jedoch einige Zeit, ist das Signal wieder zu beobachten. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass der Cluster einige Zeit benötigt, um wieder in seinen Ursprungszustand zurückzukehren. Ein Grund für dieses Verhalten könnte sowohl ein Protonentransfer als auch eine Konformationsänderung sein, die während der elektrochemischen Reduktion stattfinden. Um genauere Aussagen über die Gründe für den beobachteten Effekt zu machen oder die oben möglichen Erklärungen zu beweisen, vorgestellten wären allerdings weitergehende elektrochemische Messungen nötig.

# 4.8 Gewinnung von *D. gigas* Ferredoxin II

Um eine dauerhaftere Stabilisierung des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters zu erreichen, wurde nach einem System gesucht, dass klein genug ist, um als Modellsystem zu dienen, jedoch eine ausreichende Größe hat, um einen Cluster zu stabilisieren.

Viel versprechend in dieser Hinsicht schien das Ferredoxin II aus *Desulfovibrio gigas* (*D. gigas*), das aus einer 58 Aminosäuren umfassenden Sequenz besteht. die in der Lage ist sowohl einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster als auch einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu koordinieren [55].

## 4.8.1 Gewinnung der genomischen DNA

Eine Zellkultur von *D. gigas* wurde unter streng anaeroben Bedingungen angezogen (s. Material und Methoden). Als optimales Wachstumsmedium erwies sich das Flüssigmedium DSG, das im Kapitel Material und Methoden detailliert beschrieben ist.

Aus den durch Zentrifugation geernteten Zellen wurde daraufhin die genomische DNA isoliert (s. Material & Methoden). Um aus dieser das gewünschte DNA-Fragment zu amplifizieren, wurde das folgende PCR-Protokoll entwickelt.

| Initialisierung   | 95 °C | 5 Min   |           |
|-------------------|-------|---------|-----------|
| Denaturierung     | 95 °C | 0,5 Min | )         |
| Annealing         | 73 °C | 0,5 Min | 30 Zyklen |
| Elongation        | 72 °C | 2 Min   | J         |
| finale Elongation | 72 °C | 5 Min   |           |

Es stellte sich heraus, dass für die PCR eine ungewöhnlich hohe Annealing-Temperatur gewählt werden musste, da nur bei diesen Temperaturen eine ausreichend spezifische Amplifizierung der DNA erreicht werden konnte.

#### 4.8.2 Gewinnung des Plasmids für die Überexpression in *E. coli*

Das durch PCR erhaltene Gen wurde zur Überexpression in *E. coli* in den ligationsunabhängigen Vektor pET-52b(+) 3C/LIC eingefügt. Mit dem so entstandenen Plasmid wurden anschließend Nova Blue Zellen transformiert, um das Plasmid zu amplifizieren. Nach der Extraktion und der Aufreinigung wurde das Plasmid von einer externen Firma sequenziert. Durch die Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass das gewünschte Plasmid isoliert wurde.

## 4.8.3 Überexpression in *E. coli*

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurde das gewonnene Plasmid in die vier *E. coli* Stämme DH5α, BL21-DE3, BL21-RIL und BL21-Al kloniert.

Für alle Stämme wurde der Zeitpunkt der Induktion gleich gehalten, allerdings wurden die Expressionszeiten von 6 Stunden bis 30 Stunden variiert, um die optimale Expressionszeit zu ermitteln. Es wurden die in Abb. 4.12 und in Abb. 4.13 dargestellten Gele der Rohlysate erhalten.



Abb. 4.12: Gele der Rohlysate aus Überexpression in BL21-Al und DH5α
 Aufgetragen sind die Rohlysate jedes Stammes nach einer Expressionszeit von 6 bis 30 Stunden, sowie der Marker (M).

Anhand der Gele in Abb. 4.12 lässt sich erkennen, dass die Rohlysate der *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  und BL21-AI keine Bande im gewünschten Größenbereich von 6 kDa zeigen. Es ist auch keine Bande in einem Bereich zu beobachten, der auf die Ausbildung eines Dimers oder Oligomers des gewünschten Proteins schließen lässt. Aus diesem Grund wurde mit diesen Stämmen nicht weiter an der Expression des *D. gigas* Ferredoxins gearbeitet.





Abb. 4.13: Gele der Rohlysate aus Überexpression in BL21-DE3 und BL21-RIL Aufgetragen sind die Rohlysate jedes Stammes nach einer Expressionszeit von 6 bis 30 Stunden, sowie der Marker (M). Bei beiden Stämmen ist im gewünschten Größenbereich von 6 kDa ab einer Expressionszeit von 12 Stunden eine Proteinbande zu erkennen.

Im Gegensatz zu den Stämmen DH5α und BL21-AI zeigt das in Abb. 4.13 dargestellte Gel der Stämme BL21-DE3 und BL21-RIL Banden im gewünschten Größenbereich um 6 kDa. Zusätzlich ist eine große Bande im Bereich um 36 kDa zu erkennen, die der Expression eines Oligomers entspricht. Des Weiteren ist anhand des Gels zu erkennen, dass sich eine Verlängerung der Expressionszeit auf mehr als 21 Stunden nicht auf die Menge des zu exprimierenden Proteins auswirkt. Aus diesem Grund wurden die folgenden Expressionen über Nacht durchgeführt.

Um weitere Informationen darüber zu erhalten, welcher der Stämme BL21-DE3 und BL21-RIL besser für die Expression geeignet ist, wurde der in Abb. 4.14 gezeigte Western-Blot der beiden Rohlysate gemacht. werden kann.



Abb. 4.14: Western Blot der Rohlysate, die aus der Überexpression mit den *E. coli* Stämmen BL21-DE3 und BL21-RIL erhalten wurden.
Auf Grund des vorhandenen Strep-Tags wurde ein entsprechender Antikörper verwendet. Im Rohlysat aus BL21-DE3 ist keine Bande zu erkennen, es liegt also kein Protein mit einem Strep-Tag vor. Das Rohlysat aus BL21-RIL zeigt eine Bande im Bereich um 24 kDa, die einem Tetramer des *D. gigas* Ferredoxins zugeordnet

Anhand der Abb. 4.14 ist gut zu erkennen, dass für das Rohlysat aus BL21-DE3 keine Bande sichtbar ist. Das Protein, das auf dem Gel im gewünschten Größenbereich als Bande zu erkennen war, kann somit nicht mit einem Strep-Tag versehen sein. Da das Ferredoxin aus dem Vektor sowohl mit einem His-Tag als auch mit einem Strep-Tag exprimiert wird, kann es sich bei diesem Protein nicht um das gewünschte Ferredoxin handeln. Der Blot des Materials aus dem Stamm BL21-RIL hingegen weist eine Bande im Bereich um 24 kDa auf. Dies entspricht der Größe eines Tetramers, dessen Isolierung bereits in der Literatur beschrieben ist [8], jedoch scheint es sich bei der biologisch aktiven Form um das Monomer zu handeln. Im weiteren Verlauf der Probenvorbereitung wurde der nach der Expression gebundene Cluster unter reduzie-renden Bedingungen durch Fällung vom Protein abgetrennt (vgl. Kapitel 4.8.6 und 8.5). Hierdurch wurden die Bindungen der Proteinstränge an den Cluster und eventuell gebildete Cystinbindungen gebrochen, sodass man vor der Clusterrekonstitution das Monomer des Proteins erhält. Da der Blot für den

Strep-Tag spezifisch ist, kann es sich bei dem im Blot zu sehenden Protein nur um das gewünschte *D. gigas* Ferredoxin handeln. Für die Expression des Ferredoxins scheint somit der *E. coli* Stamm BL21-RIL optimal zu sein, sodass dieser in allen weiteren Versuchen verwendet wurde.

## 4.8.4 Punktmutationen der Ferredoxin Sequenz

Um den Einbau eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters in das Protein zu begünstigen, wurden Punktmutationen am Cystein in Position 12 der Sequenz durchgeführt. Als Basis für die Mutationen C12S, C12Y, C12F und C12W diente das Plasmid, das für die Überexpression des Wildtyp-Ferredoxins hergestellt wurde.

Für die Einführung der Punktmutationen erwies sich das folgende PCR-Programm als optimal:

| Initialisierung   | 95 °C | 0,5 Min |             |
|-------------------|-------|---------|-------------|
| Denaturierung     | 95 °C | 0,5 Min | )           |
| Annealing         | 73 °C | 1 Min   | 2 18 Zyklen |
| Elongation        | 72 °C | 6 Min   | J           |
| finale Elongation | 72 °C | 1 Min   |             |

Auch hier ist zu beobachten, dass nur eine ungewöhnlich hohe Annealing-Temperatur zu einem definierten PCR-Produkt führt.

Die Amplifizierung der DNA wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.



Abb. 4.15: Agarose-Gel der Plasmide, die nach den mittels PCR durchgeführten Punktmutationen erhalten wurden Zu erkennen sind die Plasmide der Punktmutationen C12S, C12Y und C12F in einem Größenbereich von 6 kB, basierend auf der Sequenz des *Desulfovibrio gigas* Ferredoxin II.

Das in Abb. 4.15 abgebildete Agarose-Gel zeigt, dass für die Mutationen *Dg* Fd II C12S, C12Y und C12F jeweils ein Plasmid amplifiziert werden konnte. Das gewünschte Plasmid für *Dg* FDII C12W konnte nicht gewonnen werden, auch weitere Modifikationen der Bedingungen ergaben kein PCR-Produkt. Die drei erhaltenen Plasmide zeigen eine Bande im Bereich von 6 kBasen (kB). Da dies im erwarteten Größenbereich liegt, scheint es sich um die angestrebten Plasmide zu handeln. Um zu verifizieren, dass die gewünschten Mutationen erreicht wurden, wurde die DNA aus dem Gel extrahiert und extern sequenziert. Die Sequenzierung hat bestätigt, dass die Mutationen erfolgreich waren.

## 4.8.5 Aufreinigung des Proteins

Zunächst wurde versucht, das jeweilige mutierte Protein mit Hilfe des His-Tags über eine His-Trap Säule aufzureinigen. Das Protein konnte jedoch in keiner der Wasch- oder Elutionsfraktionen gefunden werden. Das Protein scheint sich also irreversibel an das Säulenmaterial zu binden. Wahrscheinlich binden die Cysteinreste, die im Protein für die Koordinierung des Clusters verantwortlich sind, an das Nickel-enthaltende Säulenmaterial, sodass das Protein nicht mehr eluiert werden kann.

Da der His-Tag zur Aufreinigung ungeeignet ist und deshalb nicht mehr benötigt wurde, wurde durch Punktmutation ein Stop-Codon zwischen die Sequenz des Ferredoxins und den His-Tag eingefügt, sodass im Folgenden das Protein ohne His-Tag exprimiert wurde. Die Aufreinigung erfolgte nun mit Hilfe des Strep-Tags über eine Strep-Tactin-Säule. Da hier unterschiedliche Arten von Säulenmaterial zur Verfügung stehen, die in ihren Trennungseigenschaften stark voneinander abweichen, wurden Tests für die Auftrennung mit unterschiedlichen Säulenmaterialien gemacht. Geprüft wurde die Aufreinigung mit einem Superflow Resin, einem Sepharose Resin und einem MacroPrep Resin. Die Gele der erhaltenen Elutionsfraktionen sind in Abb. 4.16 gezeigt.



| 1                 | Waschfraktion 1  |
|-------------------|--|
| 2                 | Waschfraktion 2  |
| 3                 | Waschfraktion 3  |
| 4                 | Waschfraktion 4  |
| 5                 | Waschfraktion 5  |
| 6                 | Waschfraktion 6  |
| Μ                 | Marker   |
|                   |  |
| 7                 | Elutionsfraktion 1   |
| 7<br>8            | Elutionsfraktion 1<br>Elutionsfraktion 2   |
| 7<br>8<br>9       | Elutionsfraktion 1<br>Elutionsfraktion 2<br>Elutionsfraktion 3                       |
| 7<br>8<br>9<br>10 | Elutionsfraktion 1<br>Elutionsfraktion 2<br>Elutionsfraktion 3<br>Elutionsfraktion 4 |

a)



c)

Abb. 4.16: Gele der Wasch- und Elutionsfraktionen nach der Aufreinigung mit unterschiedlichen Strep-Tactin-Säulen
a) Säule mit Superflow Resin, b) Säule mit Sepharose Resin, c) Säule mit MacroPrep Resin. Säule c) separiert am besten zwischen den Proteinen der Waschfraktionen und dem gewünschten Protein, auch die schmale Bandenform

deutet auf die besten Trennbedingungen

Die Gele zeigen, dass es mit allen Säulen möglich ist, das gewünschte Produkt aufzureinigen. Jedoch findet sich bei der Säule mit MacroPrep Resin kein Protein mehr in der letzten Elutionsfraktion und die erhaltenen Banden sind wesentlich schmaler. Aus diesem Grund wurde für weitere Aufreinigungen mit der ÄKTA eine Säule mit MacroPrep Resin verwendet. Die Reinheit des Proteins wurde nach der Aufreinigung mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft. Die erhaltenen Gele, die denen in Abb. 4.16 entsprechen, zeigen, dass die Aufreinigung des Proteins mit dieser Methode erfolgreich ist. Die Konzentration c des Proteins nach der Aufreinigung wurde mit Hilfe der Absorption bei 415 nm und des Extinktionskoeffizienten anhand der Gleichung 4.1 bestimmt.

$$c = \frac{Abs_{415}}{15.7 \ M^{-1}cm^{-1}} \cdot d$$
 Gleichung 4.1

(*d* = Schichtdicke der Küvette)

Die Konzentration der Proben lag in einem Bereich von 10-15 µM.

#### 4.8.6 Rekonstitution des Clusters in das Protein

Im Anschluss an die Aufreinigung wurde der noch im Protein vorhandene Cluster vom Protein getrennt, da dieser durch die Aufarbeitung unter aeroben Bedingungen vollständig oxidiert war. Hierzu wurde die von Hong und Rabinowitz entwickelte [93] und von Moura *et al.* [8] optimierte Methode angewendet. Zunächst wurde das Protein mit Trichloressigsäure gefällt, abzentrifugiert und resuspendiert (vgl. Kapitel 8.5). Nach zweifacher Wiederholung wurde unter anaeroben Bedingungen durch Zugabe von Eisenchloridund Natriumsulfidlösung der Cluster neu rekonstituiert.



Abb. 4.17: UV/Vis-Spektrum des D.gigas Ferredoxin II nach der Rekonstitution des Clusters

Das in Abb. 4.17 gezeigte Spektrum ist typisch für einen Eisen-Schwefel-Cluster, sodass die Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters demonstriert werden konnte. Für eine genauere Identifizierung und Charakterisierung des Clusters müssten Proben mit einer höheren Konzentration gewonnen werden.

# 5 Ausblick

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde die Grundlage zur Rekonstitution und zur Charakterisierung von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern in *Maquettes* geschaffen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Klärung der Bindungsvoraussetzungen für den Cluster und auf die Einflüsse der Proteinumgebung für den gebildeten Cluster gerichtet. Hierzu wurde von der EPR- und der UV/Vis-Spektroskopie sowie von der Zyklovoltammetrie Gebrauch gemacht. Eine weitere Charakterisierung des auf dem Bindungsmotiv der Untereinheit B der Dimethylsulfoxidreduktase basierenden Peptids DmsB-P sowie seiner Mutanten sollte mit Hilfe der Resonanz Raman Spektroskopie und mit Hilfe der Mössbauer Spektroskopie erfolgen, da mit beiden Methoden Aussagen über die Koordinationsgeometrie und die Oxidationszustände der im Cluster enthaltenen Eisenatome gemacht werden kann.

Um über die erhaltenen Ergebnisse hinaus eine weiterführende Charakterisierung des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters zu ermöglichen, ist es erforderlich, mit einem *Maquette* zu arbeiten, das eine längere Lebensdauer des Clusters gewährleistet. Dazu scheint das in dieser Arbeit bereits für die Cluster-Koordinierung isolierte, 58 Aminosäuren umfassende Protein Ferredoxin II aus *Desulfovibrio gigas* geeignet zu sein.

Da die Koordinierung des Clusters mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestätigt wurde, sollte für eine genauere Charakterisierung die Ausbeute optimiert werden. Aufgrund der geringen Größe des Ferredoxins bietet es sich an, sowohl den Protein-Wildtyp als auch die hier auf biologischem Wege gewonnenen Mutationen mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese chemisch zu synthetisieren. Für die anschließende Koordinierung des Clusters könnte das gleiche Protokoll angewendet werden, das zur erfolgreichen Bindung des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters an das Protein geführt hat. Mit Hilfe dieses stabileren Clusters könnten weitere spektroskopische und elektrochemische Analysen durchgeführt

werden, deren Signale ausschließlich vom [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster verursacht werden. Des Weiteren wäre es bei der zu erwartenden Stabilität des Clusters möglich, zusätzlich zur bekannten Struktur des Wildtyp-Proteins auch die Mutanten zu kristallisieren, um so deren Struktur zu bestimmen und mit der des Wildtyps zu vergleichen. Hiermit könnten direkte Aussagen über den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die Struktur des Proteins gemacht werden.

Bei Einsatz spektroskopischer und elektrochemischer Methoden ließen sich Aussagen über den direkten Einfluss der Struktur der Proteinmatrix auf die Eigenschaften des Clusters treffen. Zusätzliche Mutationen würden es dann auch erlauben, den bereits oben beschriebenen Zusammenhang zwischen Proteinstruktur und Clustereigenschaften in weiterem Rahmen zu beschreiben. Für diese Mutationen empfiehlt es sich zunächst, die den Cluster koordinieren Cysteine zu variieren, da bei diesen der zu erwartende Effekt auf die Clustereigenschaften am größten ist. Des Weiteren wäre es von Interesse, Mutationen an den Aminosäuren, die neben den koordinierenden Cysteinen liegen, durchzuführen. Bereits bei den für die [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster Koordinierung entworfenen *Maquettes* zeigten diese Mutationen einen großen Effekt auf das Clusterpotential, so dass sich hier die Möglichkeit bietet zu untersuchen, ob [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster und [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster vergleichbar auf diese Mutationen

Mit Hilfe dieser Informationen sollte es möglich sein, noch genauere Aussagen über die Bindungsvoraussetzungen und die Funktion von [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern in nativen Systemen zu machen.

# 6 Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-Cluster sind in Proteinen omnipräsente prosthetische Gruppen, die als [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]-, [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- oder [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster vorliegen und meist an Elektronentransfer-Reaktionen beteiligt sind. Da der [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster am weitesten verbreitet ist, ist dieser auch am besten charakterisiert. Die Charakterisierung der diversen spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften erfolgte sowohl über native Systeme als auch über Modellpeptide, die das native System imitieren, sog. *Maquettes*. Im Verlauf der Arbeit sollten *Maquettes* für [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster gefunden werden, die eine genauere Charakterisierung dieses Clusters und einen Vergleich mit dem [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster erlauben. Des Weiteren sollten Informationen über die Voraussetzungen erhalten werden, die die Bildung des einen oder anderen Clustertyps begünstigen. Hierzu wurden zwei Ansätze für ein Modell zur Bindung eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters verfolgt.

Im ersten Arbeitsansatz wurde die Bindungssequenz eines Eisen-Schwefel-Clusters aus der Dimethylsulfoxidreduktase (DmsB) von *E. coli* synthetisiert. Bereits durch Rothery und Weiner [72] beschriebene Punktmutationen an der Proteinsequenz führten zur Bindung eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters anstelle des nativen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters. Deshalb sollte überprüft werden, ob auch ein 33 Aminosäuren langes, den Koordinationsbereich umfassendes Peptid, DmsB-P, an dem die gleichen Mutationen durchgeführt werden sollten, einen [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster koordinieren kann und sich somit als *Maquette* eignet.

Mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese konnten die gewünschten DmsB-P *Maquettes*, die an verschiedenen Cystein-Positionen andere Aminosäuren trugen, mit einer Ausbeute von 3 bis 10 % hergestellt werden. Die Identität und die Reinheit der erhaltenen Peptide wurden mit Hilfe von HPLC und MALDI-TOF MS bestätigt.

Nach der erfolgreichen Synthese der Peptide wurde das Rekonstitutionsprotokoll so optimiert, dass [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster und [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster in einem Verhältnis von bis zu 57 % zu 43 % gebildet wurden. Es zeigte sich, dass der drei Eisenatome enthaltende Cluster innerhalb kurzer Zeit in den stabileren [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster übergeht. Da nachgewiesen werden konnte, dass der [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster vom Peptid gebunden wurde, und da eine nachträgliche Abstraktion des vierten Eisenatoms nicht zu realisieren ist, ohne den Cluster zu zerstören, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die Koordinierung des vierte Eisenatoms erst nach der Bindung des Clusters an das Peptid erfolgt. Die Rekonstitution des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters deutet deshalb darauf hin, dass nicht wie meist angenommen, zunächst der vollständige [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster von β-Mercaptoethanol koordiniert vorliegt, bevor das Protein oder Peptid das Mercaptoethanol verdrängt, sondern dass offensichtlich eine sukzessive Koordinierung der Eisenatome stattfindet; hierauf deuten auch andere Experimente mit den verschiedenen Cysteinmutanten hin (s.u.). Der Einbau eines Clusters in das jeweilige Peptid wurde nach Anwendung des optimierten Rekonstitutionsprotokolls durch UV/Vis-Spektroskopie bestätigt. Die Proben zeigten eine typische Absorptionsbande im Bereich um 415 nm, deren Intensität sich, wie es für Eisen-Schwefel-Cluster zu erwarten war, nach Reduktion mit Dithionit um 90 % reduzierte.

Die Charakterisierung der Proben mit Hilfe der EPR-Spektroskopie zeigte, dass die Rekonstitution des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters gelungen ist. Es konnte ein Einfluss der mutierten Aminosäure auf die Clusterrekonstitution beobachtet werden. Es wurde deutlich, dass die Mutation des Cysteins in Position 27, das Teil des Bindungsmotivs ist, einen wesentlich größeren Einfluss auf die Clusterrekonstitution hat, als die Mutation des Cysteins in Position 4, das zwar ebenfalls den Cluster koordiniert, jedoch nicht zum Bindungsmotiv gehört. Hierbei zeigte sich, dass die Größe der Aminosäure, durch die das Cystein 27 ersetzt wurde, keinen Einfluss auf die Clusterrekonstitution hatte. Im Gegensatz dazu wurde jedoch gefunden, dass nur durch das Einsetzten einer polaren Aminosäure eine Clusterrekonstitution erreicht werden konnte. Durch Mutation

des Cysteins in Position 4 wurden Varianzen im Verhältnis von gebildetem [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- zu [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]- Cluster beobachtet, wobei die Einführung einer polaren Aminosäure an dieser Stelle offensichtlich die Bindung des vierten Eisenatoms in den Cluster begünstigt. Die elektrochemische Charakterisierung des *Maquettes* DmsB-P C27S ergab für das Peptid bei pH 8,3 ein Potential von -334 mV: Die Daten der Messungen bei unterschiedlichem pH-Wert weisen darauf hin, dass es sich bei der Reduktion um einen irreversiblen Prozess handelt. Außerdem konnten nach Veränderung des pH-Werts im Zyklovoltammogramm Effekte beobachtet werden, die auf einen Protonentransfer hindeuten, wie er in der Literatur für [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster des Ferredoxin I aus *Azotobacter vinlandii* bereits durch Camba *et al.* [99] beschrieben ist.

Der zweite Arbeitsansatz basiert auf dem Ferredoxin II von Desulfovibrio gigas. Hierbei handelt es sich um ein 58 Aminosäuren umfassendes Protein, das in der Lage ist, als Mediator beim Elektronentransfer zwischen Cytochrom c3 und dem Sulfitreduktasesystem zu dienen [48]. Da es sich bei diesem Ferredoxin um ein bereits ausgiebig charakterisiertes Protein handelt, kann der Effekt von Mutationen auf Clusterbindungseigenschaften und spektroskopische sowie elektrochemische Eigenschaften gut beurteilt werden. Des Weiteren ist das Protein so klein, dass es als Modellsystem für komplexere Proteine dienen kann und so zur Aufklärung sowohl der Bindungsvoraussetzungen des Clusters als auch der Einflüsse der Mutationen am Bindungsmotiv beiträgt. Es ist im Verlaufe der Arbeit gelungen, eine Methode am Institut zu etablieren, mit der Desulfovibrio gigas Ferredoxin II durch Überexpression in E. coli gewonnen werden kann. Durch Punktmutationen am Ferredoxin-Wildtyp konnten die Mutanten FdII C12S, C12Y und C12F hergestellt werden. Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass ein Eisen-Schwefel-Cluster in das jeweilige Protein rekonstituiert werden konnte, allerdings wären für die Weiterführung dieses Projektteils deutlich umfangreichere Arbeiten nötig.

In Zukunft wäre es von Interesse, eine weiterführende Charakterisierung des DmsB-P und seiner Mutanten mit Hilfe von Resonanz Raman und Mössbauer

Spektroskopie durchzuführen, um Informationen über die Koordinationsgeometrie und die Oxidationszustände der im Cluster enthaltenen Eisenatome zu erhalten.

Das Ferredoxin II aus *Desulfovibrio gigas* sowie dessen Mutanten sollten hierzu durch chemische Synthese hergestellt werden, so dass durch die höhere Ausbeute eine genauere Charakterisierung des Clusters erfolgen kann. Da davon auszugehen ist, dass dieses System den Cluster besser stabilisieren kann als die DmsB-P Peptide, sollte es möglich sein, sowohl den Wildtyp des Ferredoxins als auch seine Mutanten zu kristallisieren und weitere Untersuchungen an diesen Kristallen durchzuführen. Durch Vergleich des Ferredoxin-Wildtyps mit den Mutanten lassen sich dann Aussagen über den Einfluss der verschiedenen Aminosäuren auf die Struktur des Proteins machen. In Kombination mit spektroskopischen und elektrochemischen Untersuchungen bestünde dann die Möglichkeit, den direkten Einfluss der Proteinmatrix auf die Eigenschaften des Clusters zu untersuchen. Durch weitere Mutationen am Bindungsmotiv selbst oder in der Umgebung des Bindungsmotivs können weitere Vergleiche mit [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern durchgeführt und eine genauere Charakterisierung ermöglicht werden.

# 7 Summary

Iron sulfur clusters are omnipresent prosthetic groups in proteins. They occur as  $[Fe_2S_2]$ -,  $[Fe_3S_4]$ - and  $[Fe_4S_4]$ -clusters and are predominantly found as part of electron transfer processes. The  $[Fe_4S_4]$ -cluster is the most prevalent in nature and is thus best characterized. The characterization was based on both native systems and peptide mimicks; the so called *Maquettes*. In the course of this study, *Maquettes* should be designed and generated that were suitable for the incorporation of  $[Fe_3S_4]$ -clusters in order to enable a more detailed characterization and a comparison to  $[Fe_4S_4]$ -clusters. Furthermore, information about factors that dictate the formation of one cluster or the other should be gained. In order to arrive at this goal, two strategies were employed.

The first strategy is based on the synthesis of the iron sulfur cluster binding sequence of Dimethyl sulfoxide reductase subunit B (DmsB) of *E. coli.* As already described by Rothery and Weiner [72], point mutations in the protein sequence allowed the formation of a  $[Fe_3S_4]$ -cluster in preference to the native  $[Fe_4S_4]$ -cluster. Therefore, the cluster binding ability of the 33 amino acid peptide DmsB-P, which is containing the binding site of DmsB, was tested. The same mutations as described for the DmsB protein should then be performed with the *Maquette* in order to check whether the peptide can serve as a model for  $[Fe_3S_4]$ -clusters.

The desired *Maquettes* based on DmsB-P, which contained mutations in various cysteine positions, were successfully synthesized by solid phase peptide synthesis with a yield of 3 to 10 %. Their identity and purity were verified by HPLC and MALDI-TOF MS.

After successful synthesis of the peptide, the reconstitution protocol was optimized, to give the  $[Fe_3S_4]$ -cluster and  $[Fe_4S_4]$ -cluster in a ratio of up to 57 % to 43 %. In all cases, a conversion of the  $[Fe_3S_4]$ -cluster into the more stable  $[Fe_4S_4]$ -cluster took place in a short time. Still, the incorporation of

[Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-cluster into the peptide could be proven, but a subsequent abstraction of the fourth iron could not be performed without cluster decomposition. This allows the conclusion that at least the fourth iron atom is incorporated after the cluster has been bound to the peptide. The reconstitution of the [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-cluster indicates that a successive coordination of the iron atoms is taking place, in contrast to the common presumption of a complete formation of a mercaptoethanol-coordinated [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-cluster before incorporation to the protein or peptide. This proposal is supported by additional experiments performed on various cysteine mutants (as described below). The incorporation of an iron sulfur cluster into the synthesized peptides by application of the optimized reconstitution protocol was confirmed by UV/Vis spectroscopy. The samples show a distinctive absorption band at around 415 nm, whose intensity decreases 90 % upon reduction with dithionite, which is typical for iron sulfur clusters. Characterization of samples by EPR spectroscopy proved the successful reconstitution of the desired [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-cluster and an influence of the mutated amino acid to the cluster reconstitution was observed. A considerable influence of the mutation on cysteine 27, located in the binding motif on cluster reconstitution was observed, whereas the influence of the mutations on cysteine 4 is considerably less since it is located outside the binding motif. Mutation of cysteine 27 revealed that the size of the amino acid did not affect the cluster reconstitution, whereas polarity of the amino acid played a key role, as only peptides with polar amino acids at position 27 showed cluster incorporation. Mutations of cysteine 4 altered the [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]- to [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-cluster ratio, demonstrating that a polar amino acid in this position promoted the incorporation of the fourth iron into the cluster.

The electrochemical characterization of DmsB-P C12S *Maquettes* identified an irreversible reduction process at of -334 mV at pH 8.3. Additional effects were seen - in particular by changing the pH value of the sample - which indicate concomitant proton transfer, as described previously for [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-clusters by Camba *et al.* [99].

The second strategy is based on the Ferredoxin II of *Desulfovibrio gigas*. This protein consists of 58 amino acids and serves as a mediator in the electron transfer between cytochrome *c3* and the sulfite reductase system [48]. Since this Ferredoxin has been thoroughly characterized by spectroscopic and electrochemical techniques, effects of mutations can be conveniently assessed. Furthermore, the protein's small size enables it to be used to model more complex systems, thus giving an insight into binding conditions for clusters and influences of mutations at the binding motif. In the course of this study a protocol was established at the institute that allowed overexpression of the Ferredoxin in *E. coli*. Moreover, isolation of the *Desulfovibrio gigas* Ferredoxin II mutants FdII C12S, C12Y und C12F was successful by point mutation. Incorporation of an iron sulfur cluster into the protein and these mutants was confirmed by UV/Vis spectroscopy.

For further characterization of the DmsB-P and its mutants, Resonance Raman and Mössbauer spectroscopy is of future interest because both methods can give additional information about the coordination geometry and the iron oxidation states in the cluster.

Chemical synthesis of Ferredoxin II from *D. gigas* (wild type protein and mutants) should be performed enabling by the higher yields a further characterization of the cluster. As this system is able to stabilize the cluster better than DmsB-P peptides, crystallization of the wildtype protein and its mutants should be feasible, so that further examination on crystals can be done. Furthermore, by comparing the wild type Ferredoxin with its mutants, information about the influence of a single amino acid at a given position for the protein structure can be gained. In combination with spectroscopic and electrochemical investigations the direct effect of the protein matrix to the diverse properties of the cluster can be studied. Additional mutations beyond the here discussed ones, either at the binding motif or in the cluster binding site proximity would add valuable information for the phenomenon of iron sulfur cluster incorporation by peptides and proteins.

# 8 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden erläutert.

# 8.1 Geräte

Im Verlauf der praktisch durchgeführten Arbeiten wurden die folgenden Geräte verwendet:

# ÄKTA

| Gerät:                 | GE Healthcare, Äkta prime plus                      |
|------------------------|---|
| Säule:                 | IBA, Strep-Tactin Superflow high capacity Cartridge |
|                        | H-PR 5 mL   |
| EPR                    |   |
| Gerät:                 | Bruker, E 500                                       |
| Kryostat:              | Oxford, ESR continuous flow                         |
| Temperatursteuerung:   | Oxford, ITC 503                                     |
| Glove-box              |   |
| Glove-box: Coy Labo    | ratory Products Inc., Modell A                      |
| Wasserstoff-/Sauerstof | fdetektor: Coy Laboratory Products Inc., Modell 10  |
| HPLC                   |   |
| HPLC-System:           | Gilson-Abimed, Gradientenpumpen Typ 331 und 332     |
| Detektor:              | Gilson-Abimed, UV/Vis-456                           |

# Analytische Säule: Phenomenex, Gemini 5 µm C18 4,6 x 250 mm

Präparative Säule: Phenomenex, Genini 5 µm C18 22 x 250 mm

## Gefriertrocknung

Fa. Martin Christ, ALPHA 1-4 mit Anlagensteuerung LDC-1M

### MALDI-TOF MS

| Gerät: | Voyager-DE PRO Workstation            |
|--------|---------------------------------------|
| Laser: | Stickstofflaser (337 nm)              |
|        | Pulsenergie bei 10 Hz: 324 ±6 µJoules |

## PCR

Eppendorf, Mastercycler ep gradient

### **Peptid Synthesizer**

Advanced Chemtech, Model 348 $\Omega$ 

### pH-Meter

Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter Mettler Toledo, Seven Easy pH Meter

### **UV-Spektrometer**

Shimadzu, UV-2401 PC

### Zellaufschluss

Dispergiergerät: Art, MICCRA D-9 mit Schnellrührwerkzeug DS-20-PF-MIR

### Zentrifugen

| Mikrozentrifuge: | Heraeus, Biofuge primo R       |
|------------------|--------------------------------|
| Kühlzentrifuge:  | Beckman Coulter, Avanti J20XP  |
| Ultrazentrifuge: | Beckman Coulter, Optima L-80XP |

#### Zyklovoltammetrie

| Potentiostat: | Princeton Applied Research, Versastat 4 400 |         |           |                          |  |  |
|---------------|---|---------|-----------|--------------------------|--|--|
|               | Princeton                                   | Applied | Research, | Potentiostat/Galvanostat |  |  |
|               | Model 283                                   |         |           |                          |  |  |
| _             |   |         | -         |                          |  |  |

Referenzelektrode: Radiometer Analytical, Saturated Calomel Electrode (SCE)

## 8.2 Chemikalien

Die zur Peptidsynthese verwendeten Aminosäuren wurden von Iris-Biotech und die Kopplungsreagenzien von Novabiochem bezogen. Das verwendete PAL-PEG-PS - Harz wurde von der Firma Applied Biosystems geliefert. Die für die Peptidsynthese verwendeten Chemikalien lagen alle mindestens im Reinheitsgrad "zur Peptidsynthese" vor.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Martinsried) und die Vektoren bei Novagen (Darmstadt) bestellt.

Die für die Aufreinigungen und Extraktionen während der molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Kits wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Eine Ausnahme bildet das Kit zur Extraktion der Plasmid DNA, das bei der Firma GE Healthcare (München) bestellt wurde.

Alle weiteren von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) gelieferten Chemikalien lagen in der höchst möglichen Reinheit und mindestens vom Reinheitsrad "zur Synthese" vor.

Lösemittel, die mit dem Reinheitsgrad "technisch" bezogen wurden, sind vor Gebrauch destilliert worden.

## 8.3 Medien und Lösungen

Alle Medien wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung der Medien wurde ausschließlich Wasser aus einer Millipore-Anlage verwendet, dessen spezifische Leitfähigkeit in einem Bereich von ca.  $18,2 \text{ M}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$  lag.

### 8.3.1 Medien zur Anzucht von Desulfovibrio gigas

Zur Anzucht und Lagerung der Zellkultur wurden die folgenden Medien eingesetzt:

| DSG (Wachstumsmedium) [100]: | 4,0  | g/L  | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      |
|------------------------------|------|------|--------------------------------------|
| pH 7,2                       | 0,6  | g/L  | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O |
|                              | 0,4  | g/L  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |
|                              | 3,0  | g/L  | Trypton                              |
|                              | 0,8  | g/L  | Hefe-Extrakt                         |
|                              | 10,0 | mL/L | Na-L- Lactat                         |
|                              |      |      | (60 Gew.% in $H_2O$ )                |

Nach dem Autoklavieren wurden 1,5 mL/L einer 10 g/L FeSO<sub>4</sub>-Lösung steril hinzufiltriert.

Das Medium wurde zur Anzucht von *D. gigas* verwendet.

| РΒ | (Stammmedium) [101]: | 0,5 | g/L | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |
|----|----------------------|-----|-----|--------------------------------------|
| pН | 7,5                  | 0,5 | g/L | NH <sub>4</sub> CI                   |
|    |                      | 1,3 | g/L | CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O |
|    |                      | 2,0 | g/L | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O |
|    |                      | 4,0 | g/L | Na-L- Lactat                         |
|    |                      |     |     | (60 Gew. % in $H_2O$ )               |
|    |                      | 1,0 | g/L | Hefe-Extrakt                         |
|    |                      | 0,1 | g/L | Na-Ascorbat                          |
|    |                      | 0,5 | g/L | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O |
|    |                      | 0,1 | g/L | Thioglycolsäure                      |
|    |                      |     |     |                                      |

Das Medium wurde zur Herstellung einer Stammkultur verwendet, die bis zu drei Monate bei 4 °C gelagert werden konnte.

## 8.3.2 Medien zur Anzucht von E. coli

| SOC-Medium [102]:          | 0,5  | g/L      | NaCl                         |
|----------------------------|------|----------|------------------------------|
| pH 7,0                     | 20,0 | g/L      | Trypton                      |
|                            | 5,0  | g/L      | Hefe-Extrakt                 |
|                            | 10,0 | mL       | 250 mM KCI Lösung            |
| kurz vor Gebrauch zugeben: | 3,6  | mL       | 20 % Glucose Lösung          |
|                            | 5,0  | mL       | 2 M MgCl <sub>2</sub> Lösung |
|                            | -    | ۰.<br>۱۰ | 1                            |

Das Medium wurde während der Transformation benötigt.

| LB-Medium [102]: | 10 | g/L | NaCl         |
|------------------|----|-----|--------------|
| pH 7,4           | 10 | g/L | Trypton      |
|                  | 5  | g/L | Hefe-Extrakt |

Nach dem Autoklavieren wurden bei Bedarf 100 mg/L Penicillin zugegeben. Das Medium wurde zur Anzucht des *E. coli* Stammes Nova Blue benötigt, der für die Amplifizierung des Plasmids verwendet wurde.

| 2xYT-Medium [102]: | 5  | g/L | NaCl         |
|--------------------|----|-----|--------------|
|                    | 16 | g/L | Trypton      |
|                    | 10 | g/L | Hefe-Extrakt |

Der pH-Wert liegt bei 7,3 und musste daher nicht eingestellt werden. Nach Autoklavieren werden auch hier bei Bedarf 100 mg/L Penicillin zugegeben. Das Medium wurde zur Überexpression des nativen Proteins und der Mutanten in *E. coli* BL21 (DE3) verwendet.

# 8.4 Anzucht von *Desulfovibrio gigas* und Gewinnung des rekombinanten *D. gigas* Ferredoxin II

Die Arbeiten mit *Desulfovibrio gigas* wurden ausschließlich in einer anaeroben Glovebox durchgeführt, in der eine Stickstoff-Atmosphäre mit 2-5 % Wasserstoff-Anteil herrscht. Sowohl der Wasserstoff- als auch der Sauerstoff-Gehalt wurden kontinuierlich mit Hilfe eines Detektors kontrolliert. Eventuell in die Box eindringender Sauerstoff wurde durch einen Palladiumkatalysator mit Hilfe des Wasserstoffs zu Wasser umgesetzt, so dass der Sauerstoff-Gehalt unter 1 ppm lag.

Um das rekombinante *D. gigas* Ferredoxin II (Fd II) zu gewinnen, musste zunächst die genomische DNA aus den angezüchteten *D. gigas* Zellen isoliert und aufgereinigt werden. Anschließend wurde das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Die auf diese Weise erhaltene DNA-Sequenz wurde in einen *E. coli* -Expressionsvektor (pET-52b(+) 3C/LIC) kloniert und anschließend amplifiziert. Nach Hitzeschock-Transformation der kompetenten *E. coli* Zellen mit dem gewonnenen Plasmid (Vektor mit DNA-Fragment) wurde eine Zellkultur in größerem Maßstab erzeugt, aus der das rekombinante Ferredoxin isoliert werden konnte.

Die angewendeten Methoden sind im Folgenden detailliert beschrieben.

#### 8.4.1 Extraktion der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines Qiagen Kits (Genomic DNA Buffer Set Cat. No. 190 60) aus *D. gigas* Zellen gewonnen. Aus einem Liter Zellkultur konnten ca. 5 g Zellen für die Extraktion geerntet werden. Zur Extraktion der DNA wurde das vom Hersteller beschriebene Standardverfahren für die DNA-Extraktion aus Bakterien angewendet (Handbuch Qiagen Genomic DNA Handbook 08/2001, S. 44). Die Qualität der extrahierten DNA wurde anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### 8.4.2 Agarose – Gelelektrophorese

Die Agarose – Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren und der Abschätzung der Konzentration einer vorliegenden DNA-Lösung durch Vergleich mit gleichzeitig aufgebrachten Referenzsubstanzen. Hierzu wurden 6  $\mu$ L der DNA-Lösung mit 4  $\mu$ L Ladepuffer (15 % Glycerin, 100 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylenblau) gemischt und auf das Gel (1% Agarose in 1x TAE – Puffer / 7 cm x 10 cm) aufgebracht. Die 50 Minuten dauernde Elektrophorese fand in 1x TAE-Puffer bei 110 V statt. Im Anschluss wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1  $\mu$ g/mL) ca. 15 Minuten eingefärbt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar und können anhand ihrer Größe identifiziert werden. Die Konzentration der DNA-Lösung ließ sich durch Vergleich der Intensität der gewünschten Bande mit der Intensität einer Referenzbande des Markers (NEB QuickLoad 100 bp/1kb DNA Ladder) abschätzen.

### 8.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die gewünschten DNA-Fragmente konnten mit Hilfe der PCR in vitro amplifiziert werden. Für die im Laufe der Arbeit durchgeführten Mutationen wurden die folgenden Primer verwendet:

## D. gigas Fdll Wildtyp

| Vorwärtsprimer:  | 5'-CAGGGACCCGGTATGCCTATCGAAGTC-3' | T <sub>m</sub> = 73,0 °C |
|------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Rückwärtsprimer: | 5'-GGCACCAGAGCGTTGGACCGAATGAT-3'  | T <sub>m</sub> = 71,0 °C |

#### Primer für die im Laufe der Arbeit durchgeführten Mutationen:

#### D. gigas Fdll C12F

| Vorwärtsprimer:  | 5'-TGACGATTGCATGGCCTTTGAAGCCTGTGTGG-3' | T <sub>m</sub> = 75,0 °C |
|------------------|--|--------------------------|
| Rückwärtsprimer: | 5'-CCACACAGGCTTCAAAGGCCATGCAATCGTCA-3' | T <sub>m</sub> = 75,0 °C |

#### D. gigas Fdll C12S

| Vorwärtsprimer:  | 5'-GACGATTGCATGGCCAGTGAAGCCTGTGTGG-3' | T <sub>m</sub> = 76,0 °C |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Rückwärtsprimer: | 5'-CCACACAGGCTTCACTGGCCATGCAATCGTC-3' | T <sub>m</sub> = 76,0 °C |

D. gigas Fdll C12W

| Vorwärtsprimer:  | 5'-CGATTGCATGGCCTGGGAAGCCTGTGTGGAA-3' | T <sub>m</sub> = 76,0 °C |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Rückwärtsprimer: | 5'-TTCCACACAGGCTTCCCAGGCCATGCAATCG-3' | T <sub>m</sub> = 76,0 °C |

D. gigas Fdll C12Y

| Vorwärtsprimer:  | 5'-CGATTGCATGGCCTGGGAAGCCTGTGTGGAA-3' | T <sub>m</sub> = 75,0 °C |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Rückwärtsprimer: | 5'-TTCCACACAGGCTTCCCAGGCCATGCAATCG-3' | T <sub>m</sub> = 75,0 °C |

Die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) des jeweiligen Primers wurde den Angaben des Herstellers entsprechend übernommen.

Für die Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments kam der folgende Ansatz mit optimiertem PCR-Programm zur Anwendung:

Ansatz:

| 5,0  | μL | 10 x MgCl <sub>2</sub> PCR-Puffer |
|------|----|-----------------------------------|
| 1,5  | μL | 50 mM/L MgCl <sub>2</sub>         |
| 5,0  | μL | 2 mM/L dNTP                       |
| 2,0  | μL | 25 µM Forwärtsprimer              |
| 2,0  | μL | 25 µM Rückwärtsprimer             |
| 0,5  | μL | 5000 Units/mL Taq-Polymerase      |
| 27,5 | μL | <i>D. gigas</i> genomische DNA    |
| 5,0  | μL | 10 x PCR Enhancer                 |
| 1,5  | μL | Wasser (steril / tri-dest.)       |
|      |    |                                   |

PCR:

| Initialisierung   | 95 °C | 5 Min                |
|-------------------|-------|----------------------|
| Denaturierung     | 95 °C | ر 0,5 Min            |
| Annealing         | 73 °C | 0,5 Min<br>30 Zyklen |
| Elongation        | 72 °C | 2 Min J              |
| finale Elongation | 72 °C | 5 Min                |

Das folgende optimierte PCR-Programm kam für Einführung der Punktmutationen zur Anwendung:

Ansatz:

| 5,0          | μL      | 10 x Mg0 | Cl <sub>2</sub> F | PCR-I     | Put  | ffer                        |
|--------------|---------|----------|-------------------|-----------|------|-----------------------------|
| 5,0          | μL      | 2 mM/L o | ITN               | D         |      |                             |
| 2,0          | μL      | 25 µM Fo | orwä              | irtspri   | me   | er                          |
| 2,0          | μL      | 25 µM R  | ückv              | värtsp    | orin | ner                         |
| 1,0          | μL      | 2500 Un  | its/m             | nL Pfu    | I-P  | olymerase                   |
| 2,0          | μL      | Plasmid  | für V             | Vildty    | pül  | berexpression (siehe 8.4.4) |
| 33,0         | μL      | Wasser ( | ster              | il / tri- | de   | st.)                        |
| PCR:         |         |          |                   |           |      |                             |
| Initialisier | ung     | 95 °C    | 0,5               | Min       |      |                             |
| Denaturie    | erung   | 95 °C    | 0,5               | Min       | ٦    |                             |
| Annealing    | )       | 73 °C    | 1                 | Min       | ł    | 18 Zyklen                   |
| Elongatio    | n       | 72 °C    | 6                 | Min       | J    |                             |
| finale Elo   | ngation | 72 °C    | 1                 | Min       |      |                             |

Die Annealing-Temperatur musste so ungewöhnlich hoch gewählt werden, da die Versuche zur Optimierung der Methode zeigten, dass bei einer niedrigeren Temperatur die DNA-Amplifizierung nicht ausreichend spezifisch war. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe einer Agarose – Gelelektrophorese, bei der zunächst etwaige Verunreinigungen abgetrennt wurden. Das gewünschte amplifizierte DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Extraktions-Kits (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) entsprechend des im Handbuch (QIAquick Spin Handbook 03/2001, S. 23) beschriebenen Standardverfahrens isoliert.

#### 8.4.4 Herstellung, Extraktion und Amplifizierung der Plasmid-DNA

Entsprechend der Hersteller-Vorschrift (Novagen, Userprotokoll TB453 Rev. B 0107) wurde das amplifizierte DNA-Fragment zunächst mit T4 DNA Polymerase behandelt, bevor es mit dem Vektor pET-52b(+) 3C/LIC inkubiert wurde, um das gewünschte Plasmid zu erhalten. Bei dem hier gewählten Vektor handelte

es sich um einen ligationsunabhängigen Vektor, dessen Vorteil darin besteht, dass er mit nicht-komplementären Einzelstrangüberhängen linearisiert vorliegt, so dass die Vorbereitung des Vektors vor Einfügen des zu amplifizierenden DNA-Fragments durch Restriktionsverdau entfiel (genauere Vektorinformationen siehe Kapitel 10.1). Anschließend erfolgte die Transformation der zur Amplifizierung im Kit enthaltenen Nova Blue *E. coli* Zellen.

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Extraktions-Kits (GE Healthcare, illustra plasmidPrep Mini Spin) aus den Nova Blue Zellen gemäß dem beigefügten Handbuch (Userprotokoll TB453 Rev. B 0107) gewonnen. Die Qualität des extrahierten Plasmids wurde auch hier anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 8.4.2). Mit der genauen Sequenzanalyse wurde die Firma Sequiserve GmbH (Vaterstetten) beauftragt.

#### 8.4.5 Herstellung kompetenter Zellen

Zunächst wurden die CaCl<sub>2</sub> kompetenten Zellen nach der von Mandel und Higa beschriebenen Methode [103] hergestellt:

Über Nacht wurde eine 30 mL Vorkultur des gewünschten Zellstammes in LB-Medium unter Schütteln und bei 37 °C angezüchtet. Anschließend wurden 500 mL LB-Medium mit 500  $\mu$ L der Vorkultur inokuliert. Erreichte die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,6, wurde die Kultur auf Eis gestellt. Die Zellen wurden nun abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 10 Min) und danach in 15 mL einer eisgekühlten 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 45 mL einer eisgekühlten 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde erneut abzentrifugiert. Das Resuspendieren und Abzentrifugieren wurde nun viermal wiederholt. Nach dem letzten Resuspendieren wurde die Suspension für 1 Stunde auf Eis inkubiert, bevor erneut abzentrifugiert wurde. Es war darauf zu achten, dass die Zellen nie länger als 2 Minuten ungekühlt blieben. Das Pellet wurde nun in ca. 3 mL einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, die 15 % Glycerol enthielt. Die kompetenten Zellen wurden entweder sofort verwendet oder bis zur Benutzung in 100  $\mu$ L Portionen abgefüllt und bei – 80 °C eingefroren.

#### 8.4.6 Transformation und Überexpression in E. coli

CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) wurden mit der extrahierten und durch Gelelektrophorese (siehe 8.4.2) aufgereinigten Plasmid-DNA transformiert. Hierzu wurden zu 50 µL der kompetenten Zellen 5 µL des Plasmids gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, bevor sie erneut für 2 Minuten im Eisbad inkubiert wurden. Nach der Zugabe von 950 µL vorgewärmtem SOC-Medium wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen ausplattiert. Von einzelnen Kolonien wurden Kulturen angezogen, das Plasmid wurde isoliert und erneut sequenziert. Von den Kulturen, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden Gefrierkulturen hergestellt. Anschließend wurde das Protein dem folgenden Protokoll entsprechend überexprimiert:

2 μL der angelegten Gefrierkultur wurden in 10 mL 2xYT-Medium gegeben und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit 5 mL dieser Vorkultur wurden nun 2 L Medium inokuliert und unter Schütteln und Sauerstoffbegasung bei 37 °C inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> = 1 erreichte. Daraufhin wurde die Temperatur auf 28 °C gesenkt und die Kultur wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Am nächsten Tag (ca. 18 Stunden später) wurden die Zellen mit Hilfe einer Kühlzentrifuge (15 Min, 7500 rpm, 4 °C) geerntet und bei -80 °C eingefroren. Pro Liter Medium wurden ca. 6,5 g Zellpellet erhalten.

#### 8.4.7 Mutationen

Im Verlauf der Arbeit wurden die Punktmutationen an der Sequenz des *D. gigas* Ferredoxin II entsprechend des vom Hersteller Stratagene bereitgestellten Skripts (QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit) durchgeführt.

Die folgenden Mutanten wurden hergestellt:

#### D. gigas Fdll C12F

MPIEVNDDCMAFEACVEICPDVFEMNEEGDKAVVINPDSDLDCVEEAIDSCPAEAIIRS

## D. gigas Fdll C12S

MPIEVNDDCMASEACVEICPDVFEMNEEGDKAVVINPDSDLDCVEEAIDSCPAEAIIRS

# D. gigas Fdll C12W

MPIEVNDDCMAWEACVEICPDVFEMNEEGDKAVVINPDSDLDCVEEAIDSCPAEAIIRS

## D. gigas Fdll C12Y

MPIEVNDDCMAYEACVEICPDVFEMNEEGDKAVVINPDSDLDCVEEAIDSCPAEAIIRS

Die mutierte Aminosäure ist jeweils in rot dargestellt.

Es wurden das im Kapitel 8.4.3 bereits beschriebene PCR-Programm und die dort aufgeführten Primer verwendet. Als Templat für die PCR wurde das Plasmid, das für die Überexpression des Wildtyp-Proteins verwendet wurde, eingesetzt. Nach der Überprüfung der PCR-Produkte durch Sequenzierung wurden Transformation und Überexpression wie in Kapitel 8.4.5 beschrieben durchgeführt.

## 8.4.8 Proteinaufreinigung

Das gewonnene Zellpellet (Abschnitt 8.4.6) wurde in Puffer resuspendiert und mit Hilfe eines Dispergiergerätes in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Nach anschließendem Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge (45 Min, 1500 rpm, 4 °C) und der Ultrazentrifuge (1 Stunde, 50000 rpm, 4 °C) wurde das gewünschte Protein mit Hilfe einer ÄKTA aus dem Rohlysat isoliert. Da das gewünschte Protein nach der Expression mit einem N-terminalen Strep-Tag versehen ist, wurde die Aufreinigung über eine Strep-Tactin Säule vorgenommen. Der genaue Verlauf des Gradienten ist in Abb. 8.1 dargestellt. Verwendet wurden als Waschpuffer 1 M Tris, pH 8, mit 1,5 M NaCl und als Elutionspuffer diente der Waschpuffer, dem 25 mM D-Desthiobiotin zugesetzt wurden.



Abb. 8.1: Programm, das für die Aufreinigung der Proteine mit Hilfe der ÄKTA verwendet wurde

Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese auf ihre Proteinzusammensetzung getestet und die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt. Für die Gelelektrophorese wurden ca. 10 µL der Probe und 2 µL SDS-Gel Ladepuffer (nach Maniatis [102]) für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend auf ein NuPAGE 4-12 % TRIS Gel (Invitrogen) gegeben. Als Laufpuffer wurde MES verwendet und der See-Blue Plus 2 Prestained Standard von Invitrogen diente als Marker. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit PhastGel Blue R (Pharmacia) gefärbt.

| MES-Puffer: | 50,0 | mМ | MES  |
|-------------|------|----|------|
| рН 7,3      | 50,0 | mМ | TRIS |
|             | 3,5  | mМ | SDS  |
|             | 1,0  | mМ | EDTA |

## 8.4.9 Western Blotting

Das Protein wurde mit Hilfe des Halb-Trocken-Blotverfahrens (semi-dry-blot) vom Gel auf eine 0,2 µm PVDF – Membran (BIO RAD) übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran in Methanol getränkt. Der Transfer wurde mit einer für 3 Stunden angelegten Spannung von 25 V bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die folgenden Waschschritte bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln durchgeführt:

| 2 x | 10 Min | Waschpuffer                            |
|-----|--------|--|
| 1 x | 1 h    | Blockpuffer                            |
| 2 x | 10 Min | Tween-Puffer                           |
| 2 x | 10 Min | Waschpuffer                            |
| 1 x | 1 h    | Anti Strep-Puffer bzw. Anti His-Puffer |
| 2 x | 10 Min | Tween-Puffer                           |
| 2 x | 10 Min | Waschpuffer                            |
| 1 x | 1 h    | Anti mouse-Puffer                      |
| 2 x | 10 Min | Tween-Puffer                           |
| 4 x | 10 Min | Waschpuffer                            |

Anschließend wurde die Membran gefärbt. War die Färbung ausreichend, wurde der Prozess durch kurzes Abspülen mit Wasser gestoppt. Parallel hierzu wurde das Ursprungsgel gefärbt (siehe 8.4.8), um zu garantieren, dass der Transport vom Gel auf die Membran stattgefunden hatte.

## Verwendete Puffer:

| Transferpuffer:     | 20 % (v/v) Methanol in MES-Puffer (siehe 8.4.8)        |
|---------------------|--|
| Waschpuffer:        | 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM Tris, 600 mM NaCl,         |
|                     | 0,4 mM Pefabloc, 0,5 ‰ (v/v) β-Mercaptoethanol         |
| Blockpuffer:        | 13 µM Bovines Serumalbumin (BSA) in Waschpuffer        |
| Tween–Puffer:       | 0,5 ‰ (v/v) Tween20 in Waschpuffer                     |
| Anti Strep-Puffer:  | 0,2 ‰ (v/v) Anti-Strep-Tag II (Novagen) in Blockpuffer |
| Anti Rabbit-Puffer: | 0,2 ‰ (v/v) Anti Mouse (Invitrogen) in Blockpuffer     |
| Färbepuffer:        | 1 NBT/BCIP Ready-to-Use Tablet (Roche) in 10 mL Wasser |

# 8.5 Clusterrekonstitution der Proteine

Die aus der Aufreinigung (siehe Kapitel 8.4.8) gewonnenen Fraktionen, die das gewünschte *D. gigas* Ferredoxin enthielten, wurden in eine Glovebox mit anaerober Atmosphäre gebracht. Da die Aufreinigung des Proteins aerob erfolgte, war auch der eventuell noch im Protein gebundene Cluster vollständig oxidiert. Um diesen Cluster von dem Protein zu trennen, wurde das Protein dreimal mit 5 % Trichloressigsäure gefällt. Durch Zusatz von Mercaptoethanol während der Fällung wurde die Bildung von Cystinbrücken verhindert. Nach der Fällung wurde der Niederschlag in 50 mM Tris Puffer mit 60 mM Mercaptoethanol resuspendiert.

Um den Cluster zu rekonstituieren, wurde zunächst eine 60 mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung zugegeben. Nach ca. 30 Minuten wurde eine 60 mM Na<sub>2</sub>S-Lösung zugegeben. Eisen und Sulfid wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Das Verhältnis der Eisen- bzw. Sulfidionen zum Protein betrug 3:1. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten wurde die Lösung über eine PD-10 Säule entsalzt.

# 8.6 Festphasen Peptidsynthese (SPPS)

Die Festphasen Peptidsynthese wurde mit Hilfe eines Synthesizers durchgeführt, der mit der Fmoc/*t*-Bu-Methode arbeitet. Hierbei wurde ein PAL-PEG-PS – Harz verwendet, auf dem die gewünschte Sequenz aufgebaut wurde. Die Verwendung dieses Harzes führte dazu, dass die synthetisierte Sequenz nach der Abspaltung vom Harz am C-Terminus als Säureamid vorlag. Die zum Aufbau der Sequenz verwendeten Aminosäuren waren am N-Terminus zunächst durch eine Fmoc-Gruppe geschützt, die mit Hilfe von 25 % Piperidin in DMF abgespalten werden konnte. Des Weiteren waren die Aminosäuren mit den folgenden Seitenketten-Schutzgruppen versehen (vgl. Tabelle 3.1): *t*-Bu (*tert*-Butyl): Asp, Glu, Ser, Thr,

t-Bu (tert-Butyl):Asp, Glu, Ser, Thr,<br/>TyrBoc (tert-Butyloxycarbonyl):Lys, TrpTrt (Trityl):Asn, Gln, His, CysPbf (2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl):Arg
Die Aminosäuren Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, und Val wurden ohne Seitenketten-Schutzgruppe verwendet.

Die Systemflüssigkeit, im folgenden DMF-DE genannt, bestand aus Dimethylformamid (DMF), das mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 25 % Diethylether versetzt wurde. Die für die Kopplung nötigen Reagenzien DIPEA, Collidin, PyBOP und HATU, sowie die Aminosäuren wurden für die Synthese in N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) mit 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und im folgenden molaren Verhältnis zueinander eingesetzt:

Harz : PyBOP/HATU : DIPEA/Collidin : Aminosäure

1 : 5 : 10 : 5

Das folgende Beispiel zeigt den schrittweisen Ablauf der Peptidsynthese:

Zu Beginn der Synthese wurden 227 mg Harz (0,22 mmol/g  $\cong$  0,05 mM) in DMF-DE gequollen. Um anschließend das Harz zu entschützen, wurde drei Mal eine 25 % Piperidinlösung in hundert-fachem Überschuss zugegeben. Nach sechsmaligem Waschen mit DMF-DE, wurde die Kopplung der Aminosäure durchgeführt. Hierzu wurden in einem ersten Kopplungsschritt die Aminosäure und das Kopplungsreagenz PyBOP in fünf-fachem Überschuss, die Base DIPEA in zehn-fachem Überschuss zugegeben. Der zweite Kopplungsschritt erfolgte dem ersten Kopplungsschritt entsprechend, jedoch wurde das Kopplungsreagenz HATU verwendet. Diese Kopplungszeiten betrugen je nach Aminosäure eine bis drei Stunden. Erwies sich eine Kopplung als unzureichend, wurde die Kopplung wiederholt.

Die Entschützungs- und Kopplungsschritte wurden wiederholt, bis die vollständige Sequenz aufgebaut war. Im Anschluss an die Kopplung wurde erneut eine Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe mit Piperidin durchgeführt. Das Harz wurde daraufhin sechs Mal mit DMF-DE, zwei Mal mit Methanol und fünf Mal mit Dichlormethan gewaschen. Nach zweistündigem Trocknen des Harzes unter Argon wurden durch Zugabe der Abspaltlösung, bestehend aus 30 mL Trifluoressigsäure (TFA), 0,75 mL Anisol, 1,75 mL Thioanisol und 1,0 mL Ethandithiol, alle Seitenkettenschutzgruppen entfernt

93

und das fertige Peptid vom Harz abgespalten. Die vereinigten Abspaltlösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Ölpumpenvakuum stark eingeengt.

Um eventuell oxidierte Methionin-Seitenketten zu reduzieren, wurde der Rückstand mit 150 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 2,4 mL Ethandithiol und 2,1 mL Chlortrimethylsilan versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Einengen im Ölpumpenvakuum wurde der Rückstand mit Ether/Pentan verrieben, abgesaugt und 5 x mit Diethylether gewaschen. Danach wurde der erhaltene Feststoff mit Essigsäure / Wasser aufgenommen, lyophilisiert und mit Hilfe der HPLC aufgereinigt (siehe 8.7). Da im Verlauf dieser Arbeit ein PAL-PEG-PS Harz verwendet wurde, waren die synthetisierten Peptide am C-Terminus amidiert.

C-Terminus

Es wurden die folgenden Sequenzen hergestellt:

#### DmsB-P

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIGCRYCHMA

#### DmsB-P C27T

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIG<mark>T</mark>RYCHMA

#### DmsB-P C27S

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIG<mark>S</mark>RYCHMA

#### DmsB-P C27F

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIG<mark>F</mark>RYCHMA

## DmsB-P C27Y

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIG<mark>Y</mark>RYCHMA

## DmsB-P C27V

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIG<mark>V</mark>RYCHMA

## DmsB-P C27W

TKVCPSGAMHKREDGFVVVDEDVCIG<mark>W</mark>RYCHMA

## DmsB-P C4F

TKV<mark>F</mark>PSGAMHKREDGFVVVDEDVCIGCRYCHMA

## DmsB-P C4Y

TKV<mark>Y</mark>PSGAMHKREDGFVVVDEDVCIGCRYCHMA

Die gelb markierte Aminosäure ist im nativen System ein Cystein und koordiniert einen [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster.

## 8.7 Aufreinigung und Charakterisierung der Peptide

Die durch Festphasen-Peptidsynthese gewonnenen Peptide wurden mit Hilfe der HPLC entsprechend der in Tabelle 8.1 aufgeführten Gradienten gereinigt. Als Gradient wurde ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril verwendet, denen 0,1 % TFA zugesetzt wurde. Die verwendeten Lösemittel wurden vor Gebrauch entgast und unter Argon gehalten.

| Mutante   | Gradient        | Dauer des Gradienten |  |  |
|-----------|-----------------|----------------------|--|--|
|           | [% Acetonitril] | [min]                |  |  |
| DmsB      | 20,7 - 20,7     | 23                   |  |  |
| DmsB C27T | 23,0 - 25,0     | 55                   |  |  |
| DmsB C27S | 22,0 - 23,0     | 41                   |  |  |
| DmsB C27F | 27,0 - 27,0     | 25                   |  |  |
| DmsB C27Y | 25,0 - 25,0     | 40                   |  |  |
| DmsB C27V | 26,0 - 26,0     | 45                   |  |  |
| DmsB C27W | 26,5 - 26,5     | 35                   |  |  |
| DmsB C4F  | 26,0 - 30,0     | 30                   |  |  |
| DmsB C4Y  | 24,0 - 26,7     | 20                   |  |  |

Tabelle 8.1: Zur Peptidaufreinigung verwendete Gradienten

Im Anschluss an die präparative HPLC wurde die Homogenität der aufgereinigten Probe durch analytische HPLC mit Hilfe der oben aufgeführten Gradienten erneut überprüft. Des Weiteren wurden die Massenspektren der Peptide durch MALDI-TOF Massenspektrometrie aufgenommen. Als Matrices wurden α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und *trans*-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) verwendet, die Messgenauigkeit betrug ±0,1 % des Molekulargewichtes. Gemessen wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 20000 V. Durch Vergleich der berechneten Masse mit der tatsächlich gefundenen Masse wurden die HPLC-Fraktionen identifiziert, die das gewünschte Peptid enthalten.

## 8.8 Ellman-Test

Um die Peptidkonzentration einer Probe vor der Clusterrekonstitution zu bestimmen und so eine optimale Clusterrekonstitution zu gewährleisten, konnte nicht die im Allgemeinen vorhandene Eigenabsorption von Proteinen oder Peptiden bei 280 nm, verursacht durch Tryptophan, bestimmt werden. Da die hier synthetisierten Peptide kein Tryptophan enthalten, musste auf den Ellman-Test zurückgegriffen werden, mit dessen Hilfe sich die Konzentration der freien Cysteine und daraus folgend auch die Peptidkonzentration bestimmen ließ.

Für die Messung wurden in zwei Küvetten je 50  $\mu$ L 5,5'-Dithiobis(2nitrobenzoësäure)-Lösung (DTNB-Lösung), 100  $\mu$ L 1 M Tris, pH 8,0, und 840  $\mu$ L Wasser gegeben. In eine der beiden Küvetten (Referenz) wurden 10  $\mu$ L Wasser gegeben, in die andere Küvette 10  $\mu$ L der Peptidlösung. Die Lösungen wurden vorsichtig gemischt und anschließend 5 Minuten inkubiert. Anhand der anschließend gemessenen Absorption der Probe gegen die Referenz bei 412 nm konnte anhand der Gleichung 8.1 die Konzentration der Probe ermittelt werden.

$$\frac{OD_{412}}{13600 \ M^{-1} cm^{-1}} \cdot 100/4 \ \Rightarrow \ \frac{OD_{412}}{544 \ M^{-1} cm^{-1}} \qquad \qquad \text{Gleichung 8.1}$$

| DTNB-Lösung: | 50 mM | Natriumacetat |
|--------------|-------|---------------|
|              | 2 mM  | DTNB          |

## 8.9 Clusterrekonstitution der Peptide

Für die Rekonstitution der Cluster wurde ein Verfahren gewählt, das bereits für die Rekonstitution von [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern verwendet wurde [104, 105]. Alle Arbeiten werden in einer Glovebox durchgeführt, in der der Sauerstoff-Gehalt unter 1 ppm liegt (siehe auch 8.4). Bei diesem Verfahren wurde das gewünschte Peptid in 50 mM Tris-Puffer pH 8,3 (50 mL / g Peptid) gelöst. Zu der Lösung wurden pro mg Peptid 0,4 mL  $\beta$ -Mercaptoethanol, 150  $\mu$ L einer 60 mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung und 150  $\mu$ L einer 60 mM Na<sub>2</sub>S-Lösung zugetropft.

Zwischen der Zugabe der Lösungen wurde jeweils für 20 Minuten inkubiert. Um die Bildung von Eisensulfid zu vermeiden, musste darauf geachtet werden, dass die Natriumsulfidlösung erst dann langsam zugetropft wurde, nachdem die Lösung ihre tiefrote Färbung verloren hatte und hellgelb geworden war.

Abweichend von dem in der Literatur beschriebenen Verfahren wurde nicht über Nacht inkubiert, sondern sofort mit der Aufkonzentrierung der Probe begonnen, da gefunden wurde, dass eine längere Inkubationszeit sowohl die Bildung von [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster zu ungunsten des [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters als auch die Bildung von Eisensulfid begünstigte.

Nachdem die Lösung mit einer Amicon Zelle auf ca. 1,5 mL aufkonzentriert wurde, wurde das überschüssige Eisenchlorid und Natriumsulfid über zwei aufeinander folgende Entsalzungssäulen (Sephadex G-25 / PD-10) abgetrennt. Nach weiterem Aufkonzentrieren auf ca. 600 µL wurden 200 µL der Probe zur UV-Messung in eine gasdichte Küvette gegeben. Weitere 200 µL wurden in ein EPR-Röhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die restlichen 200 µL wurden durch Zugabe von 25 µL einer 1 M Glycinlösung (pH 10) und 25 µL 0,35 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in 1 M Glycinlösung reduziert. Auch diese Probe wurde in ein EPR-Röhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die EPR Proben wurden bis zur Messung außerhalb der Glovebox bei –80 °C gelagert.

## 8.10 Koordinierung eines synthetisch hergestellten Clusters

Um den von Frau Dr. Kinga Kulon am Institut chemisch synthetisierten Cluster (Et<sub>4</sub>N)<sub>3</sub>[Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>(SEt)<sub>3</sub>] mit Hilfe eines der Maquettes zu koordinieren, wurde zunächst das Peptid, das als Maquette dienen sollte, in Tris-Puffer (50 mM / pH 8,3) gelöst. Anschließend wurde ein Äquivalent des Clusters in so wenig Acetonitril wie möglich gelöst. Da der Cluster sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff reagiert, wurden nur sorgfältig entgaste Lösemittel verwendet. Nach einer bzw. drei Stunden wurden die Proben wie in 8.8 bereits beschrieben aufgearbeitet.

## 8.11 UV/Vis-Spektroskopie

Alle UV/Vis-Messungen wurden in gasdichten Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,5 cm unter Verwendung einer Referenzprobe des jeweiligen Puffers durchgeführt.

## 8.12 Elektron-Paramagnetische Resonanz Spektroskopie

Die EPR-Spektren wurden mit einem X-Band EPR Spektrometer aufgenommen. Da die Messbedingungen variiert wurden, werden Parameter wie Temperatur, Mikrowellenfrequenz, Modulationsamplitude, und Mikrowellenleistung in den jeweiligen Spektren angegeben.

## 8.13 Zyklovoltammetrie

Die Messungen wurden in einer Drei-Elektroden-Zelle aus Glas durchgeführt. Als Referenz diente eine gesättigte Kalomelelektrode, die in einem Seitenarm von der Hauptkammer getrennt positioniert ist und durch eine Luggin-Kapillare mit dieser verbunden ist. Die Zelltemperatur wurde durch einen Wassermantel kontrolliert. Als Gegenelektrode diente ein Platindraht. Der Aufbau gewährleistete, dass die Referenzelektrode konstant bei Raumtemperatur arbeitete, so dass das gemessene Potential durch Addition von 0,241 V in das Potential gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) umgerechnet werden konnte. Alle in der Arbeit angegebenen Redoxpotentiale beziehen sich auf die Normalwasserstoffelektrode.

Für die Messungen in Lösungen wurde eine Elektrode aus Glaskohlenstoff (Durchmesser 5 mm) verwendet, die mit 0,5 µM Aluminiumoxid (Buehler) poliert und anschließend für 5 Minuten mit Wasser im Ultraschallbad gereinigt wurde.

Für die Messungen mit kovalent an die Elektrode gebundenen Proben wurde eine im Institut angefertigte Elektrode aus hochorientiertem pyrolytischem Graphit, dessen Graphitschichten orthogonal zur Elektrodenoberfläche verlaufen, (HOPG edge plane, Durchmesser 2 mm) genutzt. Das Protokoll für die Modifikation der Elektrode wurde durch Rüdiger 2009 beschrieben [106]. Die Elektrode wurde ebenfalls mit 0,5  $\mu$ M Aluminiumoxid poliert und anschließend für 5 Minuten mit Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Nach dem Trocknen in einem Stickstoffstrom wurde die Elektrode für 5 Minuten in eine 10 mM Lösung von 4-Nitrobenzol-diazoniumsalz (ABCR GmbH & Co, Germany) in Acetonitril getaucht. Anschließend wurde die Elektrode mit Acetonitril, Ethanol und Wasser gespült. Um die nun an der Elektrode befindlichen NO<sub>2</sub>-Gruppen zu NH<sub>2</sub>-Gruppen zu reduzieren und die Bindung des Peptids an die Elektrode zu ermöglichen, wurde die Elektrode in eine elektrochemische Zelle gebracht. Die Reduktion wurde durch Zyklovoltammetrie in einem Bereich von 0 bis -1 V bei einer Flussrate von 0,2 V/s in 0,1 M Schwefelsäure überprüft.

Um das Peptid an die Elektrode zu binden, wurden 4  $\mu$ L einer ca. 25  $\mu$ M Peptidlösung, 2,3  $\mu$ L einer 18  $\mu$ M N-Hydroxysuccinimid-Lösung (NHS) und 2,5  $\mu$ L einer 38  $\mu$ M 1-Ethyl-3-(3'-dimethylpropyl)carbodiimid-Lösung (EDC) auf die Elektrode gegeben. Nach ca. einer Stunde war die Reaktion abgeschlossen.

Die genauen Messparameter sind im jeweiligen Spektrum angegeben.

## 9 Literatur

- H. Beinert, R.H. Sands: Succinic and reduced diphosphopyridine nucleotide dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance spectroscopy, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1960, 3, 41-46
- [2] L.E. Mortenson, R.C. Valentine, J.E. Carnahan: An electron transport factor from Clostridium pasteurianum, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1962, 7, 448-452
- [3] K. Tagawa, D.I. Arnon: Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas, *Nature (London, U.K.)* 1962, 195, 537-543
- [4] H. Beinert: Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises, JBIC, J.Biol.Inorg.Chem. 2000, 5, 2-15
- [5] M. Fontecave: Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles, *Nat. Chem. Biol.* 2006, 2, 171-174
- [6] J.S. Rieske, D.H. MacLennan, R. Coleman: Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome c reductase complex of the respiratory chain, *Biochem.Biophys.Commun.* 1964, 15, 388-44
- J.S. Rieske, R.E. Hansen, W.S. Zaugg: Studies on the Electron Transfer system. 58. Properties of a new Oxidation-Reduction Component of the Respiratory Chain as studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *J Biol Chem* 1964, 239, 3017-3022
- [8] J.J.G. Moura, I. Moura, T.A. Kent, J.D. Lipscomb, B.H. Huynh, J. LeGall, A.V. Xavier, E. Munck: Interconversions of [3Fe-3S] and [4Fe-4S] clusters. Moessbauer and electron paramagnetic resonance

studies of Desulfovibrio gigas ferredoxin II, *J.Biol.Chem.* 1982, 257, 6259-6267

- [9] T.A. Kent, M.H. Emptage, H. Merkle, M.C. Kennedy, H. Beinert, E. Munck: Mossbauer studies of aconitase. Substrate and inhibitor binding, reaction intermediates, and hyperfine interactions of reduced 3Fe and 4Fe clusters, *J Biol Chem* 1985, 260, 6871-6881
- [10] S. Bian, J.A. Cowan: Protein-bound iron-sulfur centers. Form, function, and assembly, *Coord.Chem.Rev.* 1999, 190-192, 1049-1066
- [11] S. Ciurli, F. Musiani: High potential iron-sulfur proteins and their role as soluble electron carriers in bacterial photosynthesis: tale of a discovery, *Photosynth.Res.* 2005, 85, 115-131
- [12] J. Meyer: Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution, *JBIC, J.Biol.Inorg.Chem.* 2008, 13, 157-170
- [13] P.R. Chitnis: Photosystem I: Function and physiology, Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol. 2001, 52, 593-626
- [14] M.L. Kennedy, S. Silchenko, N.'. Houndonougbo, B.R. Gibney, P.L. Dutton, K.R. Rodgers, D.R. Benson: Model Hemoprotein Reduction Potentials: The Effects of Histidine-to-Iron Coordination Equilibrium, *J.Am.Chem.Soc.* 2001, 123, 4635-4636
- K. Chen, G.J. Tilley, V. Sridhar, G.S. Prasad, C.D. Stout, F.A.
  Armstrong, B.K. Burgess: Alteration of the reduction potential of the [4Fe-4S]2+/+ cluster of Azotobacter vinelandii ferredoxin I, *J.Biol.Chem.* 1999, 274, 36479-36487
- P.J. Stephens, D.R. Jollie, A. Warshel: Protein Control of Redox
  Potentials of Iron-Sulfur Proteins, *Chem.Rev.(Washington, D.C.)* 1996, 96, 2491-2513

- [17] H. Beinert, R.H. Holm, E. Munck: Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science (Washington, D.C.)* 1997, 277, 653-659
- [18] M.M. Werst, M.C. Kennedy, A.L. Houseman, H. Beinert, B.M. Hoffman: Characterization of the [4Fe-4S]+ cluster at the active site of aconitase by 57Fe, 33S, and 14N electron nuclear double resonance spectroscopy, *Biochemistry (Mosc).* 1990, 29, 10533-10540
- [19] F.W. Outten: Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches, *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 206-207
- [20] J.C. Crack, J. Green, N.E. Le Brun, A.J. Thomson: Detection of Sulfide Release from the Oxygen-sensing [4Fe-4S] Cluster of FNR, *J.Biol.Chem.* 2006, 281, 18909-18913
- [21] A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A.L. de Lacey, V.M. Fernandez, E.C. Hatchikian, M. Frey, J.C. Fontecilla-Camps: Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands, *J.Am.Chem.Soc.* 1996, 118, 12989-12996
- [22] Y. Higuchi, H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka, T. Yagi: Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H2, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 .ANG. resolution, *Structure (London)* 1999, 7, 549-556
- [23] Y. Higuchi, T. Yagi, N. Yasuoka: Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution x-ray structure analysis, *Structure (London)* 1997, 5, 1671-1680
- [24] Y. Higuchi, T. Okamoto, K. Fujimoto, S. Misaki, Y. Morimoto, N. Yasuoka: Location of active sites of NiFe hydrogenase determined by the combination of multiple isomorphous replacement and

multiwavelength anomalous-diffraction methods, *Acta Crystallogr., Sect.D: Biol.Crystallogr.* 1994, D50, 781-785

- [25] M. Teixeira, I. Moura, A.V. Xavier, J.J.G. Moura, J. LeGall, D.V. DerVartanian, H.D. Peck, Jr., B.H. Huynh: Redox intermediates of Desulfovibrio gigas [nickel-iron] hydrogenase generated under hydrogen. Moessbauer and EPR characterization of the metal centers, *J.Biol.Chem.* 1989, 264, 16435-16450
- [26] E. Garcin, X. Vernede, E.C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, J.C. Fontecilla-Camps: The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center, *Structure (London)* 1999, 7, 557-566
- [27] M. Rousset, Y. Montet, B. Guigliarelli, N. Forget, M. Asso, P. Bertrand, J.C. Fontecilla-Camps, E.C. Hatchikian: [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in Desulfovibrio fructosovorans [NiFe] hydrogenase by sitedirected mutagenesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998, 95, 11625-11630
- [28] H.E. Davenport, R. Hill, F.R. Whatley: Natural factor catalyzing reduction of methemoglobin by isolated chloroplasts, *Proc.R.Soc.London, Ser.B* 1952, 139, 346-358
- [29] H.E. Davenport, R. Hill: A protein from leaves catalyzing the reduction of hem-protein compounds by illuminated chloroplasts, *Biochem.J.* 1960, 74, 493-501
- [30] D.I. Arnon, F.R. Whatley, M.B. Allen: Triphosphopyridine nucleotide (TPN) as a catalyst of photosynthetic phosphorylation, *Nature* 1957, 180, 182-185
- [31] A. San Pietro, H.M. Lang: Photosynthetic pyridine nucleotide reductase. I. Partial purification and properties of the enzyme from spinach, *J.Biol.Chem.* 1958, 231, 211-229

- [32] H.S. Gewitz, W. Voelker: A respiratory enzyme from Chlorella, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 1962, 330, 124-131
- [33] R. Cammack: Iron-sulfur clusters in enzymes: themes and variations, Adv.Inorg.Chem. 1992, 38, 281-322
- [34] W.H. Orme-Johnson, H. Beinert: Reductive titrations of iron-sulfur proteins containing two to four iron atoms, *J.Biol.Chem.* 1969, 244, 6143-6148
- [35] Y. Takahashi, T. Hase, K. Wada, H. Matsubara: Ferredoxins in developing spinach cotyledons: the presence of two molecular species, *Plant Cell Physiol.* 1983, 24, 189-198
- [36] S.G. Sligar, I.C. Gunsalus: A thermodynamic model of regulation: Modulation of redox equilibria in camphor monoxygenase, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1976, 73, 1078-1082
- [37] M. Tanaka, M. Haniu, K.T. Yasunobu, K. Dus, I.C. Gunsalus: Amino acid sequence of putidaredoxin, an iron-sulfur protein from Pseudomonas putida, *J.Biol.Chem.* 1974, 249, 3689-3701
- [38] I. Hanukoglu, C.R. Jefcoate: Mitochondrial cytochrome P-450scc.
  Mechanism of electron transport by adrenodoxin, *J.Biol.Chem.* 1980, 255, 3057-3061
- [39] J.D. Lambeth, D.R. McCaslin, H. Kamin: Adrenodoxin reductase.adrenodoxin complex. Catalytic and thermodynamic properties, *J.Biol.Chem.* 1976, 251, 7545-7550
- [40] J.R. Mason, R. Cammack: The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases, *Annu.Rev.Microbiol.* 1992, 46, 277-305

- [41] M.H. Barros, F.G. Nobrega: YAH1 of Saccharomyces cerevisiae: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin, *Gene* 1999, 233, 197-203
- [42] R. Cammack, K.K. Rao, C.P. Bargeron, K.G. Hutson, P.W. Andrew,
  L.J. Rogers: Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins,
  *Biochem.J.* 1977, 168, 205-209
- [43] A.V. Grinberg, F. Hannemann, B. Schiffler, J. Muller, U. Heinemann, R. Bernhardt: Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 2000, 40, 590-612
- [44] J. Meyer, M.H. Bruschi, J.J. Bonicel, G.E. Bovier-Lapierre: Amino acid sequence of the [2Fe-2S] ferredoxin from Clostridium pasteurianum, *Biochemistry (Mosc).* 1986, 25, 6054-6061
- [45] M.P. Golinelli, C. Chatelet, E.C. Duin, M.K. Johnson, J. Meyer: Extensive Ligand Rearrangements around the [2Fe-2S] Cluster of Clostridium pasteurianum Ferredoxin, *Biochemistry (Mosc).* 1998, 37, 10429-10437
- [46] C. Chatelet, J. Meyer: Mapping the interaction of the [2Fe-2S] Clostridium pasteurianum ferredoxin with the nitrogenase MoFe protein, *Biochim.Biophys.Acta, Protein Struct.Mol.Enzymol.* 2001, 1549, 32-36
- [47] C. Chatelet, J. Gaillard, Y. Petillot, M. Louwagie, J. Meyer: A [2Fe-2S]
  Protein from the Hyperthermophilic Bacterium Aquifex Aeolicus, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999, 261, 885-889
- [48] J.J.G. Moura, A.V. Xavier, E.C. Hatchikian, J. Le Gall: Structural control of the redox potentials and of the physiological activity by oligomerization of ferredoxin, *FEBS Lett.* 1978, 89, 177-179
- [49] J.J.G. Moura, A.L. Macedo, P.N. Palma: Ferredoxins, *Methods Enzymol.* 1994, 243, 165-188

- [50] C. Moreno, A.L. Macedo, I. Moura, J. LeGall, J.J.G. Moura: Redox properties of Desulfovibrio gigas [Fe3S4] and [Fe4S4] ferredoxins and heterometal cubane-type clusters formed within the [Fe3S4] core. Square wave voltammetric studies, *J.Inorg.Biochem.* 1994, 53, 219-234
- [51] A.L. Macedo, I. Moura, K.K. Surerus, V. Papaefthymiou, M.Y. Liu, J. LeGall, E. Munck, J.J.G. Moura: Thiol/disulfide formation associated with the redox activity of the [Fe3S4] cluster of Desulfovibrio gigas ferredoxin II. 1H NMR and Moessbauer spectroscopic study, *J.Biol.Chem.* 1994, 269, 8052-8058
- [52] A.L. Macedo, P.N. Palma, I. Moura, J. LeGall, V. Wray, J.J.G. Moura: Two-dimensional 1H NMR studies on Desulfovibrio gigas ferredoxins. Assignment of the iron-sulfur cluster cysteinyl ligand protons, *Magn.Reson.Chem.* 1993, 31, S59-S67
- [53] A.L. Macedo, I. Moura, J.J.G. Moura, J. Le Gall, B.H. Huynh: Temperature-dependent proton NMR investigation of the electronic structure of the trinuclear iron cluster of the oxidized Desulfovibrio gigas ferredoxin II, *Inorg.Chem.* 1993, 32, 1101-1105
- [54] C.R. Kissinger, L.C. Sieker, E.T. Adman, L.H. Jensen: Refined crystal structure of ferredoxin II from Desulfovibrio gigas at 1.7 .ANG, *J.Mol.Biol.* 1991, 219, 693-715
- [55] J.J.G. Moura, A.L. Macedo, B.J. Goodfellow, I. Moura: Ferredoxins containing one [3Fe-4S] cluster. *Desulfovibrio gigas* ferredoxin II solution structure, In: Messerschmidt, A., Huber, R., Wieghardt, K., and Poulos, T. (Eds.), Handbook of Metalloproteins, Volume 1, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001, pp. 553-559
- [56] R. Cammack, K.K. Rao, D.O. Hall, J.J.G. Moura, A.V. Xavier, M. Bruschi, J. Le Gall, A. Deville, J.P. Gayda: Spectroscopic studies of the oxidation-reduction properties of three forms of ferredoxin from

Desulfovibrio gigas, *Biochim.Biophys.Acta, Protein Struct.* 1977, 490, 311-321

- [57] B.H. Huynh, J.J.G. Moura, I. Moura, T.A. Kent, J. LeGall, A.V. Xavier,
  E. Munck: Evidence for a three-iron center in a ferredoxin from
  Desulfovibrio gigas. Moessbauer and EPR studies, *J.Biol.Chem.* 1980, 255, 3242-3244
- [58] V. Papaefthymiou, J.J. Girerd, I. Moura, J.J.G. Moura, E. Muenck: Moessbauer study of D. gigas ferredoxin II and spin-coupling model for Fe3S4 cluster with valence delocalization, *J.Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 4703-4710
- [59] A.J. Thomson, A.E. Robinson, M.K. Johnson, J.J.G. Moura, I. Moura, A.V. Xavier, J. LeGall: The three-iron cluster in a ferredoxin from Desulphovibrio gigas. A low-temperature magnetic circular dichroism study, *Biochim.Biophys.Acta, Protein Struct.* 1981, 670, 93-100
- [60] M.R. Antonio, B.A. Averill, I. Moura, J.J.G. Moura, W.H. Orme-Johnson, B.K. Teo, A.V. Xavier: Core dimensions in the 3Fe cluster of Desulfovibrio gigas ferredoxin II by extended x-ray absorption fine structure spectroscopy, *J.Biol.Chem.* 1982, 257, 6646-6649
- [61] E.P. Day, J. Peterson, J.J. Bonvoisin, I. Moura, J.J.G. Moura: Magnetization of the oxidized and reduced three-iron cluster of Desulfovibrio gigas ferredoxin II, *J.Biol.Chem.* 1988, 263, 3684-3689
- [62] M.K. Johnson, J.W. Hare, T.G. Spiro, J.J.G. Moura, A.V. Xavier, J. LeGall: Resonance Raman spectra of three-iron centers in ferredoxins from Desulfovibrio gigas, *J.Biol.Chem.* 1981, 256, 9806-9808
- [63] S.E. Mulholland, B.R. Gibney, F. Rabanal, P.L. Dutton: Characterization of the Fundamental Protein Ligand Requirements of [4Fe-4S]2+/+ Clusters with Sixteen Amino Acid Maquettes, *J.Am.Chem.Soc.* 1998, 120, 10296-10302

- [64] S.E. Mulholland, B.R. Gibney, F. Rabanal, P.L. Dutton: Determination of Nonligand Amino Acids Critical to [4Fe-4S]2+/+ Assembly in Ferredoxin Maguettes, *Biochemistry (Mosc).* 1999, 38, 10442-10448
- [65] B.R. Gibney, S.E. Mulholland, F. Rabanal, P.L. Dutton: Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996, 93, 15041-15046
- [66] M.L. Antonkine, M.S. Koay, B. Epel, C. Breitenstein, O. Gopta, W. Gaertner, E. Bill, W. Lubitz: Synthesis and characterization of de novo designed peptides modelling the binding sites of [4Fe-4S] clusters in photosystem I, *Biochim.Biophys.Acta, Bioenerg.* 2009, 1787, 995-1008
- [67] M.L. Antonkine, E.M. Maes, R.S. Czernuszewicz, C. Breitenstein, E.
  Bill, C.J. Falzone, R. Balasubramanian, C. Lubner, D.A. Bryant, J.H.
  Golbeck: Chemical rescue of a site-modified ligand to a [4Fe-4S]
  cluster in PsaC, a bacterial-like dicluster ferredoxin bound to
  photosystem I, *Biochim.Biophys.Acta, Bioenerg.* 2007, 1767, 712-724
- [68] S.K. Chamorovsky, R. Cammack: Direct determination of the midpoint potential of the acceptor X in chloroplast photosystem I by electrochemical reduction and ESR spectroscopy, *Photobiochem.Photobiophys.* 1982, 4, 195-200
- [69] M.P. Scott, J. Biggins: Introduction of a [4Fe-4S (S-cys)4]+1,+2 ironsulfur center into a four-alpha helix protein using design parameters from the domain of the Fx cluster in the Photosystem I reaction center, *Protein Sci* 1997, 6, 340-346
- [70] W.V. Sweeney, J.C. Rabinowitz: Proteins containing 4Fe-4S clusters: an overview, *Annu.Rev.Biochem.* 1980, 49, 139-161
- [71] J.M. Mouesca, B. Lamotte: Iron-sulfur clusters and their electronic and magnetic properties, *Coord. Chem. Rev.* 1998, 178-180, 1573-1614

- [72] R.A. Rothery, J.H. Weiner: Alteration of the iron-sulfur cluster composition of Escherichia coli dimethyl sulfoxide reductase by sitedirected mutagenesis, *Biochemistry (Mosc).* 1991, 30, 8296-8305
- [73] J.J.G. Moura, A.L. Macedo, B.J. Goodfellow, I. Moura: Ferredoxins containing one [3Fe-4S] cluster. Desulfovibrio gigas ferredoxin II solution structure, *Handb.Metalloproteins* 2001, 1, 553-559
- [74] B. Chen, N.K. Menon, L. Dervertarnian, J.J.G. Moura, A.E. Przybyla: Cloning, sequencing and overexpression of the Desulfovibrio gigas ferredoxin gene in E. coli, *FEBS Lett.* 1994, 351, 401-404
- [75] Lehninger Albert ., Nelson David L., Cox Michael M.: Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg -Berlin - Oxford, 1994.
- [76] L. Stryer, Editor.: Biochemistry, 4th Revised Edition, 1996, 1100
- [77] A.L. Lehninger: Biochemie, 2. Auflage, VCH, Weinheim, 1987.
- [78] R.B. Merrifield: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J.Am.Chem.Soc.* 1963, 85, 2149-2154
- [79] J.M. Stewart, J. D. Young: Solid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1984.
- [80] B. Gutte, Editor.: Peptides: Synthesis, Structures, and Applications, Academic Press, San Diego, 1995.
- [81] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt: Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1997.
- [82] W.C. Chan, P. D. White, Editors.: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, 2000.

- [83] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen: New coupling reagents in peptide chemistry, *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 1927-1930
- [84] X. Wang, S. Niu, X. Yang, S.K. Ibrahim, C.J. Pickett, T. Ichiye, L. Wang: Probing the intrinsic electronic structure of the cubane [4Fe-4S] cluster: nature's favorite cluster for electron transfer and storage, *J Am Chem Soc* 2003, 125, 14072-14081
- [85] T. Ohnishi: Iron-sulfur clusters/semiquinones in Complex I, Biochim.Biophys.Acta, Bioenerg. 1998, 1364, 186-206
- [86] M.S. Koay, M.L. Antonkine, W. Gaertner, W. Lubitz: Modelling lowpotential [Fe4S4] clusters in proteins, *Chem.Biodiversity* 2008, 5, 1571-1587
- [87] J.R. Pilbrow: Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance, Clarenden Press, Oxford, 1990.
- [88] R. Cammack, E. Gay, J.K. Shergill: Studies of hyperfine interactions in [2Fe-2S] proteins by EPR and double resonance spectroscopy, *Coord.Chem.Rev.* 1999, 190-192, 1003-1022
- [89] O. Salomon: Charakterisierung des Ladungstransfers von immobilisiertem Cytochrom *c*. 15-5-2006. Dissertation; Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- [90] G.A. Mabbott: An Introduction to Cyclic Voltammetry, *J.Chem.Educ.* 1983, 60, 697-702
- [91] P.T. Kissinger, W.R. Heineman: Cyclic Voltammetry, *J.Chem.Educ.* 1983, 60, 702-706
- [92] D.H. Evans, K.M. Oconnell, R.A. Petersen, M.J. Kelly: Cyclic Voltammetry, *J.Chem.Educ.* 1983, 60, 290-293

- [93] J.S. Hong, J.C. Rabinowitz: All-or-none mode of the reconstitution and the reactions of alpha ,alpha '-bipyridyl and mercurials with clostridial ferredoxin, *J.Biol.Chem.* 1970, 245, 6574-6581
- [94] H. Beinert, A.J. Thomson: Three-iron clusters in iron-sulfur proteins, Arch.Biochem.Biophys. 1983, 222, 333-361
- [95] T.A. Kent, B.H. Huynh, E. Munck: Iron-sulfur proteins: Spin-coupling model for three-iron clusters, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980, 77, 6574-6576
- [96] M.T.J. Brecht: Hochfeld- und Puls-EPR-Untersuchungen an den Kofaktoren von [NiFe]-Hydrogenasen: Beiträge zur Klärung des Mechanismusses der biologischen Wasserstoffspaltung . 2001.
- [97] I.R. Vassiliev, M.L. Antonkine, J.H. Golbeck: Iron-sulfur clusters in type I reaction centers, *Biochim.Biophys.Acta, Bioenerg.* 2001, 1507, 139-160
- [98] S.J. Lippard, J.M. Berg: Choice, Uptake, and Assembly of Metal-Containing Units in Biology, Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, Mill Valley, 1994, pp. 103-138
- [99] R. Camba, Y.S. Jung, L.M. Hunsicker-Wang, B.K. Burgess, C.D. Stout, J. Hirst, F.A. Armstrong: Mechanisms of Redox-Coupled Proton Transfer in Proteins: Role of the Proximal Proline in Reactions of the [3Fe-4S] Cluster in Azotobacter vinelandii Ferredoxin I, *Biochemistry* (*Mosc*). 2003, 42, 10589-10599
- [100] C. Fichtner: Spektroskopische und elektrochemische Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyasaki F . 2005. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [101] J.R. Postgate: The Sulfate-Reducing Bacteria. 2nd Ed, 1984, 224

- [102] T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [103] M. Mandel, A. Higa: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J.Mol.Biol.* 1970, 53, 159-162
- [104] M.L. Antonkine, D. Bentrop, I. Bertini, C. Luchinat, G. Shen, D.A. Bryant, D. Stehlik, J.H. Golbeck: Paramagnetic 1H NMR spectroscopy of the reduced, unbound Photosystem I subunit PsaC: sequencespecific assignment of contact-shifted resonances and identification of mixed- and equal-valence Fe-Fe pairs in [4Fe-4S] centers FA- and FB-, *JBIC, J.Biol.Inorg.Chem.* 2000, 5, 381-392
- [105] T. Mehari, K.G. Parrett, P.V. Warren, J.H. Golbeck: Reconstitution of the iron-sulfur clusters in the isolated FA/FB protein: EPR spectral characterization of same-species and cross-species photosystem I complexes, *Biochim.Biophys.Acta, Bioenerg.* 1991, 1056, 139-148
- [106] O. Rüdiger: Preparación y Caracterización de Electrodos para la Oxidación-Reducción de Hidrógeno Basados en la Actividad de las Hidrogenasas . 2009. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid.

# 10Anhang

## 10.1 Vektor pET-52b(+) 3C/LIC

In der folgenden Tabelle sind die Restriktionsstellen des Vektors aufgelistet.

| Ennum            | Anzahl    |                   |      |      | -    | ) o o triletie | nootollo | -    |      |      |      |
|------------------|-----------|-------------------|------|------|------|----------------|----------|------|------|------|------|
| Enzym            | Restrikt. | Resultionsstellen |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| Acd              | 2         | 183               | 2733 |      |      |                |          |      |      |      |      |
| Acil             | 5         | 761               | 2288 | 3971 | 4344 | 4770           |          |      |      |      |      |
| <i>Afe</i> l     | 2         | 504               | 2217 |      |      |                |          |      |      |      |      |
| AflII            | 2         | 1099              | 2963 |      |      |                |          |      |      |      |      |
| Ahd              | 1         | 4573              |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Alo</i> l     | 1         | 4951              |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Alw</i> NI    | 1         | 3379              |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Apa</i> l     | 1         | 1310              |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Apa</i> Ll    | 5         | 232               | 1079 | 2777 | 3277 | 3901           |          |      |      |      |      |
| Asel             | 4         | 356               | 1784 | 1843 | 4398 |                |          |      |      |      |      |
| Aval             | 1         | 206               |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| Avrll            | 1         | 97                |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Ban</i> l     | 10        | 156               | 202  | 421  | 442  | 556            | 1019     | 1738 | 1868 | 4620 | 5022 |
| <i>Ban</i> ll    | 5         | 171               | 483  | 497  | 1310 | 5060           |          |      |      |      |      |
| <i>Bbe</i> l     | 4         | 425               | 446  | 560  | 1742 |                |          |      |      |      |      |
| <i>Bbs</i> l     | 3         | 1245              | 1584 | 2081 |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Bce</i> Al    | 5         | 618               | 958  | 1585 | 3465 | 5010           |          |      |      |      |      |
| <i>Bcg</i> l     | 4         | 223               | 1425 | 2540 | 4035 |                |          |      |      |      |      |
| BcNI             | 3         | 1556              | 3166 | 3735 |      |                |          |      |      |      |      |
| Bdl              | 1         | 1113              |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Bg</i> ll     | 1         | 4455              |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Blp</i> l     | 1         | 80                |      |      |      |                |          |      |      |      |      |
| <i>Bme</i> 1580I | 6         | 236               | 1083 | 1310 | 2781 | 3281           | 3905     |      |      |      |      |
| <i>Bmr</i> l     | 6         | 628               | 1025 | 1262 | 1902 | 2702           | 4533     |      |      |      |      |
| <i>Bpm</i> l     | 5         | 243               | 937  | 1426 | 2490 | 4504           |          |      |      |      |      |
| <i>Bpu</i> 10I   | 1         | 2069              |      |      |      |                |          |      |      |      | 1    |
| <i>Bpu</i> El    | 6         | 21                | 1913 | 3054 | 3352 | 3593           | 3969     |      |      |      |      |
| <i>Bsa</i> Al    | 2         | 2715              | 4985 |      |      |                |          |      |      |      | 1    |
| <i>Bsa</i> Bl    | 3         | 372               | 382  | 2160 |      |                |          |      |      |      |      |

| Tabelle 10.1: | Restriktionsstellen | des Vektors | pET-52b(+) | 3C/LIC |
|---------------|---------------------|-------------|------------|--------|
|---------------|---------------------|-------------|------------|--------|

| BsaHl            | 6  | 422  | 443  | 557  | 1056 | 1739 | 4033 |      |      |      | 1    |
|------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Bsal             | 1  | 4507 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| BsaWl            | 7  | 2    | 1418 | 1921 | 2152 | 3169 | 3316 | 4277 |      |      |      |
| BsaXI            | 2  | 1774 | 4949 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bse</i> YI    | 3  | 1498 | 1633 | 3267 |      |      |      |      |      |      |      |
| Bsgl             | 3  | 950  | 1150 | 2123 |      |      |      |      |      |      |      |
| BsÆl             | 6  | 178  | 1884 | 2879 | 3303 | 4055 | 4204 |      |      |      |      |
| <i>Bsi</i> HKAI  | 9  | 171  | 236  | 599  | 1083 | 1957 | 2781 | 3281 | 3905 | 3990 |      |
| <i>Bsm</i> Al    | 7  | 796  | 1201 | 1327 | 1714 | 2604 | 3730 | 4507 |      |      |      |
| <i>Bsm</i> Bl    | 2  | 1714 | 2604 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bsm</i> Fl    | 4  | 196  | 560  | 2234 | 5200 |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bsp</i> 1286l | 13 | 167  | 232  | 479  | 493  | 595  | 1079 | 1306 | 1953 | 2777 | 3277 |
|                  |    | 3901 | 3986 | 5056 |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bsp</i> CNI   | 9  | 93   | 1684 | 2061 | 2223 | 2763 | 3251 | 3660 | 4085 | 4604 |      |
| <i>Bsp</i> El    | 2  | 2    | 2152 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bsp</i> HI    | 4  | 497  | 3683 | 3732 | 3764 |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bsi</i> Bl    | 5  | 141  | 328  | 2896 | 3730 | 5129 |      |      |      |      |      |
| <i>Bsi</i> DI    | 4  | 1146 | 1512 | 4339 | 4513 |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bsi</i> Fl    | 5  | 409  | 418  | 785  | 4488 | 5086 |      |      |      |      |      |
| <i>Bss</i> HII   | 1  | 1510 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bss</i> SI    | 2  | 3136 | 3904 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bst</i> API   | 1  | 782  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bst</i> Bl    | 1  | 243  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bst</i> Ell   | 1  | 1280 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bst</i> XI    | 3  | 901  | 1030 | 1153 |      |      |      |      |      |      |      |
| BstYl            | 10 | 195  | 663  | 1875 | 2155 | 3604 | 3615 | 3926 | 3943 | 4711 | 4723 |
| <i>Bst</i> Z17I  | 1  | 2734 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Btg</i> l     | 2  | 268  | 536  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Bts</i> l     | 4  | 1464 | 1832 | 4154 | 4174 |      |      |      |      |      |      |
| <i>Cla</i> l     | 1  | 376  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Dral             | 3  | 3995 | 4687 | 4706 |      |      |      |      |      |      |      |
| DrallI           | 1  | 4985 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Dral             | 3  | 2656 | 3071 | 4940 |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Eae</i> l     | 4  | 407  | 539  | 1773 | 4180 |      |      |      |      |      |      |
| Earl             | 3  | 717  | 2847 | 3774 |      |      |      |      |      |      |      |
| Eci              | 4  | 890  | 3025 | 3171 | 4431 |      |      |      |      |      |      |
| <i>Eco</i> 571   | 2  | 3511 | 3907 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Eco</i> 57MI  | 7  | 243  | 937  | 1426 | 2490 | 3511 | 3907 | 4504 |      |      |      |
| <i>Eco</i> NI    | 2  | 218  | 634  |      |      |      |      |      |      |      |      |

## 10 Anhang

| <i>Eco</i> 0109 | 4  | 53   | 210  | 532  | 196 |     |     |      |      |      |      |
|-----------------|----|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| <i>Fsp</i> l    | 1  | 4350 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Hae</i> ll   | 13 | 421  | 442  | 502  | 556 | 714 | 149 | 1738 | 2132 | 2215 | 2837 |
|                 |    | 3207 | 5132 | 5140 |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Hinc</i> ll  | 2  | 184  | 1605 |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Hpa</i> l    | 1  | 1605 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Kas</i> l    | 4  | 421  | 442  | 556  | 173 |     |     |      |      |      |      |
| MIU             | 1  | 1099 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| MsII            | 9  | 1151 | 1439 | 1469 | 195 | 214 | 253 | 3802 | 4161 | 4320 |      |
| <i>Nae</i> l    | 2  | 411  | 5088 |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Nar</i> l    | 4  | 422  | 443  | 557  | 173 |     |     |      |      |      |      |
| <i>Nco</i> l    | 1  | 268  |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Ngo</i> MIV  | 2  | 409  | 5086 |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Nsp</i> l    | 4  | 574  | 2308 | 2600 | 296 |     |     |      |      |      |      |
| Pcil            | 1  | 2963 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>PfI</i> MI   | 1  | 681  |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Pfo</i> l    | 2  | 666  | 2605 |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Ppil            | 3  | 3678 | 3945 | 4951 |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Рри</i> МI   | 2  | 210  | 1969 |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Psil            | 1  | 4857 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Psp</i> OMI  | 1  | 1306 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Pvul            | 1  | 4204 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Pvull           | 3  | 1699 | 1792 | 2554 |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Sap</i> l    | 1  | 2847 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Sca</i> l    | 1  | 4092 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Sfc</i> l    | 5  | 341  | 3228 | 3419 | 432 | 520 |     |      |      |      |      |
| <i>Sfo</i> l    | 4  | 423  | 444  | 558  | 174 |     |     |      |      |      |      |
| <i>Sgr</i> Al   | 1  | 418  |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Smi             | 6  | 36   | 1892 | 3069 | 333 | 360 | 394 |      |      |      |      |
| <i>Sph</i> l    | 1  | 574  |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Ssp</i> l    | 1  | 4777 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Styl            | 3  | 57   | 97   | 268  |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Taq</i> ll   | 5  | 1898 | 2865 | 4041 | 422 | 488 |     |      |      |      |      |
| Tat             | 3  | 189  | 2767 | 4090 |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Tsp</i> GWI  | 4  | 2088 | 2406 | 3792 | 416 |     |     |      |      |      |      |
| <i>Tth</i> 1111 | 1  | 2708 |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| <i>Xba</i> l    | 1  | 307  |      |      |     |     |     |      |      |      |      |
| Xcml            | 3  | 955  | 1471 | 1489 |     |     |     |      |      |      |      |
| Xmnl            | 2  | 2521 | 3973 |      |     |     |     |      |      |      |      |

#### Enzyme die den Vektor nicht schneiden:

Aarl, Aatli, Acc65i, Afili, Agel, Alei, Asci, AslSi, BamHi, BbvCi, BfrBi, Bgli, BmgBi, Bmti, Bpli, BseRi, BslWi, Bsmi, BspMi, BsrGi, Bsu36i, Eagl, EcolCRi, EcoRi, EcoRV, Fai, Fsel, FspAi, Hindili, Kpni, Mfel, Msci, Ndel, Nhel, Noti, Nrul, Nsi, Paci, Pmel, Pml, PshAi, Psri, Psti, Rsrii, Saci, Sacii, Sali, SanDi, Sbfi, SexAi, Sfi, Smal, SnaBi, Spel, Srfi, Stul, Swal, Xhoi, Xmal, Zrai



Abb. 10.1: Vektorkarte des 5227 Basenpaare umfassenden Vektors pET-52b(+) 3C/LIC



## 10.2 MALDI-TOF MS Spektren der synthetisierten Peptide

Abb. 10.2: MALDI-Spektrum der Peptide DmsB-P Wildtyp (berechnet 3657,3 g/mol) und DmsB-P C27W (berechnet 3740,4 g/mol)



Abb. 10.3: MALDI-Spektren der Peptide DmsB-P C27F und DmsB-P C4F (berechnet beide 3701,3 g/mol)



Abb. 10.4: MALDI-Spektren der Peptide DmsB-P C27Y und DmsB-P C4Y (berechnet beide 3717,3 g/mol)



Abb. 10.5: MALDI-Spektren der Peptide DmsB-P C27V (berechnet 3653,3 g/mol) und DmsB-P C27T (berechnet 3652,7 g/mol)

## Danksagung

Für die Möglichkeit in diesem sehr interessanten Forschungsgebiet arbeiten zu können und für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. W. Lubitz danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W Gärtner für die Überlassung des interessanten Themas, seine Diskussionsbereitschaft, hilfreichen Tipps sowie der Möglichkeit die Arbeit nach eigenen Vorstellungen zu entwickeln.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. J. Pietruszka dankbar.

Frau Dr. Maria-Eirini Pandelia und Herrn Dr. Mikhail L. Antonkine gilt mein besonderer Dank für die Hilfe und Diskussionsbereitschaft im Rahmen der EPR-Messungen.

Herrn Dr. Olaf Rüdiger danke ich für sein Engagement bei den zyklovoltammetrischen Messungen und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Kinga Kulon gilt mein Dank für die Überlassung ihres synthetisch hergestellten Clusters.

Für ihre Unterstützung bei Fragen zu biologischen Arbeitsmethoden möchte ich Frau Rashmi Shah, Frau Jana Riethausen und Frau Helene Steffen herzlich bedanken.

Frau Ingeborg Heise danke ich für die ausgezeichnete Arbeit im Rahmen der für diese Arbeit notwendigen Peptidsynthese und für den damit verbundenen unermüdlichen Kampf mit der nicht immer funktionierenden Technik.

Herrn Norbert Dickmann möchte ich für die MALDI-TOF MS Messungen danken.

Mein Dank gilt auch Frau Birgit Deckers für die fachliche Unterstützung bei Problemen mit graphischen Darstellungen.

Frau Jana Riethausen, Frau Simone Ringsdorf und Herrn Sebastian Gandor bin ich für freundschaftliche Atmosphäre, gute Diskussionen, stete Hilfsbereitschaft, ihre moralische Unterstützung und ganz besonders für das Korrekturlesen dieser Arbeit dankbar. Frau Dr. Madina Mansurova und Frau Dr. Melissa Koay haben wesentlich zur guten Atmosphäre in unserem im Büro beigetragen und es war immer eine Freude, das Büro mit ihnen zu teilen.

Des Weiteren möchte ich allen nicht namentlich genannten Mitarbeiter des Instituts danken, die auf unterschiedlichste Art und Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Für die finanzielle Unterstützung war die Max-Planck-Gesellschaft verantwortlich, auch ihr gilt mein Dank.

Meinen Eltern bin ich dankbar für die Unterstützung, ihre Kraft und Liebe, die mich all die Jahre begleitet haben.

# Lebenslauf

| Name:          | Christina Alessandra Hoppe  |  |  |  |  |  |  |
|----------------|---|--|--|--|--|--|--|
| Geburtsdatum:  | 07. Juli 1980   |  |  |  |  |  |  |
| Geburtsort:    | Duisburg  |  |  |  |  |  |  |
| Nationalität:  | deutsch   |  |  |  |  |  |  |
| Familienstand: | ledig   |  |  |  |  |  |  |
| Ausbildung     |   |  |  |  |  |  |  |
| 1987 – 1991    | Gemeinschaftsgrundschule an der Mozartstrasse,<br>Duisburg  |  |  |  |  |  |  |
| 1991 – 2000    | St Hildegardis – Gymnasium, Duisburg<br>Abschluss: Abitur   |  |  |  |  |  |  |
| 2000 - 2006    | Hochschulstudium an der Gerhard-Mercator-<br>Universität Gesamthochschule Duisburg (ab 2003<br>Universität Duisburg-Essen)<br>Studiengang: Chemie D II  |  |  |  |  |  |  |
| Februar 2006   | Diplom in Chemie an der Universität Duisburg-Essen<br>mit dem Thema "Charakterisierung eines<br>Ionenmobilitätsspektrometers mit vorgeschalteter<br>Thermodesorptionseinheit zur Bestimmung<br>ausgewählter Pestizide in wässerigen Proben" |  |  |  |  |  |  |
| März 2006      | Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für<br>Bioanorganische Chemie in Mülheim  |  |  |  |  |  |  |

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Mülheim an der Ruhr,

Christina Alessandra Hoppe