



Zusammenfassung

Die Atmungsketten des gramnegativen Bakteriums *E. coli* sind flexibel aufgebaut und ermöglichen ein Überleben bei verschiedenen Umgebungsbedingungen von aerob bis anaerob. Die aerobe Atmungskette von *E. coli* besteht aus einer Reihe primärer Dehydrogenasen und terminaler Reduktasen. Die NADH: Ubichinon Oxidoreduktase, der respiratorische Komplex I ist das größte Enzym der Atmungskette und dient als Eintrittsstelle für die Elektronen aus NADH. Komplex I besitzt eine L-Form und koppelt die Übertragung von zwei Elektronen von NADH auf Ubichinon (Q) mit der Translokation von vier Protonen über die Membran. Komplex I besteht aus einem peripheren Arm und einem Membranarm und enthält neun Eisen-Schwefel Zentren und ein Flavinmonokleotid als Kofaktoren. Alle Kofaktoren der Redoxreaktion befinden sich im peripheren Arm, während die Protonentranslokation im Membranarm stattfindet. Die Kopplung dieser Prozesse ist noch nicht geklärt. Der Membranarm enthält die drei antiporterähnlichen Untereinheiten NuoL, NuoM, NuoN, die jeweils einen Protonenweg enthalten. Ein weiterer Protonenweg, der sogenannte E-Kanal, wird von anderen Untereinheiten, gebildet. Es wird spekuliert, dass alle vier Protonen durch die vier Protonenwege transloziert werden. Eine andere Theorie sagt, dass vier Protonen durch den Weg auf der distalen Untereinheit NuoL transloziert werden.

Konformationsänderungen spielen bei der Protonentranslokation eine wichtige Rolle. Diese Bewegungen müssen visualisiert werden, um ein umfassendes Verständnis für den Enzym-Mechanismus zu erhalten. Die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) ist eine der vielseitigsten Analysetechniken für die nicht destruktive Charakterisierung von Proteinen. Gute Spektren mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis werden schnell gewonnen. Allerdings ist es schwierig, ein intensives Absorptionssignal von einer einzelnen Proteinschicht mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie zu erhalten. Die oberflächenverstärkte Infrarot-Absorptionsspektroskopie (SEIRAS) ermöglicht eine Verstärkung des Signals. Um Konformationsänderungen bei der IR-Spektroskopie sichtbar zu machen, wird ein IR-Label benötigt. Nitrilmarkierungen sind attraktive IR-Markierungen, da sie wertvolle Informationen über die lokale Umgebung der Sonde liefern können. Sie erscheinen im klaren Bereich der IR-Spektren und überschneiden sich nicht mit

Proteinsignalen. Nitrile sind klein und können an spezifischen Positionen in das Protein eingebaut werden. Die Position ihrer Signale ist empfindlich gegenüber Änderungen des Wasserstoffbrückennetzwerks und ermöglichen es, reaktionsbedingte Konformationsänderungen zu verfolgen.

Um die mögliche Beteiligung von NuoM an der Protonentranslokation zu untersuchen, wurden verschiedenen Positionen in unmittelbarer Nähe eines der mutmaßlichen Protonenwege in NuoM mit Nitril-Gruppen markiert. Einzelne Reste wurden zu Cysteinreste mutiert, die mit Cyaniden markiert wurden. Änderungen in der Umgebung der Sonden nach Zugabe der Substrate NADH and Q wurden nachgewiesen. Das Muster der Änderungen deutet darauf ein, dass NuoM an der Protonentranslokation beteiligt ist.

Die Cytochrom *bd*-I-Oxidase gehört zu den terminalen Reduktasen der Atmungsketten. Sie katalysieren Sauerstoffreduktion zu Wasser. Hierfür wird Ubichinon zu Ubichinol oxidiert und vier Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen. Die *bd*-I-Oxidase besteht aus vier Untereinheiten und enthält drei Häm-Gruppen: *b*₅₅₈, *b*₅₉₅ und Häm *d*, die sich alle auf einer Untereinheit befinden. In der Nähe der Häme *b*₅₉₅ und Häm *d* befinden sich konservierte Glutaminsäurereste. Biochemische und spektroskopische Studien wiesen auf die Bedeutung dieser Positionen ein, die einen untypisch hohen pK_a-Wert haben. In dieser Arbeit wurden diese Reste zu Asparaginsäure und Glutamin mutiert. Das Redoxpotential der beiden Häm Gruppen wurde durch die Mutationen dramatisch geändert. Gleichzeitig waren die Varianten aber enzymatisch aktiv. Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der physiologischen Rolle der *bd*-Oxidase diskutiert.

