Untersuchungen über die Rolle der Untereinheit γ im Mechanismus der Energietransduktion in der *Escherichia coli* ATP-Synthase

In augural - Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Marco Rost

aus Grevenbroich

Düsseldorf 2001 Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Hr. Prof. Dr. Strotmann

Korreferent: Hr. Prof. Dr. Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2001

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Methoden zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen	1
1.2 <i>E. coli</i> als Modellorganismus	2
1.3 Genetische Organisation im <i>unc</i> -Operon	3
1.4 Struktur der ATP-Synthase	4
1.4.1 Die Untereinheiten des F ₀	6
1.4.1.1 Untereinheit c	6
1.4.1.2 Untereinheit a	7
1.4.1.3 Untereinheit b	8
1.4.2 Die Untereinheiten des F ₁	9
1.4.2.1 Gemeinsame Strukturmerkmale von α und β	9
1.4.2.2 Strukturelle Unterschiede zwischen α und β	9
1.4.2.3 Untereinheit γ	11
1.4.2.4 Untereinheit δ	13
1.4.2.5 Untereinheit ε	13
1.5 Der katalytische Mechanismus	15
1.5.1 Der "binding-change"-Mechanismus	15
1.5.2 Die Rotationshypothese	16
1.5.3 Die Kopplungsmodelle	17
1.6 Arbeitshypothese	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Molekularbiologische Arbeiten	21
2.1.1 PCR-gerichtete Mutagenese	21
2.1.1.1 Konstruktion der Oligonukleotide	22
2.1.1.2 Durchführung der ersten PCR	24
2.1.1.3 Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Produkte	25
2.1.1.4 Durchführung der zweiten PCR	26
2.1.1.5 Klonierung der mutierten Fragmente	27
2.1.2 DNA-Sequenzierung	28
2.1.3 Konstruktion eines Fusionsproteins mit Untereinheit y	29
2.1.4 Plasmide und Stämme	30

Inhaltsverzeichnis

2.2.1 Transformation	32
2.2.2 Überexpression der γ-Untereinheit als Fusionsprotein	32
2.2.2.1 Überexpression im Schüttelkolben	32
2.2.2.2 Überexpression im Fermenter	33
2.2.3 Wachstumsversuche auf Minimalmedien	33
2.2.4 Anzucht für physiologische Untersuchungen	34
2.3 Physiologische Messungen	35
2.3.1 Präparation invertierter Membranvesikel aus E. coli	35
2.3.2 Substrate und Effektoren	35
2.3.3 ATP-Synthese	37
2.3.3.1 ATP-Synthesereaktion	37
2.3.3.2 Probenaufarbeitung	38
2.3.3.3 Detektion und Auswertung	38
2.3.4 ΔpH-induzierte Fluoreszenzlöschung	39
2.3.4.1 Substrat-induzierte Protonengradienten	40
2.3.4.2 K ⁺ -Potential-induzierte Protonengradienten	41
2.3.5 ATP-Hydrolyse	42
2.3.5.1 Membrangebundene ATP-Hydrolyse	42
2.3.5.2 Aktivierungsenergie der ATP-Hydrolyse	43
2.4 Proteinbiochemische Methoden	44
2.4.1 Aufreinigung der überexprimierten Untereinheit γ	44
2.4.2 Proteinbestimmung	45
2.4.3 SDS-Gelelektrophorese	46
2.4.4 Silberfärbung von Proteinen	47
2.5 Immunologische Methoden	48
2.5.1 Antikörperherstellung	48
2.5.1.1 Oligopeptidsynthese	48
2.5.1.2 Kopplung der Oligopeptide	48
2.5.1.3 Immunisierung der Kaninchen	49
2.5.2 Antikörperaufreinigung	49
2.5.2.1 Abtrennung von Blutbestundteilen	50
2.5.2.2 Entfernen von Antikörpern mit unerwünschter Spezifität	50
2.5.3 Western-Blots	50
2.5.4 Immunologische Quantifizierung	52

Inhaltsverzeichnis

3 Ergebnisse	54
3.1 Vorarbeiten	54
3.1.1 Herstellung von Antikörpern	54
3.1.2 Überexpression und Reinigung der Untereinheit γ	55
3.2 Mutanten der Untereinheit γ	57
3.3 Mutationen der Aminosäuren yE238 und yR242	59
3.3.1 Oxidative Phosphorylierung	59
3.3.2 Aufbau eines ΔpH	61
3.3.3 ATP-Hydrolyse	63
3.3.4 Aktivierungsenergie der ATP-Hydrolyse	64
3.3.5 Strukturelle Integrität der ATP-Synthase	67
3.3.6 Immunologische Quantifizierung	70
3.3.7 Wirkung von Nukleotiden auf den respiratorischen ΔpH	72
3.3.8 Aufbau eines ΔpH bei Anwesenheit eines K ⁺ -Potential	74
3.4 Weitere Mutationen der C-terminalen Helix der Untereinheit γ	76
3.4.1 Funktionelle Charakterisierung weiterer Mutanten der C-terminalen Helix der Untereinheit γ	77
3.5 Mutanten in der N-terminalen Helix der Untereinheit γ	79
3.5.1 Physiologische Charakterisierung N-terminaler Mutanten	80

4 Diskussion	82
4.1 Essentielle Aminosäuren im Bereich γ236-245 der Untereinheit γ	82
4.2 Destabilisierung der C-terminalen α–Helix in γ	83
4.3 Destabilisierung der N-terminalen α-Helix in γ	87
4.4 Kontakte zwischen N- und C-terminaler Helix in γ	89
4.5 Funktionsverlust in den Mutanten γE238P und γR242P	91
4.5.1 Mechanismus der ATP-Hydrolyse	92
4.5.2 Kopplung zwischen F ₁ und F ₀	93
4.5.3 Protonenpermeabilität	95
4.5.4 Mögliche Deutungen der gestörten Energieübertragung	96
4.6 Modell eines Substrat-kontrollierten Protonen-Ventils	97
4.7 Undere Hinweise auf einen Substrat-kontrollierten Protonenfluß	99
4.8 Spekulation über strukturelle Grundlagen des vorgeschlagenen Ventilmechanismus _	100
5 Zusammenfassung	_ 103
6 Literaturverzeichnis	104
7 Danksagung	112
8 Anhang	_ 113
8.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen und Symbole	113
8.2 Aminosäuren	115
8.3 Verzeichnis der Abbildungen	116
8.4 Verzeichnis der Tabellen	117

1 Einleitung

Die ATP-Synthase katalysiert eine essentielle Reaktion im Stoffwechsel der meisten Organismen. Dieses membrangebundene Enzym stellt mit dem Energieträger ATP eine der Grundvoraussetzungen für den Metabolismus aller Zellen bereit, indem es eine Phosphorsäureanhydridbindung zwischen anorganischem Phosphat und ADP knüpft. Als Energie nutzt das Enzym die Triebkraft eines transmembranen Ionengradienten. Häufig handelt es sich dabei um Protonen, seltener Natriumionen (36). Meistens wird dieser Ionengradient bei heterotrophen Organismen durch Atmung, bei photosynthetisch aktiven Organismen durch Photosynthese aufgebaut. Trotz der unterschiedlichen Art, wie der Ionengradient aufgebaut wird, ist sowohl die Grundstruktur als auch die prinzipielle Funktionsweise der ATP-Synthase in allen Zellen wahrscheinlich gleich.

Während erhebliche Teile der Struktur (vgl. 1.4.) geklärt werden konnten, ist der Mechanismus der Energieumwandlung noch weitgehend unklar. Eine entscheidende Rolle wird der in dieser Arbeit untersuchten Untereinheit γ zugewiesen, die an der Energieübertragung direkt beteiligt sein soll. Von besonderem Interesse ist dabei, welche Funktion bestimmte Domänen der Untereinheit γ bei der Kopplung des Substratumsatzes an die Protonentranslokation haben.

1.1 Methoden zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen

Ein Konzept, das sich die Funktionsaufklärung einzelner Aminosäurereste oder Domänen eines Enzymes zum Ziel gesetzt hat, muß insbesondere zwei Anforderungen erfüllen: Die untersuchten Domänen oder Reste müssen lokalisierbar sein. Diese Anforderung erfüllt die Röntgenkristallstrukturanalyse, die abhängig von der Auflösung sogar die Identifizierung einzelner Atome erlaubt. Die zweite, wichtige Voraussetzung ist, daß die Funktion am aktiven Enzym untersucht werden kann. Beugungsmessungen an kristallisierten Proteinen liefern aber nur eine "Momentaufnahme". Dies gilt insbesondere für die ATP-Synthase, deren Teilkomplexe häufig nur im gehemmten Zustand kristallisiert wurden (z. B. in Walkers Arbeitsgruppe; (52)). Aktivitätsuntersuchungen ermöglichen zusammen mit den Theorien der Enzymkinetik einen Einblick in den Mechanismus eines Enzymes. Das Manko dieser Untersuchungen ist die Zuordnung bestimmter Funktionen zu bestimmten Strukturen, die im unveränderten Enzym nicht möglich ist. Dieser Nachteil kann überwunden werden, wenn Änderungen der Funktion mit einer Modifikation des Enzymes an einer bestimmten Stelle korreliert werden können. Ein Beispiel hierfür ist der kovalent bindende Hemmstoff DCCD, der die Identifizierung eines an der Ionenleitung beteiligten sauren Aminosäurerestes in der Untereinheit c der ATP-Synthase ermöglichte (71,75). Die Möglichkeiten sind aber sowohl durch die Verfügbarkeit von geeigneten modifizierenden Reagenzien, als auch die Zugänglichkeit der Reste im Enzym stark begrenzt.

Eine weit größere Anzahl an Möglichkeiten eröffnen genetische Veränderungen von Enzymen. Einzelne Aminosäuren können ebenso wie ganze Gruppen aus einem Protein entfernt, in es eingeführt oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden. Bei der gerichteten Mutagenese ist die Position in der Primärstruktur eindeutig bestimmt. Liegen darüber hinaus weitergehende Strukturinformationen vor, die die Identifizierung des ausgetauschten Restes in einer Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur erlauben, so ist die Mutation auch in diesen Strukturen lokalisierbar. Dies setzt allerdings voraus, daß weder die Faltung des Polypeptides, noch die Assemblierung mit anderen Untereinheiten eines Enzymkomplexes durch die Mutation gravierend gestört wird.

1.2 E. coli als Modellorganismus

Um den Kopplungsmechanismus der ATP-Synthase zu untersuchen, wurde *E. coli* als Modellorganismus gewählt. Diese Wahl hat mehr Gründe als nur den, daß dieses Bakterium schon in vielen Bereichen gut untersucht ist, nicht zuletzt die Entscheidung für Mutagenesestudien: *E. coli* ist schon seit längerer Zeit genetischen Manipulationen durch Transformation mit Hilfe von Plasmiden schnell, reproduzierbar und einfach zugänglich. Da es tiefgefroren gelagert werden kann, muß das Bakterium auch nicht wie andere höhere Organismen kontinuierlich in Kultur gehalten werden. Trotz der Fortschritte, die in den letzten Jahren etwa bei Algen (149) erzielt wurden, ist eine Transformation von Pflanzen und Tieren ungleich schwieriger und komplizierter. Zudem wird das genetische System in allen Eukaryonten noch zusätzlich durch die Wechselwirkung von autonomen Organellengenomen und Kern kompliziert. Die Zellkompartimentierung bedingt unter Umständen komplexe Transportmechanismen für die exprimierten Proteine über die Membranen zum Zielort. Diese Mechanismen könnten durch Mutationen gestört werden könnten. Dieses Problem ist bei dem gramnegativen Bakterium *E. coli* bezüglich der ATP-Synthase, die zum Teil in die Cytoplasmamembran integriert ist und zum Teil in das Zellinnere hineinragt, nicht vorhanden.

Um das Enzym möglichst von anderen zellulären Prozessen zu isolieren und für von außen zugegebene Substrate zugänglich zu machen, ist eine schnelle und schonende Präparation von minimlen Funktionseinheiten notwendig. Aus dem Bakterium lassen sich durch eine kurze Ultraschallbehandlung intakte, invertierte Membranvesikel herstellen. Diese geschlossenen Vesikel enthalten neben der ATP-Synthase auch die Enzyme der Atmungskette (108), so daß durch geeignete Substrate ein respiratorischer Protonengradienten aufgebaut werden kann. Somit kann der vollständige, durch die ATP-Synthase katalysierte Prozeß verfolgt werden.

Da *E. coli* ein fakultativ anaerobes Bakterium der Gruppe *Enterococcae* ist, kann es seinen Energiebedarf nicht nur durch oxidative Phosphorylierung decken, sondern auch durch die in der Energieausbeute zwar viel ineffektivere, dafür aber schnellere Gärung (108). So führt ein Überschuß an Glucose zu einem beschleunigten Wachstum durch gemischte Säuregärung. Die verkürzte Wachstumsdauer und der fehlende Selektionsdruck erhöhen darüber hinaus die genetische Stabilität der Mutationen. Unter diesen Kulturbedingungen ist auch die Anzucht von funktionsuntüchtigen Mutanten der ATP-Synthase möglich.

1.3 Genetische Organisation im unc-Operon

Das *unc*-Operon (165) enthält neben den acht Strukturgenen für die ATP-Synthase-Untereinheiten ein neuntes Leseraster (*unc*I) am Anfang des Operons, dessen Funktion unbekannt ist (76,139). In diesem Gen liegen zwei schwache Promotoren, während der Hauptpromoter für die polycistronische mRNA des gesamten Operons wahrscheinlich 73 Basenpaare stromaufwärts liegt (139). Am 5'-Ende des Operons sind die Gene für die membranintegralen F_0 -Untereinheiten angeordnet (Abb. 1), anschließend folgen die Gene für die F_1 -Untereinheiten. Die im Enzym erforderliche Stöchiometrie der einzelnen Untereinheiten zueinander wird durch posttranskriptionelle Regulation gewährleistet, die möglicherweise auf der Sekundärstruktur der Translations-Initiations-Regionen (9,69,95,123) oder dem Abbau von mRNA spezifischer Gene durch Endonukleasen basiert (97,117). Die Expression der ATP-Synthase und ihr Anteil am Membranprotein insgesamt ist abhängig von den genauen Anzuchtbedingungen (108), wie zum Beispiel der Kohlenstoffquelle im Medium (42).



Abb. 1: Gen-Arrangement des unc-Operons

Alle Gene der ATP-Synthase liegen in *E. coli* in einem Operon (165) hintereinander und werden als polycistronische mRNA in Richtung der Blockpfeile transkribiert. Die Namen der Gene sind über den sie symbolisierenden Blockpfeilen angegeben, die davon exprimierten Polypeptide darunter. Intergenische DNA-Regionen sind als Linien eingezeichnet. Konventionsgemäß ist das 5'-Ende des Operons links, das 3'-Ende rechts dargestellt.

1.4 Struktur der ATP-Synthase

Die generelle Struktur der F_0F_1 -ATP-Synthase ist vermutlich in allen Zellen im Prinzip gleich. In dem zur Zeit mehrheitlich angenommenen Strukturmodell sind daher Erkenntnisse über Strukturdetails von ATP-Synthasen aus verschiedenen Organismen verbunden worden.

Das Enzym wird in zwei Teilkomplexe unterteilt (Abb. 2.): Der membranintegrale F₀ transloziert Protonen über die Membran, während der daran gebundene, periphere F₁ im Cytosol die Substratumsetzung katalysiert. Dieser Teilkomplex läßt sich durch Extraktion von mono- und divalenten Kationen von der Membran als Teilenzym ablösen, das die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse besitzt. Seine Untereinheiten sind nach ihrer Größe geordnet mit griechischen Buchstaben benannt. Die Hauptmasse bilden je drei große Untereinheiten α und β , die alternierend im Kreis angeordnet sind. Von diesem Enzymteil gibt es mehrere Röntgenstrukturanalysen der ATP-Synthasen aus Mitochondrien (16,52,147), Chloroplasten (59), dem thermophilen Bakterium PS3 (140) und *E. coli* (68). An diesen auch Kopf genannten Bereich binden die drei kleinen Untereinheiten γ , δ und ε . Untereinheit γ ragt mit zwei langen α -Helices in das Zentrum des Kopfes hinein und verbindet ihn als Stiel mit dem F₀ (135,167,168). Untereinheit ε bindet an γ und ist ebenfalls ein Bestandteil des sogenannten Stiels (27). Von diesen beiden Untereinheiten sind in *E. coli* und *B. taurus* die atomaren Strukturen bekannt (52,124). Eine weniger gut aufgelöste Struktur des mitochondrialen Enzyms aus Hefe (147) zeigt, daß das Rückgrat der langen α -Helices der Untereinheit γ auf einem Ring sitzt, der aus 10 Untereinheiten c des F₀ gebildet wird.





Diese Skizze gibt ein grobes Modell der zur Zeit vermuteten Anordnung der Untereinheiten im Enzym wieder. Der F1 wird von einem Hexagon aus 3 α - und 3 β -Untereinheiten gebildet, die alternierend angeordnet sind. In der Zeichnung wurden je eine Untereinheit α und β ausgespart, die dem Betrachter zugewandt sind. Dadurch werden die beiden langen α-Helices der grau unterlegten Untereinheit y im Zentrum sichtbar. Die längere wird vom C-Terminus, die kürzere vom N-Terminus gebildet. Die Untereinheiten γ und ε bilden zusammen eine Kontaktfläche auf dem F₀. Der gezeigte Zylinder repräsentiert ein Oligomer aus Untereinheiten c, deren genaue Stöchiometrie noch unbekannt ist. Außen an diesem Zylinder liegen die Untereinheit a und ein Dimer zweier Untereinheiten b, das sich von der Membran, angedeutet durch waagerechte Striche, bis zum $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon erstreckt, wo b und δ eine zweite Verbindung zwischen F₁ und F₀ herstellen. Die helicale Domäne der Untereinheit ε , deren Lage noch diskutiert wird (47), wurde nicht eingezeichnet (vgl. 1.4.2.5).

Die genaue Anzahl und Orientierung der Untereinheiten c in den verschiedenen Organismen wird noch diskutiert. Aufgrund von Untersuchungen mit dem Elektronen- und dem Kraftfeldmikroskop werden außen am c-Ring eine Untereinheit a und zwei Untereinheiten b plaziert, die den F₀ in E. coli komplettieren (18,141,153,154). In Mitochondrien kommen einige kleinere Untereinheiten (35,160) hinzu, während in Chloroplasten Untereinheit b zu zwei unterschiedlichen Homologen (I, II) divergiert ist (60). Die Untereinheit b hat neben einer transmembranen Helix eine lange, cytoplasmatische Domäne, die mit der außen an den F₁-Kopf gebundenen Untereinheit δ einen zweiten Verbindungsstiel bilden soll (40). Neuere, durch Bildbearbeitung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erzeugte Strukturmodelle zeigen einen solchen zweiten Stiel (112,173), der in älteren Strukturmodellen fehlte (55,91).

Eine atomar aufgelöste Struktur des gesamten Enzyms existiert zur Zeit noch nicht. Die vollständige Struktur des abgelösten F₁-Komplexes aus Rinderherzmitochondrien ist jedoch seit kurzem bekannt (52). Der $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplex von *E. coli* ist aufgrund der geringen Auflösung nur als Peptidrückgrat bekannt. Dagegen sind einzelne Untereinheiten der ATP-Synthase von *E. coli* in ihrer atomaren Struktur bekannt. Dies trifft insbesondere für die durch NMR ermittelten Strukturen der F₀-Untereinheiten c und b zu. Darüber hinaus wurde die relative Anordnung der Untereinheiten zueinander in *E. coli* durch Mutagenesen und Quervernetzungsexperimente untersucht. Sie sind Grundlage für das in Abb. 1 dargestellte Modell.

1.4.1 Die Untereinheiten des F₀

1.4.1.1 Untereinheit c

Untereinheit c ist mit 8,3 kDa die kleinste Untereinheit der ATP-Synthase in *E. coli*, und wird wegen ihrer stark hydrophoben Eigenschaften auch Proteolipid genannt. Ihre Struktur (Abb. 3) wurde in einem Lösungsmittelgemisch, das die hydrophobe Umgebung der Membran simulieren soll, mit NMR bestimmt (53). Danach bilden N- und C-Terminus zwei transmembrane Helices, die über eine hydrophile Schlaufe miteinander verbunden sind. Die Beteiligung dieser Domäne und des darin gelegenen Arginin cR41 an Protonentransport und Kopplung ist mehrfach vermutet worden (33). Sie steht in Kontakt mit γ und ε , wie Quervernetzungen mit diesen Untereinheiten belegen (70,168).

In der Mitte der C-terminalen Helix liegt die saure Aminosäure cD61, die für die Protonentranslokation essentiell ist (75). Sie ist in allen Organismen entweder als Asparaginsäure oder Glutaminsäure





Die Struktur der aus *E. coli* in einem Chloroform/Methanol/Wasser-Gemisch isolierte Untereinheit c besteht aus zwei α -Helices, die durch eine kurze, hydrophile Schlaufenregion miteinander verbunden sind (53). Das Bild zeigt zwei um 90° gedrehte Ansichten des Monomers, so daß ein Knick in der Cterminalen Helix sichtbar wird, den ein Prolin in der α -Helix auszulösen scheint. Der saure Rest cD61 ist an der Protonenleitung beteiligt (75) und als Kugelstabmodell angedeutet.

konserviert. Der Austausch gegen alle anderen Aminosäuren verhindert den H⁺-Fluß durch den F_0 ebenso wie die kovalente Modifikation der Carboxylgruppe durch den Hemmstoff DCCD (11,75) oder die Bindung des Antibiotikums Venturicidin (119). Der saure Rest kann

jedoch unter Erhalt der Funktion auf die N-terminale Helix verlagert werden (184). Möglicherweise führt seine Protonierung zum Abknicken der Helix (121), das für den Mechanismus als wichtig erachtet wird.

Die in SDS-Micellen bestimmte Struktur der Untereinheit c aus P. modestum weist dagegen statt zweier langer vier kurze α -Helices auf (96). Dies hat zu einem Modell geführt, in dem cD61 an der cytoplasmatischen Oberfläche der Membran liegt, während sich zwei kurze α-Helices mit der dazwischen befindlichen hydrophilen Schlaufe im Cytoplasma befinden. Nur die kurzen N- und C-terminalen Helices durchspannen die Membran. Auch dieses Modell geht aber von einem Proteolipidzylinder aus, der aus mehreren Untereinheiten c gebildet wird. Ob N- oder C-Terminus an der Außenseite des Zylinders liegen, ist noch nicht geklärt: Die veröffentlichte Röntgenkristallstruktur eines Teiles der ATP-Synthase aus Hefe (147) beinhaltet zwar das c-Oligomer, doch basiert die Positionierung des C-Terminus außen auf einer sehr vagen Zuordnung der Aminosäuren zum Peptidrückgrat (mit 2 α-Helices). Zu dieser Anordnung kommen auch Fillingame et al. (39), während Groth et al. (57,61,134) auf der Grundlage von Mutagenesestudien und Moleküldynamik-Berechnungen ein Modell mit der entgegengesetzten Orientierung vorschlagen. Auch die Anzahl der Proteolipid-Moleküle in dem Oligomer ist noch kontrovers. Sie wurde mit 10 (Hefe, (147)) bis 14 (Chloroplasten, (137)) bestimmt, und variiert möglicherweise in den Spezies oder mit den Wachstumsbedingungen (46,133). Genetisch erzeugte Fusionsproteine, die Dimeren und Trimeren der Untereinheit c entsprechen, zeigen, daß in E. coli ein aus 12 Kopien gebildetes Oligomer möglich ist (79).

1.4.1.2 Untereinheit a

Zahlreiche Quervernetzungsexperimente belegen einen engen Kontakt des Proteolipids zu Untereinheit a (48), die darüber hinaus die Anordnung der Proteolipide zu einem Ring zu induzieren scheint (144). Die größte Untereinheit (30,3 kDa) des F_0 ist bisher strukturell am wenigsten bekannt. Die Topologie ist besonders im N-Terminus umstritten, so daß Modelle mit 5 (163) und 6 (180) transmembranen Helices diskutiert werden (34). Auch die in dieser Untereinheit möglicherweise am Transport der Protonen direkt beteiligten Aminosäuren sind noch nicht unumstritten identifiziert (162). Bisher ist nur bekannt, daß alle Mutationen des Argininrests aR210 zum Funktionsverlust der ATP-Synthase führen. Er spielt daher in allen vorgeschlagenen Funktionsmodellen (vgl. 1.5.3) eine wichtige Rolle. Für die ebenfalls konservierten Reste aE196, aE219 und aH245 sind hingegen nicht homologe Austausche hergestellt worden (162), durch die die Funktion nicht vollständig beeinträchtigt wird.

1.4.1.3 Untereinheit b



Abb. 4: Der hydrophobe Bereich der Untereinheit b aus der ATP-Synthase von *E. coli*

Der gezeigte N-terminale Bereich der Untereinheit b (Reste b1-33) ist sehr hydrophob, so daß die Struktur in einem apolaren Lösungsmittelgemisch mit NMR-Spektroskopie bestimmt wurde (38). Das Schlaufenband des Modells zeigt die überwiegend helicale Struktur, die nur durch einen Knick (als Schnur dargestellt) unterbrochen wird, über dem sich zwei hier schwarz markierte Prolinreste befinden. Die Helix unter dem Knick soll die Membran vermutlich nicht senkrecht, sondern in leichtem Winkel durchspannen. Dies würde die Achse der über dem Knick beginnenden α-Helix senkrecht zur Membran ausrichten. Von dort soll sie eine Verbindung zur Oberseite des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons bilden.

Die Untereinheit b (17,3 kDa) hat über 75 % αhelicalen Anteil und liegt im Enzym wahrscheinlich als ein Dimer vor, dessen beide Monomere durch zahlreiche Quervernetzungen miteinander (38,125) ohne Einfluß auf die Enzymfunktion kovalent verbunden werden können. Der sehr hydrophobe N-Terminus bildet vermutlich einen Membrananker. Die Struktur eines Teilpeptides (b1-33) wurde in apolarem Lösungsmittel durch NMR bestimmt (38). Der Bereich von b4-23 ist α -helical (Abb. 4). Markierungsexperimente (74) zeigen, daß die Reste b23-26 im anschließenden Knick an der Membranoberfläche liegen. Die Prolinreste bP27 und bP28 sind der Beginn einer neuen α-Helix. Möglicherweise dient der Knick dazu, den peripheren Teil der Untereinheit ab b28 senkrecht zur Membran zu orientieren, so daß dieser als zweiter Stiel zwischen F₀ und F₁ die mehr als 10 nm Abstand zur Untereinheit δ am F₁ überwinden kann. Allerdings kann die Länge der Untereinheit b ohne Funktionsverlust um 1,6 nm verkürzt oder verlängert werden (143). Die vier C-terminalen Reste sind dagegen notwendig, um δ zu binden. Die Interaktion dieser beiden Untereinheiten ist für die Funktion des Enzyms essentiell (40). Der Kontakt beider Untereinheiten wurde durch Quervernetzung

zuerst in Chloroplasten nachgewiesen (12) und in jüngerer Zeit in *E. coli* bestätigt (99,100); allerdings ergeben sich unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion des Enzyms durch die Quervernetzung: In *E. coli* ist durch ATP-Hydrolyse noch der Aufbau eines Protonengradienten möglich (99). Die Quervernetzung der Untereinheiten in Chloroplasten (12) hemmt dagegen dies ebenso wie die ATP-Synthese (vgl. auch 1.5.2).

1.4.2 Die Untereinheiten des F₁

1.4.2.1 Gemeinsame Strukturmerkmale von α und β

Der Kronenregion genannte Teil besteht aus einer faßförmigen β -Faltblattstruktur. Sie wird aus den N-terminalen Enden der Untereinheiten α und β gebildet und trägt vermutlich wesentlich zum Zusammenhalt der abwechselnd im Kreis angeordneten drei α - und β - Untereinheiten bei. Ein Vergleich der Kronenregionen von Mitochondrien, Chloroplasten und dem thermophilen Bacillus PS3 zeigt in den beiden letzteren zusätzlich inserierte Aminosäuren in β , die zu den benachbarten Untereinheiten α hinüberreichen und über eine verstärkte Wechselwirkung möglicherweise die zunehmende Hitzestabilität dieser Enzyme bewirken (59). Veränderungen in der Kronenregion führen nicht nur zur Destabilisierung des F₁, sondern haben auch einen Einfluß auf die Protonentranslokation (64,65,77,92,178,179).

Das mittlere Drittel der Untereinheiten α und β wird durch α -Helices und β -Faltblätter charakterisiert. In ihm liegen 6 Nukleotidbindungstaschen an den Grenzflächen zwischen den Untereinheiten. Die drei Zentren, die überwiegend von der Untereinheit β gebildet werden, sind die katalytischen Stellen. Auf die an der Katalyse beteiligten Reste wird später eingegangen (vgl. 1.5.1). Zwischen den Untereinheiten β und γ gibt es einen räumlichen Kontakt, der sich oberhalb der Nukleotidbindungsstelle befindet und möglicherweise für die Katalyse von Bedeutung sein könnte (50,105,107).

Das C-terminale Drittel der Untereinheiten α und β ist überwiegend aus α -Helices aufgebaut und steht ebenfalls in engem Kontakt mit Untereinheit γ . Auffälligstes Merkmal ist eine Schlaufe, die sich in Richtung des F₁-Zentrum mit der dortigen Untereinheit γ erstreckt und in der Untereinheit β je nachdem, ob ein Nukleotid gebunden ist oder nicht, unterschiedliche Positionen einnimmt (s. u.).

1.4.2.2 Strukturelle Unterschiede zwischen α und β

Die Struktur des mitochondrialen F_1 aus Rinderherzen (2, 52) ist zur Zeit die am höchsten aufgelöste und vollständigste Struktur dieses Teilkomplexes der ATP-Synthase. Sie wurde an Kristallen bestimmt, in denen das Enzym entweder durch hohe Konzentrationen DCCD (52) oder das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP (2) gehemmt war. Da die DCCD-Hemmung die Nukleotidbesetzung der Bindungsstellen verändert (52, 170), wird im folgenden auf die Struktur mit AMP-PNP (2) eingegangen. Während alle drei Kopien der Untereinheit α in dieser Struktur eine weitgehend einheitliche, kompakte Struktur einnehmen, zeigt Untereinheit β zwei deutlich verschiedene Konformationen. Die geschlossene Konformation mit einem AMP-PNP oder ADP in der Nukleotidbindungstasche ähnelt sehr der Struktur von α , an dessen drei Kopien im Kristall stets das ATP-Analogon AMP-PNP gebunden ist (2). Die Untereinheit β , an die kein Nukleotid gebunden ist, zeigt hingegen eine offene, deutlich veränderte Nukleotidbindungstasche und eine zur Membran hin abgeklappte Schlaufe. Diese Konformationsunterschiede sind als strukturelles Äquivalent zu katalytischen Zwischenstadien interpretiert worden (vgl. 1.5.2).



Abb. 5: Struktur der großen Untereinheiten α und β

Das Schleifenmodell zeigt Teile des mitochondrialen F₁ (52), da die Struktur des F₁ in *E. coli* nur eine geringe Auflösung hat. Links und rechts von den langen, N- und C-terminalen α -Helices der Untereinheit γ sind zur Übersichtlichkeit nur je eine Untereinheit α und β aus dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon dargestellt (in dem Schema des Gesamtenzyms links grau unterlegt). Die hauptsächlich aus β -Faltblättern bestehenden N-terminale Domänen von α und β sind schwarz gegenüber den Mittelbereichen mit den Nukleotidbindungstaschen hervorgehoben. Die ebenfalls schwarzen C-Termini besteht hauptsächlich aus α -Helices. Zwei dieser Helices bilden eine zu γ orientierte Schlaufe, deren Position sich in den verschiedenen Konformationen der drei Untereinheiten β stark unterscheidet. Die ausgewählte Untereinheit β befindet sich in der offenen Konformation, wie an der im Vergleich zu Untereinheit α (geschlossene Konformation) weit nach unten abgeklappten C-terminalen Schlaufe zu erkennen ist. Die Bedeutung der C-terminalen Bereiche von α und β für die Kopplung und Katalyse ist mehrfach belegt worden (102,106,122,132). Häufig wurde dies mit einer Gruppe negativer Ladungen in dem sogenannten DELSEED-Sequenzmotiv (β 380-386) in Verbindung gebracht (81,85), das in der C-terminalen Schlaufe der Untereinheit β stark konserviert ist, in Untereinheit α aber nicht vorhanden ist (81,85). Eine Angleichung der entsprechenden Aminosäuresequenz in α beschleunigt in den Mutanten die Katalyse, während die Kopplung der ATP-Hydrolyse an den Protonentransport stark geschwächt wird (64). In Untereinheit β können dagegen alle sauren Aminosäuren ohne gravierende Funktionsverluste gegen ihre Säureamide (15) oder gegen Alanin ausgetauscht werden (63).

1.4.2.3 Untereinheit γ

Untereinheit y (31,4 kDa) wird eine wesentliche Rolle bei der Kopplung des Protonentransportes an den Substratumsatz zugeschrieben. In allen bisher bekannten Strukturen (16,52,68,147) bilden der C- und N-Terminus des Proteins zwei lange α-Helices (Abb. 5). Sie sind - zum Teil unterschiedlich stark - umeinander gewunden und reichen vom Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons bis zu den Untereinheiten c des F₀. Der Mittelteil von γ wurde erst vor kurzem unabhängig voneinander im mitochondrialen F_1 (52) und einem Untereinheiten-Komplex aus E. coli (124) strukturell mit atomarerAuflösung aufgeklärt. Der bakterielle Sub-Komplex besteht aus der verkürzten Untereinheit γ' , der Teile der N- und C-terminalen Helix fehlen, sowie der Untereinheit ε . In beiden Fällen zeigt der mittlere Bereich von γ eine ähnliche Struktur aus β-Faltblättern, die zusammen ein Bündel bilden und oberhalb und unterhalb von je einer α -Helix bedeckt werden. Die obere dieser beiden Helices enthält viele positiv geladene Reste und liegt im mitochondrialen Enzym unmittelbar unter der C-terminalen Schlaufe der Untereinheit β mit dem DELSEED-Motiv negativ geladener Aminosäuren. Dieser Kontaktbereich wurde schon früher durch Quervernetzungen belegt (4,45). Neben diesem Strukturmotiv sind bei der Untereinheit γ aus *E. coli* noch zwei weitere α -Helices und ein β -Faltblatt zu erkennen. Bis auf die beiden langen, terminalen Helices lassen sich die Positionen der übrigen Sekundärstrukturen nicht mit einer vorher beschriebenen, schwach aufgelösten 3D-Struktur (68) in Einklang bringen, in der möglicherweise Elektronendichten falsch zugeordnet wurden (124).

Abb. 6: Der γ'/ϵ Komplexes aus *E. coli*

Diese Abbildung wurde aus der Arbeit von Rodgers und Wilce (124) zusammengestellt und befindet sich als Farbkopie zum Ausklappen im hinteren Einband. Zur besseren Orientierung ist oben links ein Schema der ATP-Synthase angedeutet.

Das Modell zeigt in der Mitte die Struktur der verkürzten Untereinheit γ mit ihren beiden langen α -Helices. Der Beginn der N-terminalen Helix links und das Ende der C-terminalen Helix rechts fehlen in der verkürzten Untereinheit. Über die Helices ist die Struktur der entsprechenden Reste des mitochondrialen Enzyms so gelegt, das bestmögliche Übereinstimmung erzielt wird. Daraus ergibt sich die Position der C-terminalen Schlaufe von Untereinheit β oben rechts. Sie steht nicht nur in engem Kontakt zur C-terminalen Helix von γ , sondern auch zu einem Strukturmotiv des mittleren Teils von γ. Hier ist ein Bündel von β-Faltblättern zwischen zwei α -Helices gepackt, deren obere mit β wechselwirken könnte. Da von den Autoren (124) ionische Wechselwirkungen zwischen Untereinheit γ und β vermutet werden, sind einige geladene Seitengruppen als Stabmodell dargestellt.



Von der Untereinheit ε ist nur die N-terminale Domäne gezeigt, die ein β -Faltblatt-"Sandwich" bildet. Es liegt auf der linken Seite der beiden terminalen Helices von γ , mit denen es eine Kontaktfläche bildet. Diese Kontaktfläche weist im unteren Bereich einen Spalt (Pfeil) zwischen ε und γ auf, der sich in Richtung der Untereinheiten c öffnet, die ebenfalls (unten links) in das Bild modelliert wurden. Der Spalt wird durch eine Schlaufe von γ begrenzt, die unmittelbar in die C-terminale Helix übergeht.

Die gesamte Polypeptidkette außerhalb der terminalen Helices liegt im γ'/ϵ -Komplex nahezu ausschließlich auf der Seite der C-terminalen Helix, die von der N-terminalen Helix abgewandt ist. Auf der gegenüberliegenden Seite bindet die Untereinheit ϵ . Allerdings befindet sich zwischen den zueinander gewandten Flächen der beiden Untereinheiten eine Kluft, die zum F₀ hin geöffnet ist. Auch im mitochondrialen F₁ ist dieser Spalt zwischen den Untereinheiten γ und δ (= ϵ -Homolog) zu sehen (52). Er wird von γ mit den Resten γ 203-209 begrenzt, an die sich unmittelbar die C-terminale Helix anschließt. Dort lassen sich die Untereinheiten γ und c miteinander vernetzen (167,168).

Die beschriebenen Strukturmotive von γ stimmen in generellen Zügen mit denen der Untereinheit γ des mitochondrialen F₁ überein. Sie unterscheiden sich jedoch insbesondere in der Krümmung und Lage der terminalen α -Helices (47), wie ein Vergleich von Abb. 5 und Abb. 6 zeigt (vgl. auch Abb. 37).

1.4.2.4 Untereinheit δ

Untereinheit δ (19,3 kDa) soll Teil einer zweiten Verbindung zwischen F₀ und F₁ sein, indem der C-Terminus mit Untereinheit b interagiert. Entsprechende Quervernetzungen (12,13,100) bestätigen dies, doch ist über die Art der Interaktionen ebensowenig wie über die daran beteiligten Strukturen Näheres bekannt. Der isolierte N-terminale Teil von δ (δ 1-134) bildet ein Bündel aus sechs aneinander gelagerten α -Helices (175,176). Fluoreszenzresonanztransfermessungen im Chloroplasten-Enzym (41) belegen die Bindung an α und β an der membranabgewandten Seite des F₁-Kopfes ebenso wie Quervernetzungen (90,111). Die Bindung wurde als stark genug eingeschätzt, um die bei der Katalyse vermuteten Kräfte zu kompensieren (67).

1.4.2.5 Untereinheit ε

Die Untereinheit ε (15 kDa) ist für die Bindung des F₁ an den F₀ essentiell (145) und hemmt den isolierten F₁ in seiner Hydrolyseaktivität (146). Sie besteht aus einem N-terminalen Faß aus β-Faltblättern und zwei α-Helices des C-Terminus (Abb. 7), die durch eine Schlaufe miteinander verbunden sind (124). Die C-terminalen Helices können ohne Funktionsverlust deletiert werden (88). Quervernetzungsexperimente deuten auf eine Nähe zu den F₁-Untereinheiten α, β und γ hin (27). Mit letzterer bildet die Untereinheit ε einen Komplex, dessen Struktur aus *E. coli* atomar aufgelöst ist (vgl. 1.4.2.3). Dies unterstützt die Interpretation, daß die N-terminale β-Faltblattdomäne von ε zusammen mit γ die Kontaktfläche des F₁ mit dem Proteolipidzylinder des F₀ ausbildet (27).

Die beiden α -Helices der Untereinheit ε stehen im γ'/ε -Komplex fast rechtwinklig zueinander und legen sich dadurch fast 180° um die terminalen Helices von γ . Sie sind in Richtung des F₁-Kopfes orientiert und der C-Terminus von ε würde in dieser Konformation wahrscheinlich Kontakt mit den großen Untereinheiten α und β haben. In der Ausrichtung der Helices unterscheidet sich diese Konformation von allen anderen bisher veröffentlichten Strukturen der isolierten Untereinheit ε aus *E. coli* und des mitochondrialen F₁ (27,52,124,158,174). In diesen sind die beiden Helices (der zu ε homologen mitochondrialen Untereinheit δ) antiparallel zueinander orientiert, wie dies auch Quervernetzungen innerhalb der Untereinheit vermuten lassen (135). Möglicherweise sind die Positionen der Helices auch im Komplex sehr flexibel und ändern ihre Lage (124).



Abb. 7: Struktur der Untereinheit ε im γ'/ε -Komplex aus *E. coli*

Diese Stereobilder sind der Arbeit von Rodgers und Wilce (124) entnommen. Sie zeigen die Faltung des Peptidrückgrates. Im oberen Bereich ist nur die Untereinheit ε dargestellt, deren C-Terminus zwei α -Helices bildet, während der N-Terminus ein β -Faltblatt-"Sandwich" formt. Er ist durch zwei schwarze Helices teilweise verdeckt, die die Position der C-terminalen Helices in der Struktur der isolierten Untereinheit ε wiedergibt. Im unteren Bildteil ist die β -Faltblattstruktur von ε im Komplex mit γ' (schwarzes Rückgrat) deutlicher zu erkennen (vgl. auch Abb. im hinteren Einband). Von der rechten Seite des Komplexes ausgehend läuft die erste der beiden Cterminalen α -Helices von ε schräg nach links oben. Die zweite Helix steht fast in 90° dazu und ist nach rechts oben gerichtet. Dadurch umspannen die beiden Helices die Untereinheit γ in der Mitte um fast eine halbe Drehung.

1.5 Der katalytische Mechanismus

Die ATP-Synthase wandelt unter H^+ -Transport reversibel ATP + H_2O und ADP + P_i ineinander um, wobei die Reaktionsrichtung vom Phosphorylierungspotential und der Höhe des Protonengradienten abhängt. ATP-Hydrolyse ohne H^+ -Translokation wird auch durch den isolierten F_1 -Teilkomplex katalysiert. Um in der folgenden Darstellung Konfusionen zu vermeiden, wird vor allem auf diese Reaktionsrichtung eingegangen.

1.5.1 Der "binding-change"-Mechanismus

 β E181 ist der essentiell an der Katalyse beteiligte Rest, der ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff (S_N2) auf die β , γ -Phosphorsäure-Anhydridbindung des ATP aktiviert. Daneben sind noch weitere für die Katalyse, die ATP-Bindung und die Kooperation der drei katalytischen Stellen wichtige Reste identifiziert worden, deren mögliche Bewegungen während der Katalyse ein von Weber *et al.* (169) vorgestelltes Modell sehr detailliert behandelt. Die meisten der zur Zeit diskutierten Modelle nehmen den von Boyer (22,23) vorgeschlagenen "Binding-change"-Mechanismus an. Das erste und wichtigste Postulat ist, daß in der ATP-Synthese Energie nicht für die Knüpfung der Anhydridbindung verwendet wird, sondern für die Veränderung der Konformationen der katalytischen Stellen, durch die die scheinbaren Affinitäten für Substrate und Produkte geändert werden.

"Binding-change"-Mechanismus



Abb. 8: "Binding-change"-Mechanismus der ATP-Synthase

Dieses Schema (116) stellt den von Boyer postulierten Wechsel der Bindungsaffinität dreier aktiver Zentren im Enzym während der Katalyse dar. Um ihren unterschiedlichen Zustand hervorzuheben, ist die Nukleotidbindungsstelle mit der hohen Affinität für ATP grau unterlegt und mit T (=,,tight binding") benannt. Die schraffierte Bindestelle hat eine geringere Affinität (L=,,loose"), während die dritte Bindungstasche geöffnet ist (O=,,open") und ADP + P_i freisetzen oder ATP binden kann, wie die Pfeile in der linken Zeichnung andeuten. Durch diese Bindung ändern alle katalytischen Zentren ihre Konformation. Dies geht einher mit der Bildung von ADP und P_i an der anfänglichen T-Stelle und der Freisetzung dieser Produkte aus der anfänglichen L-Stelle, die jetzt offen ist und ein neues ATP binden kann. Nach dreien solcher Schritte sind alle katalytischen Zentren nach Hydrolyse von 3 ATP wieder im Ausgangszustand, so daß das Schema erneut durchlaufen werden kann. Betrachtet man den Reaktionsverlauf in der Gegenrichtung, erhält man ein Modell für die ATP-Synthese

In dem in Abb. 8 dargestellten Modell durchlaufen drei aktive Zentren nacheinander drei verschiedenen Katalysestadien, wobei sich alle drei zum gleichen Zeitpunkt in unterschiedlichen Konformationen befinden. Dies deckt sich nicht mit der im Enzym von Rinderherzmitochondrien gefundenen Nukleotidbesetzung der drei katalytischen Stellen, die das ATP-Analogon AMP-PNP, ADP und kein Nukleotid gebunden haben (2). Es ist kein klarer Konformations-Unterschied zwischen den Untereinheiten β zu erkennen, die ADP bzw. AMP-PNP gebunden haben, nach dem "Binding-change"-Mechanismus also unterschiedliche Konformationen ("tight" und "loose" in Abb. 8) haben sollten. Untersuchungen, nach denen die Inaktivierung von nur einem katalytischen Zentrum durch Inhibitoren oder Mutagenese die kooperative Hydrolyse unterbinden, werden als funktionelle Konsequenz aus diesem Mechanismus interpretiert (8,114).

Andere Experimente sprechen aber dafür, daß die Beteiligung von zwei katalytischen Zentren für die volle Aktivität des Enzyms ausreichend ist (14). Ein weiterer Kritikpunkt an dem Mechanismus ist die Nukleotidbesetzung, die im Widerspruch zum Modell am ATP-hydrolysierenden F_1 -Teilkomplex aus *E. coli* mit einem ATP und zwei ADP bestimmt wurde (171).

1.5.2 Die Rotationshypothese

Nach der Rotationshypothese dreht sich die Untereinheit γ relativ zu den drei Untereinheiten β , wobei die Konformation der katalytischen Zentren durch die relative Position zu γ determiniert wird. Dadurch treibt die Konformationsveränderung einer Bindestelle während der ATP-Hydrolyse nicht nur die Drehung von γ an, sondern induziert durch die veränderte Orientierung von γ die Konformationsänderung aller anderen aktiven Zentren. Nach einer vollständigen Umdrehung der Untereinheit γ haben alle drei aktiven Zentren einen katalytischen Zyklus durchlaufen, drei ATP hydrolysiert und befinden sich wieder im Anfangszustand.

Untersuchungen an Teilkomplexen der ATP-Synthase aus dem thermophilen Bakterium PS3 bestätigen, daß die Substrat/Produkt-Affinitäten der Nukleotidbindungsstellen im $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon erst durch γ unterschiedlich werden (83). Sie zeigen aber auch, daß $\alpha_3\beta_3$ ohne γ noch substantielle ATP-Hydrolyse katalysieren kann (82,182), die Anwesenheit von γ also für die Hydrolyse des ATP nicht essentiell ist.

Die Bewegung der Untereinheit γ in Abhängigkeit von den gebundenen Nukleotiden und der Katalyse ist in verschiedenen Experimenten gezeigt worden. Von den zahlreichen Quervernetzungsexperimenten sind besonders die von Zhou et al. (166,186) zu erwähnen, die im aktiven F_0F_1 eine Lageveränderung der Untereinheit γ relativ zu den Untereinheiten β zeigen. Sabbert *et al.* (127) konnten mit Hilfe einer Fluoreszenzpolarisationsmethode am immobilisierten F_1 -Teilkomplex eine Drehung der am C-Terminus von y befestigten Fluoreszenzsonde von mindestens 280° beobachten, woraus auf eine Rotation geschlossen wurde. Noji et al. banden an die Untereinheit y ein fluorochrom-markiertes Aktinfilament. Die Rotation dieses Filaments konnte im Fluoreszenzmikroskop bei PS3 (110) und E. coli (109) in 120°-Schritten (3,66,128,181) beobachtet werden. Für die Drehung wurde ein Drehmoment von 50 pN*nm berechnet (113). Allerdings ist die Häufigkeit von in eine Richtung drehenden Filamenten sehr gering und die überwiegend beobachtete Pendelbewegung könnte auch auf einen Mechanismus mit zwei aktiven Zentren hinweisen (14). In einer ausführlichen Diskussion von McCarty et al. (98) wird argumentiert, daß keines der angeführten Resultate ein zwingender Rotationsbeweis sein müsse. Tatsächlich sind auch Quervernetzungen zwischen γ und α/β beschrieben (103), die die Katalyse nicht im erwarteten Ausmaß stören.

Die Rotation wurde auch beobachtet, wenn das fluoreszierende Filament an ε gebunden wurde (84). ε bildet im F₁ einen Komplex mit γ (vgl. 1.4.2.3). Mittlerweile wurden solche Untersuchungen auch mit einem am C-Terminus der F₀-Untereinheit c eines solubilisierten Komplexes befestigten Filaments durchgeführt, allerdings mit widersprüchlichen Resultaten (129, 157), die den vorgeschlagenen Rotorkomplex $\gamma \varepsilon_{9-12}$ (s. u.) noch nicht beweisen.

1.5.3 Die Kopplungsmodelle

Die Diskussion um den Mechanismus der Kopplung zwischen der reversiblen ATPase-Reaktion und der Protonentranslokation wird zur Zeit von Modellen beherrscht, die eine starre Verbindung zwischen γ und ε im F₁ und dem Proteolipidzylinder im F₀ annehmen. Bisher ist eine Quervernetzung der drei Untereinheiten bekannt, die zu keiner Funktionsstörung führt (M. Yoshida und S. P. Tsunoda, pers. Mitteilung), dagegen aber auch Quervernetzungen von γ mit c, die die Kopplung beeinträchtigen (135). Der Komplex soll als ein Rotor arbeiten, der durch die ATP-Hydrolyse am F₁ angetrieben wird und Protonen über die Membran pumpt. Um diese Drehung sowohl relativ zu $\alpha_3\beta_3$ als auch zu Untereinheit a auszuführen, muß eine weitere Verbindung dieser Untereinheiten durch b und δ postuliert werden, die ein Mitdrehen mit dem Rotor verhindert. Dieser zweite Stiel ist bisher strukturell nur durch Computerverarbeitung vorsortierter, elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt worden. Je nach Autor sind eine (91), zwei (112,173) oder drei (20) Verbindungen zwischen F₀ und F₁ vorhanden. Es ist aber über eine Quervernetzung zwischen den Untereinheiten γ und b berichtet worden, die nicht die Aktivität unterbindet (51). Andererseits hemmt im Chloroplasten-Enzym eine Quervernetzung zwischen der zu b homologen Untereinheit I und δ den Protonentransport (12). Darüber hinaus ist schwierig zu verstehen, warum ein auf der cytoplasmatischen Schlaufe von c bindender Antikörper die vorgeschlagene Drehung am zweiten Stiel vorbei nicht sterisch blockiert (17).



Abb. 9: Modelle des gekoppelten Protonentransports

Die linke Seite zeigt eine funktionelle Schemazeichnung des F_0 nach dem Modell von Junge *et al.* (80). Auf der rechten Seite ist das von Dimroth *et al.* (37) entworfene Modell in ein strukturelles Schema der ATP-Synthase integriert. Beide sind leicht modifiziert.

Das linke Modell (A) zeigt den F_0 -Teil der ATP-Synthase. Hier sind in Untereinheit a zwei Halbkanäle vorhanden, die von der Cytoplasma- bzw. Periplasma-Seite her zugänglich sind. Beide Kanäle sind in der Mitte der Membran voneinander getrennt. Die Protonen besetzen die Bindungsstellen auf den Untereinheiten c, deren beide transmembranen Helices für eine Untereinheit exemplarisch angedeutet sind. Der Weg eines einzelnen Protons kann entlang des Pfeiles verfolgt werden. Das Proton erreicht durch den cytoplasmatischen Protonenkanal seine Bindestelle auf einer Untereinheit c. Die durch die ATP-Hydrolyse angetriebene Drehung des Proteolipidzylinders transportiert die Untereinheit a erreicht ist. Hier wird das Proton an das Periplasma abgegeben. Im rechten Modell (B) sind die Kationen-Bindungstaschen (mit dem essentiellen Rest cD61) für die als Kugeln modellierten Ionen an der Untereinheit c vom Cytoplasma her frei zugänglich. Eine Drehung des Ringes aus Untereinheiten c transportiert die Ionen zu einem vom Cytoplasma her unzugänglichen Kanal in Untereinheit a, durch den sie ins Periplasma gelangen. Der Proteolipid-Zylinder ist starr mit den F_1 -Untereinheiten γ und ϵ verbunden, deren gemeinsame Drehung durch ATP-Hydrolyse im F_1 angetrieben wird. Um ein Mitdrehen des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons zu verhindern, wird eine zweite Verbindung ($b_2\delta$) zwischen F_0 und F_1 angenommen.

In dem von Junge *et al.* (80) sowie Vik *et al.* (162) vorgeschlagenen Modell (Abb. 9A) liegen die protonierbaren Aminosäuren cD61 der Untereinheiten c auf der Höhe der Membranmitte.

Sie sind in allen Untereinheiten des Zylinders protoniert, die Kontakt zur Membran haben. Hier erlaubt die hydrophobe Umgebung keine negativ geladene Aspartatgruppe, während Untereinheiten c, die in Kontakt mit Untereinheit a stehen, nicht protoniert sind. Diffundiert ein Proton durch den Protonenkanal in Untereinheit a aus dem Cytoplasma zu einem unprotonierten cD61, so kann der Proteolipidzylinder weitergedreht werden. Dadurch wird eine andere, protonierte Untereinheit c im Proteolipidring so weit gedreht, daß sie nun nicht mehr mit der Membran, sondern mit einem Teil der Untereinheit a in Kontakt steht. Die sich hier in Untereinheit a befindenden Ladungen, darunter aR210, erzwingen die Abgabe des Protons an einen zweiten Kanal, durch den es ins Periplasma abgegeben wird. Da im Ausgangszustand alle der Membran zugewandten Reste cD61 protoniert sind, führt schon die erste Drehung des Proteolipidzylinders zu einem Netto-Protonentransport. Dabei sind allerdings das aus dem Cytoplasma aufgenommene und das ins Periplasma abgegebene Proton nicht identisch. Problematisch ist in diesem Modell die unterschiedliche Stöchiometrie von ATP und H+. Die Untereinheit y rotiert vermutlich in 120° Schritten (s. o.) während der Proteolipidzylinder in Abhängigkeit von der tatsächlich vorhandenen Anzahl der Untereinheiten c nur ungefähr 30° (bei Annahme von 12 Kopien) pro Proton drehen würde. Als Lösung für dieses Problem der unterschiedlichen Drehwinkel wurde eine Torsion der Untereinheit γ vorgeschlagen, die bisher aber nur theoretisch in Simulationen getestet wurde (116).

Das Modell von Dimroth (37) schlägt dagegen nur einen Teilkanal in a und vom Cytoplasma her zugängliche Kationenbindungsstellen vor. Kationen (Na⁺ bzw. H⁺) werden zunächst an die Aspartatreste der Untereinheiten c des Proteolipidzylinders gebunden. Eine anschließende Drehung des Zylinders um eine Untereinheit c bringt eine beladene Bindungsstelle der Untereinheit c in Kontakt zu dem Protonenkanal, durch den die Ionen ins Periplasma gelangen. Neben cD61 spielt auch in diesem Modell aR210 eine entscheidende Rolle, das für die Übertragung der Protonen vom Proteolipid auf den Protonenkanal in a verantwortlich sein soll.

In beiden Modellen wird der Protonenstrom durch die Katalyse der ATP-Hydrolyse kontrolliert, die für die Rotation des Proteolipidzylinders Voraussetzung ist. Die Stöchiometrie zwischen Protonen und ATP wird noch kontrovers diskutiert. Die für *E. coli* an ganzen Zellen ausgeführten Bestimmungen (133) ergeben 3 H⁺/ATP, während eine genaue Bestimmung bei Chloroplasten 4 H⁺/ATP ergeben hat (159). Möglicherweise könnte dieses Verhältnis in bestimmten Grenzen zwischen den Spezies aber auch ebenso unterschiedlich sein wie die Anzahl der Proteolipide im F₀ (46,137).

1.6 Arbeitshypothese

Trotz einer Vielzahl von Modellen ist der Mechanismus der Kopplung zwischen Substratumsetzung und Protonentranslokation in der ATP-Synthase noch unklar. Einigkeit herrscht darüber, daß die Untereinheit γ eine wichtige Rolle spielt. Ihr herausragendes Strukturmerkmal sind zwei lange α -Helices (52), die von den N- und C-terminalen Enden gebildet werden. Nicht zuletzt diese Struktur hat es nahe gelegt, die Untereinheit als rotierende Achse im Enzym zu postulieren (2,115). Eine gezielte Störung der Sekundärstruktur ist aber bisher nicht versucht worden, obwohl sie eine grundlegende Annahme der Rotationshypothese testen würde. Daher wurden der α -Helix-Brecher Prolin und das helixdestabilisierende Glycin (31) durch gerichtete Mutagenese in die N- und C-terminalen Bereiche der Untereinheit γ aus E. *coli* eingeführt. Die Mutagenese konzentriert sich insbesondere auf den Bereich γ 236-245 in der C-terminalen Helix. Er liegt am Unterrand des F₁-Kopfes, wo y engen Kontakt zu den Cterminalen Schlaufen aus α und β hat. Eine Auf- und Abbewegung dieses Bereiches während der Katalyse könnte eventuell zur Energieübertragung von den katalytischen Zentren auf y dienen (94). Die Untersuchungen wurden auf den benachbarten Bereich der N-terminalen Helix aus y ausgeweitet. Um die mögliche Interaktion der beiden Helices in diesem Bereich differentiell beurteilen zu können, wurde ein konservierter Rest an der Kontaktfläche der beiden Helices im oberen Bereich des N-Terminus ebenfalls untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Die genetische Manipulation der ATP-Synthase mit Hilfe molekularbiologischer Techniken bildete die Grundlage der durchgeführten Mutagenesestudien. Der Modellorganismus *E. coli* bot hier den Vorteil, daß für die notwendigen Versuche fast durchgängig fest etablierte Standardtechniken vorhanden sind. Sie wurden dem Laborhandbuch von Sambrook (130) entnommen und, falls notwendig, nach den Herstellerangaben der eingesetzten Enzyme modifiziert. DNA wurde durch Anionenaustauscher-Chromatographie isoliert, wobei Materialien der Firma Qiagen (Hilden) nach den mitgelieferten Protokollen eingesetzt wurden. Ausgangspunkt für die molekularbiologischen Arbeiten war das Plasmid pDP34 (vgl. 2.1.4),

das die Gene für alle Untereinheiten der ATP-Synthase in einem Operon enthält.

2.1.1 PCR-gerichtete Mutagenese

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) nutzt die Fähigkeit der DNA-Polymerase, von einem vorhandenen DNA-Strang eine Kopie zu erstellen. Dazu ist die Bindung von kurzen, komplementären Oligonukleotiden als Startermoleküle an die zu kopierenden Matrizen-Stränge notwendig. Diese Moleküle werden durch Einbau von Nukleotiden komplementär zur Vorlage verlängert. In den neu entstandenen DNA-Strängen sind die eingesetzten Oligonukleotide vollständig eingebaut.

Die PCR-gerichtete Mutagenese (10) verwendet Oligonukleotide mit Sequenzabweichungen als Startermoleküle. Die veränderte Sequenz wird in die neuen DNA-Moleküle eingebaut, so daß diese eine Mutation tragen. Diese mutierten DNA-Moleküle dienen in einer zweiten PCR als Startermoleküle, um ein DNA-Produkt zu erhalten, das auf beiden Seiten der Mutation Restriktionsschnittstellen besitzt, die das Einfügen der mutierten anstelle der unveränderten Sequenz in das Expressionsplasmid pDP34 erlauben.

2.1.1.1 Konstruktion der Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Da sie in das später klonierte Produkt eingebaut wurden, wurden sie vor ihrer Lieferung durch HPLC von allen Nebenprodukten mit falscher Sequenz getrennt.

Die Konstruktion geeigneter Oligonukleotide wurde durch Sequenzanalysen mit dem Programm gcg (Generic Computer Group) erleichtert. Sie sollten zum einen möglichst gut an die Matrizen-DNA binden, zum anderen aber auch keine Konkurrenzreaktionen eingehen.

Die Bindungsstärke des Oligonukleotides charakterisiert der Schmelzpunkt. Bei dieser Temperatur löst sich ein gebundenes Oligonukleotid von der DNA wieder ab. Aus diesem Grund wurden stets Oligonukleotide eingesetzt, deren Schmelzpunkt unter PCR-Bedingungen mindestens 4 °C höher lag als die Temperatur in der Bindungsphase der PCR. Da GC-Basenpaare die Bindung stärker stabilisieren als AT-Basenpaarungen, wurde der GC-Gehalt möglichst über 40 % gehalten. Außerdem endete das Oligonukleotid am 3'-Ende vorzugsweise mit mindestens 2 G oder C, um die Bindung am Startpunkt der Polymerasereaktion zu verstärken.

Die Bindung an die Matrizen-DNA kann aber auch durch Konkurrenzreaktionen behindert werden. Enthält das Oligonukleotid komplementäre Abschnitte, so können diese miteinander paaren. Dadurch entstehen haarnadelförmige Strukturen, in denen die Basenpaare nicht mehr frei sind für die Bindung an einen anderen DNA-Strang. Ebenfalls vermieden werden mußte die Bildung von Dimeren, in denen sich zwei Oligonukleotide aneinander lagern. Da stets zwei Oligonukleotide eingesetzt wurden, mußte sowohl die Möglichkeit von Homo- als auch von Heterodimeren minimiert werden. Zusätzlich wurde überprüft, ob sich in der Matrizen-DNA eine weitere mögliche Bindungsstelle für die Oligonukleotide befand, die zu falschen Produkten hätte führen können.

Im Falle der flankierenden Oligonukleotide (Tab. 1) konnten die obigen Voraussetzungen durch die Wahl der Bindestelle an der Matrizen-DNA erreicht werden, die flexibel war. Sie mußte lediglich außerhalb der beiden Klonierungsstellen liegen. Intergenische Bereiche wurden vermieden, da sich dort häufig Sekundärstrukturen in der DNA bilden, die die Bindung behindern. Mit den gleichen Oligonukleotiden konnte später sequenziert werden (vgl. 2.1.2). Im Falle der Mutageneseoligonukleotide waren die oben ausgeführten Anforderungen schwie-

riger zu erfüllen, denn die Position der Bindungsstelle war durch die gewünschte Mutation vorgegeben. Darüber hinaus mußte dieses Oligonukleotid beiderseits der Mutagenesestelle hinreichend fest an die Matrizen-DNA binden. Denn es war nicht nur in der ersten PCR das Startermolekül, es war auch in der zweiten PCR der Teil des PCR-Produktes, der von der DNA-Polymerase verlängert wurde. Dies erforderte sehr lange Oligonukleotide mit etwa 40 Basenpaaren, die zur Bildung von Haarnadelstrukturen und Dimeren neigten. Um dies zu verhindern, mußten bei Mutationen von γ S34 verkürzte Oligonukleotide eingesetzt werden. Es wurde der komplementäre Bereich verkürzt, der erst in der zweiten PCR verlängert wurde, in der die zusätzlichen Basenpaare des PCR-Produktes die Bindung an die DNA-Matrize stabilisierten.

Mutation	Beginn 5' Sequenz		3′	Ende
γV13A,P	4869	GATCTTTTGCGTGTTCTGagsGCTTGCGATCTTACTACG		4831
γV13G,C	4869	GATCTTTTGCGTGTTCTGacmGCTTGCGATCTTACTACG		4831
γS34P	4923	GCGATCCTGagsTTTACGCATTTTGGAAGCGGCG		4890
γS34G	4923	GCGATCCTGacmTTTACGCATTTTGGAAGCGGCG		4890
γA236P	5537	CGGGCGGCCTGCTCGCTagsCAGGTTTTCAACCACGC		5502
γA236G,C	5537	CGGGCGGCCTGCTCGCTacmCAGGTTTTCAACCACGC		5502
γA241P	5558	CTTTCATCGCCACCATACGcggGGCCTGCTCGCTGGCC		5517
γA245P	5565	GTCGGTCGCGGCTTTCATcggCACCATACGGGCGGCC		5529

Name	Beginn 5	Sequenz	3′	Ende
RostI	5190	CTCCGTGGGCGGCAATGTTG		5209
RostII	5736	CGGCGCCGATTACCTAC		5718
RostIII	5358	CGGAACCTGAGACATGG		5342
RostVI	4565	GCAGCAGAACGTGGTTACC		4583

Tab. 1: Basensequenz der eingesetzten Oligonukleotide.

Großbuchstaben entsprechen den Sequenzen im *unc*-Operon, deren Position nach der Numerierung von (165) angegeben sind. Oligonukleotide, die dem nichtcodogenen Strang entsprechen, beginnen bei einer höheren Position als sie enden. Klein geschriebene Buchstaben kennzeichnen das mutierte Codon, wobei s für ein Gemisch gleicher Mengen G und C steht, m für A und C. Die ursprünglichen Aminosäuren, ihre Position und die neuen Reste (bei zweien durch Komma getrennt) ergeben die Bezeichnung der untersuchten Mutanten.

Die Mutagenesestelle selber war in ihrer Sequenz auf die Basentripletts der gewünschten Aminosäure festgelegt. Die Auswahl wurde weiter eingegrenzt durch seltene Codons, die in den Genen der ATP-Synthase praktisch nicht benutzt werden (165). Da sie die Proteinexpression beeinträchtigen können, wurden sie nicht verwendet. Um den Mutageneseaufwand zu verringern, wurde eine gerichtete Mehrfachmutagenese durchgeführt. Hierbei wurde ein Basengemisch aus zwei anstatt einer Base bei der Synthese des Oligonukleotides in der Mutagenesestelle eingesetzt. Dies ermöglichte das parallele Erzeugen einer zweiten Mutation ohne nennenswerten Mehraufwand bei der anschließenden Identifikation durch Sequenzierung. Die konstruierten Oligonukleotide sind in Tab. 1 aufgelistet.

2.1.1.2 Durchführung der ersten PCR

In der ersten PCR wurde ein Bereich des Plasmides pDP34 mit dem zu mutierenden *uncG*-Gen vervielfältigt. Dabei wurde die von der Vorlage abweichende Sequenz des verwendeten Mutageneseoligonukleotid in die neu synthetisierte DNA eingebaut.

Die Reaktion fand in einem Cetus-Thermocycler (PerkinElmer) statt. Der Reaktionsansatz enthielt in 20 µl Reaktionspuffer 10 mM aller vier Desoxynukleotide als Substrat für die DNA-Neusynthese. Als Startermolekül für die Kettenverlängerung wurden je 10 pmol des flankierenden und des Mutageneseoligonukleotides eingesetzt, während 5 ng pDP34 als Matrizen-DNA dienten. Die jeweils eingesetzten Oligonukleotide sind dem Mutageneseschema (Abb. 10) zu entnehmen. Um ein Verdampfen zu verhindern, wurde der Ansatz mit 50 µl sterilfiltriertem Mineralöl überschichtet.

Die PCR wurde in 30 Zyklen durchgeführt, die sich jeweils in drei Phasen unterteilten (Tab. 2). In der Denaturierungsphase wurde der Ansatz so weit erhitzt, daß sich die doppelsträngige DNA voneinander trennte. Um am Anfang der PCR eine vollständige Trennung der Plasmidstränge zu gewährleisten, wurde im ersten Zyklus länger und bei erhöhter Temperatur denaturiert. Da dies auch die DNA-Polymerase teilweise inaktiviert hätte, wurde 5 µl (1 U) der verdünnten Polymerase erst in der darauffolgenden Bindungsphase hinzugegeben. Hier wurde die Temperatur so weit gesenkt, daß die Oligonukleotide an die Matrizen-DNA binden konnten. Sie wurden in der Verlängerungsphase von der Pfu-Polymerase (Stratagene) verlängert. Dieses Enzym arbeitet bei 72 °C optimal und besitzt eine sehr geringe Fehlerrate (10⁻⁶), die Sequenzabweichungen durch falsch eingebaute Nukleotide minimierte. Die Dauer der Verlängerungsphase richtete sich nach der Größe des neu zu synthetisierenden Stranges, wobei für 1000 Basenpaare 1-2 Minuten kalkuliert wurden. Die Verlängerungsphase des letzten Zyklusses wurde verlängert, damit alle Stränge vollständig zu Ende synthetisiert wurden und die Polymerase nicht mehr an die DNA gebunden war. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt.

Zyklus	1	2-29	30
Denaturierungsphase	5 min 94 °C	1 min 93 °C	1 min 93 °C
Bindungsphase	2 min 54 °C	1 min 53 °C	2 min 53 °C
Verlängerungsphase	1 min 72 °C	1 min 72 °C	5 min 72 °C

 Tab. 2 : Programm der ersten PCR

Die Tabelle gibt die unterschiedliche Dauer und Temperatur der einzelnen Phasen an. Da Zyklus 1 und 30 von den anderen Zyklen abweichen, sind sie separat angegeben. Nach der PCR wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt.



Abb. 10: Mutageneseschema

Die Zeichnung veranschaulicht die PCR-Mutagenese in dem Plasmid pDP34. Die gezackten Enden begrenzen einen Ausschnitt, in dem Gene als Blockpfeile in Richtung ihrer Ablesung dargestellt sind und intergenische Bereiche als einfache Linie. Die zur Klonierung benutzten Restriktionsschnittstellen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Einfache Pfeile symbolisieren die gebundenen Oligonukleotide, die durch PCR in Pfeilrichtung zu den als Doppellinien dargestellten Produkten verlängert wurden. Da ein Strang des ersten PCR-Produktes als Startermolekül in der zweiten PCR eingesetzt wurde, wurde seine Verlängerungsrichtung durch eine Pfeil angedeutet. Die durch einen Kasten markierte Sequenzabweichung wurde aus dem zweiten PCR-Produkt anstelle der Ausgangssequenz in den Expressionsvektor pDP34 kloniert.

2.1.1.3 Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt. Die Bande mit der gewünschten Größe wurde ausgeschnitten und die DNA daraus eluiert, um in der zweiten PCR eingesetzt zu werden.

Nach der PCR wurde das Mineralöl abgenommen und der Ansatz mit DNA-Probenpuffer gemischt. Der gesamte Ansatz wurde auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, das mit DNA-Elektrophoresepuffer überschichtet war. Der Vergleich mit 0,5 µg eines geeigneten Größenstandards erlaubte nach 2 Stunden Gelelektrophorese bei 65 mA eine Größenabschätzung der entstandenen PCR-Fragmente. Hierzu wurde das Gel auf einen Blaulicht-Leuchtschirm (Mo-BiTec) mit einer Filterbrille betrachtet, die nur oranges Fluoreszenzlicht durchließ. Im Gegensatz zu ultravioletter Strahlung schädigte das Blaulicht die DNA nicht, sondern regte nur die Fluoreszenz des daran gebundenen Ethidiumbromides an. Die Gelbereiche mit Banden in der erwarteten Größe der PCR-Produkte wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde durch Aufschmelzen der Agarose und anschließende Anionenaustauscherchromatographie (Qiaex, Qiagen) wiedergewonnen, um in der zweiten PCR eingesetzt zu werden. Der Erfolg der Elution wurde vorher durch Gelelektrophorese (siehe oben) überprüft.

DNA-Elektrophoresepuffer:		Agarosegel-Lösung:
40 mM 20 mM 1 mM pH	Tris NaAcetat EDTA 7,5 mit Essigsäure	20 g/l Agarose 1 mg/l Ethidiumbromid in DNA-Elektrophoresepuffer
		DNA-Probenpuffer:
		1 g/l Bromphenolblau 50 % Glycerin (v/v) in DNA-Elektrophoresepuffer

2.1.1.4 Durchführung der zweiten PCR

Das Produkt der ersten PCR enthielt neben der gewünschten Mutation bereits eine Klonierungsstelle. Um die zweite Klonierungsstelle auf der anderen Seite der Mutation zu erzeugen, wurde die DNA in einer zweiten PCR verlängert.

Diese PCR gleicht in ihrer Durchführung der ersten PCR. Allerdings wurde hier statt des Mutageneseoligonukleotides das Produkt der ersten PCR eingesetzt. Da es sich hierbei um einen Doppelstrang handelte, konkurrierte die Bindung des komplementären Stranges mit der Bindung an die Matrizen-DNA. Um letzteres zu begünstigen, wurde die 10fache Menge der Plasmid-DNA eingesetzt.

Aus dem Mutageneseschema (Abb. 10) geht das eingesetzte zweite flankierende Oligonukleotid hervor. Es band im Gegensatz zu dem der ersten PCR in der entgegengesetzten Orientierung und auf der anderen Seite der Mutagenesestelle, so daß in das Endprodukt eine zweite Klonierungsstelle eingebaut wurde. Die Temperatur der Bindungsphase wurde dem Schmelzpunkt des flankierenden Oligonukleotides angepaßt (Tab. 3). Die Dauer wurde verlängert, damit das mehrere hundert Basenpaare lange Produkt der ersten PCR genug Zeit für eine Bindung hatte.

Zyklus	1	2-29	30	
Denaturierungsphase	5 min 94 °C	1 min 93 °C	1 min 93 °C	
Bindungsphase	3 min 54 °C	3 min 53 °C	6 min 53 °C	
Verlängerungsphase	1 min 72 °C	1 min 72 °C	5 min 72 °C	

Tab. 3: Programm der zweiten PCR

Die Tabelle gibt die unterschiedliche Dauer und Temperatur der einzelnen Phasen an. Da Zyklus 1 und 30 von den anderen Zyklen abweichen, sind sie separat angegeben. Nach der PCR wurden die Proben auf 4 °C abge-kühlt.

2.1.1.5 Klonierung der mutierten Fragmente

Die Produkte der zweiten PCR enthielten singuläre Erkennungssequenzen für zwei Endonukleasen, die auch in pDP34 nur jeweils einmal schnitten. Nach Restriktion mit diesen und Gelelution konnten sie in pDP34 kloniert werden.

Die von Mineralöl befreiten Ansätze der zweiten PCR wurden ebenso wie das Plasmid pDP34 über Nacht bei 37 °C einer Doppelrestriktion unterzogen. Die geeigneten Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe von 10fach konzentriertem Reaktionspuffer der Hersteller eingestellt. Bei Mutationen im N-terminalen Bereich der Untereinheit γ wurden die Endonukleasen Stul und Sful (Roche) benutzt. Wurde der C-Terminus mutiert, wurde mit RsrII und PmeI (NEB) restringiert. Der Vektor wurde darüber hinaus mit alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert, um in der anschließenden Ligation keine Selbstreligation zu erlauben. Die mit DNA-Probenpuffer versetzten Proben wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und DNA-Fragmente mit der erwarteten Größe eluiert (vgl. 2.1.1.3). Die Konzentration im Eluat wurde durch Gelelektrophorese eines Aliquots und Vergleich mit bekannten DNA-Mengen abgeschätzt.

Anschließend wurde das Fragment mit dem Vektor ligiert. Dazu wurden 15 fmol Fragment mit 5 fmol Vektor und 5 U T4-DNA-Ligase (Roche) im entsprechenden Ligationspuffer gemischt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C, um die Ligation glatter Enden zu erlauben. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde in kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert (vgl. 0). Von den Kolonien wurden Kulturen angezogen und Plasmid-DNA durch partielle Lyse und Anionenaustauscherchromatographie (Qiaspin, Qiagen) isoliert. Ausbeute und Größe wurden auf einem 0.75%igen Agarosegel überprüft, bevor die Plasmide sequenziert wurden.

2.1.2 DNA-Sequenzierung

Nach der gerichteten Vielfachmutagenese klärte eine erste Sequenzierung der Plasmide, ob und welche der möglichen Mutationen eingeführt worden waren. Sie wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (131) durchgeführt. Bei mutierten Plasmiden wurden zusätzliche Sequenzabweichungen ausgeschlossen, indem der klonierte Bereich inklusive Restriktionsschnittstellen sequenziert wurde. Die Ergebnisse wurden durch eine Auftragssequenzierung bei der Firma MWG-Biotech bestätigt. Nach derselben Strategie wurde bei dem Überexpressionsvektor pCYB1 γ (vgl. 2.1.3) vorgegangen.

Um einzelsträngige DNA zu erhalten wurden 3 μ g der Plasmide in 0,4 M NaOH für 10 min bei Raumtemperatur alkalisch denaturiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Nach Resuspendieren in Bindungspuffer, dem 10 pmol Oligonukleotid zugefügt wurden, band dieses bei 37 °C an die Plasmid-DNA. Die Neusynthese des DNA-Stranges erfolgte durch T7-DNA-Polymerase (Pharmacia) unter Einbau von [α -³²P]-dATP zur radioaktiven Markierung. Die Strangverlängerung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und durch Einbau von Didesoxynukleotiden kontrolliert abgebrochen.

Die Gelelektrophorese der DNA-Fragmente, die mit bekanntem Nukleotid endeten, erfolgte in einer vertikalen S2-Gelapparatur von Gibco. Durch die denaturierenden Bedingungen im 4% igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel wurden sie nach ihrer Länge in Basenpaaren aufgetrennt. Nach 2 h mit 60 W wurde das zur Stabilisierung auf einer Glasplatte gebundene Gel in 10% iger Essigsäure fixiert, getrocknet und mit einem Röntgenfilm (Kodak) belegt. Nach einer Autoradiographie über Nacht wurde der Film entwickelt und aus dem Bandenmuster die DNA-Sequenz ermittelt.

2.1.3 Konstruktion eines Fusionsproteins mit Untereinheit γ

Die Isolation der nativen Untereinheit γ aus E. coli ist präparativ sehr aufwendig und liefert vergleichsweise geringe Ausbeuten. Deswegen wurde die Untereinheit y mit einem Protein fusioniert, das aus einem Inteinelement und einer Chitin-Binde-Domäne besteht (29). Durch letztere ist eine schnelle und effiziente Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie möglich. Erstere ist eine ursprünglich aus Hefe stammende Aminosäuresequenz, die unter reduzierenden Bedingungen die Selbstspaltung des Proteins auslöst. Dadurch werden das Inteinelement und die Chitin-Binde-Domäne von der γ Untereinheit abgetrennt, so daß sie ohne zusätzliche Aminosäuren isoliert



Abb. 11: Plasmidkarte pCYB1y

Die Plasmidkarte zeigt das aus dem Plasmid pCYB1 (28) konstruierte Plasmid pCYB1 γ in seiner zirkulären Form. Das Gen für das Fusionsprotein aus Untereinheit γ , Intein und Chitin-Binde-Domäne (CBD) sowie für die Ampicillinresistenz (amp) sind als Blockpfeile in ihrer Ableserichtung dargestellt. Die Zahlen geben Beginn und Ende von codierenden Genabschnitten in einer Numerierung nach Basenpaaren an, deren Startpunkt willkürlich gewählt ist.

wurde. Der von NEB vertriebene Vektor pCYB1 erlaubt darüber hinaus über einen IPTGinduzierbaren Promoter die Überexpression des Fusionsproteins zur Steigerung der Ausbeute.

Der proteincodierende Bereich des Genes *uncG* wurde so in das Plasmid pCYB1 kloniert, daß sowohl das Startcodon hinter dem *lac*-Promoter für die Translation benutzt wurde, als auch das Leseraster mit dem am 3'-Ende fusioniertem Protein übereinstimmte. Die hierzu benötigten Sequenzen wurden vor und hinter dem Strukturgen mit Hilfe einer PCR eingefügt, die in ihrer Durchführung mit der in 2.1.1.2 geschilderten PCR bis auf die folgenden Abweichungen übereinstimmte:

Die Oligonukleotide bestanden am 3'-Ende aus der Basensequenz, die für den N- bzw. C-Terminus der Untereinheit γ codierten. Das 5'-Ende der Oligonukleotide entsprach der Sequenz des Überexpressionsvektors und enthielt die darin singulären Restriktionsschnittstellen für SapI bzw. NdeI. Als Matrizen-DNA wurden 5 ng pDP34-Plasmid eingesetzt. Um eine Veränderung des Genes *uncG* durch Lesefehler der Polymerase zu verhindern, wurde Pfu-Polymerase (Stratagene) mit ihrer geringen Fehlerrate verwendet.

Das fertige PCR-Produkt wurde ebenso wie der Vektor pCYB1 mit SapI und NdeI in dem von Roche mitgelieferten Reaktionspuffer verdaut. Der Vektor pCYB1 wurde darüber hinaus durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert, um seine Religation zu verhindern. Bei einer anschließenden Gelelektrophorese wurden andere DNA-Fragmente von der DNA mit der erwarteten Größe abgetrennt. Diese wurde eluiert und ihre Konzentration durch ein Agarosegel bestimmt. Da sowohl SapI als auch NdeI überhängende Enden erzeugen, reichte eine 60minütige Inkubation von 15 fmol Fragment, 5 fmol Vektor und 5 U DNA-Ligase in Ligationspuffer bei 37 °C. Die Hälfte des Ansatzes wurde in XL1-Blue-Zellen transformiert. Von den resultierenden Kolonien wurden Kulturen angezogen und die Plasmid-DNA isoliert. Durch Sequenzierungen (vgl. 2.1.2) wurden Sequenzabweichungen im klonierten Bereich ausgeschlossen.

2.1.4 Plasmide und Stämme

Je nach Zielsetzung der Versuche mußten für die Experimente unterschiedliche Vektoren und Stämme eingesetzt werden, um optimale Plasmid-Replikation, Proteinexpression oder physiologische Messungen zu ermöglichen. Ihre Genotypen sind in Tab. 4 angegeben.

Der Stamm XL1-Blue diente zur Aufnahme und Produktion von Plasmid-DNA während der molekularbiologischen Arbeiten, da bei ihm ein defektes Reparatursystems (recA⁻) unerwünschte Rekombinationen verhindert.

Durch Klonieren des *uncG*-Strukturgenes in den von NEB bezogenen Vektor pCYB1 entstand das Plasmid pCYB1 γ (vgl. Abb. 11.). Von ihm konnte durch Induktion mit IPTG ein Fusionsprotein überexprimiert werden, in dem der C-Terminus der Untereinheit γ mit einem Inteinelement und ein Chitin-Binde-Protein verbunden war. Als Expressionsstamm wurde BL21(DE3) eingesetzt. Die damit ermöglichte Isolation reiner Untereinheit war die Grundlage für die immunologische Quantifizierung (vgl. Abb. 27).

Für physiologische Untersuchungen (vgl. 2.3) wurde der ATP-Synthase-defiziente Stamm DK8 mit dem Plasmid pDP34 (92) komplementiert. Es ist ein Derivat des Vektors pUC118 (161), in dessen multiple Klonierungsstelle mit HindIII und KpnI alle Strukturgene des Enzyms von *E. coli* kloniert sind. Die Klonierung des *unc*-Operons von Position 870 bis 7763
(numeriert nach (165)) ließ sich aus der Literatur nicht eindeutig ermitteln und wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Zur Charakterisierung von Mutanten wurden Plasmide eingesetzt, die im *uncG*-Gen die entsprechende Mutation trugen. Aufgrund der Deletion eines Großteils des *unc*-Operons in DK8 war die Interferenz genomischer Allele ausgeschlossen.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	recA ⁻ (recA1; lac ⁻ ; endA1; gyrA96; thi; hsdR17; supE44; re-	(1)
	lA1; {@F' proAB; lac^{q} ; $lacZ \Delta M15$; Tn10})	
BL21(DE3)	hsdS gal (lcI ts857 ind 1 Sum7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	(151)
DK8	1100 Δ(uncB-uncC) ilv::Tn10	(87b)

Tab. 4: Genotypen der verwendeten Stämme

Die Tabelle listet die verwendeten Stämme mit ihrem Genotyp und ihrer Referenz in der Literatur auf.

2.2 Mikrobiologische Methoden

Die Wahl des Modellorganismus *E. coli* erleichterte nicht nur die genetische Manipulation, sie erlaubte auch eine schnelle und einfache Anzucht.

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Lösungen wurden entweder durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Die Bakterien wurden (außer in 2.2.3) in 2YT-Vollmedium unter selektiven Bedingungen (0,1 g/l Ampicillin) angezogen, unter denen nur rekombinante Zellen mit Plasmid wuchsen. Dies stellte eine homogene Kultur sicher, in der alle Zellen dieselbe genetische Komplementation behielten.

2YT-Medium:	16 g/l	Casein
	10 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	pН	7,5 mit NaOH

2.2.1 Transformation

Bakterien wurden nach einer Methode von Hanahan (62) für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent gemacht und transformiert.

Nach dem langsamen Auftauen der gefrierkompetenten Zellen auf Eis wurden 50 ng der gewünschten Plasmid-DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, bevor er einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s unterzogen wurde. Anschließend wurde der Transformationsansatz sofort mit 450 µl 2YT-Medium versetzt, das auf 37 °C vorgewärmt war. Während einer anschließenden Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C bildeten transformierte Zellen ihre neuerworbenen Antibiotikaresistenz aus. Danach wurden 50 µl des Ansatzes auf Agarplatten ausgestrichen, deren 2YT-Medium 15 g/l Agar und 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Überexpression der γ-Untereinheit als Fusionsprotein

Die Überexpression eines Fusionsproteins der Untereinheit γ der ATP-Synthase basiert auf der Induktion eines dem Gen vorgeschalteten Promoters durch IPTG (151). Nach Transformation des Plasmides pCYB1 γ in BL21(DE3) wurden die Expressionsbedingungen in kleinem Maßstab erprobt. Sie wurden zur Überproduktion an den Fermentermaßstab angepaßt. Die aufgereinigte Untereinheit diente später zur Quantifizierung des Enzymgehaltes.

2.2.2.1 Überexpression im Schüttelkolben

Mit Zahnstochern wurden Zellen in zwei 5-ml-Röhrchen 2YT (+100 µg/ml Ampicillin) überführt. Die Vorkultur wuchs über Nacht bei 37 °C und 180 Upm. Mit der gesamten Kultur wurde ein 2-l-Kolben mit Schikanen angeimpft, der 1 l 2YT-Medium und 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Zellen hatten nach 3 h eine OD von ca. 1 bei 600 nm erreicht. Dann wurden sie in 5 Ansätze á 200 ml aufgeteilt, die bei verschiedenen Temperaturen (16, 25, 30 und 37 °C) kultiviert wurden. Die Expression wurde durch 1 mM IPTG induziert. Ein Kontrollansatz wurde nicht mit IPTG versetzt. Die Zellernte erfolgte wie in 2.3.1 beschrieben.

2.2.2.2 Überexpression im Fermenter

Die Überexpression erfolgte in einem 1,51-Fermenter (Braun Biotech) im Institut für Biochemie der Universität zu Köln. Die Fermentation bot neben einem größeren Kulturvolumen den Vorteil, durch bessere Sauerstoffversorgung höhere Zelldichten als im Schüttelkolben erreichen zu können.

Mit einem Zahnstocher wurden Zellen einer Einzelkolonie in 2 ml 2YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin übertragen. Nach 6 Stunden Anzucht bei 37 °C unter Schütteln wurde die gesamte Kultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml desselben Mediums überführt und über Nacht bei 30 °C mit 100 Upm geschüttelt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 4 bei 600 nm wurde die gesamte Vorkultur in einen Fermenter überführt, der 1,4 l Medium enthielt. Die Zellen wuchsen 4 h bei 30 °C und 30 % Sauerstoffsättigung, bis sie mit 0,4 mM IPTG induziert wurden. Zusätzlich wurden 1,5 ml Ampicillin (50 mg/ml) hinzugegeben. Das Antibiotikum sollte verhindern, daß Zellen ohne Plasmide durch ihren Selektionsvorteil nach Induktion die überproduzierenden Zellen überwuchsen. 2 h nach Induktion wurde die Fermentation beendet und die Zellen geerntet (vgl. 2.3.1).

2.2.3 Wachstumsversuche auf Minimalmedien

Kann die ATP-Synthase aufgrund einer Mutation kein ATP mehr synthetisieren, so ist *in vivo* keine oxidative Phosphorylierung im Rahmen der Atmung mehr möglich (19). Dies verhindert das Wachstum auf einem von Tanaka (155) beschriebenen Minimalmedium, wenn es das nicht vergärbare Succinat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthält.

DK8-Zellen, deren Gene für die ATP-Synthase weitgehend deletiert sind, wurden durch eine Transformation mit dem Plasmid pDP34 komplementiert, das diese Gene entweder unverändert oder mit den zu untersuchenden Mutationen enthielt. Um das Wachstum des unkomplementierten Stammes zu überprüfen, wurde durch das Plasmid pUC18 Ampicillinresistenz vermittelt. Nach Ausbildung der Antibiotikaresistenz in 2YT-Medium wurde dieses Vollmedium entfernt, da es ein Wachstum durch Gärung erlaubt hätte. Daher wurden die Zellen für 30 s bei 14.000 xg sedimentiert, der Überstand abgenommen und durch ein gleiches Volumen Minimalmedium ersetzt. Die Zellen wurden resuspendiert und der Vorgang zweimal wiederholt. Anschließend wurden von der Zellsuspension 50 µl auf Agarplatten getropft, die das Minimalmedium entweder mit 0,4 g/l Succinat oder mit 0,4 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle enthiel-

ten. Jede Platte wurde neben den mutanten Stämmen auch mit DK8/pUC18 und DK8/pDP34Wt als Kontrollen beimpft und bei 37 °C 48 Stunden inkubiert. Um fehlendes von langsamen Wachstum zu unterscheiden, wurde der Zeitraum auf bis zu 7 Tage ausgedehnt.

34	mМ	K ₂ HPO ₄
64	mМ	KH_2PO_4
20	mМ	$(NH_4)_2SO_4$
15	g/l	Agar
0,3	mМ	$MgSO_4$
10	μM	CaCl ₂
1	μM	FeSO ₄
1	μM	ZnCl ₂
50	mg/l	Isoleucin
50	mg/l	Valin
50	mg/l	Asparagin
50	mg/l	Thymin
2	mg/l	Thiamin
50	mg/l	Ampicillin
	34 64 20 15 0,3 10 1 1 50 50 50 50 2 50	34 mM 64 mM 20 mM 15 g/l 0,3 mM 10 μM 1 μM 1 μM 50 mg/l 50 mg/l 50 mg/l 50 mg/l 50 mg/l 50 mg/l

2.2.4 Anzucht für physiologische Untersuchungen

Unterschiedliche Anzuchtbedingungen beeinflussen die Physiologie und die genetische Stabilität von *E. coli* (108). Unter den gewählten Bedingungen vergärt *E. coli* das Überangebot an Zucker, so daß die ATP-Synthase als Teil der oxidativen Phosphorylierung keinem Selektionsdruck unterliegt, der bei Funktionsstörung eventuell auftretende Revertanten fördert.

Die Anzucht erfolgte in 11-Erlenmeyerkolben, die zwei gegenüberliegende Schikanen für einen verbesserten Lufteintrag besaßen. Sie wurden mit 500 ml 2YT-Medium gefüllt und durch 30minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Die Sterilität wurde durch eine mindestens 24stündige Lagerung bei Raumtemperatur überprüft. Anschließend wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 7,5 ml 50%iger (w/v) Glucose versetzt. Zum Animpfen wurden ausschließlich Zellen des Stammes DK8 benutzt, die am Tag zuvor transformiert und über Nacht bei 37 °C auf Agarplatten kultiviert worden waren. Von den erhaltenen Einzelkolonien wurden Bakterien mit einem Zahnstocher in das Flüssigmedium überführt. Die Kulturen wurden bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt, bis sie die spät logarithmische Phase erreichten und die Zellen geerntet wurden.

2.3 Physiologische Messungen

Um die ATP-Synthase physiologischen Messungen zugänglich zu machen, war zunächst die Präparation von invertierten Membranvesikeln aus *E. coli* notwendig. Dadurch wurde das Enzym für von außen zugegebene Substrate zugänglich. Gleichzeitig verblieb es intakt in einem Membransystem, das den Aufbau eines Protonengradienten erlaubte.

2.3.1 Präparation invertierter Membranvesikel aus E. coli

Um invertierte Membranvesikel aus *E. coli* zu isolieren, wurde eine Methode von Hase und Strotmann (65) modifiziert.

Die Zellen aus 0,5 l Medium wurden bei 9.000 xg für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und im folgenden bei 4 °C im Kühlraum weiter bearbeitet. Der Überstand wurde dekantiert und die sedimentierten Zellen in so viel eiskaltem Isolationsmedium mit einem gummiüberzogenen Glasstab resuspendiert, daß sich eine Suspension mit 0,325 g Frischgewicht/ml ergab.

Je 4 ml der Zellsuspension wurden mit einem *Sonifier Cell Disruptor B 15* (Branson) für 6 Minuten bei 50 % Puls und Stufe 2 beschallt. Dabei entstehende Wärme wurde durch eine Eiswasserbad abgeführt. Unaufgeschlossene Zellen und Zellfragmente wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 27.000 xg und 4 °C abgetrennt. Die in Lösung verbliebenen, intakten Vesikel wurden durch eine präparative Ultrazentrifugation sedimentiert (75 min bei 4 °C und 278.000 xg). Das Sediment wurde mit einem Spatel in 500 µl Isolationsmedium resuspendiert und enthielt durchschnittlich 40 µg/µl Protein.

Isolationsmedium:	20	mМ	Tricin
	10	mМ	MgCl ₂
	100	g/l	Glycerin
		pН	8,0 mit NaOH

2.3.2 Substrate und Effektoren

Substrate und Inhibitoren hatten entscheidenden Einfluß auf die physiologischen Messungen. Sie wurden nicht nur auf ihre Konzentration und Reinheit überprüft, sondern auch ihr pH-Wert eingestellt und mögliche Lösungsmitteleffekte ausgeschlossen. Die Konzentration der Stoffe wurde, wann immer möglich, mit den Extinktionskoeffizienten aus Tab. 5 bestimmt. Für Phosphat war hierfür ein colorimetrischer Nachweis nötig (vgl. 3.3.3), mit dem auch die Verunreinigung der organischen Phosphatverbindungen durch anorganisches Phosphat bestimmt wurde.

Im Falle von ADP und ATP konnte eine Verunreinigung durch den jeweils anderen Stoff aufgrund des gleichen Extinktionskoeffizienten im Spektralphotometer nicht ausgeschlossen werden. Hier wurde durch gekoppelte optisch-enzymatische Tests der Gehalt an diesen Substanzen bestimmt: ADP wurde über ein Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-System quantifiziert, ATP über ein Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-System. Die jeweiligen Verunreinigungen sind in Tab. 5 zusammengefaßt und lagen stets unter 1 %.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Indikatorpapier kontrolliert. Er wurde bei sauren Lösungen (insbesondere ATP!) durch Zugabe von festem Natriumcarbonat auf 8 eingestellt. Bei Natrium- bzw. Kaliumphosphat wurden gleich konzentrierte Lösungen aus primären und sekundärem Phosphat gemischt, bis laut pH-Elektrode pH 8,0 erreicht war.

Einige der Stoffe waren nur in Ethanol löslich, darunter auch der Entkoppler Nigericin und der Fluoreszenzfarbstoff ACMA. Die Endkonzentration des Ethanols lag in den Versuchen stets unter 0,5 % (v/v). Um einen Einfluß auf die Messungen auszuschließen, wurden zu allen Versuchen Kontrollmessungen ausgeführt, in denen aber auch 1 % (v/v) Ethanol die Messungen nicht beeinflußte.

-	Wellen-	Extinktions-	zitiert	Verunreinigung		ng
	länge	koeffizient	nach	in % (mol/mol) mit		mit
	in nm	in cm/mM		ATP	ADP	Pi
ATP	259	15,4	(130)	-	0,9	0,8
ADP	259	15,4	(130)	0,12	-	0,12
AP ₅ A	259	30,8	(44)	0,7	0,8	0,5
NADH	366	3,22				0,1
ACMA	412	8,2	(96)			
Aurovertin	369	38,5	(90b)			

Tab. 5: Extinktionskoeffizienten und Verunreinigungen

Angegeben sind zum einen die Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten, mit denen die Konzentration der Stoffe ermittelt wurde. Daneben sind für Adeninderivate die Verunreinigungen durch Adeninnukleotide und Phosphat angegeben.

2.3.3 ATP-Synthese

Die Bildung von ATP aus ADP und P_i wurde über den Einbau von radioaktiv markierten anorganischem Phosphat in organische Verbindungen (ATP, Glucose-6-phosphat) nachgewiesen. Als energetische Triebkraft wurde mit NADH ein respiratiorischer Protonengradient an invertierten Membranvesikeln aufgebaut.

2.3.3.1 ATP-Synthesereaktion

Die Synthesereaktion wurde bei 25 °C in der gerührten Glasküvette eines selbstgebauten Fluorimeters durchgeführt, in dem parallel der ΔpH verfolgt werden konnte (vgl. 2.3.4).

Zunächst wurden Membranvesikel mit 900 µg Protein zu dem Synthese-Meßmedium gegeben, das 40 µM AP₅A enthielt, um die Adenylatkinase zu hemmen (44). Die Zugabe von 0,2 µM ACMA ermöglichte über die Aufzeichnung der Fluoreszenzlöschung das Verfolgen des Protonengradienten. Dieser wurde durch Zugabe von 600 µM NADH induziert. Nach einer Minute wurde die Synthesereaktion durch 50 µl Substratmix gestartet. Er enthielt 15 mM ADP, 250 mM nicht-radioaktives Phosphat und 20 µCi trägerfreies [³²P]P_i (Amersham). Das entstehende ATP wurde durch Hexokinase mit Glucose zu Glucose-6-phosphat umgesetzt. Dies regenerierte ADP und hielt somit das Phosphorylierungspotential konstant, da Phosphat im Überschuß vorhanden war. Im Abstand von 15 s wurden aus den 2,5 ml Reaktionsansatz 150 µl Probe entnommen und auf einem gleichen Volumen eiskalter 3 M Perchlorsäure gestoppt.

Synth	ese-M	eßmedium:	<u>Substr</u>	at-Mix:	
20	mМ	Tricin	15	mМ	ADP
5	mМ	MgCl ₂	250	mМ	K-Phosphat
150	mМ	KCl	20	μCi	³² P-Phosphat
12	mМ	Glucose	3,5	U/µl	Hexokinase
40	μM	AP ₅ A	in	Synthe	ese-Meßmedium
100	nM	Valinomycin			
	рН	8,0 mit NaOH			

2.3.3.2 Probenaufarbeitung

Die Proben wurden nach der Methode von Sugino und Miyoshi (152) aufgearbeitet, um in organische Stoffe eingebautes Phosphat von anorganischem zu trennen. Zu Beginn wurden 50 μ l in ein Scintillationsgefäß mit 10 ml H₂0 überführt, um die Gesamtmenge an radioaktivem Phosphat ermitteln zu können. Dann wurde anorganisches Phosphat mit 500 μ l Fällungsreagenz 20 min auf Eis ausgefällt und durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C sedimentiert. Um die Fällung des radioaktiv markierten Phosphates zu verbessern, wurden 50 μ l 10 mM P_i hinzugegeben und die Proben erneut wie oben auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurden 700 μ l des Überstandes, der das organisch gebundene ³²P enthielt, zu 10 ml H₂O in einem Scintillationsgefäß gegeben.

Fällungsreagenz:	30	g/l	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O
(frisch angesetzt)	5	%	<i>conc</i> . HCl (v/v)
	1	%	Triethanolamin (v/v)
	1	%	Bromwasser (v/v)

2.3.3.3 Detektion und Auswertung

Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des Cerenkov-Effektes im Scintillations-Zähler Wallac 1410 (Wallac, Freiburg) detektiert. Zur Auswertung wurde ein Programm von Dr. Schwarz (136) benutzt. Es ermittelt nicht nur durch lineare Regression unter Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen die ATP-Syntheserate, sondern es stellt auch die Meßpunkte grafisch dar, so daß diese kritisch bewertet werden konnten. Ein anfangs beobachteter, nach unten abweichender letzter Meßpunkt konnte mit Hilfe der parallel aufgenommenen Fluoreszenzlöschung dem Zusammenbruch des Protonengradienten am Ende der Meßzeit zugeordnet werden. Dieses Problem wurde durch Erhöhung der NADH-Konzentration auf 0,6 mM gelöst. Neben dem Δ pH wurde auch die Konzentration der Substrate indirekt überwacht. Da ADP und radioaktives P_i in einem Schritt zugegeben wurden, konnte über die Gesamtmenge an Radioaktivität nachvollzogen werden, daß beide Substratkonzentrationen in den Reaktionsansätzen eines Meßtages vergleichbar waren.

2.3.4 ApH-induzierte Fluoreszenzlöschung

Die Messung des Protonengradienten über der Membran basiert auf der damit einhergehenden Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffes ACMA. Er ist eine schwache Base ($pK_a=8,6$ (93)), die unprotoniert membranpermeabel ist. Über den genauen Mechanismus der Fluoreszenzlöschung wird noch diskutiert, unumstritten ist die Abhängigkeit vom Protonengradient (78).

Die Fluoreszenz wurde in einem nach Strotmann (150) gebauten Fluorimeter (Abb. 12) gemessen, in dessen Küvette der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 3 ml auf 25 °C temperiert und mit 700 Upm gerührt wurde. Die Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 410 nm angeregt und nach Durchgang durch einen Interferenzfilter (495 nm) von einer Photodiode gemessen. Der Protonengradient selber wurde entweder durch Substrate für protonenpumpende Enzyme oder durch ein Kalium-Potential induziert.





Aufriß eines Fluorimeters nach Strotmann (150)

Der Meßansatz wird in einer Glasküvette (1), die in einem temperierten Aluminiumblock (2) integriert ist, mit Hilfe eines magnetischen Rührkerns (4) und eines Magnetrührers (5) gerührt. Durch einen Lichtleiter (3) gelangt das Licht einer nicht gezeigten Lampe zur Fluoreszenzexcication in die Küvette und die Fluoreszenzemission aus der Küvette zu einer angeschlossenen Photodiode. Die Meßkammer wird während der Messung mit einem Deckel (6) verschlossen, um störenden Lichteinfall von außen zu vermeiden.

2.3.4.1 Substrat-induzierte Protonengradienten

In der Cytoplasmamembran von *E. coli* befinden sich neben der ATP-Synthase auch die Komplexe der Atmungskette (108). In invertierten Membranvesikeln sind sie für ihre von außen zugegebenen Substrate erreichbar und können durch gerichteten Protonentransport einen Gradienten aufbauen.

Vesikel mit 100 µg Membranprotein wurden zu dem vortemperierten Meßmedium gegeben, das 100 nM Valinomycin enthielt, um ein elektrisches Potential zu unterbinden. Nachdem das Grundsignal registriert worden war, wurden 0,2 µM ACMA hinzugefügt und gewartet, bis sich das Fluoreszenzsignal stabilisiert hatte. Dann wurden entweder 2 mM ATP oder 0,3 mM NADH als Substrat hinzugegeben, um einen Protonengradienten aufzubauen. Sollte der Effekt von Nukleotiden auf den respiratiorischen Δ pH gemessen werden, so wurde er durch 30 mM Lactat und 8 U Lactat-Dehydrogenase stabilisiert. Am Ende der Messungen wurde 0,3 µM Nigericin als Entkoppler eingesetzt, das den Protonengradienten über der Membran zusammenbrechen ließen. Dadurch konnte die maximal mögliche Fluoreszenz ermittelt werden, die durch Wechselwirkung der Nukleotide mit dem Farbstoff gegenüber der Anfangsfluoreszenz in der Regel verringert war.

Meßmedium:	20	mМ	Tricin
	5	mМ	MgCl ₂
1	50	mМ	KCl
1	00	nM	Valinomycin
		pН	8,0 mit NaOH

2.3.4.2 K⁺-Potential-induzierte Protonengradienten

Zur Erzeugung eines elektrochemischen Potentials wurden Kaliumionen-beladene Vesikel in einem Kalium-armen Medium mit Valinomycin für diese Ionen permeabilisiert (118,119). Der Ausstrom von K⁺ erfordert zur elektrischen Kompensation den Einstrom anderer positiver Ladungen wie Protonen. Dieser Protoneneinstrom war maßgeblich von der Protonenpermeabilität der Membran abhängig.

500 μ l der zuvor isolierten Membransuspension (vgl. 2.3.1) wurden mit kaltem Kalium-Waschmedium auf 5 ml aufgefüllt und durch eine Zentrifugation (75 min bei 4 °C und 278.000 xg) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment resuspendiert und erneut wie oben gewaschen. Die Membranen in 250 μ l des Puffers resuspendiert und nach einer Proteinbestimmung auf 30 μ g/ μ l eingestellt, so daß stets gleiche Mengen K⁺-Ionen (<0,75 mM Endkonzentration) in das Meßmedium eingetragen wurden.

Der Protonengradient wurde wie oben beschrieben durch die ACMA-Fluoreszenzlöschung in 3 ml Endvolumen gemessen. Das Meßmedium enthielt statt Kaliumchlorid 400 mM Natriumchlorid und kein Valinomycin. 5 mM Natriumphosphat wurde, falls angegeben, vor Beginn der Messung im Medium vorgelegt. Unmittelbar nachdem 450 µl Membransuspension hinzugegeben worden waren, wurde die Grundlinie registriert und 33 nM ACMA hinzugefügt. 15 s nach den Membranen wurde 165 nM Valinomycin gemeinsam mit den angegebenen Nukleotiden zum Medium gegeben. Am Ende der Messung wurden die Vesikel durch Zugabe von 0,33 µM Nigericin entkoppelt.

Kalium-Waschmedium:		Natri	Natrium-Meßmedium:			
20 mM 5 mM 250 mM 10 %	Tricin MgSO ₄ K ₂ SO ₄ Glycerin (w/v) 8 0 mit KOH	20 5 400	mM mM mM pH	Tricin MgCl ₂ NaCl 8,0 mit NaOH		

2.3.5 ATP-Hydrolyse

Die Hydrolyse von ATP wurde über die colorimetrische Bestimmung des dabei freigesetzten Phosphates nach Taussky und Shorr (156) unter Bedingungen gemessen, die die maximale Stabilität des F_0F_1 gewährten. Für die Bestimmung der Aktivierungsenergie aus der Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse mußten diese Bedingungen modifiziert werden, um die maximale Geschwindigkeit zu ermitteln.

2.3.5.1 Membrangebundene ATP-Hydrolyse

Neben dem intakten Enzym kann auch der lösliche F_1 Subkomplex ATP hydrolysieren, wobei sich durch Ablösung eine stark gesteigerte Hydrolyseaktivität zeigen kann (146). Um dies bei destabilisierten Mutanten zu verhindern, wurde bei hohen Magnesiumkonzentrationen gemessen, die die Bindung des F_1 an den F_0 in der Membran fördern.

Darüber hinaus enthielt das Meßmedium den Entkoppler Nigericin, der verhindert, daß ein durch ATP-Hydrolyse gebildeter Protonengradient die Hydrolyse inhibiert. Zu dem auf 25 °C vorgewärmten Meßmedium wurden 450 µg Membranprotein gegeben und 30 s äquilibriert. Die Reaktion wurde durch Zumischen von ATP zu einer Endkonzentration von 2 mM gestartet. Alle 15 s wurden aus dem Ansatz mit 1,5 ml Endvolumen je 300 µl Proben entnommen und auf demselben Volumen eiskalter 1 M Trichloressigsäure gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 4 °C mit 14.000 Upm abzentrifugiert, 300 µl Farbreagenz hinzugegeben und 1 min bei 37 °C inkubiert. Eine erneute Zentrifugation verhinderte Trübungen durch ausgefallenes Protein. Die Extinktion des Phosphomolybdatkomplexes bei 740 nm wurde photometrisch bestimmt und durch den Vergleich mit einer Eichreihe bekannter Phosphatkonzentration kalibriert.

Hydrolyse-Meßmedium:	20	mМ	Tricin
	5	mМ	MgCl ₂
	150	mМ	KC1
	333	nM	Nigericin
	100	nM	Valinomycin
		pН	8,0 mit NaOH

2.3.5.2 Aktivierungsenergie der ATP-Hydrolyse

Die Aktivierungsenergie der ATP Hydrolyse wurde über die Temperaturabhängigkeit der Reaktion mit Hilfe der Arrheniusgleichung (7) bestimmt. Um die ermittelte Aktivierungsenergie eindeutig dem geschwindigkeitslimitierenden Teilschritt zuordnen zu können, wurde die maximale Rate v_{max} bestimmt.

Dazu war zum einen der Einsatz eines ATP-regenerierenden Systems notwendig, in dem Pyruvatkinase gebildetes ADP mit Phosphoenolpyruvat wieder zu ATP umsetzte. Zum anderen mußte die ATP-Konzentration auf 10 mM erhöht werden. Dies gewährleistete nicht nur die Substratsättigung des Enzyms ($K_m = 0,1$ mM), sondern auch eine niedrige Konzentration freier Mg²⁺-Ionen, die die ATP-Synthase kompetetiv hemmen. Die Aktivität von 0,3 mg Membranprotein wurde von 20-50 °C gemessen. Der pH-Wert wurde bei diesen Temperaturen nachtitriert und die Aktivitätssteigerung durch Verkürzung der Meßzeit kompensiert.

Der Arrheniusplot ergibt sich aus der Auftragung des Logarithmus von v_{max} gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur T, bei der die maximale Rate bestimmt wurde. Die Steigung der resultierenden Gerade ergibt nach Multiplikation mit -R (= -8,31441 J/K/mol) die Aktivierungsenergie E_a des geschwindigkeitslimitierenden Reaktionsschrittes in kJ/mol. Aus ihr errechnet sich die Enthalpie des Übergangszustandes ΔH^{\ddagger} durch Abzug von R*T. Die freie Gibb'sche Energie ΔG^{\ddagger} des Übergangszustandes und die Entropie ΔS^{\ddagger} wurden nach den in (7) angegebenen Methoden und Formeln ermittelt.

Arrhenius-Meßmedium:	20	mМ	Tricin
	5	mМ	MgCl ₂
	150	mМ	KCl
	333	nM	Nigericin
	100	nM	Valinomycin
	5	mМ	Phosphoenolpyruvat
	27	U/ml	Pyruvatkinase
(pH 8,0 mit NaOH bei der	jeweiligen I	Meßtem	peratur eingestellt)

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Aufreinigung der überexprimierten Untereinheit γ

Nach der Expression wurden die Zellen geerntet und aufgebrochen. Das während der Überexpression gebildete Fusionsprotein wurde an eine Chitinsäule gebunden, von der die Untereinheit γ nach Abspaltung des Intein/Chitin-Binde-Protein eluiert wurde. Die Abspaltung beruht auf der autokatalytischen Proteaseaktivität des Intein-Elements unter reduzierenden Bedingungen, wie sie für dieses Protein ursprünglich in Hefe beschrieben worden ist (29).

Die Bakterienkultur wurde bei 9.000 xg für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Je 4 g der Zellen wurden in 40 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und mit einer *French Press* bei 1100 psi Druck in zwei bis drei Durchgängen aufgeschlossen, bis die Lösung dünnflüssig war. Unaufgeschlossene Zellen und Zellfragmente wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 27.000 xg und 4 °C, Membranvesikel durch eine anschließende Ultrazentrifugation (75 min bei 4 °C und 278.000 xg) abgetrennt.

Je 10 ml des Überstandes wurden auf eine Chitinsäule (2 ml Säulenmaterial, Durchmesser 1 cm) aufgetragen, die mit Chitinsäulenpuffer voräquilibriert war. Sie wurde mit 10 Säulenvolumen dieses Puffers gewaschen. Nach dem Auftrag von 2 Säulenvolumen Spaltungspuffer wurde der noch vorhandene Chitinsäulenpuffer von der Säule eluiert und die Chromatographie gestoppt. Über Nacht führte das im Spaltungspuffer vorhandene 30 mM DTT zur Abspaltung des Inteins samt Chitin-Binde-Domäne von der Untereinheit γ . Diese wurde am nächsten Morgen mit insgesamt 10 ml Spaltungspuffer eluiert, während das Intein/Chitin-Binde-Protein an der Säule gebunden blieb.

Das Eluat wurde mit 50 mM Magnesiumchlorid und 15 % (w/v) PEG8000 versetzt. Nach einer Stunde auf Eis wurde das ausgefällte Protein durch eine Zentrifugation (60 min 30.000 xg 4 °C) sedimentiert und in 1 ml Spaltungspuffer ohne DTT resuspendiert. Nach einer Proteinbestimmung wurde die Reinheit auf einem silbergefärbten SDS-Gel (vgl. 3.1.2) überprüft, bevor die Untereinheit als Standard in der Quantifizierung benutzt wurde.

Aufscl	hluß-P	uffer:	Spal	tungsp	uffer:
20	mМ	Na-Phosphat pH 8.0	20	тM	Henes
500	mM	NaCl	0,1	mM	EDTA
0,1	mМ	EDTA	50	mМ	KCl
1	g/l	Na-Azid		pН	8,0 mit NaOH
frisch	hinzug	efügt:	frisc	h hinzı	ugefügt:
2	mg/l	DNAseI	30	mМ	DTT
1,25	g/l	complete Proteasehemmer (Roche)			
Chitin	säulen	puffer:			
20	mМ	Hepes			
0,1	mМ	EDTA			
500	mМ	KCl			
	pН	8,0 mit NaOH			

2.4.2 Proteinbestimmung

Der Gehalt an Protein wurde durch eine Farbreaktion mit Hilfe der Bichinonsäure (142) bestimmt. Dieser Nachweis ist besonders geeignet für die Bestimmung von Membranprotein.

Die dazu notwendige Bichinonsäure- und Kupfersulfatlösungen wurden von Pierce bezogen. Sie sind als Einzelkomponenten stabil und wurden kurz vor der Reaktion miteinander gemischt. Die Proteinproben und die als Eichlösung eingesetzte Rinderserumalbumin-Lösung wurden so verdünnt, daß sie in 50 µl 5-50 µg Protein enthielten. Während der Inkubation mit 1 ml der Färbelösung bei 37 °C für 30 min wurden die Cu²⁺-Ionen reduziert. Die entstanden Cu⁺-Ionen bildeten mit zwei Bichinonsäuremolekülen einen purpurnen Komplex mit einem Extinktionsmaximum bei 562 nm. Durch Vergleich mit der Eichgeraden wurde die Konzentration an Protein ermittelt.

2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese (49) nach ihrem Molekulargewicht getrennt, wobei Proteinkomplexe in der Regel in ihre Untereinheiten dissoziierten.

Als Gelmatrix wurde ein gelöstes Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch in 1 mm Dicke zwischen zwei Glasplatten durch Zugabe von TEMED und APS radikalisch polymerisiert. Nach dem Erhärten der Trenngellösung, die je nach aufzulösender Proteingröße zwischen 10 und 15 % Acrylamid enthielt, wurde darauf ein 5%iges Sammelgel gegossen. Durch einen darin eingesteckten Kamm wurden Taschen für die spätere Probenaufnahme ausgespart.

Zur Elektrophorese wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur (V15-17, Gibco) vertikal eingespannt und die Pufferreservoirs mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die in SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 10 min denaturierten Proben wurden in die Probentaschen gefüllt. Durch Anlegen einer Spannung von 180 V zwischen der oberen Kathode und der unteren Anode wanderten die Proteine durch das Gel nach unten. Der Gellauf wurde gestoppt, sobald der im SDS-Probenpuffer enthaltene Farbstoff das untere Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten getrennt und entweder geblottet oder silbergefärbt.

Trenngellösung:		<u>10x SDS-E</u>	10x SDS-Elektrophoresepuffer:		
375 mM 1 g/l 100 g/l 2,7 g/l	Tris/Cl pH 8,9 SDS Acrylamid Bisacrylamid	0,21 M 1,92 M 0,5 g/l	Tris Glycin SDS		
Sammelgellösung:		5x SDS-Pro	<u>obenpuffer</u>		
125 mM 1 g/l 50 g/l 1,3 g/l	Tris/Cl pH 6,7 SDS Acrylamid Bisacrylamid	250 mM 250 g/l 100 g/l 25 %	Tris/Cl pH 8,0 Glycerin SDS β-Mercaptoethanol (v/v) Promphanolblau		

2.4.4 Silberfärbung von Proteinen

Die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (72) hatte eine sehr geringe Nachweisgrenze, so daß selbst 5-10 ng Protein im Gel sichtbar gemacht werden konnten.

Das Gel wurde über Nacht in Fixierlösung geschüttelt, bevor es 1 h in Inkubationslösung getränkt wurde. Nach dreimaligem Waschen in H₂O für 15 min wurde es für 30 min mit Silberlösung inkubiert. Nach kurzem Umschwenken in H₂O wurde durch Carbonatlösung die Färbung entwickelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Dann wurde die Reaktion mit 50 mM EDTA gestoppt. Die Gele wurden in PE-Folie eingeschweißt aufbewahrt.



Abb. 13: Silberfärbung von Proteinen

Die Grafik skizziert den Ablauf einer Silberfärbung. Das SDS-Gel wurde die angegebene Zeit in den Lösungen geschüttelt, deren Zusammensetzung unter den Wannen aufgeführt ist. Sobald die Proteinbanden sichtbar waren, wurde das Gel in 50 mM EDTA-Lösung aufbewahrt, um die Entwicklung zu stoppen.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Antikörperherstellung

Die Herstellung von Antikörpern gegen Epitope im N- und C-Terminus des Proteins sollte später ermöglichen, auch teilexprimierte oder degradierte Formen zu identifizieren. Dazu wurden künstliche Oligopeptide mit entsprechender Sequenz synthetisiert. Um ihre Erkennung durch das Immunsystem zu ermöglichen wurden sie an das Trägerprotein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) gekoppelt, bevor die Kaninchen damit immunisiert wurden. Die Immunreaktion wurde durch Entnahme von Blut überwacht, aus dem auch die Antikörper isoliert wurden.

2.5.1.1 Oligopeptidsynthese

Die Oligopeptide wurden nach der Festphasenmethode (101) mit einem automatischen Peptidsynthesizer (Applied Biosystems) von Dr. Köhrer hergestellt. Ihre Sequenz entsprach einem Teil des C- und des N-Terminus von Untereinheit γ (Tab. 6). Die Epitope wurden so ausgesucht, daß sie in Computeranalysen mit dem Programm gcg (Genetic Computer Group, Madison, Wi, USA) eine hohe Antigenizität versprachen. Der C-Terminus der künstlichen Oligonukleotide trug stets ein Cystein, um die Kopplung an das Trägerprotein zu erlauben.

Lokalisation	Sequenz	entspricht in γ
N-Terminus	KDIRSKIASVQNTQKC	γ4-18
C-Terminus	YNKARQASITQELTEC	γ264-278

Tab. 6: Sequenz künstlicher Oligopeptide

Die Tabelle gibt für die synthetisierten Peptide die Aminosäuresequenzen an, und welchem Bereich der Untereinheit γ diese entsprechen. Das C-terminale Cystein kommt jeweils nicht in γ vor, war aber zur Kopplung der Peptide an ein Trägermolekül notwendig.

2.5.1.2 Kopplung der Oligopeptide

Die Oligopeptide wurden nach einer Methode von Gnann *et al.* (54) an das Trägerprotein KLH gekoppelt, um so ihre Erkennung durch das Immunsystem zu fördern.

55 μl 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,2, vgl. 2.3.2) wurden zu 250 μl einer Stammlösung mit 5 mg KLH gegeben. Unter langsamen Rühren wurden 85 μl MBS-Lösung hinzugefügt, so daß

eine lokale Dimethylformamid-Konzentration über 30 % vermieden wurde, die das KLH ausgefällt hätte. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit MBS an freie Aminogruppen des KLH binden konnte. Überschüssiges MBS wurde durch eine Gelfiltration über eine Sephadex-G25-Säule in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) abgetrennt. Die proteinhaltigen Fraktionen im Ausschlußvolumen der Säule wurden durch ihre Absorption bei 280 nm erkannt und in Fraktionen á 1 ml aufgefangen. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt wurden vereinigt und unter Rühren zu 5 mg der Oligopeptide gegeben, die in 1 ml entgastem PBS-Puffer gelöst waren. Der pH-Wert des Ansatzes wurde auf 7-7,5 eingestellt, bevor bei 4 °C unter Rühren für 4 h die Kopplung der Peptide über eine Schwefelbrücke erfolgte. Aliquots wurden bis zur Immunisierung der Kaninchen bei -20 °C eingefroren.

MBS-Lösung:	PBS-Puffer:
6 g/l MBS in Dimethylformamid	150 mM NaCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 40 mM Na ₂ HPO ₄

2.5.1.3 Immunisierung der Kaninchen

Es wurden 360 µl des Kopplungsansatzes mit der gleichen Menge kompletten Freundschen Adjuvans (Difco, Detroit) vermischt und den Kaninchen subcutan gespritzt.

Unmittelbar zuvor wurde aus der Ohrvene Blut abgenommen, um das sogenannte Nullserum zu erhalten, das auf schon vorhandene Reaktionen mit *E. coli*-Proteinen getestet wurde. Die Blutentnahmen wurden im zweiwöchigen Rhythmus fortgesetzt, bis sich in den Seren eine ausreichende Immunantwort zeigte. Diese wurde durch eine zweite, subcutane Injektion von 360 µl Kopplungsansatz gemischt mit 360 µl inkompletten Freundschem Adjuvans verstärkt. Eine Woche danach wurden die Kaninchen entblutet.

2.5.2 Antikörperaufreinigung

Die Antikörper wurden vor ihrer Verwendung in zwei Schritten aufgereinigt. In einem ersten Schritt wurden die Antikörper von anderen Blutbestandteilen getrennt. Danach wurden nach einer Methode von Wright und Overath (177) Antikörper entfernt, die an andere Proteine und nicht an die ATP-Synthase banden, um so die Spezifität des Antiserums zu erhöhen.

2.5.2.1 Abtrennung von Blutbestandteilen

Das Kaninchenblut gerann über Nacht und wurde bei 5000 xg für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 15 min bei 56 °C denaturiert und erneut wie oben zentrifugiert.

Das als Überstand verbleibende Rohserum wurde mit einem vierfachen Volumen 60 mM Acetat, pH 4,0, sowie 1/8 Volumen Caprylsäure versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das säuregefällte Serumalbumin wurde durch eine 30minütige Zentrifugation bei 15.000 xg sedimentiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 1/20 seines Volumens 20x PBS-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Antikörper aus dem Überstand durch Zugabe von 0,277 g/ml Ammoniumsulfat unter Rühren bei 4 °C für 30 min gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 7.000 xg für 15 min wurde das Sediment in 1/10 Volumen des eingesetzten Rohserums mit PBS-Puffer resuspendiert. Eingetragenes Ammoniumsulfat wurde durch eine Dialyse über Nacht bei 4 °C gegen PBS-Puffer entfernt.

2.5.2.2 Entfernen von Antikörpern mit unerwünschter Spezifität

200 µl der aufgereinigten Antiseren wurden mit 20 ml 1%iger Caseinlösung verdünnt. Außerdem wurden ATP-Synthase-freie Membranvesikel mit insgesamt 2 mg Protein hinzugegeben, die aus dem Stamm DK8/pUC18 isoliert worden waren (vgl. 2.3.1). Der Ansatz wurde 5 min bei 0 °C mit einem Branson Sonifier Cell Disruptor bei 50 % Puls und Stufe 2 beschallt. Eine Inkubation bei 4 °C für 2 Stunden unter Rühren ermöglichte die Bindung von Antikörpern, die andere Membranproteine als die ATP-Synthase in *E. coli* erkennen, an ihre Antigene auf den Vesikeln. Sie wurden durch eine Zentrifugation bei 4 °C für 75 min bei 278.000 xg zusammen mit den Vesikeln abgetrennt. Der Überstand wurde mit 2 mg Membranprotein versetzt und erneut wie oben behandelt. Die aufgereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.5.3 Western-Blots

Um die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit Antikörpern spezifisch nachweisen zu können, müssen sie auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und immobilisiert werden. Hierzu wurde eine "Semi-dry"-Blotting Apparatur (Novablot, Amersham Pharmacia) nach einer von Kyhse-Andersen (89) ausgearbeiteten Vorschrift benutzt. Auf die befeuchtete Anode wurden drei mit Lösung 3 getränkte Filterpapiere luftblasenfrei übereinander gestapelt. Darauf wurde das kurz in Lösung 2 geschwenkte Gel gelegt. Das Gel wurde mit einer in Lösung 2 getränkten Nitrocellulosemembran mit 0,1 µm Porengröße bedeckt. Anschließend wurden ein mit Lösung 2 und zwei mit Lösung 1 getränkte Filterpapiere aufgelegt. Eventuell vorhandene Luftblasen, die den Stromfluß behindert hätten, wurden durch vorsichtiges Überrollen mit einem Glasstab zu den Seiten hin ausgetrieben.



Abb. 14: Aufbau eines Western-Blot

Der Aufbau eines Western-Blots ist schematisch gezeigt. Die Filterpapiere sind als Striche dargestellt, zwischen die das SDS-Gel (Viereck) und die Membran (dünner Strich) gepackt sind. Die Lösungen, in denen sie getränkt wurden, sind rechts davon mit ihrer Zusammensetzung angegeben. Auf der linken Seite ist der Stromkreis zwischen Kathode und Anode angedeutet, dessen Spannung Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern läßt.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 4 °C durch einen Stromfluß von 1 A/cm² für 1 Stunde. Anschließend wurde das Gel zur Kontrolle einer Silberfärbung unterzogen. Die Nitrocellulose wurde in Ponceau-Rot-Lösung umgeschwenkt, bis die gebundenen Proteine gut sichtbar waren. Überschüssige Farblösung wurde durch kurzes Umschwenken in H₂O entfernt, bevor die Spuren und die Banden im Standard markiert wurden. Zwei 20minütige Inkubationen in Caseinlösung sättigten die Nitrocellulose mit Protein ab, so daß der Antikörper nicht mehr unspezifisch an die Membran binden konnte. Überschüssiges Casein wurde durch eine Waschung mit TN-Puffer für 20 Minuten abgewaschen, bevor die Membran zusammen mit dem gewünschten Erstantikörper in PE-Folie eingeschweißt wurde.

Der Antikörper band über Nacht bei 4 °C unter Schütteln an seine membrangebundenen Antigene. Eine anschließende dreifache Waschung in TNT-Puffer für je 20 Minuten entfernte lose anhaftende Antikörper. Nach einer weiteren Waschung in TN-Puffer für 20 Minuten wurden die Membranen erneut eingeschweißt, diesmal mit Zweitantikörperkonjugat. Nach 90 min Schütteln bei Raumtemperatur wurden ungebundene Antikörper durch Waschen wie oben entfernt. Die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase wurde durch Inkubation der Membran mit dem Chemiluminescence-Reagenz von Roche nachgewiesen. Das darin enthaltene H_2O_2 setzte das Enzym zu O_2 um, das Luminol unter Lichtentwicklung oxidierte. Die Signale wurden in der Dunkelkammer durch Belichtung eines Filmes (Fuji) dokumentiert.

TN-Puffer:		TNT-Puffer:	Caseinlösung:
150 mM 10 mM pH	NaCl Tris 8,0 mit NaOH	100 g/l Triton-X100 in TN-Puffer	10 g/l Casein in TN-Puffer

2.5.4 Immunologische Quantifizierung

Die Quantifizierung einzelner Untereinheiten stellvertretend für die Gesamtmenge an vorhandener ATP-Synthase erfolgte immunologisch über quantitative Immunodetektion. Die Signalstärke relativ zur eingesetzten Probenmenge ermöglichte im Vergleich mit einem Standard die Abschätzung der vorhandenen Enzymmenge.

Zunächst wurden unterschiedliche Mengen der Proben und des Standards durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Aufgrund des inhomogenen elektrischen Feldes in Randbereichen wurde nur das Zentrum der Blotelektroden verwendet. Der Nachweis erfolgte ebenfalls über Biolumineszenz, allerdings mit den ECL Plus-Reagenzien (Amersham Pharmacia). Sie ergaben für einen größeren Bereich der eingesetzten Probenmenge einen linearen Zusammenhang zur gemessenen Biolumineszenz als die Reagenzien von Roche, die bei geringen Mengen eine größere Empfindlichkeit erreichten.

Die Lichtsignale wurden durch eine CCD-Kamera von Fuji in einer lichtdichten Kammer direkt digital aufgenommen. Dies vermied im Vergleich mit dem Scannen eines zuvor entwikkelten Filmes zusätzliche Zwischenschritte und damit verbundene Fehlerquellen. Die direkte Aufnahme der Lumineszenz war technisch bedingt aber mit zwei Fehlern behaftet:

Zum einen hat ein Photodetektor immer Fehlströme, die zu einem elektrischen Stromsignal führten, obwohl gar kein Licht vorhanden war. Da dies mit steigender Temperatur zunimmt, wurde die Kamera während der Aufnahmen auf -30 °C gekühlt. Zudem wurde nach der Aufnahme für dieselbe Zeitdauer das Signal bei verschlossener Blende aufgezeichnet und als Rauschen von dem aufgenommenen Bild abgezogen (sogenannte *Dark-frame-correction*).

Zum anderen ergibt sich bei der Aufnahme ein geometrisches Problem: Licht von Punkten, die unmittelbar senkrecht unter der Linse liegen, hat den kürzesten Weg zum Objektiv. Diese Strecke ist für Licht von den Randpunkten des Bildes aus länger, so daß die Signale dort durch den längeren Weg an Intensität verlieren würden. Dieser Fehler wurde aufgrund der bekannten Kamerageometrie berechnet und bei der Aufnahme des Bildes korrigiert (sogenannte *Flat-frame-correction*).

Das aufgenommene Bild wurde mit Hilfe des Programmes *Image gauge* (Fuji) ausgewertet, indem das aufgezeichnete Signal der einzelnen Banden integriert wurde. Die Signalstärken wurden relativ zur eingesetzten Proteinmenge aufgetragen, was in dem eingesetzten Mengenbereich für die Proben lineare Zusammenhänge ergab. Die Steigung der Ausgleichsgeraden wurde als Maß für die Menge der ATP-Synthase relativ zu den anderen Proben ausgewertet. Das gleiche Verfahren wurde auf F₁ bzw. Untereinheit γ angewendet. Die dabei ermittelte Steigung erlaubte unter Annahme 100%iger Reinheit und der bekannten Molekulargewichte (31,4 kDa für γ , 580 kDa für F₁ F₀) die Umrechnung der relativen Werte in absolute Mengen ATP-Synthase pro mg Protein.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

Die durchgeführten Mutagenesestudien basieren darauf, daß eventuelle Funktionsstörungen allein den Mutationen im Enzym zugeordnet werden können. Eine gestörte Expression würde die Ergebnisse verfälschen und mußte durch einen spezifischen Nachweis des Proteins ausgeschlossen werden. Hierzu wurden Antikörper gegen die γ -Untereinheit der ATP-Synthase aus *E. coli* erzeugt. Mit ihnen wurde die Menge der Untereinheit in den Membranvesikeln ermittelt. Die für die absolute Quantifizierung notwendige Untereinheit γ wurde isoliert, indem ein IPTG-induzierbares Fusionsprotein mit einem Intein konstruiert, überexprimiert und gereinigt wurde.

3.1.1 Herstellung von Antikörpern

Zur Immunisierung wurden zwei künstliche Peptide synthetisiert, die je einer Teilsequenz der Untereinheit γ aus *E. coli* entsprechen. Die eng begrenzten und definierten Epitope erlauben die Immunodetektion verschiedener Domänen der Untereinheit. Beide hergestellten Antiseren detektieren im Western-Blot die Untereinheit γ (Abb. 15). Der gereinigte Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins (γ 4-18) ist monospezifisch. Der Antikörper gegen den C-Terminus (γ 264–278) geht zwar darüber hinaus eine Immunoreaktion mit einem hochmolekularen Protein aus *E. coli* ein. Dieses ist von seiner Größe her jedoch so deutlich von Untereinheit γ verschieden, daß es deren Nachweis nicht stört (Abb. 15). Beide Antikörperpräparationen zeigen keine Kreuzreaktionen mit der γ -Untereinheit aus *Chlamydomonas reinhardtii* (A. Knopp, pers. Mitteilung). Ebensowenig zeigt ihre Zugabe zu invertierten Membranvesikeln von *E. coli*, die die ATP-Synthase des Wildtyps enthalten, einen Einfluß auf die ATP-Hydrolyse oder die dadurch getriebene Protonentranslokation. Dies spricht für eine Lokalisation der Epitope im Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes, wie sie auch nach der Röntgenkristallstruktur zu erwarten ist (52,68).



Spezifität der Anti-_{\gamma}-Antikörper gegen den

Abb. 15 : Spezifität der Anti-γ-Antikörper

Um die Immunoreaktion der Antikörper zu testen, wurden Proben des Stammes DK8/Wt (+) eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Proben des ATP-Synthase-freien Stammes DK8/pUC18 (-). Gesamtzellprotein ist mit Z, Membranvesikel mit M und cytosolischer Überstand mit Ü bezeichnet. Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und immunodetektiert. Die Laufweite der F₁-Untereinheiten α , β und γ ist am Rand durch Pfeile markiert. Das zur Untereinheit gehörende Immunsignal ist durch den Vergleich mit dem F₁-Standard identifizierbar. In dem linken Western-Blot zeigt der gegen das Nterminale Epitop gerichtete Antikörper nur eine Immunreaktion gegen Untereinheit γ . Der gegen das C-terminale Epitop gerichtete Antikörper zeigt im rechten Western-Blot darüber hinaus noch Signale, die oberhalb der Untereinheit γ liegen.

3.1.2 Überexpression und Reinigung der Untereinheit γ

Der Vektor pCYB1 γ trägt ein Genkonstrukt, in dem an die Untereinheit γ eine Inteinsequenz und eine Chitin-Binde-Domäne angehängt sind. Die Expression des Fusionsproteins wird durch IPTG induziert. Nach Vorversuchen mit Schüttelkulturen wurde ein Fermentationsprotokoll für einen Rührfermenter ausgearbeitet, das die Expression von großen Mengen Fusionsprotein erlaubt.



Abb. 16: Fermentationsverlauf

Dargestellt sind die Entwicklung der Zelldichte (Punkte) und der Rührerdrehzahl (Linie). Sie stellt ein Maß für den Sauerstoffeintrag dar, der mit dem Sauerstoffverbrauch identisch ist, da der O₂-Partialdruck konstant auf 30 % gehalten wurde. Für die Induktion (Pfeil) mußte der Rührer angehalten und die Druckluftzufuhr unterbrochen werden, damit nach Abbau des Überdrucks IPTG- und Ampicillinlösung zugegeben werden konnten.

färbten SDS-Gelen (nicht gezeigt) gegenüber den Vorversuchen reduziert, doch überkompensiert dies die erhöhte Zellmasse bei weitem. Die Ausbeute war 4,5 mg Fusionsprotein aus 1,51 Kulturmedium gegenüber 0,6 mg/l im Schüttelkolben.

Das Fusionsprotein wird durch Bindung an eine Chitinsäule von anderen Polypeptiden getrennt. Nach DTTinduzierter Abspaltung des Fusionsproteins eluiert die Untereinheit γ zusammen mit einigen anderen Proteinen. Diese werden durch PEG-Fällung entfernt, wonach die Untereinheit γ nahezu rein ist (Abb. 17). Sie zeigt im SDS-Gel dieselbe Laufstrecke wie die entsprechende Bande in isoliertem F₁. Ob sie in ihrer nativen Konformation vorliegt, konnte noch nicht geklärt werden. Versuche, sie an CF₀ in Thylakoidmembranen aus Spinat zu binden, schlugen bisher fehl (K. Zientek, pers. Mitteilung). Da der Sauerstoffeintrag im Fermenter gegenüber dem Schüttelkolben wesentlich verbessert ist, kann die Induktion bei hohen Zelldichten erfolgen. Die Proteinbiosynthese führt zur Stagnation des Wachstums, die mit einem konstanten Sauerstoffbedarf einhergeht (Abb. 16). Bei 30 °C und 0,4 mM IPTG wird das Fusionsprotein in löslicher Form exprimiert. Sein Anteil am Gesamtprotein erscheint zwar in silberge-



Abb. 17:

Gereinigte Untereinheit y

Das silbergefärbte SDS-Gel zeigt links den isolierten F_1 als Standard. Er enthält einige Fremdproteine. Rechts davon ist die überexprimierte Untereinheit γ nach Chromatographie über eine Chitinsäule (Spur 1) und anschließender Fällung des Fusionsproteins mit PEG (Spur 2) aufgetragen.

3.2 Mutanten der Untereinheit γ

N-Terminus			C-Terminus	
Mutation	neues]	Mutation	neues
	Codon			Codon
γV13P	cct		γA236P	cct
γV13G	ggt		γA236G	ggt
γV13A	gct		γA236C	tgt
γV13C	tgt		γE238P*	ccg
γS34P	cct		γE238I [*]	ata
γS34G	ggt		γA241P	ccg
			γR242P [*]	cca
			γR242L	ctg
			γA245P	ccg

Tab. 7: Mutationen der Untereinheit γ

Die Tabelle faßt die vorgestellten Mutanten zusammen. Neben ihrer Bezeichnung aus ursprünglicher Aminosäure, Position und neuer Aminosäure enthält sie das jeweilige verwendete Codon. Die mit * gekennzeichneten Mutanten wurden schon in meiner Diplomarbeit (126) erzeugt.

Die Mutagenesestudien konzentrieren sich auf die α -helicalen C- und N-terminalen Bereiche der Untereinheit γ , in denen der überwiegende Teil der konservierten Aminosäuren liegen (Abb. 18). Die α -Helices liegen im Zentrum des Enzyms umeinandergewunden und erscheinen als Rotationsachse prädestiniert. Der Einbau von Prolin und Glycin, die die Struktur von α -Helices destabilisieren, läßt nach der Rotations-Hypothese schwere Funktionsstörungen erwarten. Über diese Fragestellung hinaus wurden einzelne Seitengruppen daraufhin untersucht, ob sie möglicherweise eine spezielle, essentielle Funktion in dem postulierten Mechanismus erfüllen. Als Ziele für die Mutagenese wurden daher Reste ausgewählt, die in allen Organismen überwiegend identisch oder streng konserviert sind. Die durch Mutation ausgetauschten Aminosäuren der Untereinheit γ sind in Tab. 7 aufgelistet. Sie konzentrieren sich besonders auf die Domäne zwischen $\gamma 236$ und $\gamma 245$.



Abb. 18: Konservierte Aminosäuren und Mutationen in γ

Die Abbildung zeigt das Peptidrückgrat der Untereinheiten α , β und γ , deren Lage in dem oben links eingeblendeten Schema des Enzyms grau unterlegt ist. In der Bildmitte liegen die beiden N- und C-terminalen α -Helices der Untereinheit γ als Bandmodell. Die konservierten Aminosäuren sind grün gefärbt; in Rot sind in dieser Arbeit mutierte, konservierte Aminosäuren dargestellt. Links und rechts der Untereinheit γ sind zur besseren Orientierung die Rückgrate einer Untereinheit α und β gezeigt. Da die geringe Auflösung der Struktur des F₁ aus *E. coli* keine zweifelsfreie Identifizierung von Resten erlaubt, wurde die Struktur aus *B. taurus* (52) verwendet.

3.3 Mutationen der Aminosäuren yE238 und yR242

Bisher liegt noch keine hochaufgelöste Struktur des F₁ aus *E. coli* vor, in der Seitenketten und ihre relative Lage zu anderen Resten und Untereinheiten identifiziert werden können. Im mitochondrialen Enzym (52) liegen γ E238 und γ R242 in der C-terminalen α -Helix der γ -Untereinheit eine Helixwindung übereinander (vgl. Abb. 18 und Abb. 31). Insbesondere bei γ R242 ist in der Struktur nicht eindeutig zu ermitteln, ob der Rest sich knapp unterhalb oder schon im Kopf des F₁ befindet. Beide Seitenketten ragen in Richtung der sogenannten "DELSEED"-Schlaufe im C-terminalen Drittel der Untereinheit β . Eine Modellierung der Röntgenkristallstruktur einer verkürzten Untereinheit γ' aus *E. coli* (124) in das mitochondriale Enzym zeigt einen engen Kontakt zwischen γ und β in dieser Region, der auch Aminosäuren aus dem mittleren Teil der Untereinheit γ einbezieht. Dieser Kontakt könnte daran beteiligt sein, die Rotation von γ während der Katalyse in Konformationsänderungen von β umzuwandeln (124). Dies sollte hohe sterische Anforderungen an die Drehachse stellen, deren α -helicale Struktur in den Mutanten durch den Einbau von Prolin gestört werden sollte.

Darüber hinaus sind die Aminosäuren γ E238 und γ R242 in fast allen Organismen konserviert. Die bisher bekannten Austausche erhalten stets die jeweilige negative bzw. positive Ladung an diesen Positionen. Die Nähe zu anderen, geladenen und ebenfalls konservierten Aminosäuren, insbesondere zu der oben erwähnten "DELSEED"-Schlaufe in Untereinheit β, läßt eine ionische Wechselwirkung vermuten. Die Bedeutung der Ladungen für die die Funktion der ATP-Synthase wurde durch ihren Austausch gegen unpolare Reste in den Mutanten γ E238I und γ R242L untersucht.

3.3.1 Oxidative Phosphorylierung

Das Wachstum von *E. coli* auf Minimalmedien mit Succinat basiert auf der Veratmung dieser Kohlenstoffquelle über die Atmungskette und erfordert eine funktionell intakte ATP-Synthase. Abb. 19 zeigt, daß der Einbau von Prolin in die Untereinheit γ anstelle von γ E238 oder γ R242 das Wachstum der so mutierten Stämme verhindert, während die Stämme mit den Mutationen γ E238I und γ R242L, die die geladenen Seitengruppen gegen unpolare Reste austauschen, wie der Wildtyp wachsen. Daß der Einbau des α -Helix-Brechers Prolin in die C-terminale α -Helix der Untereinheit γ zu einer Funktionsstörung der ATP-Synthase führt, zeigt die in vitro fehlende ATP-Syntheseaktivität invertierter Membranvesikel mit den Prolinmutationen (Abb. 20). Bei diesen Vesikeln wurde durch Oxidation von NADH ein respiratorischer Protonengradient als Triebkraft für die ATP-Synthese aus ADP und Pi aufgebaut, der sich bei den Mutanten erniedrigt zeigte (vgl. die Fluoreszenzmessungen in 3.3.2). Um zu überprüfen, ob möglicherweise die verringerte Triebkraft des reduzierten ApH die ATP-Synthese verhindert, wurden Wildtypvesikel durch Nigericin teilweise entkoppelt, bis sie einen den Mutanten vergleichbaren ΔpH aufbauten. Auch mit dieser verringerten energetischen Triebkraft synthetisiert der Wildtyp ATP, so daß die fehlende ATP-Synthese an Membranvesikeln, die ATP-Synthasen mit den Mutationen yE238P oder yR242P tragen, nicht auf den verringerten respiratorischen Protonengradienten zurückgeführt werden kann.



Abb. 19:

Wachstum auf Succinatminimalmedium

Die abgebildete Agarplatte enthält Succinatminimalmedium und ist mit Bakterien des Stammes DK8 beimpft, die auf dem Plasmid pDP34 die angegebenen Mutationen in y tragen. Als Positivkontrolle ist der Stamm DK8/Wt mitgeführt, als Negativkontrolle der ATP-Synthase-freie Stamm DK8/pUC18. Die Mutationen yE238P und yR242P verhindern das Wachstum. Alle Stämme wachsen in einem Kontrollexperiment auf Nigericin). Dies entspricht dem in den Mutanten beobdiesem Minimalmedium, wenn es Glucose als Kohlenstoffquelle enthält (nicht gezeigt).



.Abb. 20: ATP-Synthese

der Mutanten yE238P und yR242P

Das Balkendiagramm zeigt die spezifische ATP-Synthese-Aktivität von invertierten Membranvesikeln Der als Triebkraft genutzte respiratorische Protonengradient ist im teilentkoppelten Wildtyp durch 90 nM Nigericin soweit reduziert, daß die mit NADH erreichte Fluoreszenzlöschung in den Kontrollexperimenten, die nach den Angaben in 2.3.4 durchgeführt wurden, nur noch 60 % beträgt (gegenüber 76 % ohne achteten Quench (vgl. 3.3.2). Die Werte sind gemittelt aus jeweils mindestens drei Messungen aus drei verschiedenen Vesikelpräparationen. Eine Hintergrundaktivität von 3 nmol/mg/min wurde von den Werten abgezogen. Die Standardabweichung beträgt bei den Mutanten je 3, beim Wildtyp 7 bzw. 9 nmol/mg/min.

3.3.2 Aufbau eines ∆pH

Die Hydrolyse von ATP durch die ATP-Synthase führt in der Umkehrung der Phosphorylierungsreaktion zum Aufbau eines Protonengradienten, der ebenso wie ein durch NADH-Oxidation aufgebauter Protonengradient die Fluoreszenz des Farbstoffes ACMA verringert (vgl. 2.3.4). Berns (15) hat die Fluoreszenzlöschung in dem hier verwendeten Meßsystem durch Aufprägung von unterschiedlichen Phosphatpotentialen kalibriert, so daß der durch den Protonentransport erreichte ΔpH abgeschätzt werden kann.

Die Höhe des Protonengradienten wird durch die Mutation γ E238I beeinträchtigt (Tab. 8), während die Fluoreszenzlöschung in γ R242L sich nicht signifikant vom Wildtyp unterscheidet. Bei Mutanten der Untereinheit γ , die in Position γ 238 oder γ 242 ein Prolin haben, wird durch ATP kein Protonengradient über die Vesikelmembran mehr induziert (Abb. 21). Auch unterschiedliche Meßtemperaturen führen bei diesen Mutanten zu keinem meßbaren Δ pH.



Abb. 21: ΔpH-induzierte Fluoreszenzlöschung durch ATP

Der Verlauf des ACMA-Fluoreszenzsignals ist in dieser Grafik exemplarisch für den Wildtyp und die Mutanten γ E238P und γ R242P dargestellt. Er dient als Maß für den unter ATP-Hydrolyse durch die F₀F₁-ATPase aufgebauten Δ pH. Die Pfeile über den Kurven geben den Zeitpunkt an, an dem die jeweilige Substanz zugegeben wurde. Die Messung beginnt mit den im Medium vorgelegten Membranvesikeln und endet nach der Entkopplung durch Nigericin. Die Differenz zwischen Anfangs- und Endsignal ist die maximal mögliche Fluoreszenz, die als Bezug dient und geringer als die Fluoreszenz nach ACMA-Zugabe ist, da das zugegebene ATP einen Teil der Fluoreszenz durch Interaktion mit ACMA löscht.

Dagegen führt die Oxidation von NADH durch die Komplexe der Atmungskette in allen untersuchten Vesikelpräparationen zu einem respiratorischen Protonengradient. Er ist in Vesikeln reduziert, die eine ATP-Synthase mit der Mutation γ E238P oder γ R242P enthalten, obwohl Kontrollmessungen zeigen, daß die Rate der NADH-Oxidation in diesen Vesikel nicht geringer als bei Wildtypvesikeln ist. Der mit NADH induzierte Protonengradient läßt sich aber durch eine Vorinkubation mit DCCD, das den F₀ für Protonen blockiert, wieder steigern. Dieser entkoppelte Protonenausstrom durch den F₀ in Enzymen, die die Mutationen γ E238P oder γ R242P tragen, erscheint in seinem Ausmaß aber keine hinreichende Erklärung für das vollkommene Fehlen eines Protonengradienten durch Hydrolyse von ATP. Daher wurde bei diesen Mutanten die ATP-Hydrolyse genauer charakterisiert (s. u.).

	Protor	NADH-		
Stamm	ATP	NADH	NADH/DCCD	Oxidation
DK8/pDP34	% Quench der	max. ACMA-Flu	oreszenz (ΔpH)	µmol/min/mg Protein
Wildtyp	61 (2,36)	76 (2,48)	77 (2,49)	0,900
γE238P	0 (0)	59 (2,35)	70 (2,43)	0,879
γR242P	0 (0)	61 (2,36)	71 (2,44)	0,880
γE238I	48 (2,28)	80 (2,52)	79 (2,51)	
γR242L	57 (2,34)	79 (2,51)	78 (2,50)	

Tab. 8: Protonengradient und NADH-Oxidation

Angegeben ist die Fluoreszenzlöschung in % der maximalen Fluoreszenz, dahinter in Klammern der dieser Löschung entsprechende ΔpH , der nach der Kalibrierung von Berns (15) errechnet wurde. Alle Messungen wurden bei 25 °C mit 2 mM ATP oder 0,3 mM NADH als Substrat und 33 mg/l Membranprotein durchgeführt. Vorinkubationen mit 10 μ M DCCD dauerten 10 min bei 25 °C. Die Werte sind gemittelt aus jeweils mindestens 3 Messungen aus 3 verschiedenen Vesikelpräparationen. Die Standardabweichung beträgt in allen Fällen weniger als 4 %. In der rechten Spalte ist die Rate der NADH-Oxidation für die Mutanten angegeben, die mit NADH einen verringerten Protonengradienten aufbauen. Die Oxidation wurde spektralphotometrisch anhand der Abnahme der Extinktion bei 366 nm verfolgt.

3.3.3 ATP-Hydrolyse

Die Rate der ATP-Hydrolyse wird über das aus dem ATP freigesetzte anorganische Phosphat gemessen. Vesikelpräparationen aus allen Mutanten können ATP-Hydrolyse ausführen (Abb. 22). Bei γ E238P ist die Rate der des Wildtyps vergleichbar. Bei γ E238I, γ R242L und γ R242P ist sie bezogen auf Vesikelprotein erniedrigt. Bei der letzteren Mutation korreliert dies jedoch mit einem verringerten Enzymgehalt in den Membranvesikeln, so daß die spezifischen Aktivitäten vergleichbar sind.



Abb. 22: ATP-Hydrolyse

Das Balkendiagramm zeigt die Rate des bei der Hydrolyse freigesetzten Phosphates bezogen auf die Proteinmenge. Die Meßbedingungen sind in Tab. 9 angegeben.

Eine Division der ermittelten Raten v (Abb. 22) durch die in der Quantifizierung bestimmten Enzymmengen E (in pmol/mg Protein aus Tab. 12) ergibt die Wechselzahlen w der Enzyme nach der Formel w = v/E. Sie betragen für den Wildtyp 74 s⁻¹, für γ E238P 67 s⁻¹ und für γ R242P 84 s⁻¹. Da die Bestimmung der Enzymmenge nur eine Genauigkeit von 20 % aufweist, sind die Schwankungen wahrscheinlich nicht signifikant.

Um eine mögliche Funktionsstörung der Mutanten genauer lokalisieren zu können, wurde die ATP-Hydrolyse durch verschiedene Inhibitoren gehemmt (Tab. 9). Sowohl die F_1 -spezifischen Inhibitoren Azid und Aurovertin, als auch die am F_0 angreifenden Hemmstoffe Venturicidin und DCCD zeigen bei allen Mutanten ähnliche Wirkung wie beim Wildtyp.

In Gegenwart des Entkoppler Nigericin kann durch ATP-Hydrolyse kein Protonengradient aufgebaut werden. Unter diesen Bedingungen wird die maximale Hydrolysekapazität gemessen, ohne daß eine gestörte Kopplung einen Einfluß auf die Rate hat, da eine Rückhemmung durch einen Protonengradienten aufgehoben wird. Wird dem Versuchsansatz kein Entkoppler hinzugefügt, verringert sich die Hydrolyserate von Wildtypvesikeln um 30 %. Dies ist bei den Mutanten γ E238P und γ R242P dagegen nicht zu beobachten, die ja auch keinen Protonengradienten durch die ATP-Hydrolyse aufbauen (s. o.).

		DK8/pDP34		
	Wildtyp	γE238P	γR242P	
Hemmung	µmol/min/mg			
keine	0,313 (100)	0,304 (100)	0,145 (100)	
30 µM DCCD	0,157 (50)	0,151 (50)	0,064 (45)	
5 µg Venturicidin	0,154 (49)	0,154 (51)	0,070 (49)	
10 µM Aurovertin	0,056 (18)	0,066 (22)	0,025 (18)	
10 mM Azid	0,013 (4)	0,012 (4)	0,009 (7)	
ohne Nigericin	0,219 (70)	0,289 (95)	0,133 (92)	

Tab. 9: Hemmung der ATP-Hydrolyse

Die Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Rate der ATP-Hydrolyse wurde bei 25 °C gemessen, nachdem Membranvesikel mit den Inhibitoren für 10 min (bei Azid für 30 min) bei 25 °C vorinkubiert wurden. Die Hemmstoffkonzentrationen sind nahe dem K_I, um sowohl erhöhte als auch erniedrigte Sensitivität der Mutanten möglichst gut erkennen zu können. Eine Ausnahme bilden 10 μ M Aurovertin und Azid, die als Kontrollen zu den in 3.3.7 und 3.3.8 aufgeführten Experimenten durchgeführt wurden. Zum besseren Vergleich ist die verbleibende Restaktivität, bezogen auf die ungehemmten Hydrolyse, als Prozentwert in Klammern angegeben. Die Werte sind gemittelt aus jeweils mindestens 3 Messungen mit 3 verschiedenen Vesikelpräparationen. Die Standardabweichung beträgt in allen Fällen weniger als 10 %.

3.3.4 Aktivierungsenergie der ATP-Hydrolyse

Der Prozeß der F₀F₁-katalysierten ATP-Hydrolyse von Vesikeln kann durch die Aktivierungsenergie E_a charakterisiert werden. Sie hängt von der Natur des Übergangszustandes ab und bestimmt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} von der absoluten Temperatur T nach Arrhenius gemäß der Gleichung $\ln(v_{max}) = -\frac{E_a}{R} * \frac{1}{T}$, wobei R die allgemeine Gaskonstante ist (zitiert nach (7)).

Komponente in	Hydrolyse in µmol/min/mg Protein		
doppelter Konzentration	bei 20 °C	bei 50 °C	
keine	0,498	1,668	
Phosphoenolpyruvat	0,519	1,621	
Pyruvatkinase	0,505	1,637	
ATP	0,518	1,641	

Tab. 10: Kontrollmessungen zur Ermittlung von v_{max}

Um sicherzustellen, daß bei der Temperaturmessung die Maximalgeschwindigkeit v_{max} der ATP-Hydrolyse gemessen wurde, wurden verschiedene Komponenten getestet, ob ihre Konzentration die ATP-Hydrolyse limitiert. Angegeben sind jeweils die Hydrolyseraten, die mit Wildtypvesikeln erzielt wurden, wenn die Konzentration der links angegebenen Komponente gegenüber der Standardkonzentration verdoppelt wurde. In der ersten Datenzeile sind die Raten mit den Komponenten in ihren Standardkonzentrationen (27 U/ml Pyruvatkinase, 5 mM Phosphoenolpyruvat und 10 mM ATP) angegeben. Zu den weiteren Meßbedingungen vgl. 2.3.5.2 sowie Tab. 9 für Mittlung und Genauigkeit der Raten.

Abb. 23 zeigt die Auftragung ln(vmax) gegen 1/T im Bereich zwischen 20-50 °C. Im Bereich von 20 bis 40 °C, in dem sowohl die Anzucht (37 °C) als auch die Aktivitätsmessungen (25 °C) stattfanden, ergeben sich in allen Fällen Geraden, die nach der Gleichung auch erwartet wurden. Über 40 °C ist die Beziehung insbesondere bei der Mutation yE238P nicht mehr linear: Zunächst sinkt die Aktivität leicht, bis bei 45 °C eine Aktivitätssteigerung einsetzt, so daß bei 50 °C wieder die nach der Ausgleichsgeraden erwartete Aktivität erzielt wird. Diese Abweichungen in yE238P deuten möglicherweise auf eine thermische Instabilität hin (s. u.).

Entsprechende Kontrollen (Tab. 10) bei der niedrigsten und höchsten Meßtemperatur zeigen, daß weder die **ATP-Konzentration** noch das regenerierende System Reaktionsgeschwindigdie keit begrenzen. Die Raten sind unter diesen Meßbedingungen nicht durch Magnesiumionen gehemmt (vgl. 2.3.5.2), sondern spiegeln die maximale Rate v_{max} wider (6).

Arrheniusplot Wildtyp



Abb. 23: Arrheniusplot der ATP-Hydrolyse

Die Diagramme zeigen exemplarisch für den Wildtyp und die Mutanten γ E238P und γ R242P je einen als Arrheniusplot aufgetragenen Datensatz der Hydrolyserate in Abhängigkeit von der Temperatur. Diese Auftragung sollte nach der Arrheniusgleichung zu einer Geraden führen. Besonders in γ E238P ist aber oberhalb von 40 °C eine deutliche Abweichung festzustellen, die möglicherweise auf eine thermische Instabilität deuten könnte.

Aus den Geradensteigungen wurden die Aktivierungsenergien errechnet. Die ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase der Mutanten γ E238P und γ R242P hat Aktivierungsenergien, die etwas niedriger als beim Wildtyp mit 39 kJ/mol bestimmt wurden. Diese Werte wurden anhand von v_{max} ermittelt, charakterisieren also den Übergangszustand des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes.

Aus den Daten wurden auch die thermodynamischen Parameter der Übergangszustände abgeleitet. Alle Werte wurden für 25 °C berechnet (Tab. 11). Die mit $E_a = \Delta H^{\ddagger} + RT$ bestimmte Enthalpieänderung ΔH^{\ddagger} zeigt eine leichte Erniedrigung. Für die Ermittlung der Gibbs'schen freien Energie des Übergangszustandes ΔG^{\ddagger} wurde die Hydrolyserate durch die in 0 bestimmten Enzymmenge geteilt, um die Wechselzahl k_{cat} zu erhalten, aus der sich ΔG^{\ddagger} (= $RT \ln(\frac{kT}{\hbar}) - RT \ln(k_{cat})$) ergibt. Während hier für das unmutierte und die mutierten Enzyme ähnliche Werte bestimmt wurden, liegen die Werte für -T ΔS^{\ddagger} bei den Mutanten um 5 kJ/mol höher. -T ΔS^{\ddagger} wurde als Differenz von ΔG^{\ddagger} und ΔH^{\ddagger} bestimmt, so daß sich hier die Standardabweichung der Werte addieren und zu einer höheren Schwankungsbreite der Werte führen. Eine Erniedrigung der Enthalpie, die durch eine erhöhten Entropieterm kompensiert wird, so daß ΔG^{\ddagger} unverändert bleibt, kann so interpretiert werden, daß zur Erreichung des Übergangszustandes weniger (Bindungs-)Kräfte überwunden werden müssen (5, 138)

Stamm	Ea	ΔH^{\ddagger}	ΔG^{\ddagger}	$-T\Delta S^{\ddagger}$
DK8/pDP34		k.)	I/mol	
Wildtyp	39 (±2)	37 (±2)	59 (±2)	20 (±4)
γE238P	34 (±3)	32 (±3)	59 (±2)	25 (±5)
γR242P	35 (±4)	33 (±4)	60 (±2)	25 (±6)

Tab. 11: Aktivierungsenergie

Die Werte ergeben sich aus der Steigung von jeweils mindestens drei voneinander unabhängigen Arrheniusplots (vgl. Abb. 23). Die Meßpunkte decken den Bereich zwischen 20 und 40 °C in 1°C-Schritten mit Dreifachbestimmungen der maximalen Aktivität ab. In Klammern sind die Abweichungen in kJ/mol angegeben.
3.3.5 Strukturelle Integrität der ATP-Synthase

Der Versuch, die ATP-Synthase nach einer Methode von Hase (64) zu solubilisieren und so strukturell intakte Enzyme nachzuweisen, schlug bei Enzymen mit den Mutationen γ E238P und γ R242P fehl. Aus diesen fehlgeschlagenen Solubilisierungsversuchen und einer möglicherweise bei der Temperaturabhängigkeit der Hydrolyserate beobachteten thermischen Instabilität (s. o.) ergibt sich der Verdacht, daß die Enzyme durch die Mutation γ E238P und γ R242P eventuell strukturell destabilisiert sein könnten. Eine Ablösung des F₁-Teilkomplexes vom membranintegralen F₀-Teil vor oder während der Messungen würde erklären, warum trotz Hydrolyse von ATP kein Protonengradient aufgebaut wird, aber nicht, warum die ATP-Hydrolyse durch DCCD oder Venturicidin gehemmt wird.



Abb. 24: Verteilung der Hydrolyseaktivität

Die Diagramme zeigen die Verteilung der absoluten Hydrolyseaktivität nach einer erneuten Zentrifugation der Vesikelsuspension. Der überwiegende Teil der Gesamtaktivität (=100 %) bleibt membrangebunden (grau schraffiert), während nur ein kleiner Anteil sich im Überstand befindet. Die Membranvesikel wurden in Reaktionsmedium verdünnt und 5 min bei 25 °C inkubiert, bevor sie durch Zentrifugation erneut sedimentiert und resuspendiert wurden. In allen Fällen ist 94 % oder mehr der gemessenen ATP-Hydrolyseaktivität membrangebunden, während nur ein geringer Teil der Gesamtaktivität im Überstand gelöst ist (Abb. 24).

Auch mit Hilfe von Antikörpern gegen die Untereinheiten γ oder α (Abb. 25) wurde keine F₁-Ablösung detektiert. F₁ dissoziiert auch bei der Inkubation mit den Substraten ATP oder ADP und P_i nicht ab. Die Untereinheiten sind auf den Membranvesikeln gebunden und zeigen im Western-Blot die gleiche

Größe wie im Wildtyp (Abb. 26). Untereinheit γ wird in allen Fällen von Antikörpern sowohl gegen den N-, als auch gegen den C-Terminus des Proteins erkannt. Eventuelle Abbauprodukte mit einem niedrigeren Molekulargewicht als die intakte Untereinheit können in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Immunodetektionen abgelöster Untereinheiten



Abb. 25: Immunodetektion membranabgelöster F₁-Untereinheiten

Membranvesikel wurden unter Reaktionsbedingungen (vgl. 2.3) mit Substraten inkubiert. Nach einer anschließenden Abzentrifugation der Membranen zeigen die Western-Blots der Überstände mit Antikörpern gegen die Untereinheit α (Teil A) und γ (N-terminales Epitop, Teil B), daß sich keine dieser Untereinheiten abgelöst hat. Über dem Immunoblot sind die analysierten Proben wie folgt gekennzeichnet: Wt steht für Wildtyp, E für die Mutante γ E238P und R für die Mutante γ R242P. Darunter ist angegeben, ob die Membranen ohne Substrate (-), mit 2 mM ATP oder mit 300 μ M ADP und 5 mM P_i inkubiert wurden



Abb. 26: Immunodetektion von α und

γ auf Membranvesikeln

Die Untereinheiten α und γ wurden durch Western-Blot in den Membranvesikelsuspensionen der Mutanten nachgewiesen. Vesikel des Wildtyps (Wt) und aus dem ATP-Synthase-freiem Stamm (*unc*⁻) sind, ebenso wie F₁ als Standard, zur Kontrolle ebenfalls analysiert. Die Herkunft der untersuchten Proben ist aus der Beschriftung am Oberrand des Western-Blots zu erkennen. Die Antikörper sind gegen α (Teil A) gerichtet sowie gegen den N-Terminus (Teil B) und den C-Terminus (Teil C) von γ .



3.3.6 Immunologische Quantifizierung

Sowohl eine gestörte Expression als auch eine Instabilität der mutierten ATP-Synthase, sei es bei der Assemblierung des F_0F_1 -Komplexes oder bei der Präparation, könnten die Enzymmenge und damit die membrangebundene Enzymaktivität verändern. Stellvertretend für das gesamte Enzym wurden die Untereinheiten α und γ immunologisch quantifiziert.

Verschiedene Proteinmengen der Proben wurden einer Westernblot-Analyse unterzogen (vgl. 2.5). Dabei wurden die Untereinheiten durch einen Antikörper erkannt, der durch Biolumineszenz nachgewiesen wurde. Die Leuchtstärke wurde zur Proteinmenge in Bezug gesetzt, wodurch sich ein linearer Zusammenhang ergab (Abb. 27). Die Steigung der Ausgleichsgeraden wurde als Maß für die Menge der Untereinheit ausgewertet.

Die Quantifizierung der Untereinheit α auf der Vesikelmembran (Abb. 27) zeigt bei der Mutante γ E238P keinen Unterschied zum Wildtyp. Bei der Mutante γ R242P läßt sich aus dem Verhältnis von Signalintensität zu Proteinmenge abschätzen, daß nur etwa 50 % der Untereinheit auf der Membran vorhanden sind.

Quantifizierung der α -Untereinheit



Abb. 27: Immunologische Quantifizierung der Untereinheit α

Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Quantifizierung der Untereinheit α in den Mutanten und im Wildtyp. Im oberen Teil sind die Auszüge der ausgewerteten Westernblots zu sehen. Die relative Signalstärke der Immunoreaktion ist in den darunter liegenden Diagrammen gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen. Aus dem Verhältnis der Steigungen der Ausgleichsgeraden wurde die relative Menge der Untereinheit in Bezug zum Wildtyp ermittelt. Die gemittelten Werte der unterschiedlichen Experimente sind in Tab. 12 aufgelistet. Diese Ergebnisse wurden durch die Quantifizierung der Untereinheit γ bestätigt (Tab. 12). Der Vergleich mit der Signalstärke der reinen Untereinheit γ ermöglicht die Berechnung der vorhandenen ATP-Synthase-Menge bezogen auf das Gesamtprotein der Membranvesikel. Die Berechnung basiert auf einem reinen Standard. Sie setzt voraus, daß jede Untereinheit γ Teil eines kompletten ATP-Synthase-Enzyms ist, worauf das gegenüber dem Wildtyp unveränderte Verhältnis zwischen den Untereinheiten α und γ in den Mutanten hindeutet. Unter diesen Prämissen ergeben sich die in Tab. 12 aufgeführten Werte. Sie sind aufgrund der Fehlerstreuung der Signale nicht genauer als 20 %, so daß zwar eine reduzierte Enzymmenge bei γ R242P festgestellt werden kann; die Menge bei γ E238P ist jedoch nicht signifikant vom Wildtyp zu unterscheiden. Der Anteil der ATP-Synthase von 3,6 % am Protein, das in den Membranvesikeln enthalten ist, stimmt für den Wildtyp mit bereits veröffentlichten Werten überein (42).

	Wildtyp	γE238P	γR242P
relative Menge α [%]	100	105	48
relative Menge γ [%]	100	109	43
μg γ/ mg Protein	2,2	2,4	1,0
pmol γ/mg Protein	70	76	31
% F ₀ F ₁ /Membranprotein	3,6	4,0	1,6

Tab. 12: Immunologische Quantifizierung von F1-Untereinheiten

Der obere Tabellenteil gibt den relativen Gehalt an Untereinheiten auf den Membranen an (vgl. Abb. 27), wobei der Wildtyp willkürlich auf 100 % gesetzt ist. Der untere Teil enthält die Werte, die sich beim Vergleich mit dem Signal/Protein-Verhältnis der reinen γ -Untereinheit ergeben. Dabei wurde angenommen, daß jede Untereinheit γ einem vollständigen F₀F₁-Enzym entspricht mit Molekulargewichten von 31,4 kDa für γ bzw. 520 kDa für F₀F₁. Die Angabe des F₀F₁-Gehaltes in der letzten Zeile ist in Gewichtsprozent (g/g). Aufgrund der starken Streuung der Signale ist die Ungenauigkeit der Bestimmungen mindestens 20 %.

3.3.7 Wirkung von Nukleotiden auf den respiratorischen ∆pH

Die Zugabe von Substraten für die ATP-Synthase beeinflußt den durch NADH-Oxidation aufgebauten Protonengradienten.

Zugegebenes ATP wird im Wildtyp hydrolysiert, wobei Protonen in die Vesikel gepumpt werden und so den ΔpH erhöhen. Aus ADP und P_i dagegen wird ATP unter Abbau des Protonengradienten synthetisiert. Um die mit der Substratzugabe einhergehenden ACMA-Fluoreszenzveränderungen besser vergleichen zu können, sind die Signalverläufe nach Zugabe der verschiedenen Nukleotide in je einem Graphen der Abb. 29 zusammengefaßt. Die gleichen Ergebnisse wie mit dem Wildtyp werden auch mit Vesikeln erzielt, deren ATP-Synthasen die Mutationen γ E238I und γ R242L enthalten.

Bei den Mutanten, die an diesen Stellen ein Prolin haben, führt nicht nur der Zusatz von ADP und P_i , sondern auch die Zugabe von ATP zur Erniedrigung des Protonengradienten. Die Effekte sind von der Konzentration aller drei Substrate abhängig (Abb. 28). ADP alleine hat keinen Einfluß auf den Protonengradienten (vgl. 0 mM P_i in Abb. 28), ebensowenig wie das nicht hydrolisierbare ATP-Analogon AMP-PCP (Abb. 29). Die Effekte lassen sich durch Vorinkubation mit DCCD, das den F_0 für Protonen blockiert (75), verhindern. Aurovertin, das die kontinuierliche Katalyse, aber nicht die Substratbindung (170) durch seine Interaktion mit F_1 hemmt, verhindert die Nukleotideffekte beim Wildtyp, nicht jedoch bei den Mutanten.



Abb. 28: Entkopplung durch Substrate in Abhängigkeit von ihrer Konzentration

Die Kurven zeigen die Δp H-abhängige ACMA-Fluoreszenzlöschung durch einen mit NADH erzeugtem respiratorischen Protonengradienten und seine Veränderung durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Nukleotiden (vgl. 2.3.4.1). Details sind in Abb. 29 aufgeführt. Exemplarisch ist nur die Abhängigkeit des Protonenausstromes bei der Mutanten γ E238P dargestellt. Im Falle variierender ADP-Konzentrationen wurden 5 mM P_i, bei variierender P_i-Konzentration 300 μ M ADP eingesetzt.



Abb. 29: Wirkung von Nukleotiden auf den respiratorischen ΔpH

Die Kurven zeigen die Δ pH-abhängige ACMA-Fluoreszenzlöschung durch einen mit NADH erzeugten respiratorischen Protonengradienten und seine Veränderung durch Zugabe von Nukleotiden. Nach Aufnahme der Grundlinie und Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes ACMA wurde ein respiratorischer Δ pH an Membranvesikeln wie in 2.3.4 beschrieben durch Zugabe von NADH und Lactat aufgebaut. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem 300 µM der angegebenen Nukleotide zugegeben wurden. Bei Versuchen mit ADP waren stets von Beginn der Messung an 5 mM P_i vorhanden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Reihe A die Signalverläufe mit AMP-PCP, ATP oder 300 µM ADP und 5 mM P_i übereinandergelegt. Reihe B zeigt den Effekt bei Membranen, die 10 min bei 25 °C mit 10 µM DCCD vorinkubiert wurden. In Reihe C sind die Vesikel unter denselben Bedingungen mit 10 µM Aurovertin vorinkubiert worden. Wenn die Signalverläufe von ADP und P_i mit dem von ATP deckungsgleich sind, ist aus Platzgründen nur letzterer dargestellt. Am Ende aller Messungen wurde der Protonengradient durch Nigericin aufgelöst, um die maximale Fluoreszenz zu erhalten.

3.3.8 Aufbau eines ΔpH bei Anwesenheit eines K⁺-Potential

Durch Inkubation in einem K⁺-reichen Medium (0,51 M K⁺-Ionen, vgl. 2.3.4.2) wird eine hohe Konzentration K⁺-Ionen in den Vesikeln erzeugt. Die Zugabe von Valinomycin in K⁺armen Medium (<0,75 mM K⁺-Ionen, vgl. 2.3.4.2) läßt K⁺-Ionen aufgrund des Konzentrationsunterschiedes aus den Vesikeln strömen, so daß zur elektrischen Kompensation H⁺ einströmen. Der Protonengradient ist bei gleichem K⁺-Gradienten, der unter Versuchsbedingungen etwa 167 mV entspricht, in Höhe und Dauer von der Protonenpermeabilität der Membranen abhängig. Der alleine durch Valinomycin induzierte H⁺-Gradient ist in diesen Experimenten gering. Er ist in der Mutanten γ R242P etwas stärker als beim Wildtyp und der Mutanten γ E238P (Abb. 30). Dies deutet auf eine erhöhte Protonenpermeabilität in der Mutanten γ R242P hin, wie auch der verminderte Aufbau eines respiratorischen Δ pH vermuten läßt (vgl. Tab. 8).

Zum Aufbau eines deutlichen und konstanten Protonengradienten kommt es im Wildtyp erst nach zusätzlicher Zugabe von ATP. Auch Vesikel mit den ATP-Synthase-Mutationen γE238P und γ R242P zeigen mit einem K⁺-Potential und ATP einen hohen, transienten Protonengradienten, der jedoch nach kurzer Zeit wieder zusammenbricht. Durch die Anwesenheit des K⁺-Potentials wird also eine Störung in diesen Mutanten kompensiert, die den Aufbau eines ApH durch ATP-Hydrolyse verhindert (vgl. Abb. 21). Wird der F₀ durch eine DCCD-Inkubation für Protonen blockiert, so ist weder in den Mutanten, noch im Wildtyp ein Protoneneinstrom sichtbar. Auch wenn die ATP-Hydrolyse durch die Hemmstoffe Aurovertin und Azid unterbunden wird, wird trotz ATP und K⁺-Potential kein Protonengradient beobachtet. Daß für den Aufbau eines ApH neben dem Kaliumpotential in den Mutanten auch die Hydrolyse des zugegebenen ATP notwendig ist, und nicht bloß die Bindung des Nukleotides an das Enzym, zeigt das Experiment mit dem nicht hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PCP (Abb. 30 A). Es führt im Wildtyp und beiden Mutanten zu keiner Erhöhung des K⁺-Potential-getriebenen Protonengradienten über die Membran. Ebensowenig erhöht die Anwesenheit von ADP und anorganischem Phosphat den Protonengradienten bei Vesikeln des Wildtyps oder der Mutanten yE238P und yR242P, obwohl es in den Mutanten bei einem bestehenden respiratorischen ΔpH die Permeabilität der Membranen für einen Protonenefflux erhöht (s. o.).



Abb. 30: Aufbau eines ∆pH bei Anwesenheit eines K⁺-Potential

Ein K⁺-Potential wurde wie in 2.3.4.2 beschrieben aufgebaut. Unmittelbar nach Zugabe der Vesikel zum Reaktionsmedium wurde ein Grundsignal aufgenommen und der Fluoreszenzfarbstoff ACMA dem Versuchsansatz hinzugefügt. 15 s danach wurden zusammen 165 nM Valinomycin und die angegebenen Nukleotide (300 μ M) zugefügt. 0,33 μ M Nigericin ließ am Ende der Messung den Protonengradienten zusammenbrechen, so daß die maximal mögliche Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Die Maßstäbe für die Zeit und die max. Fluoreszenz sind durch Pfeile angegeben und in allen Graphen gleich; in den Reihen B bis E ist aus Platzgründen die Grundlinie nicht gezeigt. In Reihe A sind die Kurven mit AMP-PCP und ATP übereinandergelegt. In Reihe B waren zusätzlich zu 300 μ M ADP noch 5 mM P_i vorhanden, während in Reihe C nur Valinomycin hinzugegeben wurde. Darunter sind die Effekte von ATP nach Vorinkubation mit 10 μ M DCCD (Reihe D) und 10 μ M Aurovertin (Reihe E) für 10 min bei 25 °C dargestellt.

3.4 Weitere Mutationen der C-terminalen Helix der Untereinheit γ

Um unterscheiden zu können, ob die Effekte des Prolineinbaues für yE238 und yR242 nur an diesen speziellen Positionen oder generell bei einer Störung der α -helicalen Struktur in diesem Bereich auftreten, wurden um diese Positionen herum weitere Aminosäuren gegen Prolin ausgetauscht. Da sie nach Möglichkeit keine für die Katalyse essentiellen, funktionellen Gruppen tragen sollen, wurden die Alanine in den Positionen $\gamma 236$, $\gamma 241$ und γ 245 ausgewählt. Sie liegen in der α-Helix unter, zwischen und über yE238 und yR242. Betrachtet man ihre Lage entlang der Helixachse (Abb. 31), so schließen sie mit den Ladungen unterschiedliche Winkel ein, sind also zu verschiedenen Seiten der Helix orientiert.



Abb. 31:

Ausrichtung C-terminaler Reste in der α -Helix Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der C-terminalen Helix der γ -Untereinheit, der den Bereich $\gamma 235-245$ in *E. coli* umfaßt. Da die Strukturdaten dieser Domäne für *E. coli* noch nicht zugänglich sind, wurden die Daten des in diesem Bereich strukturell ähnlichen mitochondrialen F₁ (52) für das Modell verwendet. Es zeigt das Peptidrückgrat als Tubus, in dem jeder Knick das C_{α}-Atom eine Aminosäure repräsentiert. Die mutierten Positionen sind schwarz gefärbt; sie sind ebenso wie die beiden geladenen Seitengruppen als Stabmodell dargestellt. Um Konfusion zu vermeiden, wurde die Reste nach der Sequenz aus *E. coli* bezeichnet.

Alle Alanine sind konserviert, wobei sie in maximal 10 % der bekannten Sequenzen durch Se-

rin ersetzt sind bzw. Threonin oder Cystein für γ A236. In der Diskussion (4.2, 4.4) wird besonders auf die Effekte der Mutation γ A236P eingegangen. Daher werden hier neben dem Austausch gegen Prolin auch Substitutionen gegen Cystein und Glycin vorgestellt.

3.4.1 Funktionelle Charakterisierung weiterer Mutanten der C-terminalen Helix der Untereinheit γ



Abb. 32: Expressionsnachweis der

Untereinheit y in den C-terminalen Mutanten

Die Untereinheiten γ wurde durch Western-Blot in den Membranvesikelsuspensionen der C-terminalen Mutanten nachgewiesen. Vesikel des Wildtyps (Wt) und aus dem ATP-Synthase-freiem Stamm (unc⁻) sind, ebenso wie F₁ als Standard, zur Kontrolle ebenfalls analysiert. Die Herkunft der untersuchten Proben ist aus der Beschriftung über dem Ausschnitt aus dem Western-Blots zu erkennen. Alle Mutanten exprimieren die Untereinheit γ (Abb. 32), wobei die Signale im Western-Blot keine offensichtlichen Mengenunterschiede zeigen, und wachsen auf Succinatminimalmedium (Tab. 13). An invertierten Membranvesikeln der Mutanten γ A241P und γ A245P wird mit NADH ein den Wildtypvesikeln vergleichbarer Δ pH aufgebaut, der durch ATP induzierte Protonengradient ist hingegen stark reduziert. Dies geht mit einer auf etwa ein Drittel reduzierten Rate der ATP-Hydrolyse einher.

Tab. 13: Funktionelle Charakterisierung der Mutanten in der C-terminalen Helix von y

Stamm	ATP-	Protonengradient induziert mit		
	Hydrolyse	ATP	NADH	
DK8/pDP34	µmol/min/mg Protein	% Quench der .	ACMA-Fluoreszenz	
Wildtyp	0.317	58	76	
γA236G	0,301	41	76	
γA236C	0,253	46	75	
γA236P	0,266	46	75	
γA241P	0,109	27	72	
γA245P	0,113	19	71	

Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Messungen an den C-terminalen Mutanten zusammen. Die Meßbedingungen sind wie in Tab. 8 bzw. Tab. 9 angegeben.

Mutationen von γ A236 sind durch moderatere Effekte gekennzeichnet. Der durch NADH induzierte Protonengradient ist dem Wildtyp vergleichbar, der mit ATP erzeugte Protonengradient ist reduziert. Die Hydrolyseraten von γ A236C und γ A236P wurden 20 bzw. 15 % niedriger als beim Wildtyp bestimmt (Tab. 13). In beiden Fällen ist die Rückhemmung durch den Protonengradienten in Abwesenheit des Entkopplers und die Sensitivität gegenüber dem F_0 -Inhibitor DCCD (Abb. 33) nicht stark genug erniedrigt, um vom Wildtyp signifikant abzuweichen.

Die Mutation γ A236G bewirkt von den drei Austauschen des γ A236 die stärkste Reduktion des ATP-induzierten Protonengradienten, auch wenn ein Rückgang auf 41 % im Vergleich zu den Mutationen an anderen Stellen (s. o.) relativ gering erscheint. Die Aktivität der ATP-Hydrolyse in Gegenwart von Nigericin ist in der Mutanten γ A236G gegenüber dem Wildtyp nicht beeinträchtigt und ist genauso groß wie in Abwesenheit von Entkoppler. Sie zeigt eine verringerte Sensitivität gegenüber DCCD.



Abb. 33: ATP-Hydrolyse

Das Balkendiagramm zeigt die Rate der ATP-Hydrolyse von Vesikeln bezogen auf die Vesikel-Proteinmenge. Die Werte sind gemittelt aus jeweils mindestens 3 Messungen mit 3 verschiedenen Vesikelpräparationen. Die Standardabweichung beträgt in allen Fällen weniger als 10 %. Die Zahlen in den Balken sind Prozentwerte.

3.5 Mutanten in der N-terminalen Helix der Untereinheit γ

Die N-terminale und C-terminale Helix der γ -Untereinheit sind umeinander gewunden und haben engen Kontakt miteinander. Dies trifft auch für die C-terminale Domäne γ 236-245 am Unterrand des F₁-Kopfes zu, die mit γ 23-39 der N-terminalen Helix benachbart ist. Da das Peptidrückgrat dieses Helixbereiches in *E. coli* von der Position abweicht, die der Helixbereich in *B. taurus* einnimmt (47), kann die Lage der Reste im C- und N-Terminus zueinander zur Zeit noch nicht geklärt werden: Es ist unklar, ob die Abweichungen spezifisch sind, oder darauf zurückzuführen sind, daß in *E. coli* eine an beiden Enden verkürzte Untereinheit (γ' im Komplex mit ε) untersucht wurde. In der niedrig aufgelösten Struktur des F₁ aus *E. coli* (68) ist keine Lagebestimmung der Aminosäuren möglich.

Aus diesem Grund konnte die Lage von γ S34 nach Auswertung der vorhandenen Strukturdaten (52,68,124) nur abgeschätzt werden. Die in allen Organismen als Serin, Threonin oder Alanin vorhandenen Aminosäuren liegen wahrscheinlich oberhalb von γ A236 und auf gleicher Höhe mit γ E238. Es war daher von besonderem Interesse, ob die Destabilisierung der Nterminalen Helix durch Prolin oder Glycin an dieser Stelle ähnliche Effekte haben würde wie die Mutationen in der benachbarten C-terminalen Helix.

Um die möglichen Bedeutung der mutierten Domänen für den Mechanismus des Enzyms differentiell beurteilen zu können, wurde der Rest γ V13 mutiert. Er befindet sich nicht im Mittel-, sondern im Anfangsteil der N-terminalen Helix, der oberhalb der C-terminalen Schlaufen der großen Untereinheiten, aber unterhalb des sogenannten P-Loops in β liegt (vgl. Abb. 18). Da hier das Peptidrückgrat von *B. taurus* und *E. coli* fast deckungsgleich ist (68), läßt sich eine Orientierung der konservierten aliphatischen Seitenkette zur C-terminalen Helix annehmen. Die Mutation von γ V13 sollte daher die Wechselwirkung mit den C-terminalen Nachbarresten stören, deren Interaktionen die beiden umeinander gewundene Helices gegenseitig in ihrer Lage stabilisiert (vgl. 4.4). Nach Arbeiten von Nakamoto *et al.* (105) trägt die Cterminale Helix von γ im oberen Bereich mit γ Q269 und γ T273 zwei Aminosäuren, die während der Katalyse direkt mit Aminosäuren der Untereinheit β in der Nähe der katalytischen Bindungstaschen wechselwirken sollen. Sie könnten ein Element der Untereinheit γ sein, daß die für die Rotationshypothese angenommene kooperative Konformationsänderung an den aktiven Zentren koordiniert. Eine strukturelle Veränderung in den oberen Helixbereichen sollte also vor allem die Katalyse der ATP-Hydrolyse stören.

3.5.1 Physiologische Charakterisierung N-terminaler Mutanten

Ein Western-Blot (Abb. 34) zeigt, daß in allen Mutanten Untereinheit γ exprimiert wird. Das Wachstum auf Succinatminimalmedium wird durch die Mutationen ebenfalls nicht gestört.



Abb. 34: Expressionsnachweis der Unter-

einheit y in den N-terminalen Mutanten

Die Untereinheiten γ wurde durch Western-Blot in den Membranvesikelsuspensionen der N-terminalen Mutanten nachgewiesen. Vesikel des Wildtyps (Wt) und aus dem ATP-Synthase-freiem Stamm (unc⁻) sind, ebenso wie F₁ als Standard, zur Kontrolle ebenfalls analysiert. Die Herkunft der untersuchten Proben ist aus der Beschriftung über dem Ausschnitt aus dem Westernblots zu erkennen.

Die Mutationen des Restes γ V13 reduzieren vor allem die ATP-Hydrolyseaktivität, bei γ V13P oder γ V13G auf etwa 40 % der Wildtyp-Rate, während γ V13A und γ V13C ca. 60 % erreichen. Trotz der deutlich verringerten Rate baut die Mutante γ V13C gegenüber dem Wildtyp keinen verringerten Protonengradienten auf. Eine erhöhte Protonenstöchiometrie n in der Reaktion (ATP + n H⁺_{innen} \Longrightarrow ADP + P_i + n H⁺_{außen}) könnte dies mathematisch erklären, wurde aber bisher noch nie beobachtet. Allerdings sollte dann die Hemmung durch dieselbe Konzentration des "Produktes" H⁺_{innen} wesentlich stärker als im Wildtyp erwartet werden. Dies kann aber bei Messungen ohne Entkoppler nicht beobachtet werden, in denen die Hydrolyse der Mutanten γ V13C durch den Protonengradienten wie beim Wildtyp gehemmt wird. Möglicherweise befindet sich die Messung des mit ATP aufgebauten Protonengradienten in einem Bereich, in dem sie gegen Beeinträchtigungen der Hydrolyserate relativ unanfällig ist, da die Nachweisempfindlichkeit von ACMA mit steigendem Δ pH abflacht.

Die verringerte Aktivität ist bei allen Austauschen von γ V13 mit DCCD hemmbar, wenn auch γ V13P eine leicht verringerte Sensitivität zeigt. Bei γ V13P und γ V13G zeigt sich bei Abwesenheit des Entkopplers keine signifikante Rückhemmung durch den Δ pH. Dieser ist bei γ V13P stärker verringert als bei γ V13G und γ V13A. Der respiratorische Δ pH ist in keiner der Mutanten gegenüber dem Wildtyp verringert.

Dies gilt auch für die Mutationen γ S34P und γ S34G. Erstere zeigt eine leichte, zweitere eine deutlich verringerte Fluoreszenzlöschung mit ATP. Die entkoppelte Hydrolyserate ist in γ S34P gegenüber dem Wildtyp vergleichbar, in γ S34G hingegen deutlich erniedrigt. Diese Er-

gebnisse unterscheiden sich deutlich von den Resultaten mit der Mutanten γ E238P und ähneln mehr den Beobachtungen mit γ A236P. Möglicherweise wurde die Position von γ S34 nicht richtig abgeschätzt, wie in 4.2 und 4.4 diskutiert wird.

Stamm	Protonen	gradient		se	
	induziert mit				
	ATP	NADH	entkoppelt	30 µM DCCD	ohne Nigericin
DK8/pDP34	% Lösch	% Löschung der		µmol/min/mg	
	ACMA-Fi	luoreszenz			
Wildtyp	58	71	0,298	0,120 (40)	0,235 (79)
γV13P	38	66	0,113	0,066 (58)	0,109 (97)
γV13G	52	67	0,123	0,062 (50)	0,114 (93)
γV13A	52	70	0,180	0,077 (43)	0,148 (82)
γV13C	62	69	0,184	0,077 (42)	0,149 (81)
γS34P	52	67	0,347		
γS34G	43	73	0,176		

Tab. 14: Physiologische Charakterisierung der N-terminalen Mutanten.

Die Tabelle faßt die Ergebnisse der physiologischen Messungen an den N-terminalen Mutanten zusammen. Das Wachstum aller Mutanten auf Succinatminimalmedium ist durch + symbolisiert (Der zur Kontrolle mituntersuchte ATP-Synthase-freie Stamm zeigt kein Wachstum (vgl. Abb. 19) und ist nicht aufgelistet). Die Werte für die Fluoreszenzlöschung mit invertierten Membranvesikeln sind in % der maximalen ACMA-Fluoreszenz angegeben. Hinter den Hydrolyseraten der Hemmversuche ist in Klammern die Aktivität in % der entkoppelten, ungehemmten Rate der jeweiligen Mutante aufgeführt. Die Werte sind gemittelt aus jeweils mindestens 3 Messungen aus 3 verschiedenen Vesikelpräparationen. Die Standardabweichung beträgt in allen Fällen weniger als 4 % bei den Fluoreszenzmessungen und 10 % bei den Hydrolysemessungen.

4 Diskussion

In der F₀F₁-ATP-Synthase ist die Protonentranslokation durch den membranintegralen F₀-Teilkomplex mit Konformationsänderungen verbunden, die die aktiven Zentren des F₁-Teilkomplexes so verändern, daß diese ADP + P_i und ATP + H₂O ineinander umwandeln. Die Rotationshypothese (21) postuliert, daß die Bewegungsenergie durch die Rotation der Untereinheiten γ und ε relativ zu den anderen F₁-Untereinheiten des Enzyms zu den katalytischen Zentren übertragen wird.

Nach den bisher bekannten Strukturen (16,52,68,124,147) bilden N- und C-Terminus von γ zwei lange, umeinander gewundene α -Helices (vgl. Abb. 18), die mit einem Ende wahrscheinlich den F₀ berühren (47,147). Die Enden ragen wie eine Achse in das Zentrum des F₁-Kopfes hinein, der aus je drei alternierend im Kreis angeordneten Untereinheiten α und β besteht. Den Hauptteil der katalytischen Zentren tragen die Untereinheiten β . Neben Kontakten oberhalb der aktiven Zentren hat die Untereinheit β vor allem mit einer Schlaufe in ihrem C-terminalen Drittel, die durch das konservierte "DELSEED"-Motiv charakterisiert ist, Kontakt zur Untereinheit γ . Die für die Schlaufe vermuteten Auf- und Abbewegungen während der Katalyse haben zu Spekulationen geführt (87,115), daß sich hier eine energieübertragende Schnittstelle zwischen β und γ befinden könne, durch die ein katalytisches Zentrum geöffnet und geschlossen wird.

Schwerwiegende Störungen der Energieumwandlung sind zu erwarten, wenn die α -helicale Struktur der postulierten Drehachse in γ durch Mutationen gestört wird. Als besonders kritisch erschien die Domäne γ 236-245 in der C-terminalen Helix der Untereinheit γ , die sich unmittelbar am unteren Rand des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons im Übergang zum Stielbereich befindet.

4.1 Essentielle Aminosäuren im Bereich γ 236-245 der Untereinheit γ

Die Seitengruppen konservierter Aminosäuren in der postulierten Drehachse könnten für die Energieumwandlung essentiell sein. Bei Mutationen sollte der Austausch dieser Reste durch einen Funktionsverlust auffallen.

Die Reste γ E238 und γ R242 sind ohne schwerwiegende Funktionsstörungen gegen ungeladene hydrophobe Reste (γ E238I, γ R242L) austauschbar. Ihre geladenen Seitengruppen sind also nicht essentiell. Die Mutationen führen zwar zu einer Verringerung der ATP-Hydrolyserate und des dadurch erzeugten Protonengradienten, aber nicht zum Ausfall einer bestimmten Funktion. Bei der Mutante γR242L ist auch die Aktivierungsenergie in der ATP-Hydrolyse nicht signifikant verändert (85), so daß von einem unveränderten katalytischen Mechanismus ausgegangen werden kann. Diese Ergebnisse bestätigt der Einbau anderer Aminosäuren an diesen Positionen ohne größere Störungen (6,105). Eine Ausnahme bildet die Mutation γR242E, die die Assemblierung des Enzyms verhindert (85). Dies ist vermutlich auf die unmittelbare Nähe zu der darunter liegenden Ladung von γE238 und einer Gruppe negativer Ladungen in der C-terminalen Schlaufe der Untereinheit β zurückzuführen. Für diese DELSEED-Sequenz wurde lange Zeit eine Wechselwirkung mit den positiven Ladungen in γ vermutet. Diese Annahme widerlegen nicht nur die oben dargestellten Ergebnisse, die mit den Mutanten γE238I und γR242L erzielt wurden. In Untersuchungen von Berns (15) und Hara *et al.* (63) wurden die gesamten geladenen Aminosäuren des DELSEED-Motives in β gegen ungeladene Aminosäuren ausgetauscht, ohne daß ein Funktionsverlust auftrat. Die Interaktion zwischen γ und β scheint also nicht durch ionische Wechselwirkungen dominiert zu werden.

4.2 Destabilisierung der C-terminalen α -Helix in γ

Prolin stört die α -helicale Sekundärstruktur, da es nicht die notwendige Konformation einnehmen kann (31,43). Der Einbau dieser Aminosäure in die C-terminale α -Helix von γ zwischen γ 241-245 führt zu einem klaren Aktivitätsrückgang der ATP-Hydrolyse der membrangebundenen ATP-Synthase (Abb. 36). Dieser Bereich der Drehachse liegt unmittelbar am Unterrand des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon (vgl. Abb. 18,Abb. 35). Hier besteht eine enge räumliche Nähe zum C-Terminus der Untereinheiten α und β , die wenig Platz für strukturelle Veränderungen läßt. Ein Einbau von Prolin läßt sterische Konflikte erwarten, die den F₁ sowohl strukturell destabilisieren als auch seine Aktivität funktionell stören sollten. Insbesondere wenn die Cterminale Schlaufe der Untereinheit β sich während der ATP-Hydrolyse auf- und ab bewegen muß (81), könnte eine deformierte Helixachse die Konformationsänderungen der katalytischen Zentren stören. Bei der Mutation γ R242P korreliert die verringerte Hydrolyseaktivität mit einem reduzierten Enzymgehalt. Möglicherweise könnten sterische Konflikte bei der Assemblierung die Menge des Enzyms in den Membranen verringern, wie dies für andere Mutationen dieses Restes beschrieben ist (85). Ein Einbau von Prolinen in Position $\gamma 236$ und $\gamma 238$ verringert die Hydrolyseaktivität dagegen weniger. In dieser Position liegen die Reste eine Helixwindung näher zur Membran und wahrscheinlich knapp unterhalb des $\alpha_3\beta_3$ -Ringes. Sowohl im mitochondrialen F₁, als auch in einem γ'/ϵ -Komplex aus *E. coli* ist die C-terminale Helix an dieser Stelle bereits von drei Peptidschlaufen (mit den Resten $\gamma 87$, $\gamma 111$ und $\gamma 143$) aus dem mittleren Bereich der Untereinheit γ umgeben, so daß ein direkter Kontakt von $\gamma A236$ oder $\gamma E238$ mit α oder β unwahrscheinlich ist (Abb. 35). Mutationen dieser Reste haben deswegen vermutlich nur geringe Wirkung auf den F₁ und Katalyse-Vorgang. Nach der Rotationshypothese sollte eine Strukturstörung in der Antriebsachse aber einen Effekt auf die Kopplung der reversiblen ATP-Hydrolyse-Reaktion an die H⁺-Translokation zeigen.



Abb. 35: Kontakt zwischen γ und β

Dieses Stereobild ist der Arbeit von Rodgers und Wilce (124) entnommen (Eine Farbkopie der Struktur befindet sich zum Ausklappen im hinteren Einband). Es zeigt in grün eine Teilstruktur der γ -Untereinheit mit den beiden langen, terminalen α -Helices auf der linken Seite als Schlaufenmodell (Pfeile zeigen β -Faltblätter). Über sie ist in rot die Struktur aus Rinderherz modelliert. Dabei wurden die Untereinheiten so ausgerichtet, daß sich die terminalen Helices im Bereich gemeinsamer Struktur möglichst gut überlappen (vgl. Abb. 37 für eine Gegendarstellung). Die daraus resultierende Lage der sogenannten "DELSEED"-Schlaufe ist oben rechts zu sehen. Geladene Reste dieses Sequenzmotives und einer darunter befindlichen α -Helix aus γ sind als Stabmodell kenntlich gemacht. Die Lage der in dieser Arbeit mutierten Ladungen γ E238 und γ R242 sind durch Einschwärzung auf der Cterminalen Helix kenntlich gemacht. Unmittelbar rechts von ihnen sind zwei Schleifen als Linien zu erkennen, die als Raum-ausfüllende Modelle die C-terminale Helix von der Vorder- und Hinterseite umhüllen.

Der Protonengradient als Maß für die H⁺-Pumpleistung zeigt keine klare Abhängigkeit von der Nähe der mutierten Position zum unteren Rand des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons. Betrachtet man jedoch die Orientierung der Reste entlang der Helixachse, so ergibt sich ein klar erkennbares Schema (Abb. 36): Der ATP-induzierte ΔpH wird immer geringer, je weiter der Einbau des Prolins vom vermutlichen Kontaktbereich (vgl. 4.3) zur N-terminalen Helix in γ wegrückt. Den stärksten Effekt haben die Mutationen γ E238P und γ R242P, die wahrscheinlich an der Außenseite der Achse lokalisiert sind. Diese Mutanten zeigen einen totalen Verlust der Kopplung. Das könnte folgendermaßen erklärt werden:



Abb. 36: Effekte des Prolineinbaus in die C-terminale Helix

Die Grafik zeigt den Bereich $\gamma 235-246$ der C-terminalen α -Helix als Peptidrückgrat links von der Seite, rechts entlang der Achse betrachtet aus dem mitochondrialen F₁, dessen Strukturdaten zugänglich sind (52). Die schwarz markierten Positionen wurden durch Prolin ersetzt. Neben der Seitenansicht sind die jeweiligen Positionen der Mutationen und die Hydrolyseraten de zugehörigen Mutanten aufgeführt. Um die Ansicht entlang der Helixachse ist die Fluoreszenzlöschung in % der maximalen ACMA-Fluoreszenz angegeben, die ein Maß für den durch ATP-Hydrolyse aufgebauten ΔpH ist. Der Wildtyp erreicht 61 % bzw. 0,313 µmol/mg/min.. Unterhalb der C-terminalen Helix ist die Position der N-terminalen Helix als Umriß angedeutet. Die Position dieser Helix ist in *E. coli* möglicherweise leicht verschoben (vgl. 4.3).

Das Vorhandensein von Prolin bewirkt einen Knick von etwa 30° in α -Helices (43), wie beispielsweise in der Struktur der Untereinheit b oder c der ATP-Synthase erkennbar ist (vgl. Abb. 3 und 4). Einen solchen Knick zeigt auch die N-terminale Helix der Untereinheit γ aus *E. coli* aufgrund des Prolins γ P43, der die Richtung der Helixachse um etwa 20° verändert (vgl. Abb. 35). Bei den Mutanten γ E238P und γ R242P würde eine Lageveränderung des Helixendes gegenüber F₀ bewirkt werden, und die Vermutung liegt nahe, daß dadurch die Interaktion zwischen F₀ und γ gestört würde (vgl. letztes Kapitel). Die Funktionsstörungen müssen insbesondere bei den Austauschen der Alanine gegen Prolin nicht alleine auf die Störung der α -helicalen Struktur zurückzuführen sein. Prolin (90 Å³) hat auch ein größeres van-der-Waals-Volumen (31) als Alanin (67 Å³), das bei dichtem Kontakt mit anderen Proteindomänen durch den höheren Raumbedarf sterische Probleme verursachen kann. Dies ist wahrscheinlich bei der Mutation γ A236P an der Kontaktfläche der C- und Nterminalen Helix von γ der Fall. Wird dieses Alanin gegen Cystein (86 Å³) ausgetauscht, das etwa die gleiche Größe wie Prolin hat, aber kein α -Helixbrecher ist, so zeigen beide Mutanten dieselben Funktionsbeeinträchtigungen. Leicht stärkere Störungen als für Cystein berichten Nakamoto *et al.* (105) für das etwas größere Threonin (93 Å³). Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, daß eine Störung der α -helicalen Sekundärstruktur an der Kontaktfläche der beiden Helices nicht die Protonentranslokation beeinträchtigt. Auf die Helix-Wechselwirkungen wird später genauer eingegangen (vgl. 4.4).

Neben Prolin destabilisiert auch Glycin α -Helices (31). Die auf ein Wasserstoffatom reduzierte Seitenkette gibt der Aminosäure sterisch sehr große Flexibilität und nahezu freie Drehwinkel. Dies lockert die starre Ausrichtung des Peptidrückgrates in einer α -Helix und verringert deren Rigidität. Die ATP-Synthase scheint durch die entsprechende Mutation γ A236G partiell entkoppelt zu werden. Trotz gleicher ATP-Hydrolyseaktivität wird ein verringerter Protonengradient aufgebaut. Die fehlende oder verringerte Sensitivität der ATP-Hydrolyse gegen Behinderungen des Protonentransportes durch einen Δ pH oder den F₀-Inhibitor DCCD können sich dadurch gut erklären lassen.

4.3 Destabilisierung der N-terminalen α -Helix in γ



(Eine Farbkopie der bakteriellen Struktur befindet sich zum Ausklappen im hinteren Einband). Rechts ist der Komplex einer verkürzten Untereinheit γ' mit ε zu sehen, links der Ausschnitt aus dem mitochondrialen F₁ mit γ und der zu ε homologen Untereinheit δ . Im Zentrum beider Abbildungen stehen die terminalen Helices von γ , die als Schlaufenmodell gezeigt sind. Sie laufen in *E. coli* fast parallel zueinander, während sie in Rinderherzenzym deutlich geknickt und umeinander gewunden sind. Der Grund für diese Unterschiede ist noch unklar: Er könnte Spezies-abhängig sein oder auf die verkürzten Helices der Untereinheit aus *E. coli* zurückzuführen sein. Da die Lageunterschiede im Mutagenesebereich (Pfeil) gravierend sind, ist eine Bewertung der experimentellen Ergebnisse durch kritischen Vergleich mit der Struktur nur schwierig möglich. Das Rückgrat der Nterminalen Helix in E. coli (68,124) weicht im unteren Bereich stärker von der Struktur (52) in Bos taurus ab (Abb. 37). Eine vergleichende Zuordnung positioniert γ S34 auf etwa gleicher Höhe mit yE238P und orientiert beide Seitenketten scheinbar in ungefähr dieselbe Raumrichtung, so daß möglicherweise ähnliche Auswirkungen der Mutation erwartet werden könnten.

Im Gegensatz zu γE238P beeinflußt γS34P aber die Protonentranslokation fast gar nicht, während sich die Hydrolyse leicht erhöht zeigt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß die

Seitenkette nicht zu den umgebenden Untereinheiten α und β orientiert ist, sondern mit der Cterminalen Helix von γ in Kontakt steht. Eine unmittelbare Nachbarschaft zu γ A236, wie sie im mitochondrialen F₁ zu erkennen ist, wäre möglich. Wie schon für diesen Rest diskutiert, scheint die Störung der α -helicalen Struktur an dieser Kontaktfläche durch Prolin keinen gravierenden Einfluß auf die Funktion zu haben. Die für γ A236 diskutierte höhere Raumbeanspruchung durch Prolin scheint bei dem größeren Serin (73 Å³) ebensowenig wie der Verlust der Hydroxylgruppe die Enzymfunktion negativ zu beeinflussen.

Die Mutation γ S34G ist dagegen in der ATP-Hydrolyse und Protonentranslokation eingeschränkt. Möglicherweise könnte dies ebenso wie die Effekte der benachbarten Mutation γ A236G mit derselben Störung des H⁺-Transportes im Hinblick auf eine verringerte Rigidität interpretiert werden. Allerdings ist bei dem Austausch Serin gegen Glycin (48 Å³) auch das verringerte Volumen in Betracht zu ziehen, durch das möglicherweise der van-der-Waals-Kontakt zwischen den Seitenketten der beiden Helices verloren gehen könnte.

Der Rest γ V13 ist zur Kontaktfläche zwischen N- und C-Terminus der Untereinheit γ orientiert (Abb. **38**). Er liegt im mitochondrialen F₁ (52) oberhalb der Cterminalen Schlaufen von α und β , aber noch unterhalb des sogenannten P-Loops in β in einem Bereich, in dem γ in keinem direkten Kontakt zu den großen Untereinheiten steht (vgl. Abb. 18).

Alle dort eingefügten Reste führen zu einer deutlich reduzierten Hydrolyseaktivität, wobei kein Zusammenhang mit der Raumausfüllung besteht. Die geringste Aktivität zeigen die Helixdestabilisierenden Mutationen yV13P und γV13G (beide etwa 40 % des Wildtyps), in denen die Hydrolyseaktivität auch nicht durch den Protonengradienten rückgehemmt wird. Im Gegensatz zu yV13G ist in yV13P auch der ATP-induzierte Protonengradient klar reduziert, während der respiratorische ΔpH in beiden Mutanten und dem Wildtyp gleich hoch ist. Dies spricht dafür, daß der reduzierte ΔpH in

Abb. 38: Lage des Restes yV13

Die Grafik zeigt einen Ausschnitt aus der C- und Nterminalen Helix der mitochondrialen Untereinheit γ (52), deren atomare Struktur in *E. coli* zum Großteil noch unbekannt ist. Das Rückgrat der N-terminalen Helix windet sich auf der linken Bildseite von oben nach unten, ihr Gegenstück auf der rechten Seite von unten nach oben. Sie sind an ihrer Kontaktfläche durch eine dichte Pakkung von meist hydrophoben Resten ineinander verzahnt. Die Seitenketten dieser Reste sind als Stabmodelle dargestellt, von denen der mutierte Rest γ V13 schwarz hervorgehoben ist. Die für die Interaktion mit den katalytischen Zentren wichtigen Reste γ Q269 und γ T273 (50,105,107) unmittelbar oberhalb der Helixpackung, die durch die Mutationen in ihrer Orientierung verändert werden könnten, sind als Kugelstabmodell gezeigt der Mutante $\gamma V13P$ nicht auf eine erhöhte Protonenpermeabilität der Membran zurückzuführen ist. Vielmehr scheint ein Teil des ATP ohne H⁺-Transport hydrolysiert zu werden, so daß trotz der gleichen Hydrolyserate ein geringerer ΔpH als in $\gamma V13G$ aufgebaut wird. Für eine solche mechanistische Entkopplung der beiden Teilreaktionen spricht auch die verringerte Sensitivität von $\gamma V13P$ gegenüber dem F₀-Inhibitor DCCD.

Die strukturelle Grundlage der durch Mutation von γ V13 ausgelösten Hydrolysestörungen ist nicht klar. An der Mutagenesestelle selber besteht kein enger Kontakt zu den Untereinheiten α und β , obwohl ein solcher Kontakt durch einen Prolin-Knick der Helix entstehen könnte. Für eine solche Spekulation fehlen aber Argumente. Möglicherweise könnte als Erklärung auch eine gestörte Wechselwirkung mit der C-terminalen Helix von γ herangezogen werden, die im folgenden Kapitel diskutiert wird.

4.4 Kontakte zwischen N- und C-terminaler Helix in γ

Die N- und C-terminalen Helices der Untereinheit γ sind im Zentrum des F₁ umeinandergewunden und stehen in einem engen räumlichen Kontakt zueinander. Die Kontaktfläche wird vor allem von kleinen und hydrophoben Resten gebildet. Sie haben zueinander einen Abstand von 3, 4 oder 7 Resten (Abb. 38). Dadurch können sich die Reste in einem Band übereinander anordnen und die Helices über van-der-Waals-Wechselwirkungen miteinander verknüpfen (30).

Ein Aminosäurepaar, das an der Kontaktfläche zwischen den beiden Helices liegen könnte, ist γ S34/ γ A236. Die ähnlichen Auswirkungen ihrer Mutationen deuten auch auf einen funktionellen Kontakt hin. Der Einbau von Prolin scheint hier weniger durch eine veränderte Sekundärstruktur zu stören, als vielmehr durch seine höhere Raumausfüllung. Dementsprechend senkt ein Ersatz des kleinen Alanins Hydrolyserate und ATP-getriebene Protonentranslokation stärker als die Mutation des größeren Serin zu Prolin. Die mit einer Vergrößerung von 73 auf 124 Å³ verbundene Mutation γ S34L führt hingegen zum Verlust von 33 % der Hydrolyseaktivität (105). In Analogie hierzu läßt sich vermuten, daß die in der Mutante γ S34G, nicht aber in der Mutante γ A236G gestörte Hydrolyse auf eine Schwächung der Helixinteraktion durch den verlorengegangenen Kontakt der Seitenketten zurückzuführen sein könnte. Die gegenseitige Stabilisierung der beiden Helices wäre ein plausibler Grund dafür, daß eine Prolin-induzierte Störung an der gemeinsamen Kontaktfläche strukturell kompensiert und so funktionell toleriert werden könnte. Die Energie der Wechselwirkungen würde eine Konformation der Aminosäuren um das Prolin herum fördern, die nach einem kurzen, unstrukturierten Bereich die Interaktionen durch Rückkehr zur ursprünglichen Helixstruktur möglichst unverändert wiederherstellt. Zudem würden die Helices unter Umständen in ihrem Gegenüber die Ausbildung eines Prolinknickes behindern, wenn die Position der abgeknickten Helix mit der zweiten Helix in sterische Konflikte käme.

Mit einer solchen Stabilisierungsfunktion wäre gut in Einklang zu bringen, daß eine erhöhte Flexibilität durch Glycineinbau den Aufbau eines ΔpH stärker behindert als das starre Prolin. Möglicherweise könnte die Rigidität der mutierten Helixdomänen für die Weitergabe von Konformationsänderungen während der Kopplung wichtiger sein als ihre exakte, lokale Struktur an dieser Stelle.

Im Anfangsbereich des N-Terminus scheint dagegen die lokale Struktur eine wichtigere Bedeutung zu haben (vgl. Abb. 38). Die Mutation von γ V13 hat auch bei Austauschen gegen Alanin und Cystein eine starke Störung der Hydrolyse zur Folge. Der daran gekoppelte Aufbau eines Δ pH ist aber, mit der Ausnahme von γ V13P, fast gar nicht gestört. Dieses Ergebnis ist durch eine direkte Wirkung der Mutationen auf die umgebenden Untereinheiten α und β nur schwierig zu erklären, da diese in keinem engen räumlichen Kontakt stehen. Zudem ist das Valin zur C-terminalen Helix von γ orientiert (Abb. 38), so daß die Mutationen wahrscheinlich indirekt über die Interaktion mit dieser Helix wirken. Andere Mutagenesestudien haben gezeigt, daß oberhalb von γ V13 im C-Terminus ein Segment beginnt, das für die ATP-Hydrolyse sehr wichtig ist (50,105,107). Die dort liegenden Aminosäuren γ Q269 und γ T273 sollen im Kontakt zu Resten der Untereinheit β nahe der katalytischen Zentren stehen. Gestörte Wechselwirkungen mit der N-terminalen Helix könnten die Position dieser Domäne verändern und so die Hydrolyse beeinträchtigen.

Die aus der Struktur abgeleitete Stabilisierung der beiden Helices könnte also in ihren verschiedenen Bereichen unterschiedliche Funktionen für die verschiedenen Teilreaktionen des Enzyms haben. Diese Funktionsdifferenzierung der Domänen sollte bei der Untereinheit γ zu erwarten sein, wenn sie an der Energieumwandlung als Mittler direkt beteiligt ist (vgl. 4.6). Wenn die Untereinheit γ als Kopplungsachse fungiert, sollte ein Bereich mit den katalytischen Zentren während der Substratumsetzung interagieren, während ein anderer Bereich die Protonentranslokation durch Wechselwirkungen mit dem F₀ beeinflußt. Die Mutationen von γ V13 deuten möglicherweise darauf hin, daß die Interaktion mit den katalytischen Zentren durch die oberen Domänen der α -Helices in γ erfolgen könnte, was aufgrund der räumlichen Nähe zu den Nukleotidbindungsstellen plausibel erscheint. Im folgenden sollen nun die beiden Mutanten γ E238P und γ R242P besprochen werden, die die Wechselwirkung der Untereinheit γ mit dem F₀ stören.

4.5 Funktionsverlust in den Mutanten yE238P und yR242P

Von den in dieser Arbeit charakterisierten Mutanten der Untereinheit γ haben nur γ E238P und γ R242P die Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung verloren, und zwar *in vivo* und *in vitro* (vgl. 3.3.1).

Die Mutationen betreffen beide Reaktionsrichtungen der reversiblen ATPase-Reaktion, die Mutantenvesikel bauen also durch Hydrolyse von ATP auch keinen Protonengradienten auf. Dieser Defekt tritt bei allen Temperaturen zwischen 20 und 40 °C auf. Er ist also im Gegensatz zu anderen, in der Literatur beschriebenen Mutationen wie γ E208K (86) in diesem Bereich nicht temperaturabhängig. Bei dieser Mutanten verschlechtert der Austausch der negativen Seitengruppe in unmittelbarer Nähe des F₀ durch eine positive Ladung wahrscheinlich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem F₁ und dem F₀, die für die Katalyse und Kopplung von entscheidender Wichtigkeit sind (46b). Bei niedriger Temperatur erlauben die geschwächten Interaktionen noch eine Energieübertragung, die bei hohen Temperaturen und/oder den damit einhergehenden hohen Wechselzahlen verloren geht und zur Entkopplung führt.

Im Gegensatz dazu scheint bei den in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten γ E238P und γ R242P eine für die Funktion wichtige Wechselwirkung nicht nur geschwächt, sondern komplett verloren. Die Mutationen könnten diese Wechselwirkungen indirekt durch strukturelle Auswirkungen auf andere Enzymbereiche wie den F₀ (vgl. 4.2) verhindern, oder eine direkte Wirkung am Mutageneseort auf die Wechselwirkungen der Untereinheit γ mit den Untereinheiten β und/oder α haben. Daß die direkten Wechselwirkungen nicht ionischer Art sein müßten, wurde bereits anhand der unpolaren Substituenten dargestellt (vgl. 4.1). Ob die Hydrolyse oder die Interaktion zwischen dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon und der Untereinheit γ betroffen sind, an deren Kontaktfläche die Reste sich befinden, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.5.1 Mechanismus der ATP-Hydrolyse

Die annähernd gleichen Wechselzahlen lassen vermuten, daß die Katalyse der ATP-Hydrolyse im unveränderten und den mutierten Enzymen gleich ist. Sie wird auch durch die Hemmstoffe Aurovertin und Azid ähnlich stark gehemmt (Abb. 39). Um den Katalysemechanismus genauer zu charakterisieren, wurden die thermodynamischen Parameter für den Wildtyp und die Mutanten γ E238P und γ R242P bestimmt (Tab. 11). Sowohl die freie Gibbs'sche Energie ΔG^{\ddagger} , als auch die Entropie ΔS^{\ddagger} und die Enthalpie ΔH^{\ddagger} stimmen für die unveränderte ATP-Synthase in Membranvesikeln mit bisherigen Veröffentlichungen überein (85). ΔG^{\ddagger} in den Mutanten yE238P und yR242P gleicht denen des Wildtyps im Rahmen der Meßungenauigkeit, dagegen wurde -T ΔS^{\ddagger} um 5 kJ/mol höher bestimmt. Der veränderte Entropiewert wird durch eine entsprechende Senkung der Enthalpie ΔH^{\ddagger} kompensiert. Diese thermodynamischen Parameter können so interpretiert werden, daß für die Erreichung des Übergangszustandes in den mutierten Enzymen weniger Energie aufgewendet werden muß. Die Veränderung des Entropieterms legt nahe, daß dies mit dem Verlust von (Bindungs)-Kräften erklärt werden könnte, die im Wildtyp, nicht aber in den Mutanten überwunden werden müssen, um den Übergangszustand zu erreichen. Da die ATP-Hydrolyse in den Mutanten nicht mehr mit einer Protonentranslokation verbunden ist, könnte dies einen solchen verringerten Energieaufwand erklären. Zur Zeit wird noch kontrovers diskutiert, ob die Protonentranslokation während des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Reaktion stattfindet (5,32,115,116). Da die Maximalgeschwindigkeit bestimmt wurde, kann der hier charakterisierte Übergangszustand diesem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katalyse zugeordnet werden (138). Welcher Schritt dies ist, wird zur Zeit noch diskutiert. Die genaue Zuordnung wird dadurch erschwert, daß sich nach dem "binding-change"-Mechanismus (22,23) drei aktive Zentren in einem Enzym an der Katalyse beteiligen, wobei jedes Zentrum zur gleichen Zeit ein anderes der drei

Katalysestadien durchläuft. In einem wird ATP gebunden, in einem ATP hydrolysiert und in einem ADP + P_i freigesetzt. Alle drei tragen zum thermodynamischen Profil des Übergangszustandes bei, so daß er schon im F_1 -Teilkomplex nicht gleichgesetzt werden kann mit dem chemischen Übergangszustand, wie ihn etwa das Analogon MgAlF₃ADP (24,104) widerspiegelt. Im intakten F_0F_1 -Enzym fließen darüber hinaus noch die mit der Protonentranslokation einhergehenden Prozesse ein.



Abb. 39: Hemmung der ATP-Hydrolyse in den Mutanten γE238P und γR242P Die Balken geben die verbleibende Restaktivität unter den unterschiedlichen Bedingungen an.

4.5.2 Kopplung zwischen F₁ und F₀

Die Inhibition der ATP-Hydrolyse durch Hemmstoffe des Protonentransports läßt Rückschlüsse über die Kopplung beider Teilprozesse zu. Der Hemmstoff DCCD bindet kovalent an die Carboxylgruppe D61 der Untereinheit c, die an der Protonenleitung durch den F₀ essentiell beteiligt ist. In den in 1.5.3 ausführlich vorgestellten Modellen liegt der Rest cD61 an der Au-Benseite eines Zylinders aus mehreren Untereinheiten c, an dessen Oberseite Untereinheit y und ε fest gebunden sind. Seine Rotation an der peripheren Untereinheit a vorbei Protonen über die Membran transportieren. Die Bindung des voluminösen DCCD verhindert nach diesem Modell nicht nur die Protonenleitung, sondern blockiert auch die Drehung des Komplexes aus γ , ε und c sterisch, so daß am F₁ keine kontinuierliche, kooperative ATP-Hydrolyse stattfinden kann. In Experimenten von Zhou et al. (185) wurde durch eine Disulfidbrücke eine Untereinheit γ und β miteinander verknüpft und dann mit den anderen Untereinheiten zu einem Enzym rekonstituiert. Entsprechende Markierungen erlauben die Identifikation der Untereinheit β , die zu Beginn mit γ verknüpft war. Nach Auflösen der Disulfidbrücke und Katalyse wurde die Disulfidbrücke erneut geknüpft. Die nun mit γ vernetzten Untereinheiten β wurden analysiert. Nach ATP-Hydrolyse zeigt sich eine nach dem Modell erwartete, statistische Verteilung der unterschiedlichen Untereinheiten β , die an γ gebunden wurden. Bei Vorinkubation mit DCCD wurde hingegen überwiegend wieder die Quervernetzung mit der Untereinheit β hergestellt, mit der γ zu Beginn des Experimentes verbunden war. Dies wurde als eine Unterbindung der Drehung von γ relativ zu $\alpha_3\beta_3$ interpretiert, obwohl das Experiment nicht zeitaufgelöst ist und die Rotation selber gar nicht verfolgen kann.

Bei den beiden nicht protonentranslozierenden Mutanten γ E238P und γ R242P hemmt 30 μ M DCCD die ATP-Hydrolyse ebenso wie beim Wildtyp um circa 50 % (Abb. 39). Im Rahmen der oben genannten Hypothese könnte dies so verstanden werden, daß die mechanistische Kopplung zwischen F₀ und F₁ in den Mutanten weitgehend intakt ist, so daß die Blockade des F₀ auf die Katalyse des F₁ wirkt. Aus Messungen am isolierten F₁ ist für die durch die ATP-Hydrolyse erzeugte mechanische Kraft ein Drehmoment von 50 pN*nm ermittelt worden (113). Dieses müßte demnach auf den Proteolipidzylinder übertragen werden und dabei müßte ihm die Wechselwirkung zwischen F₁ und F₀ widerstehen.

DCCD kann in höheren Konzentrationen (> 100 μ M) an die Untereinheit β binden und so den F₁ direkt hemmen (170,183). Hemmversuche mit Venturicidin (119), das spezifisch nur an den F₀ bindet, führen aber zu denselben Ergebnissen wie die Experimente mit DCCD. Beide F₀-Hemmstoffe hemmen also die Mutanten genauso wie den Wildtyp. Eine daraus abzuleitende mechanische Kopplung zwischen F₀ und F₁ geht aber nicht mit einer funktionellen Kopplung einher. Mit der ATP-Hydrolyse wird in den Mutanten kein Protonengradienten aufgebaut.

4.5.3 Protonenpermeabilität

Der fehlende Aufbau eines ∆pH durch ATP-Hydrolyse deutet auf eine erhöhte Protonenpermeabilität der Membranvesikel in den Mutanten hin.

Sie wird dadurch belegt, daß der an die NADH-Oxidation gekoppelte respiratorische Protonengradienten in den Mutanten erniedrigt ist. Sie ist auf einen erhöhten H⁺-Ausstrom durch den F₀ zurückzuführen, denn die Blockade des F₀ durch DCCD bringt den respiratorischen Δ pH auf ein dem Wildtyp vergleichbares Niveau.

In beiden Mutanten wird der Protonenausstrom durch die Zugabe von ADP + P_i beschleunigt, dabei wird jedoch kein ATP produziert und anders als im Wildtyp erhöht auch ATP den H⁺-Ausstrom (Abb. 29).

Der beschleunigte H⁺-Ausstrom wird nicht durch Aurovertin gehemmt. Daraus kann geschlossen werden, daß dafür die Bindung der Substrate verantwortlich ist, denn die ATP-Hydrolyse wird durch Aurovertin spätestens nach einem katalytischen Zyklus gestoppt (170). Möglicherweise sind es das im katalytischen Zentrum gebildete ADP und P_i, die die Beschleunigung des Protonenausstrom nach ATP-Zugabe bewirken. Das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PCP hat nämlich keinen Einfluß auf den Δ pH. Die Erhöhung der Protonenpermeabilität, die den Aufbau eines Δ pH durch ATP-Hydrolyse in den Mutanten verhindert, ist demnach auf zwei Ursachen zurückzuführen, einen intrinsischen und einen Substratinduzierten Entkopplungseffekt. Allerdings reichen beide Effekte zusammen nicht aus, um den durch NADH-Oxidation aufgebauten Gradienten vollständig zum Erliegen zu bringen. Dies hat vermutlich damit zu tun, daß die an die Atmungskette gekoppelte Protonentranslokation in ihrer Rate höher ist als die an die ATPase gekoppelte.

Wird eine zusätzliche Triebkraft durch ein K⁺-Diffusions-Potential bereitgestellt, so bauen auch ATPasen mit der Mutation γ E238P oder γ R242P nach ATP-Zugabe vorübergehend einen Protonengradienten auf.

Das K⁺-Potential, das künstlich durch einen K⁺-Konzentrationssprung erzeugt wurde, wird im Laufe der Reaktion abgebaut. Deswegen ist der ΔpH in den Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp, wo das zusätzliche Potential nicht erforderlich ist, transitorisch. Die mutierten Enzyme können ohne das Zusatzpotential den Protonengradienten nicht gegen die Leckströme aufrecht erhalten.

4.5.4 Mögliche Deutungen der gestörten Energieübertragung

Den Verlust der Möglichkeit zur Energiekonservierung bei intakter mechanischer Kopplung von F_0 und F_1 könnte ein unspezifisches Protonenleck erklären. Sowohl die Protonenströme als auch die ATP-Hydrolyse werden aber durch DCCD und Venturicidin gehemmt. Beide Inhibitoren greifen an dem einzigen Rest (cD61) an, dessen Beteiligung an dem produktiven Protonentransportweg durch F_0 unumstritten ist (11,75). Die bei den Mutanten beobachteten, erhöhten Protonenflüsse gehen daher über den gleichen Weg.

Eine Erklärung könnte sein, daß nur ein Teil der Enzyme H⁺-Transport-gekoppelte ATP-Hydrolyse ausführt, während durch einen anderen Teil der Enzyme, die als Leck fungieren würden, die Protonen wieder ausströmen. Dies ist aber unwahrscheinlich, sofern man keine zwei verschiedenen Enzympopulationen annimmt (s. u.), da die Experimente unter Substratsättigung ausgeführt wurden, so daß alle Enzyme in der ATP-Hydrolyse aktiv sein sollten. Die gegenüber dem Wildtyp unveränderten Wechselzahlen bestätigen diese Vermutung. Möglicherweise könnte dieser Erklärungsansatz aber geeignet sein, die teilweise Entkopplung der Membranen bei Aufbau eines respiratorischen ΔpH (ohne ATP/ADP-Zugabe) durch Enzyme zu erklären, an die nach der Präparation noch Nukleotide des Cytosol fest gebunden geblieben sind. Auch zwei unterschiedliche Enzympopulationen erscheinen als Erklärung unwahrscheinlich, da ihre Herkunft schlecht zu erklären wäre. Der Stamm DK8 besitzt durch eine Deletion kein Gen für die Untereinheiten der ATP-Synthase, so daß sie vom (mutierten) Plasmid exprimiert werden muß. Zellen ohne Plasmid können aufgrund der fehlenden Resistenz gegen das zugesetzte Antibiotikum nicht wachsen, während das Wachstum durch Glucose-Vergärung einen Selektionsdruck für etwaige Spontanmutationen in der ATP-Synthase minimiert.

Die immunologischen Nachweise sowohl des N- als auch des C-Terminus der Untereinheit in den isolierten Membranvesikeln belegen, daß in keiner der Mutanten Degradationsprodukte der Untereinheit vorhanden sind, die veränderte Komplexe bilden könnten. Auch unvollständig zusammengebaute Enzyme konnten nicht nachgewiesen werden. Dagegen belegen die Quantifizierung der Untereinheiten α und γ , daß zumindest die Stöchiometrie zwischen α und γ nicht verändert zu sein scheint. Auch eine Ablösung dieser Untereinheiten oder des F₁ vom membranständigen F₀ findet unter den Versuchsbedingungen nicht statt. F₁-freier F₀ könnte auch nicht die Nukleotideffekte erklären, da er keine entsprechenden Bindestellen besitzt. Bei der Interpretation der Mutanten ist es daher sinnvoll, von einer einheitlichen Enzympopulation auszugehen, in denen die Mutationen in allen Enzymen dieselbe Veränderung des Mechanismus bewirken.

4.6 Modell eines Substrat-kontrollierten Protonen-Ventils

Angenommen wird ein Substrat-abhängiger Kontrollmechanismus für die Richtung des Protonenflusses durch ein "Protonen-Ventil". Dieses würde im Wildtyp zwischen einer für den Protoneneinstrom oder Protonenausstrom offenen und einer geschlossenen Form wechseln. Der jeweils eingenommene Zustand wäre von der Reaktionsrichtung und -phase abhängig und könnte durch den Protonengradienten und die gebundenen Substrate gesteuert werden. In der offenen Form würden die Protonen aufgenommen bzw. abgegeben, in der geschlossenen Form würde die Kraft aufgebaut, um die Protonen über die Transportbarriere zu befördern bzw. die Achse in Bewegung zu setzen. Die Öffnung würde durch die Bindung von ADP und P_i gesteuert; der Verschluß wäre mit dem katalytischen Reaktionsschritt der Umwandlung von ADP + P_i und ATP + H₂O ineinander koordiniert.



Abb. 40: Modell des vorgeschlagenen Ventilmechanismus

Dieses Modell zeigt die Modifikationen, die möglicherweise bei dem von Junge vorgeschlagenen Kopplungsmodell notwendig sind. Der periphere F_1 ist in hellgrau unterlegt, der membranintegrale F_0 in dunkelgrau. Dieses Funktionsmodell geht davon aus, daß Protonen durch die Drehung des Proteolipidzylinders zwischen zwei Halbkanälen transportiert werden und so die Membran passieren können (80). Der Rotor mit dem Schaft soll die postulierte, starre Verbindung mit der Untereinheit γ symbolisieren, deren terminale α -Helices angedeutet sind. Die beiden waagerechten Striche, die vom Schaft ausgehen, sollen die Interaktion von zwei Domänen der Untereinheit γ mit dem Enzymkomplex veranschaulichen. Die obere Wechselwirkung induziert die Umsetung der Substrate in der katalytischen Bindungstasche, während die untere den Protonenfluß durch den F_0 kontrolliert. Beide Vorgänge werden durch die Untereinheit γ miteinander verbunden und dadurch koordiniert. Die Wechselwirkung mit den katalytischen Zentren scheint bei Mutationen von γ V13 gestört zu sein, während in γ E238P und γ R242P das Protonenventil am F_0 nicht richtig zu schließen scheint.

Dies würde zwei funktionelle Domänen in der Untereinheit γ , die die Koordination steuert, erfordern: Eine Domäne stände mit der Nukleotidbindungsstelle während der Katalyse in Kontakt. Die durch Mutation von γ V13 ausgelösten Störungen der ATP-Hydrolyse deuten darauf hin, daß sich eine solche Domäne im oberen Teil der terminalen Helices der Untereinheit γ befinden könnte, wie auch schon von Nakamoto *et al.* (105) diskutiert wurde.

Die zweite Domäne hätte die Funktion eines Protonenventils, das den Protonenfluß durch den F_0 kontrollieren würde. Das in Abb. 40 gezeigte Modell illustriert die Rolle eines solchen Ventils in der Katalyse. Dabei wurde als Grundlage der Zeichnung das von Junge (80) vorgeschlagene Schema der Protonentranslokation verwendet. Diese Hypothese ist aber keinesfalls die Grundlage des hier vorgestellten Kontrollmechanismus und kann durch andere Modelle, sei es von Dimroth (37) oder ganz ohne Rotation, ersetzt werden. Der Weg der Protonen im F_0 müßte dann entsprechend anders dargestellt werden.

Die Funktionsstörungen der Mutanten γ E238P und γ R242P könnten in einem solchen Modell durch eine falsche Steuerung des Ventils erklärt werden, bei dem das Ventil unvollständig verschlossen würde. Eine solche Fehlfunktion würde sich weder auf den Mechanismus der ATP-Hydrolyse noch auf die mechanische Kopplung zwischen F₀ und F₁ auswirken. Das System würde jedoch einen Teil seiner Kraft verlieren, um Protonen gegen den sich aufbauenden Gradienten zu pumpen und den Rückstrom von Protonen in das Medium zu verhindern. Ein solcher Defekt könnte durch eine zusätzliche Triebkraft für den Aufbau eines Δ pH kompensiert werden, wie beispielsweise mit dem K⁺-Potential demonstriert. Umgekehrt würde durch diesen Defekt auch die Nutzung des chemiosmotischen Potentials für die ATP-Synthese verhindert.

Das vorgestellte Modell ist aber nicht nur in der Lage, das Verhalten der Mutanten zu beschreiben. Es bietet durch die zusätzliche, Substrat-abhängige Kontrolle des Protonenflusses auch eine Erklärung für die effiziente Kopplung der beiden Reaktionen in der ATP-Synthase.

4.7 Andere Hinweise auf einen Substrat-kontrollierten Protonenfluß

In den Kopplungsmodellen von Junge *et al.* (80) und Dimroth *et al.* (37), die zur Zeit die Diskussion beherrschen, ist der Protonenausstrom integraler Bestandteil der ATP-Synthese-Reaktion, wird also nur durch die Katalyse selber kontrolliert. Tatsächlich ist die Synthese von ATP aus ADP und P_i in allen bekannten ATP-Synthasen mit einem Ausstrom von Protonen verknüpft. Dieses Verhalten ist ein wichtiger Bestandteil des normalen katalytischen Prozesses, sagt aber noch nichts über den Kontrollmechanismus.

ADP-Analoga, die nicht phosphoryliert werden können, bewirken beim Chloroplastenenzym ebenfalls einen Protonenausstrom (164). Daraus wurde geschlossen, daß die Bindung der Nukleotide den Protonenfluß kontrollieren könne. Da der Effekt des ADP-Analogons TNP-ADP sowohl durch ADP als auch durch P_i verhindert wurde, kamen die Autoren zu dem Schluß, daß TNP-ADP nicht nur die Bindung des ADP, sondern auch des anorganischen Phosphates im Enzym nachahme. Diese Interpretation würde gut zu dem vorgeschlagenen Ventilmodell passen, in dem ADP und P_i bei der Umwandlung in ATP im Zustand 3 den Protonenkanal öffnen. Würde TNP-ADP unter Nachahmung der Substrate ebenfalls diesen Zwischenzustand erreichen, ergäbe sich so ein Protonenausstrom trotz fehlender Phosporylierung. Die Rolle des vorgeschlagenen Protonenventils in der ATP-Synthase von *E. coli* könnte die bessere Konservierung der Energie sein. Der vorgeschlagene Ventilmechanismus öffnet den Protonenkanal im Wildtyp nur in dem Moment, wenn ADP und P_i als Substrate am Enzym gebunden sind. Dadurch wird der Abbau eines bestehenden Protonengradienten verhindert, wenn kein ATP synthetisiert werden kann. Dies würde die Energieverluste während der Atmung minimieren und die Energie des chemiosmotischen Potentials effizienter ausnutzen.

4.8 Spekulation über strukturelle Grundlagen des vorgeschlagenen Ventilmechanismus

Das vorgeschlagene Modell eines Ventils, das den Protonenfluß durch den F_0 kontrolliert, erfordert entsprechende strukturelle Voraussetzungen. Das Ventil selber muß sich am Protonenkanal befinden und mit den Mutagenesestellen γ E238P und γ R242P, die Einfluß auf seine Öffnung haben sollen, in einen glaubhaften Zusammenhang gebracht werden können.

Beide Anforderungen erfüllt der Beginn der C-terminalen α-Helix von γ und die davor liegende Schlaufe mit den Resten y203-209 (Abb. 41). Nach einem Strukturmodell von Rodgers und Wilce (124) stehen diese Aminosäuren in unmittelbarem Kontakt zu der hydrophilen Schlaufe der Untereinheit c des F₀. Für diese Schlaufe wird eine direkte Beteiligung am Protonenfluß vermutet (34). Ihre Nähe zu dem angesprochenen Bereich in γ wird sowohl durch Quervernetzungen (135,167,168), als auch durch das Peptidrückgrat eines F₁-Untereinheit c-Komplexes aus Hefe bestätigt (147). In unmittelbarem Kontakt mit c befindet sich vermutlich auch die Untereinheit ε , die einen Komplex mit γ bildet. Die Struktur dieses Komplexes (125) zeigt zwischen γ und ε einen Spalt. Dieser ist auch zwischen den homologen Untereinheiten des mitochondrialen F₁ zu sehen und erreicht bis zu 8 Å Breite (52). Er wird auf der einen Seite von einem β -Faltblatt der Untereinheit ϵ (ϵ 41-45) gebildet. Die andere Seite bildet die Schlaufe $\gamma 203-209$ vor der C-terminalen Helix der Untereinheit γ . Über die funktionelle Rolle dieser Spalte kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden, doch wäre sie groß genug für eine hydrophile Schlaufe der Untereinheit c. Es wäre daher verführerisch, über diese Spalte als hypothetisches Protonentor mit Zugang zu dem Arginin cR42 des Protonenkanal im F₀ zu spekulieren.



Abb. 41: Strukturelle Grundlagen der Mutagenese

Diese Abbildung wurde aus der Arbeit von Rodgers und Wilce (124) zusammengestellt und befindet sich als Farbkopie zum Ausklappen im hinteren Einband. Sie zeigt einen Ausschnitt aus der von ihnen modellierten Kontaktfläche zwischen Untereinheit c und dem γ' / ϵ -Komplex. α -Helices sind als Schlaufenband, β -Faltblätter als Pfeile dargestellt. Der Pfeil deutet auf den Spalt zwischen γ' und ϵ hin, der im mitochondrialen Enzym (52) ebenfalls vorhanden und mehr als 7 Å breit ist. Die von dort senkrecht nach oben laufende C-terminale α -Helix von γ ist an den Positionen γ E238 und γ R242 schwarz markiert, an denen ein Prolineinbau zu Störungen des Protonenflusses führt. Dieser Erklärungsansatz würde in direktem Widerspruch zu dem Rotationsmodell stehen, das eine starre Verbindung zwischen γ und dem Proteolipidzylinder ebenso voraussetzt wie einen sequentiellen Zugang einzelner Untereinheiten c in diesem Ring zu dem Protonenkanal. Würde man die Spalte zwischen γ und ε als ein Teil des Protonenkanals ansehen, müßte eine der beiden Voraussetzungen falsch sein. Über eine Funktion als Protonentor nur aufgrund der Struktur zu spekulieren, erscheint aufgrund fehlender funktioneller Charakterisierung dieses Bereiches übereilt.

Daß ein Einfluß auf die Protonentranslokation des F_0 durch die Mutationen γ E238P und γ R242P möglich ist, ist auch ohne die oben erwähnten Spekulationen plausibel. Durch die lange α -Helix ist der Beginn der C-terminalen Helix, der im Kontakt mit dem F_0 steht, mit den Mutagenesestellen in der Domäne γ 236-245 verknüpft. Wie das Beispiel des Prolins γ P43 in der N-terminalen Helix der Untereinheit γ zeigt, kann der Einbau von Prolin das Abknicken einer α -Helix induzieren. Dies könnte bei den Mutationen im C-Terminus zu einer Lageveränderung des Helixbeginn auf der Kontaktfläche zum F_0 führen. Eine Vorhersage, wie sich die Lage der C-terminalen Helix verändern könnte, würde eine Strukturberechnung der mutierten Untereinheit im vollständigen Enzymkomplex erfordern. Die dazu notwendigen Strukturdaten sind aber zur Zeit noch nicht erhältlich. Die Lageveränderung durch einen Knick wäre aber von der Helixseite abhängig, auf der das Prolin eingebaut ist. Eine solche Abhängigkeit des durch ATP-Hydrolyse erzeugten Protonengradienten von der Lage des Prolins wurde in der Tat beobachtet (Abb. 36).
5 Zusammenfassung

Die F_0F_1 -ATP-Synthase aus *E. coli* nutzt das chemiosmotische Potential von Protonen, die entlang eines Gradienten durch den membranintegralen F_0 -Teil strömen, um aus ADP und anorganischem Phosphat am peripheren F_1 -Teil ATP zu synthetisieren. Beide Prozesse sollen durch die Rotation der Untereinheit γ innerhalb des Enzyms reversibel miteinander gekoppelt sein. Die beiden Enden der Untereinheit γ erstrecken sich vom Zentrum des F_1 bis zum F_0 als zwei lange, umeinander gewundenen α -Helices, die als Rotationsachsen prädestiniert scheinen. Ihre helicale Struktur wurde in dieser Arbeit durch Einbau von Prolinen und Glycinen gestört.

Der Einbau des α -Helix-Brechers Prolin beeinträchtigt bei zwei Mutationen (γ S34P, γ A236P) die Enzymfunktion nicht nennenswert. Sie liegen an der Kontaktfläche der beiden Helices, deren gegenseitige Stabilisierung die Strukturstörung möglicherweise kompensieren kann. Die Mutationen γ S34G und γ A236G sowie Austausche des Restes γ V13 zeigen Störungen der Protonentranslokation und der ATP-Hydrolyse, die die funktionelle Bedeutung der Helix-Interaktionen unterstreichen.

Membranvesikel mit den ATPase-Mutanten yE238P und yR242P können weder ATP synthetisieren, noch durch ATP-Hydrolyse einen ApH aufbauen. Dies ist nicht auf den Verlust der negativen (E) bzw. positiven Ladungen (R) zurückzuführen, da die hydrophoben Substitutionen yE238I und yR242L funktionell nur geringe Beeinträchtigungen zur Folge haben. Die weitere Charakterisierung der Prozesse der ATP-Hydrolyse in den Mutanten yE238P und yR242P zeigt keine gravierende Veränderung der katalytischen Reaktion. Die Hydrolyse von ATP führt jedoch zu keinem ΔpH. Die Bindung von ATP erhöht die Protonenpermeabilität des F₀-Teilkomplexes, vermutlich durch das am Enzym gebildete ADP und Phosphat. Dies erklärt, warum trotz ATP-Hydrolyse und möglichen H⁺-Transport über die Membran kein Gradient aufgebaut wird. Ein ApH kann aber aufgebaut werden, wenn eine zusätzliche Triebkraft in Form eines K⁺-Potentials zur Verfügung steht. Die Ergebnisse lassen sich mit einem Ventilmodell erklären, in dem die Bindung von ADP und Phosphat den sonst verschlossenen Protonenkanal im F₀ vorübergehend öffnet. In den Mutanten yE238P und yR242P würde das Protonen-Ventil zwar richtig geöffnet, aber unvollständig geschlossen. Dieser Ventil-Mechanismus wäre sehr effektiv, um den ΔpH mit hohem Wirkungsgrad für die Phosphorylierung zu nutzen.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Bullock, W. O., Fernandez, J. M., und Short, J. M. (2000) Biotechniques 5, 376-379
- 2. Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., und Walker, J. E. (1994) Nature 370, 621-628
- Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M., und Kinosita, K. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 7243-7247
- 4. Aggeler, R., Haughton, M. A., und Capaldi, R. A. (1995) J. Biol. Chem. 270, 9185-9191
- 5. Al-Shawi, M. K., Ketchum, C. J., und Nakamoto, R. K. (1997) Biochemistry 36, 12961-12969
- 6. Al-Shawi, M. K., Ketchum, C. J., und Nakamoto, R. K. (1997) J. Biol. Chem. 272, 2300-2306
- 7. Al-Shawi, M. K. und Senior, A. E. (1988) J. Biol. Chem. 263, 19640-19648
- 8. Amano, T., Hisabori, T., Muneyuki, E., und Yoshida, M. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18128-33
- 9. Angov, E. und Brusilow, W. S. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1183, 499-503
- 10. Ansubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. (1992) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & sons, New York
- 11. Azzi, A., Casey, R. P., und Nalecz, M. J. (1984) Biochim. Biophys. Acta 768, 209-226
- 12. Beckers, G., Berzborn, R. J., und Strotmann, H. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1101, 97-104
- 13. Belogrudov, G. I., Tomich, J. M., und Hatefi, Y. (1995) J. Biol. Chem. 270, 2053-2060
- 14. Berden, J. A. und Hartog, A. F. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 234-251
- 15. Berns, M. (2000) Dissertation an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- 16. Bianchet, M. A., Hullihen, J., Pedersen, P. L., und Amzel, L. M. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 11065-11070
- 17. Birkenhager, R., Greie, J. C., Altendorf, K., und Deckers-Hebestreit, G. (1999) Eur. J. Biochem. 264, 385-396
- Birkenhager, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F., und Altendorf, K. (1995) Eur. J. Biochem. 230, 58-67
- 19. Boogerd, F. C., Boe, L., Michelsen, O., und Jensen, P. R. (1998) J. Bacteriol. 180, 5855-5859
- 20. Bottcher, B. und Graber, P. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 404-416
- 21. Boyer, P. D. (1997) Annu. Rev. Biochem. 66, 717-749
- 22. Boyer, P. D. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 252-262
- 23. Boyer, P. D., Cross, R. L., und Momsen, W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 2837-2839
- 24. Braig, K., Menz, R. I., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., und Walker, J. E. (2000) Structure With Folding Und Design 8, 567-573

- 25. Braun, G., Evron, Y., Malkin, S., und Avron, M. (1991) FEBS Lett. 280, 57-60
- 26. Cabezon, E., Butler, P. J. G., Runswick, M. J., und Walker, J. E. (2000) J. Biol. Chem. 275, 25460-25464
- 27. Capaldi, R. A. und Schulenberg, B. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 263-269
- Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., Pelletier, J. J., Paulus, H., und Xu, M. Q. (1997) *Gene* 192, 271-281
- 29. Chong, S., Shao, Y., Paulus, H., Benner, J., Perler, F. B., und Xu, M. Q. (1996) J. Biol. Chem. 271, 22159-22168
- 30. Cohen, C. und Parry, D. A. (1990) Proteins 7, 1-15
- 31. Creighton, T. E. (1996) Proteins: Structure und Molecular Properties, Freeman, New York
- 32. Cross, R. L. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 270-275
- 33. Deckers-Hebestreit, G. und Altendorf, K. (1996) Annu. Rev. Microbiol. 50, 791-824
- 34. Deckers-Hebestreit, G., Greie, J. C., Stalz, W. D., und Altendorf, K. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 364-373
- 35. Devenish, R. J., Prescott, M., Roucou, X., und Nagley, P. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 428-442
- 36. Dimroth, P., Kaim, G., und Matthey, U. (1998) Biochim. Biophys. Acta 1365, 87-92
- 37. Dimroth, P., Matthey, U., und Kaim, G. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1459, 506-513
- 38. Dmitriev, O., Jones, P. C., Jiang, W. P., und Fillingame, R. H. (1999) J. Biol. Chem. 274, 15598-15604
- 39. Dmitriev, O. Y., Jones, P. C., und Fillingame, R. H. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 7785-7790
- 40. Dunn, S. D., McLachlin, D. T., und Revington, M. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 356-363
- 41. Engelbrecht, S., Giakas, E., Marx, O., und Lill, H. (1998) Eur. J. Biochem. 252, 277-283
- 42. Etzold, C., Deckers-Hebestreit, G., und Altendorf, K. (1997) Eur. J. Biochem. 243, 336-343
- 43. Fasman, G. (1990) *Prediction of protein structure und the principles of protein conformation*, Plenum Press, New York
- 44. Feldhaus, P., Fröhlich, T., Goody, R. S., Isakov, M., und Schirmer, R. H. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 197-204
- 45. Feng, Z., Aggeler, R., Haughton, M. A., und Capaldi, R. A. (1996) J. Biol. Chem. 271, 17986-17989
- 46. Ferguson, S. J. (2000) Current Biology 10, R804-R808
- 46b. Fiedler, H. R., Ponomarenko, S., von Gehlen, N. und Strotmann, H. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 135-142
- 47. Fillingame, R. H. (2000) Nature Structural Biology 7, 1002-1004
- 48. Fillingame, R. H., Jones, P. C., Jiang, W., Valiyaveetil, F. I., und Dmitriev, O. Y. (1998) *Biochim. Biophys.* Acta 1365, 135-142
- 49. Fling, S. P. und Gregerson, D. S. (1986) Anal. Biochem. 155, 83-88

- 50. Futai, M., Iwamoto, A., Omote, H., Orita, Y., Shin, K., Nakamoto, R. K., und Maeda, M. (1992) *J. Exp. Biol.* 172, 443-449
- 51. Gaballo, A., Zanotti, F., Raho, G., und Papa, S. (1999) FEBS Lett. 463, 7-11
- 52. Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., und Walker, J. E. (2000) Nature Structural Biology 7, 1055-1061
- 53. Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L., und Fillingame, R. H. (1998) *Biochemistry* 37, 8817-8824
- 54. Gnann, J. W., Jr., Smith, L. L., und Oldstone, M. B. (1989) Methods Enzymol. 178, 693-714
- 55. Gogol, E. P. (1994) Microsc. Res. Tech. 27, 294-306
- 56. Green, D. W. und Grover, G. J. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 343-355
- 57. Groth, G. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 417-427
- 58. Groth, G. und Junge, W. (1993) Biochemistry 32, 8103-8111
- 59. Groth, G. und Pohl, E. (2000) J. Biol. Chem. in Press,
- 60. Groth, G. und Strotmann, H. (1999) Physiologia Plantarum 106, 142-148
- 61. Groth, G., Tilg, Y., und Schirwitz, K. (1998) Journal Of Molecular Biology 281, 49-59
- 62. Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580
- 63. Hara, K. Y., Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Kinosita, K., und Yoshida, M. (2000) J. Biol. Chem. 275, 14260-14263
- 64. Hase, B. (1998) Dissertation an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- 65. Hase, B., Werner-Grüne, S., Deckers-Hebestreit, G., und Strotmann, H. (1996) FEBS Lett. 382, 171-174
- 66. Hasler, K., Engelbrecht, S., und Junge, W. (1998) Febs Letters 426, 301-304
- 67. Hasler, K., Panke, O., und Junge, W. (1999) Biochemistry 38, 13759-13765
- 68. Hausrath, A. C., Gruber, G., Matthews, B. W., und Capaldi, R. A. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 13697-13702
- 69. Hellmuth, K., Rex, G., Surin, B., Zinck, R., und McCarthy, J. E. (1991) Mol. Microbiol. 5, 813-824
- 70. Hermolin, J., Dmitriev, O. Y., Zhang, Y., und Fillingame, R. H. (1999) J. Biol. Chem. 274, 17011-17016
- 71. Hermolin, J. und Fillingame, R. H. (1989) J. Biol. Chem. 264, 3896-3903
- 72. Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988) Electrophoresis 9, 28-32
- 73. Hisabori, T., Motohashi, K., Kroth, P., Strotmann, H., und Amano, T. (1998) J. Biol. Chem. 273, 15901-15905
- 74. Hoppe, J., Montecucco, C., und Friedl, P. (1983) J. Biol. Chem. 258, 2882-2885
- 75. Hoppe, J. und Sebald, W. (1984) Biochim. Biophys. Acta 768, 1-27
- 76. Hsu, D. K. und Brusilow, W. S. (1995) FEBS Lett. 371, 127-131

- 77. Hu, D., Fiedler, H. R., Golan, T., Edelman, M., Strotmann, H., Shavit, N., und Leu, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5457-5463
- 78. Huang, C. S., Kopacz, S. J., und Lee, C. P. (1983) Biochim. Biophys. Acta 722, 107-115
- 79. Jones, P. C. und Fillingame, R. H. (1998) J. Biol. Chem. 273, 29701-29705
- 80. Junge, W., Lill, H., und Engelbrecht, S. (1997) Trends In Biochemical Sciences 22, 420-423
- 81. Kagawa, Y. und Hamamoto, T. (1996) J. Bioenerg. Biomembr. 28, 421-431
- 82. Kagawa, Y., Ohta, S., und Otawara Hamamoto, Y. (1989) FEBS Lett. 249, 67-69
- 83. Kaibara, C., Matsui, T., Hisabori, T., und Yoshida, M. (1996) J. Biol. Chem. 271, 2433-8
- KatoYamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., und Yoshida, M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 19375-19377
- 85. Ketchum, C. J., Al-Shawi, M. K., und Nakamoto, R. K. (1998) Biochem. J. 330 Part 2, 707-712
- 86. Ketchum, C. J. und Nakamoto, R. K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 22292-22297
- 87. Kinosita, K., Yasuda, R., Noji, H., und Adachi, K. (2000) *Philosophical Transactions Of The Royal Society* Of London Series B Biological Sciences **355**, 473-489
- 87b. Klionsky, D. J. und Simoni, R. D. (1985) J. Biol. Chem. 260, 11200-11206
- 88. Kuki, M., Noumi, T., Maeda, M., Amemura, A., und Futai, M. (1988) J. Biol. Chem. 263, 17437-17442
- 89. Kyhse Undersen, J. (1984) J. Biochem. Biophys. Methods 10, 203-209
- 90. Lill, H., Hensel, F., Junge, W., und Engelbrecht, S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 32737-32742
- 90b. Linnett, P. E. und Beechey, R. B. (1979) Methods Enzymol. 55, 472-518
- 91. Lucken, U., Gogol, E. P., und Capaldi, R. A. (1990) Biochemistry 29, 5339-5343
- 92. Maggio, M. B., Parsonage, D., und Senior, A. E. (1988) J. Biol. Chem. 263, 4619-4623
- 93. Marty, A., Bourdeaux, M., Dell'-Amico, M., und Viallet, P. (1986) Eur. Biophys. J. 13, 251-257
- 94. Masaike, T., Mitome, N., Noji, H., Muneyuki, E., Yasuda, R., Kinosita, K., und Yoshida, M. (2000) J. Exp. Biol. 203 Pt 1, 1-8
- 95. Matten, S. R., Schneider, T. D., Ringquist, S., und Brusilow, W. S. A. (1998) J. Bacteriol. 180, 3940-3945
- 96. Matthey, U., Kaim, G., Braun, D., Wuthrich, K., und Dimroth, P. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 459-467
- 97. McCarthy, J. E., Schauder, B., und Ziemke, P. (1988) Gene 72, 131-139
- 98. McCarty, R. E., Evron, Y., und Johnson, E. A. (2000) Annual Review Of Plant Physiology Und Plant Molecular Biology **51**, 83-109
- 99. McLachlin, D. T., Bestard, J. A., und Dunn, S. D. (1998) J. Biol. Chem. 273, 15162-15168
- 100. McLachlin, D. T. und Dunn, S. D. (2000) Biochemistry 39, 3486-3490
- 101. Merrifield, B. (1986) Science 232, 341-347

- 102. Miyauchi, M., Tozawa, K., und Yoshida, M. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1229, 225-232
- 103. Musier, K. M. und Hammes, G. G. (1987) Biochemistry 26, 5982-5988
- 104. Nadanaciva, S., Weber, J., und Senior, A. E. (1999) J. Biol. Chem. 274, 7052-7058
- 105. Nakamoto, R. K., Al-Shawi, M. K., und Futai, M. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14042-14046
- 106. Nakamoto, R. K., Ketchum, C. J., Kuo, P. H., Peskova, Y. B., und Al-Shawi, M. K. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 289-299
- 107. Nakamoto, R. K., Maeda, M., und Futai, M. (1993) J. Biol. Chem. 268, 867-872
- 108. Neidhardt, F. C. (1998) Escherichia coli und Salmonella typhimurium: Cellular und molecular biology, ASM Press, Washington
- 109. Noji, H., Hasler, K., Junge, W., Kinosita, K., Yoshida, M., und Engelbrecht, S. (1999) *Biochem Biophys* Res Commun 260, 597-599
- 110. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., und Kinosita, K. (1997) Nature 386, 299-302
- 111. Ogilvie, I., Aggeler, R., und Capaldi, R. A. (1997) J. Biol. Chem. 272, 16652-16656
- 112. Ogilvie, I., Wilkens, S., Rodgers, A. J. W., Aggeler, R., und Capaldi, R. A. (1998) Acta Physiol Scund 163 Suppl. 643, 169-175
- 113. Omote, H., Sambonmatsu, N., Saito, K., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihara, A., Yanagida, T., Wada, Y., und Futai, M. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 7780-7784
- 114. Orriss, G. L., Leslie, A. G. W., Braig, K., und Walker, J. E. (1998) Structure 6, 831-837
- 115. Oster, G. und Wang, H. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 482-510
- 116. Panke, O. und Rumberg, B. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1412, 118-128
- 117. Patel, A. M. und Dunn, S. D. (1995) J. Bacteriol. 177, 3917-3922
- 118. Perlin, D. S., Cox, D. N., und Senior, A. E. (1983) J. Biol. Chem. 258, 9793-9800
- 119. Perlin, D. S., Latchney, L. R., und Senior, A. E. (1985) Biochim. Biophys. Acta 807, 238-244
- 120. Ponomarenko, S., Volfson, I., und Strotmann, H. (1999) Febs Letters 443, 136-138
- 121. Rastogi, V. K. und Girvin, M. E. (1999) Nature 402, 263-268
- 122. Ren, H. M. und Allison, W. S. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 221-233
- 123. Rex, G., Surin, B., Besse, G., Schneppe, B., und McCarthy, J. E. (1994) J. Biol. Chem. 269, 18118-18127
- 124. Rodgers, A. J. W. und Wilce, M. C. J. (2000) Nature Structural Biology 7, 1051-1054
- 125. Rodgers, A. J. W., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M. B., Howitt, S. M., und Capaldi, R. A. (1997) J. Biol. Chem. 272, 31058-31064
- 126. Rost, M. (1995) Diplomarbeit an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- 127. Sabbert, D., Engelbrecht, S., und Junge, W. (1996) Nature 381, 623-625
- 128. Sabbert, D. und Junge, W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 2312-2317

- 129. Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., und Futai, M. (1999) *Science* **286**, 1722-1724
- 130. Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 131. Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463-5467
- 132. Schemidt, R. A., Brauning, C. K., Bouvier, A., und Brusilow, W. S. A. (1996) J. Biol. Chem. 271, 33390-33393
- 133. Schemidt, R. A., Qu, J., Williams, J. R., und Brusilow, W. S. A. (1998) J. Bacteriol. 180, 3205-3208
- 134. Schnick, C., Forrest, L. R., Sansom, M. S. P., und Groth, G. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1459, 49-60
- 135. Schulenberg, B., Aggeler, R., Murray, J., und Capaldi, R. A. (1999) J. Biol. Chem. 274, 34233-34237
- 136. Schwarz, O. (1997) Dissertation an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- 137. Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H., und Muller, D. J. (2000) Nature 405, 418-419
- 138. Segel, I. H. (1975) Enzyme kinetics, Wiley, New York
- 139. Senior, A. E. (1990) Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 19, 7-41
- 140. Shirakihara, Y., Leslie, A. G. W., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y., und Yoshida, M. (1997) *Structure* **5**, 825-836
- 141. Singh, S., Turina, P., Bustamante, C. J., Keller, D. J., und Capaldi, R. (1996) FEBS Lett. 397, 30-34
- 142. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., und Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- 143. Sorgen, P. L., Bubb, M. R., und Cain, B. D. (1999) J. Biol. Chem. 274, 36261-36266
- 144. Steffens, K., Hoppe, J., und Altendorf, K. (1988) Eur. J. Biochem. 170, 627-630
- 145. Sternweis, P. C. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3123-3128
- 146. Sternweis, P. C. und Smith, J. B. (1980) Biochemistry 19, 526-531
- 147. Stock, D., Leslie, A. G., und Walker, J. E. (1999) Science 286, 1700-1705
- 148. Strotmann, H., Kiefer, K., und Altvater-Mackensen, R. (1986) Biochim. Biophys. Acta 850, 90-96
- 149. Strotmann, H., Shavit, N., und Leu, S. (1998) in *The molecular biology of chloroplasts und mitochondriain Chlamydomonas* (Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M., und Merchant, S. eds) pp. 477-500, Kluwer Academic Publishers,
- 150. Strotmann, H., Thelen, R., Muller, W., und Baum, W. (1990) Eur. J. Biochem. 193, 879-886
- 151. Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130
- 152. Sugino, Y. und Miyoshi, Y. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2360-2364
- 153. Takeyasu, K., Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Iwamoto Kihara, A., und Futai, M. (1996) *FEBS Lett.* **392**, 110-113

- 154. Takeyasu, K., Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Iwamoto Kihara, A., und Futai, M. (1997) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **834**, 149-152
- 155. Tanaka, S., Lerner, S. A., und Lin, E. C. (1967) J. Bacteriol. 93, 642-648
- 156. Taussky, H. H. und Shorr, E. (1953) J. Biol. Chem. 202, 675-685
- 157. Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Noji, H., Kinosita, K., Yoshida, M., und Capaldi, R. A. (2000) Febs Letters 470, 244-248
- 158. Uhlin, U., Cox, G. B., und Guss, J. M. (1997) Structure 5, 1219-1230
- 159. Van Walraven, H. S., Strotmann, H., Schwarz, O., und Rumberg, B. (1996) FEBS Lett. 379, 309-313
- 160. Velours, J., Paumard, P., Soubannier, V., Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., und Graves, P. V. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 443-456
- 161. Vieira, J. und Messing, J. (1987) Methods Enzymol. 153, 3-11
- 162. Vik, S. B., Long, J. C., Wada, T., und Zhang, D. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1458, 457-466
- 163. Wada, T., Long, J. C., Zhang, D., und Vik, S. B. (1999) J. Biol. Chem. 274, 17353-17357
- 164. Wagner, R., Ponse, G., und Strotmann, H. (1986) Eur. J. Biochem. 161, 205-209
- 165. Walker, J. E., Saraste, M., und Gay, N. J. (1984) Biochim. Biophys. Acta 768, 164-200
- 166. Wang, Z. G., Sheluho, D., Gatti, D. L., und Ackerman, S. H. (2000) Embo Journal 19, 1486-1493
- 167. Watts, S. D., Tang, C., und Capaldi, R. A. (1996) J. Biol. Chem. 271, 28341-28347
- 168. Watts, S. D., Zhang, Y., Fillingame, R. H., und Capaldi, R. A. (1995) FEBS Lett. 368, 235-238
- 169. Weber, J., Nadanaciva, S., und Senior, A. E. (2000) Febs Letters 483, 1-5
- 170. Weber, J. und Senior, A. E. (1998) J. Biol. Chem. 273, 33210-33215
- 171. Weber, J., Wilke Mounts, S., Lee, R. S., Grell, E., und Senior, A. E. (1993) J. Biol. Chem. 268, 20126-20133
- 172. Werner-Grüne, S., Gunkel, D., Schumann, J., und Strotmann, H. (1994) Mol. Gen. Genet. 244, 144-150
- 173. Wilkens, S. und Capaldi, R. A. (1998) Biochim. Biophys. Acta 1365, 93-97
- 174. Wilkens, S. und Capaldi, R. A. (1998) J. Biol. Chem. 273, 26645-26651
- 175. Wilkens, S., Dunn, S. D., Chundler, J., Dahlquist, F. W., und Capaldi, R. A. (1997) Nature Structural Biology 4, 198-201
- 176. Wilkens, S., Rodgers, A., Ogilvie, I., und Capaldi, R. A. (1997) Biophysical Chemistry 68, 95-102
- 177. Wright, J. K. und Overath, P. (1984) Eur. J. Biochem. 138, 497-508
- 178. Xu, T., Cundita, C., Amoruso, G., und Papa, S. (1998) Eur. J. Biochem. 252, 155-161
- 179. Xu, T., Cundita, C., und Papa, S. (1996) FEBS Lett. 397, 308-312
- 180. Yamada, H., Moriyama, Y., Maeda, M., und Futai, M. (1996) FEBS Lett. 390, 34-38

- 181. Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., und Yoshida, M. (1998) Cell 93, 1117-1124
- 182. Yoshida, M. und Allison, W. S. (1990) J. Biol. Chem. 265, 2483-2487
- 183. Yoshida, M., Allison, W. S., Esch, F. S., und Futai, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10033-10037
- 184. Zhang, Y. und Fillingame, R. H. (1994) J. Biol. Chem. 269, 5473-5479
- 185. Zhou, Y., Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Hutcheon, M. L., und Cross, R. L. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1275, 96-100
- 186. Zhou, Y. T., Duncan, T. M., und Cross, R. L. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 10583-10587

7 Danksagung

Herrn Professor Strotmann danke ich für ein sehr gutes Dissertationsthema, das immer wieder neues Interesse wecken und neue Möglichkeiten eröffnen konnte, und die viele, jahrelange Geduld. Er mußte hartnäckigste, für mich sehr hilfreiche Diskussion über sich ergehen lassen, bevor diese Arbeit geschrieben war.

Herrn Professor Westhoff danke ich für die Übernahme des Co-Referates und manch klare, prägnante Aussagen, die sich immer als verläßlich erwiesen haben.

All denen, für die ich auch jetzt in diesem Moment wieder zu wenig Zeit habe, die aber immer viel Zeit für mich hatten, schulde ich Dank - sei es im Privaten oder im Wissenschaftlichen.

Ich versichere, daß ich die hier vorgelegte Arbeit selbständig verfaßt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen von mir benutzt worden sind.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen und Symbole

Å	Angström (= 0,1 nm)
А	Adenin (bei Nukleinsäuren), Alanin (bei Aminosäuren)
AA	Acrylamid
ACMA	9-Amino-6-Chloro-2-Methyloxyacridin
AMP-PCP	β , γ -Methylenadenosin 5'-triphosphat
AP ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -di(Adenosin-5')-Pentaphosphat
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase (E. C. 3.6.1.34)
BAA	Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
B. taurus	Bos taurus (Hausrind)
С	Cytosin (bei Nukleinsäuren), Cystein (bei Aminosäuren)
DCCD	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid
ΔG^{\ddagger}	freie Gibb'sche Energie des Übergangszustundes
$\Delta \mathrm{H}^{\ddagger}$	Enthalpie des Übergangszustundes
$\Delta \mathrm{S}^{\ddagger}$	Entropie des Übergangszustundes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
Е	Enzymmenge
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin (bei Nukleinsäuren), Glycin (bei Aminosäuren)
xg	(Viel-)fache der Erdbeschleunigung (1 $xg = 9,81 \text{ m/s}^2$)
h	Planck'sche Konstante (6,626*10 ⁻³⁴ Js)
Hepes	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
k	Boltzmann'sche Konstante (1,380*10 ⁻²³ J/K)
k _{cat}	Wechselzahl
KLH	Trägerprotein zur Immunisierung (keyhole limpet hemocyanin)
min	Minute
NADH	Nikotinamid-dinukleotid (reduziert)

NMR	Nuklear-Magnetische Resonanz
OD	optische Dichte (Extinktion bei 1 cm Lichtweg)
P _i	anorganisches Phosphat
R	allgemeine Gaskonstante (= 8,31441 J/K/mol)
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sekunde
Т	Thymin (bei Nukleinsäuren), Threonin (bei Aminosäuren)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TNP-ADP	2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-Adenosin 5'-diphosphat
Tricin	N-tris-(Hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
unc	Kürzel für die Gene der F ₀ /F ₁ -ATPase bei <i>E. coli</i> (engl.= <i>uncoupling</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
W	Wechselzahl
WT	Wildtyp

8.2 Aminosäuren

Name	Buchstabe	van-der-Waals-	α-Helix-
		Volumen	Stabilisierung
		in Å ³	in kJ/mol
Alanin	А	67	-0,77
Arginin	R	148	-0,68
Asparagin	Ν	96	-0,07
Aspartat	D	91	-0,15
Cystein	С	86	-0,23
Glutamin	Q	114	-0,33
Glutamat	E	109	-0,27
Glycin	G	48	0
Histidin	Н	118	-0,06
Isoleucin	Ι	124	-0,23
Leucin	L	124	-0,62
Lysin	K	135	-0,65
Methionin	М	124	-0,50
Phenylalanin	F	135	-0,41
Prolin	Р	90	+3
Serin	S	73	-0,35
Threonin	Т	93	-0,11
Tryptophan	W	163	-0,45
Tyrosin	Y	141	-0,17
Valin	V	105	-0,14

Tab. 15: Eigenschaften der Aminosäuren

Die Tabelle listet die 20 codogenen Aminosäuren alphabetisch auf. In der zweiten Spalte sind die Buchstaben aufgeführt, die für diese Aminosäuren als Abkürzungen verwendet werden. Das van-der-Waals-Volumen und die Stabilisierungsenergie für den Einbau in eine α -Helix sind ebenfalls angegeben. Dabei stabilisieren Aminosäuren eine α -Helix um so besser, je negativer der Energiewert ist. Glycin wurde als Bezugspunkt willkürlich auf 0 kJ/mol gesetzt. Alle Daten stammen aus (31).

8.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Gen-Arrangement des unc-Operons	4
Abb. 2: Schematischer Aufbau der ATP-Synthase aus E. coli	5
Abb. 3: Untereinheit c aus E. coli	6
Abb. 4: Der hydrophobe Bereich der Untereinheit b aus der ATP-Synthase von E. coli	8
Abb. 5: Struktur der großen Untereinheiten α und β	10
Abb. 6: Der γ'/ε Komplexes aus E. coli	12
Abb. 7: Struktur der Untereinheit ε im γ'/ε -Komplex aus E. coli	14
Abb. 8: "Binding-change"-Mechanismus der ATP-Synthase	15
Abb. 9: Modelle des gekoppelten Protonentransports	18
Abb. 10: Mutageneseschema	25
Abb. 11: Plasmidkarte pCYB1γ	29
Abb. 12: Aufriß eines Fluorimeters nach Strotmann (150)	39
Abb. 13: Silberfärbung von Proteinen	47
Abb. 14: Aufbau eines Western-Blot	51
Abb. 15 : Spezifität der Anti-γ-Antikörper	55
Abb. 16: Fermentationsverlauf	56
Abb. 17: Gereinigte Untereinheit γ	56
Abb. 18: Konservierte Aminosäuren und Mutationen in γ	58
Abb. 19: Wachstum auf Succinatminimalmedium	60
.Abb. 20: ATP-Synthese der Mutanten YE238P und YR242P	60
Abb. 21: ApH-induzierte Fluoreszenzlöschung durch ATP	61
Abb. 22: ATP-Hydrolyse	63
Abb. 23: Arrheniusplot der ATP-Hydrolyse	65
Abb. 24: Verteilung der Hydrolyseaktivität	67
Abb. 25: Immunodetektion membranabgelöster F ₁ -Untereinheiten	68
Abb. 26: Immunodetektion von α und γ auf Membranvesikeln	69
Abb. 27: Immunologische Quantifizierung der Untereinheit α	70
Abb. 28: Entkopplung durch Substrate in Abhängigkeit von ihrer Konzentration	72
Abb. 29: Wirkung von Nukleotiden auf den respiratorischen ΔpH	73
Abb. 30: Aufbau eines ΔpH bei Anwesenheit eines K^+ -Potential	75
Abb. 31: Ausrichtung C-terminaler Reste in der œ-Helix	76
Abb. 32: Expressionsnachweis der Untereinheit γin den C-terminalen Mutanten	77
Abb. 33: ATP-Hydrolyse	78

Abb. 34: Expressionsnachweis der Untereinheit γin den N-terminalen Mutanten	
Abb. 35: Kontakt zwischen γ und β	84
Abb. 36: Effekte des Prolineinbaus in die C-terminale Helix	85
Abb. 37: Untereinheit γaus E. coli und B. taurus	87
Abb. 38: Lage des Restes $\gamma V13$	88
Abb. 39: Hemmung der ATP-Hydrolyse in den Mutanten YE238P und YR242P	93
Abb. 40: Modell des vorgeschlagenen Ventilmechanismus	98
Abb. 41: Strukturelle Grundlagen der Mutagenese	101

8.4 Verzeichnis der Tabellen

[ab. 1: Basensequenz der eingesetzten Oligonukleotide.	
Tab. 2 : Programm der ersten PCR	24
Tab. 3: Programm der zweiten PCR	27
Tab. 4: Genotypen der verwendeten Stämme	31
Tab. 5: Extinktionskoeffizienten und Verunreinigungen	36
Tab. 6: Sequenz künstlicher Oligopeptide	48
Tab. 7: Mutationen der Untereinheit γ	57
Tab. 8: Protonengradient und NADH-Oxidation	62
Tab. 9: Hemmung der ATP-Hydrolyse	64
Tab. 10: Kontrollmessungen zur Ermittlung von v _{max}	65
Tab. 11: Aktivierungsenergie	66
Tab. 12: Immunologische Quantifizierung von F1-Untereinheiten	71
Tab. 13: Funktionelle Charakterisierung der Mutanten in der C-terminalen Helix von γ	77
Tab. 14: Physiologische Charakterisierung der N-terminalen Mutanten.	81
Tab. 15: Eigenschaften der Aminosäuren	115