

Struktur und Regulation
der F_1F_0 ATP Synthase aus
Spinat Chloroplasten

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Mariana Grieben
aus Bonn

November 2011

Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Georg Groth

Koreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2012

solve et coagula

Paracelsus

Meiner Familie

Abstract

The CF₁CF₀ ATP synthase from *Spinacia oleracea* belongs to the F-Type ATPases and catalyses the formation of ATP from ADP and inorganic phosphate powered by a transmembrane proton electrochemical gradient. The enzyme is composed by the subunits $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon c_{14}abb'$ and can be divided into two subcomplexes: the soluble CF₁ and the membrane-embedded CF₀. The CF₁ subcomplex synthesises ATP whereas protons are translocated at the c/a interface of the CF₀ in the direction of the gradient. The exact mechanism of the proton translocation is still to be clarified. The energy gained from the translocation of protons leads to the rotation of the c₁₄ $\gamma\epsilon$ complex while the peripheral stator abb' δ prevents the ($\alpha\beta$)₃ hexamer from following the movement. The γ subunit interacts differently with the three catalytic active β subunits endowing them with different nucleotide affinities. The three β subunits behave cooperative to each other and are at any time in different stages of catalysis.

The hydrolysis of ATP is prevented in chloroplasts by the regulation of the CF₁- γ subunit. When the transmembrane proton gradient, created during photosynthesis, collapses in the dark, thioredoxin, an oxidoreductase, inactivates the enzyme by oxidizing two cysteins located in the CF₁- γ subunit. This inactivation can be reversed.

The ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* is similar to the ATPase from chloroplasts. Both organisms carry out photosynthesis. The major difference is probably the fact that there is no regulation of the CF₁- γ subunit by thioredoxin in *T. elongatus*.

Crystallization trials were done with the CF₁CF₀ ATP synthase purified from *Spinacia oleracea*. Attempts were made to improve the diffraction quality of the c₁₄-rotor ring crystals (Vollmar et al, 2009) and to crystallize the intact ATP synthase containing all subunits. These efforts gave rise to a $\gamma\epsilon c_x a$ complex that diffracted to 2 Å.

To study the redox regulation of the chloroplastic CF₁- γ subunit and the conformational changes involved in this regulation a CF₁ γ -thioredoxin_{E. coli} fusion protein was heterologously overexpressed in *E. coli* and purified. Crystallization trials were made with the oxidized and the reduced state. Crystals of the oxidized state were obtained, which however did not diffract roentgen radiation. The reduced state could not be crystallized due to the instability of the monomeric fusion protein.

The F₁ ATP synthase from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* is not controlled by thioredoxin but it is possible to lend a redox sensitivity to the thermophilic F₁- γ by insertion of the regulatory amino acid sequence from the chloroplast γ subunit. Crystallization trials

were made with the oxidized and the reduced chimeric F_1 ATP synthase ($F_1\alpha_3\beta_3\gamma_{\text{redox}}\epsilon$). Additionally the same crystallization trials were made with the wild type F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$). All three protein complexes could be crystallized with the same crystallization condition but the crystal morphology was inappropriate for X-ray experiments.

Zusammenfassung

Die chloroplastidäre CF_1CF_0 ATP Synthase aus *Spinacia oleracea* gehört dem F-Typ der ATPasen an und katalysiert die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat, angetrieben von einem transmembranen elektrochemischen Protonengradienten. Das Enzym besteht aus den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon c_{14}abb'$ und lässt sich in zwei Subkomplexe einteilen: den wasserlöslichen CF_1 und den membranlokalisierten CF_0 . Während im CF_1 ATP synthetisiert wird, werden an der a/c Kontaktfläche des CF_0 Protonen entlang des herrschenden Gradienten transportiert. Der genaue Mechanismus der Protonentranslokation ist noch unbekannt. Die bei der Protonentranslokation gewonnene Energie führt zur Rotation des $c_{14}\gamma\epsilon$ Komplexes, wobei der periphere Stator $abb'\delta$ verhindert, dass das $(\alpha\beta)_3$ Hexamer der Bewegung folgt. Die γ Untereinheit interagiert unterschiedlich mit den drei katalytisch aktiven β Untereinheiten, was zu einer Asymmetrie dieser führt. Die drei β Untereinheiten verhalten sich kooperativ zueinander und befinden sich jederzeit in unterschiedlichen Stadien der Katalyse.

Die Hydrolyse von ATP wird in Chloroplasten durch eine Regulation durch die Oxidoreduktase Thioredoxin verhindert. Wenn der transmembrane Protonengradient, der während der Photosynthese entsteht, im Dunkeln zusammenbricht, oxidiert Thioredoxin zwei Cysteinreste in der CF_1 - γ Untereinheit, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Dieser Prozess ist reversibel.

Die ATP Synthase aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* ähnelt in ihrem Aufbau der ATP Synthase aus Chloroplasten, mit dem Unterschied, dass, obwohl auch Cyanobakterien Photosynthese betreiben, eine Regulation der F_1 - γ Untereinheit über Thioredoxin nicht stattfindet.

Mit der nativ gereinigten chloroplastidären CF_1CF_0 ATP Synthase aus *Spinacia oleracea* wurden Kristallisationsversuche unternommen. Es wurden Versuche unternommen die Qualität der c_{14} -Rotorring Kristalle (Vollmar et al, 2009) zu verbessern und die intakte ATP Synthase mit allen Untereinheiten zu kristallisieren, welche zum Wachstum von Kristallen eines $\gamma\epsilon c_x\alpha$ Komplexes führten, die bis 2 Å streuten.

Mit der Absicht die Regulation und die damit verbundenen Konformationsänderungen der chloroplastidären CF_1 - γ Untereinheit zu verstehen, wurde ein $CF_1\gamma$ -Thioredoxin_{E. coli} Fusionsprotein heterolog im Expressionswirt *E. coli* exprimiert und aus dem bakteriellen Expressionssystem gereinigt. Kristallisationsansätze wurden sowohl mit dem oxidierten, als auch mit dem reduzierten Zustand durchgeführt. Vom oxidierten Zustand sind Kristalle gewachsen, die jedoch keine Beugung von Röntgenstrahlung zeigten. Der reduzierte Zustand hingegen konnte aufgrund der Instabilität des monomeren Fusionsproteins nicht kristallisiert werden.

Die F_1 ATP Synthase aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* wird zwar nicht über Thioredoxin reguliert, jedoch kann man ihr eine Redoxsensitivität durch Insertion der regulatorischen Aminosäuresequenz aus Chloroplasten in die F_1 - γ Untereinheit verleihen. Kristallisationsansätze wurden mit der oxidierten und mit der reduzierten chimären F_1 ATP Synthase ($\alpha_3\beta_3\gamma_{\text{redox}}\epsilon$) durchgeführt und parallel auch mit dem Wildtyp F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$). Alle drei Zustände konnten unter gleichen Bedingungen kristallisiert werden, jedoch eigneten sich die Proteinkristalle aufgrund ihrer Morphologie nicht für Röntgenbeugungsexperimente.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Zusammenfassung.....	3
Abkürzungen	9
Aminosäuren	13
1 Einleitung.....	14
1.1 F ₁ F ₀ ATP Synthasen	14
1.2 Photosynthese in höheren Pflanzen	15
1.3 Photosynthese im Cyanobakterium <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	17
1.4 Struktur der CF ₁ CF ₀ ATP Synthase aus Chloroplasten.....	17
1.4.1 Struktur des CF ₁	18
1.4.2 Struktur des CF ₀	22
1.5 Reaktionsmechanismen im CF ₁ und CF ₀	25
1.5.1 Der katalytische Mechanismus im CF ₁	25
1.5.2 Energetik und Mechanismus des CF ₀	28
1.6 Regulation der CF ₁ CF ₀ ATP Synthase.....	32
2 Zielsetzung.....	35
3 Material und Methoden	36
3.1 Materialien	36
3.1.1 Biologisches Material	36
3.1.2 Geräte und Hilfsmittel.....	36
3.1.3 Säulen und Säulenmaterial.....	37
3.1.4 Chemikalien.....	38
3.1.5 Antibiotika-Stammlösungen.....	38
3.1.6 Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	38
3.1.7 Vektoren.....	39
3.1.8 Vektorkarten.....	40
3.1.9 Bakterienstämme	41
3.1.10 Verbrauchsmaterialien	41
3.1.11 Kommerzielle Kits.....	42
3.1.12 Proteingrößenstandard	42
3.1.13 Materialien für die Kristallisation.....	42
3.2 Reinigung und Kristallisation der CF ₁ CF ₀ ATP Synthase	44

3.2.1	Spinaternte	44
3.2.2	Isolation der Thylakoidmembranen	44
3.2.3	Solubilisierung von CF_1CF_0	45
3.2.4	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	46
3.2.5	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	46
3.2.6	Reinigung von CF_1CF_0 durch Anionenaustauschchromatographie.....	47
3.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
3.2.8	Silberfärbung von Acrylamidgelen	49
3.2.9	Coomassiefärbung von Acrylamidgelen	50
3.2.10	Pufferwechsel und Proteinkonzentrierung	51
3.2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	51
3.3	Reinigung von Lamellen-Lipiden aus Spinatchloroplasten.....	52
3.3.1	Reinigung von intakten Chloroplasten	52
3.3.2	Entfernung der äußeren und inneren Chloroplastenmembran	52
3.3.3	Lipidisolierung nach der Methode von Bligh & Dyer (1959)	53
3.3.4	Dünnschicht Chromatographie zur Trennung und qualitativen Bestimmung der Lamellen Lipide.....	53
3.3.5	Bestimmung der an der CF_1CF_0 ATP synthase gebundenen Lipide.....	54
3.4	Kristallisationsversuche mit der CF_1CF_0 ATP Synthase aus Spinat Chloroplasten.....	54
3.4.1	Kristallisation des C_{14} -Rotorringes	54
3.4.2	Kristallisationsversuche mit der intakten ATP Synthase	56
3.5	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Reinigung des $CF_1\gamma$ -Thioredoxin _{<i>E. coli</i>} Fusionsproteins und der F_1 ATPase aus <i>T. elongatus</i>	61
3.5.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	61
3.5.2	Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock.....	62
3.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA	62
3.5.4	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	62
3.5.5	Heterologe Expression des $CF_1\gamma$ -Thioredoxin _{<i>E. coli</i>} Fusionsproteins und der F_1 ATPase aus <i>T. elongatus</i>	62
3.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
3.5.7	Silberfärbung von Acrylamidgelen	63
3.5.8	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	63
3.6	Reinigung des $CF_1\gamma$ -Thioredoxin _{<i>E. coli</i>} Fusionsproteins.....	64
3.6.1	Zellaufschluss.....	64
3.6.2	Reinigung über Metallchelatchromatographie	64
3.6.3	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	65

3.6.4	Präparative Gelfiltration.....	65
3.6.5	Proteinkonzentrierung	66
3.6.6	Analytische Gelfiltration.....	66
3.6.7	Kristallisationsansätze bei 19 °C.....	67
3.6.8	Optimierung der Kristallisationsbedingung.....	67
3.6.9	Kristallisationsansätze bei 4 °C.....	68
3.7	Reinigung der F ₁ ATP Synthase aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	68
3.7.1	Zellaufschluss und Hitzeaktivierung.....	68
3.7.2	Reinigung über Metallchelatchromatographie	68
3.7.3	Nukleotidbeladung des Komplexes.....	69
3.7.4	Anionenaustauschchromatographie.....	69
3.7.5	Proteinkonzentration	70
3.7.6	Analytische Gelfiltration.....	70
3.7.7	Kristallisationsansätze	71
4	Die Proteinkristallographie.....	73
4.1	Methoden der Proteinkristallographie.....	73
4.1.1	Batch Methode.....	74
4.1.2	Dampfdiffusionsmethode.....	74
4.1.3	Dialyse	75
4.1.4	Kristallisation von löslichen Proteinen	75
4.1.5	Kristallisation von Membranproteinen	75
4.1.6	Interpretation des Kristallisationstropfen.....	77
4.1.7	Kommerziell erhältliche Kristallisationskits.....	78
4.1.8	Analyse von Proteinkristallen.....	79
4.1.9	Theorie der Kristallographie.....	80
4.1.10	Messung von Datensätzen und Datenprozessierung.....	83
5	Ergebnisse	85
5.1	Reinigung der CF ₁ CF ₀ ATPase aus <i>Spinacia oleracea</i>	85
5.2	Reinigung von Lamellen-Lipiden aus Spinatchloroplasten.....	85
5.3	Kristallisation der CF ₁ CF ₀ ATPase aus <i>Spinacia oleracea</i>	88
5.3.1	Optimierungsversuche der c ₁₄ -Rotorring Kristalle	88
5.3.2	Kristallisationsversuche mit der intakten CF ₁ CF ₀ ATPase	93
5.4	Expression, Reinigung und Kristallisation des CF ₁ γ-Thioredoxin _{E.coli} Fusionsproteins	107
5.4.1	Heterologe Expression und Reinigung des CF ₁ γ-Thioredoxin _{E.coli} Fusionsproteins.....	107
5.4.2	Analytisch Gelfiltration des CF ₁ γ _{ox} -Thioredoxin _{E. coli ox} Fusionsproteins	108

5.4.3	Kristallisation des CF ₁ γ-Thioredoxin _{E.coli} Fusionsproteins	109
5.4.4	Optimierungsversuche der CF ₁ γ _{ox} -Thioredoxin _{E.coli ox} Kristalle	110
5.4.5	Diffractionsmessung der CF ₁ γ _{ox} -Thioredoxin _{E.coli ox} Kristalle.....	111
5.5	Expression, Reinigung und Kristallisation der F ₁ ATPase aus <i>T. elongatus</i>	113
5.5.1	Expression und Reinigung der F ₁ ATPase aus <i>T. elongatus</i>	113
5.5.2	Kristallisation der F ₁ ATPase aus <i>T. elongatus</i>	118
6	Diskussion.....	121
6.1	Reinigung und Kristallisation der CF ₁ CF _o ATP aus <i>Spinacia oleracea</i>	121
6.1.1	Kristallisationsversuche mit der intakten CF ₁ CF _o ATP Synthase	121
6.1.2	Kristallisation der CF ₁ CF _o ATPase solubilisiert in LPD-12	122
6.1.3	Reinigung von Lamellenlipiden und Analyse der an der ATPase spezifisch gebundene Lipide.....	125
6.1.4	Kristallisationsversuche in der Lipidic sponge phase	126
6.1.5	Kristallisationsversuche unter dem Zusatz von Lipiden	128
6.1.6	Optimierungsversuche der c ₁₄ -Rotorring Kristalle	129
6.2	Reinigung und Kristallisation des CF ₁ γ-Thioredoxin _{E.coli} Fusionsproteins und der chimären F ₁ ATPase aus <i>T. elongatus</i>	132
6.2.1	Reinigung und Kristallisation des CF ₁ γ-Thioredoxin _{E.coli} Fusionsproteins	132
6.2.2	Reinigung und Kristallisation der F ₁ ATPase aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	134
7	Anhang	137
8	Literaturverzeichnis.....	152
9	Danksagung	189
10	Erklärung.....	190

Abkürzungen

Å	Angström
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AFM	Atomic Force Microscopy
AMPPNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat
AS	Aminosäure(n)
ASU	Asymmetrische Untereinheit
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	ATP Synthase
β_{DP}	katalytische β Untereinheit im DP-Zustand
β_{TP}	katalytische β Untereinheit im TP-Zustand
BSA	Rinderserumalbumin
BTP	Bis-Tris-Propan
CF ₁	F ₁ -Subkomplex der chloroplastidären ATPase
CF _o	F _o -Subkomplex der chloroplastidären ATPase
CF ₁ F _o	Chloroplasten-ATPase
CMC	Kritische Mizellenkonzentration
c _x -Ring	Proteolipidring mit nicht definierter Anzahl an c Monomeren
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DGDG	Digalaktosyl-Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Enzymklasse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF ₁	<i>Escherichia coli</i> F ₁ Subkomplex der ATPase
EF ₀	<i>Escherichia coli</i> F ₀ Subkomplex der ATPase
ESI-TOF	electrospray ionisation/time-of-flight mass spectrometry
FID	Free interface diffusion
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His-tag	Histidinanker
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
K _m	Michaelis-Menten Konstante
L	Loose-Zustand
LHC	Lichtsammelkomplex
M, mM	Molar (mol/L), Millimolar
mA	Milliampère
MGDG	Monogalaktosyl-Diacylglycerol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MF ₁	Mitochondrialer F ₁ Subkomplex
MF ₀	Mitochondrialer F ₀ Subkomplex
min	Minute
MPa	Mega Pascal
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
MWCO	molecular weight cut off
NADH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaPPi	Natriumpyrophosphat
ncs	Nicht Kristallographische Symmetrie

Ni-NTA	Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O	Open-Zustand
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysis
PC	Phosphatidylcholin
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglycol
pg	Pikogramm
P _i	Anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PPO	Pentaerythritol-propoxylat
PS	Photosystem
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
T	Tight-Zustand
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamid
TF ₁	Bacillus PS3 F ₁ Subkomplex der ATPase
TF ₀	Bacillus PS3 F ₀ Subkomplex der ATPase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	Enzymeinheit (μmol Substrat/min)
UE	Untereinheit
μg, g	Mikrogramm, Gramm
μl, ml, L	Mikroliter, Milliliter, Liter
ü.N.	über Nacht

UpM	Umdrehungen pro Minute
V, mV	Volt, Millivolt
(v/v)	Volumen zu Volumen
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht zu Volumen
x g	Vielfaches der Erdanziehungskraft

Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glyzin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

1.1 F₁F₀ ATP Synthasen

F₁F₀ ATP Synthasen gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3.6.3.14) und sind sowohl zur Hydrolyse, als auch zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) fähig. ATP ist ein Nukleotid bestehend aus einem Adeninrest, dem Zucker Ribose und drei Phosphaten und dient als universeller Energieträger in lebenden Organismen. Das erste Phosphat ist über eine Esterbindung mit der Ribose verknüpft, während die beiden darauf folgenden Phosphate über Anhydridbindungen verbunden sind. Die Energie ist in den Phosphorsäureanhydridbindungen gespeichert und wird erst durch Spaltung dieser freigesetzt. Durch die Abspaltung eines Phosphates entsteht das Adenosindiphosphat (ADP) bzw. das Adenosinmonophosphat (AMP) wenn zwei Phosphate abgespalten werden.

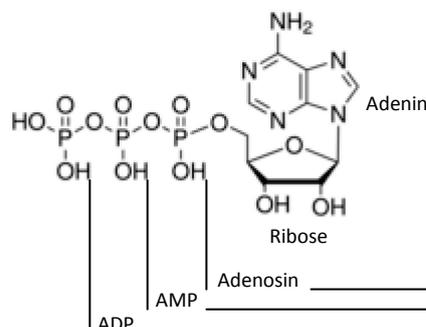


Abbildung 1.1: Struktur des Nukleotides Adenosintriphosphat.

Das ATP, das für alle energieverbrauchenden Prozesse benötigt wird: die Muskelkontraktion, Synthese von Biomolekülen und Stofftransporte über Biomembranen wird durch zwei verschiedene Wege, die Photophosphorylierung und die Elektronentransportphosphorylierung (auch Atmungskette genannt), gewonnen. Die Photophosphorylierung findet in den Thylakoidmembranen von pflanzlichen Chloroplasten und Cyanobakterien statt, während die Elektronentransportphosphorylierung in der inneren Membran von tierischen Mitochondrien und in der Plasmamembran von Bakterien abläuft.

F-Typ ATP Synthasen sind multimere Membranproteinkomplexe, die zur Katalyse des ATP aus ADP und anorganischen Phosphat (P_i) eine Energiezufuhr von 45 kJ/mol benötigen. Für diese Energiegewinnung koppelt das Enzym die Synthese des ATP mit einer energetisch begünstigten Protonentranslokation entlang eines transmembranen Gradienten. In einigen anaerob lebenden Bakterienarten wird statt der Protonen ein Natriumionengradient genutzt.

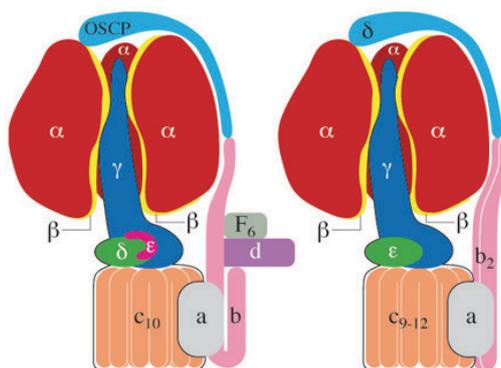


Abbildung 1.2: Modelle der ATP Synthase aus Mitochondrien (links) und *E. coli* (rechts) (aus Stock et al, 2000).

Die F-ATP Synthasen der verschiedenen Organismen unterscheiden sich nur gering in der Komposition ihrer Untereinheiten. Dieses Protein besteht aus zwei mechanisch rotierenden Motoren: dem membranintegrierten F_0 Subkomplex, in dem die Protonentranslokation stattfindet und dem wasserlöslichen F_1 Subkomplex, in dem die ATP Synthese bzw. Hydrolyse stattfindet. Die beiden Prozesse werden über die mechanische Rotation gekoppelt.

1.2 Photosynthese in höheren Pflanzen

Photosynthese findet in den Chloroplasten höherer Pflanzen, Algen und einigen Bakterienarten statt. Bei diesem biochemischen Prozess wird aus dem Kohlendioxid der Luft über den Calvin Zyklus Glucose gebildet. Die nötige Energie (in Form von ATP) und Reduktionsäquivalente (NADPH) bezieht die Pflanze aus der Photophosphorylierung, deren Vorteil gegenüber der Atmungskette, die in den Mitochondrien stattfindet, darin liegt, dass sie für ihre Biosynthesen die Sonnenstrahlung als Energiequelle nutzt. Die Leistungsfähigkeit der Photosynthese wird zusätzlich dadurch gesteigert, dass sich die Thylakoidmembran zu sogenannten Grana stapelt, wodurch sich die Anzahl an Thylakoidmembranen in einem gegebenen Volumen erhöht. Die Lichtabsorption findet in den Lichtsammelkomplexen (LHCII und LHCI) statt, in denen sich Chlorophylle befinden, die aufgrund von alternierenden Einfach- und Doppelbindungen exzellente Photorezeptoren des Sonnenlichtes darstellen.

An der Photophosphorylierung in höheren Pflanzen sind vier Membranproteinkomplexe beteiligt: das Photosystem II, der Cytochrom-b/f-Komplex, das Photosystem I und die CF_1CF_0 ATP Synthase. Während der Cytochrom-b/f-Komplex durchwegs über die gesamte Thylakoidmembran verteilt ist, ist das Photosystem II hauptsächlich in den gestapelten Regionen lokalisiert. Das Photosystem I und die ATP Synthase hingegen sind nur in den nicht gestapelten Bereichen zu finden. Plastochinon und Plastocyanin sind die Elektronen-Carrier, die die Elektronen von einem Komplex

zum nächsten transportieren. Abbildung 1.3 zeigt den schematischen Ablauf der Photophosphorylierung, ungeachtet der räumlichen Lokalisation der Proteinkomplexe. Getrieben durch das Licht, werden im ersten Schritt Elektronen durch die Spaltung (Photolyse) von Wassermolekülen gewonnen, wobei freie Wasserstoffionen im geschlossenen Thylakoidlumen entstehen. Zusätzlich transportieren der Cytochrom-b/f-Komplex und das Photosystem I Protonen aus dem Stroma in das Lumen. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung eines elektrochemischen Protonengradienten zwischen dem Lumen und dem Stroma. Der Thylakoidinnenraum hat einen pH-Wert von ungefähr 4. Der Protonengradient liegt etwa bei 3,5 pH-Einheiten. Dies entspricht einer protonenmotorischen Kraft von 0,2 V.

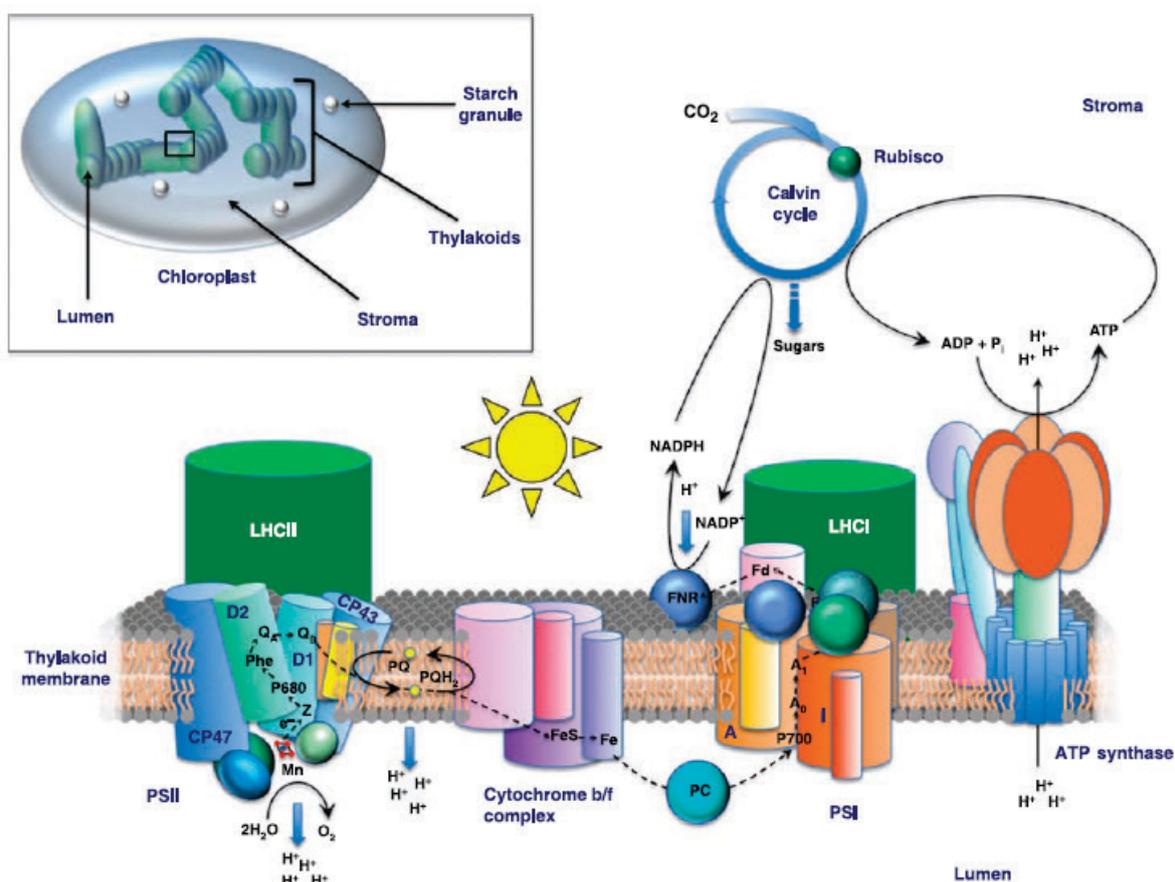


Abbildung 1.3: Photophosphorylierung in der Thylakoidmembran pflanzlicher Chloroplasten.

Die Lichtabsorption geschieht an den Photosystemen II (PSII) und I (PSI), die mit Lichtsammelkomplexen (LHCII und LHCI) assoziiert sind. Die Lichtenergie führt zur Anregung von Elektronen und folglich wird eine Elektronentransportkette in Gang gesetzt. Elektronen, die durch die Photolyse von Wasser gewonnen werden, werden über eine Reihe von Redoxkomponenten (PSII, PSI, Plastochinon PQ, Cytochrom-b/f-Komplex, Plastocyanin, Ferredoxin-NADPH Oxidoreduktase (FNR)) auf NADPH übertragen. Der transmembrane Elektronentransport generiert einen Gradienten, der als Antriebskraft von der ATP Synthase zur Synthese von ATP genutzt wird. Das bei der Photophosphorylierung produzierte ATP und NADPH wird im Stroma vom Calvin Zyklus genutzt um aus atmosphärischem Kohlendioxid Glukose herzustellen. Links oben ist der Aufbau eines Chloroplasts zu sehen (Näheres in Jansson et al, 2010).

Die freiwerdende Energie bei der Translokation von Protonen vom Thylakoidlumen durch den F_0 Subkomplex in das Stroma wird vom löslichen F_1 Subkomplex auf der Stromaseite genutzt, um

das ATP zu synthetisieren. Die Hypothese, dass die ATP Synthase von einem pH-Gradienten angetrieben wird (chemiosmotische Theorie) wurde erstmals von Peter Mitchell im Jahre 1960 erstellt.

1.3 Photosynthese im Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus*

Cyanobakterien wie *Thermosynechococcus elongatus* sind zur oxygenen Photosynthese fähig und besiedeln heiße Quellen. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 55 °C. Phylogenetische Analysen mittels 16S rRNA-Sequenzen lassen darauf schließen, dass sich dieser Organismus noch nah am Ursprung des Stammbaumes der Cyanobakterien befindet (Nakamura et al, 2002).

T. elongatus dient schon lange als Modellorganismus zur Studie der Photosynthese. Die Photosysteme I (Jordan et al, 2001) und II (Loll et al, 2005), die in der Thylakoidmembran eingebettet sind konnten beide kristallisiert werden und die Strukturen wurden mit Auflösungen von 2,5 Å bzw. 3 Å berechnet.

Cyanobakterien spielen eine große Rolle in der Endosymbiontentheorie, weil sie als Ursprungorganismen der Chloroplasten gesehen werden.

Die F_1F_0 ATP Synthase von *T. elongatus* konnte bisher noch nicht kristallisiert werden. Das Interesse an dieser ATPase liegt hauptsächlich an ihrem thermophilen Charakter. Vom Aufbau her ist sie der ATP Synthase aus Chloroplasten sehr ähnlich da sie, aus stöchiometrischer Sicht betrachtet, aus den gleichen Untereinheiten zusammengesetzt ist. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch darin, dass, im Gegensatz zur chloroplastidären ATP Synthase, keine Redox-Regulierung der γ Untereinheit stattfindet.

1.4 Struktur der CF_1CF_0 ATP Synthase aus Chloroplasten

Die CF_1CF_0 ATP Synthase (C steht für Chloroplast und F für Faktor) ist ein Enzym, das aus zwei mechanisch rotierenden Motoren aufgebaut ist, dem ATP getriebene CF_1 Motor und dem Protonen getriebene CF_0 Motor (Yoshida et al, 2001) und das das elektrochemische Potential des Protonengradienten in chemische Energie (Synthese von ATP) via mechanische Rotation konvertiert. Im Falle der Hydrolyse verläuft der Prozess umgekehrt: Die chemische Energie der ATP Hydrolyse wird für die mechanische Rotation und folglich zum Protonenpumpen entgegen des Gradienten eingesetzt. Der wasserlösliche CF_1 besteht aus den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 410 kDa und der in der Membran lokalisierte F_0 (Faktor Oligomycin), bestehend aus den Untereinheiten $c_{14}abb'$, ist mit etwa 180 kDa deutlich kleiner. Die Untereinheiten

γ , ϵ und c_{14} rotieren und können deshalb als Rotoren bezeichnet werden, während die Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\delta ab\delta'$ nicht rotieren und als Stator bezeichnet werden.

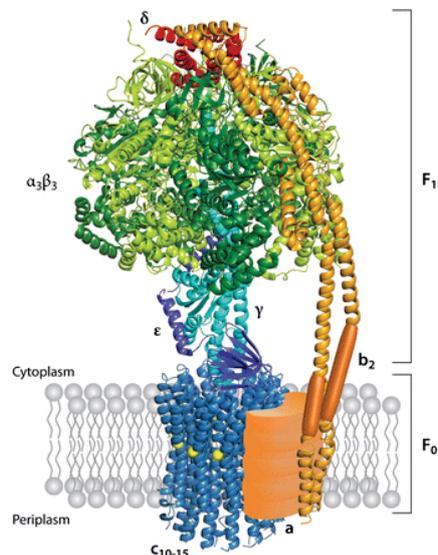


Abbildung 1.4: Struktur einer F_1F_0 ATP Synthase wie sie in Chloroplasten zu finden ist.

Die Strukturen der einzelnen Untereinheiten wurden aus der RCSB Proteindatenbank entnommen und aufgrund biochemischer Daten assembliert. Die Strukturen stammen von *Ilyobacter tartaricus* (1CYYE, c Ring), *Escherichia coli* (1JNV, F_1), *Escherichia coli* (2A7U, δ UE), Rinderherzmitochondrien (2CLY, periphere Stator) und der membranintegrierte Teil der b UE stammt ebenfalls aus *Escherichia coli* (1B9U). Von der Untereinheit a und der Gelenkregion von b existieren bislang keine hochauflösenden Strukturen. Diese Illustration wurde mit PyMOL (deLano Scientific LLC) erstellt (aus Ballmoos et al, 2008).

Die chloroplastidäre ATP Synthase ist bei niedrigen Phosphatkonzentrationen in Stroma zur Dimerisierung, über den CF_1 , fähig (Rexroth et al, 2004).

1.4.1 Struktur des CF_1

Der CF_1 Subkomplex ist aus den fünf Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ zusammengesetzt, die nach abnehmendem Molekulargewicht geordnet sind. Die Untereinheiten α und β sind hexagonal alternierend angeordnet und umschließen eine *coiled coil* Struktur bestehend aus den zwei C- und N-terminalen α -Helices in der γ Untereinheit.

Aufschluss über die Struktur des F_1 erhielt man erstmals durch die Röntgenkristallographie. Die Kristallisation und Berechnung der Struktur der MF_1 -ATPase, bei einer Auflösung von 2,9 Å, gelang erstmals John Walker im Jahr 1994.

Inzwischen konnten auch die Strukturen von verschiedenen anderen F_1 ATP Synthasen bestimmt werden, welche in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 1.1: Überblick über die bisher kristallisierten F₁ Subkomplexe.

F ₁ ATP Synthase	Ursprungsorganismus	Auflösung	PDBID
CF ₁	<i>Spinacia oleracea</i>	3,2 Å	1FX0
EF ₁	<i>Escherichia coli</i>	3,26 Å	3OAA
TF ₁	<i>Bacillus sp.</i>	3,06 Å	2QE7
MF ₁	<i>Bos taurus</i>	1,9 Å	2JDI
MF ₁	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,8 Å	2HLD
MF ₁	<i>Rattus norvegicus</i>	2,8 Å	1MAB

Der CF₁ Subkomplex ($\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$) aus Spinat Chloroplasten wurde bereits kristallisiert (Groth et al, 2001) und die Struktur bei einer Auflösung von 3,2 Å bestimmt.

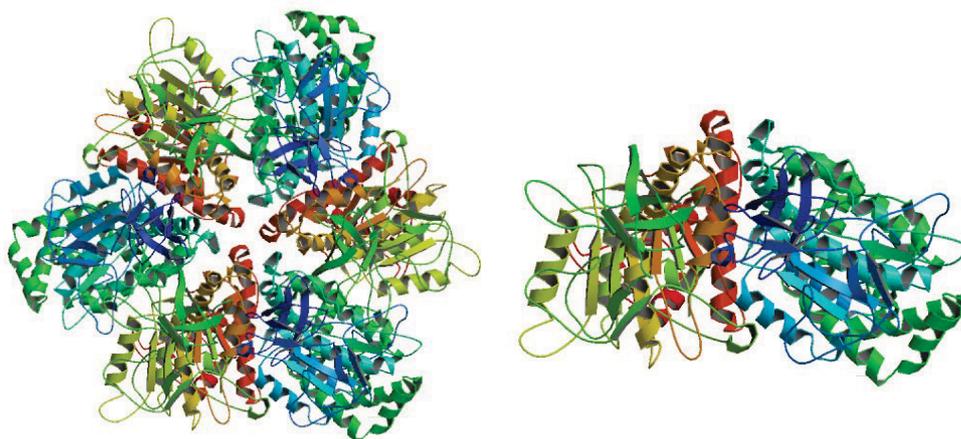


Abbildung 1.5: Struktur des chloroplastidären $\alpha_3\beta_3$ Hexamers aus Spinat bei 3.2 Å.

Links ist das $\alpha_3\beta_3$ Hexamer zu sehen und rechts ist die Asymmetrische Untereinheit der Kristallstruktur dargestellt (Groth et al, 2001).

Aufgrund der hohen Flexibilität der Untereinheiten γ und ϵ und der Raumgruppe (H 3 2) der Kristalle konnten die Strukturen dieser beiden Untereinheiten nicht mittels Molekularen Ersatz berechnet werden. In der Asymmetrischen Untereinheit der Kristalle befindet sich nur eine β und eine α Untereinheit, weshalb man davon ausgeht, dass alle drei α bzw. β Untereinheiten die gleiche Konformation haben. Die Kristalle wurden in Anwesenheit von Nukleotiden im Kristallisationsmedium, jedoch in Abwesenheit von Magnesium erhalten, welches essentiell für die Nukleotidbindung ist (Girault et al, 1982 und Digel et al, 1998). Die beiden Untereinheiten in der ASU befinden sich im geschlossenen Zustand, zeigen aber keine erkennbaren gebundenen Nukleotide, weshalb diese Struktur wahrscheinlich den latenten Zustand der chloroplastidären ATPase darstellt.

Dieser latente Zustand tritt nur bei den ATP Synthasen der Chloroplasten und Cyanobakterien auf. Die α und β Untereinheiten weisen hier untereinander, wie auch bei den ATP Synthasen anderer Organismen, eine sehr ähnliche Struktur auf, was auch schon aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie zu erwarten war.

Die α und β Untereinheiten lassen sich in drei unterschiedliche Domänen unterteilen: einer N-terminalen β -Faltblatt Domäne, einer zentralen β -Faltblatt Domäne mit assoziierten α -Helices, die die Nukleotidbindestellen enthält und einem C-terminalen α -helikalen Bündel. Katalytisch wirkende Aminosäurereste und regulatorische Sequenzen im CF_1 wurden durch *Photo-labeling* und Fluoreszenz Resonanz Energietransfer identifiziert (McCarty et al, 1987). Die Struktur zeigt eine potentielle Tentoxin Bindestelle an der α/β Kontaktfläche in der Nähe von βAsp^{83} . Die Aminosäuresequenz zwischen βGly^{56} und Asn^{60} in der N-terminalen β -Faltblatt Domäne, eine Salzbrücke zwischen βAsp^{83} und αArg^{297} sowie zusätzliche Kontakte in der β -Faltblatt Domäne erhöhen wahrscheinlich die thermische Stabilität des Komplexes (Groth et al, 2001).

Weil es keine Struktur des chloroplastidären F_1 Subkomplexes mit differenzierten β Untereinheiten gibt, werden im Folgenden die Konformationen der Untereinheiten β_E , β_{DP} und β_{TP} auf atomarer Ebene, anhand der Struktur der mitochondrialen F_1 ATP Synthase aus Rinderherzen (Abrahams et al, 1994) näher gelegt. Bereits bei einer Auflösung von 2,8 Å ist hier erkennbar, dass sich die drei katalytisch wirksamen β Untereinheiten in ihrer Konformation und in den gebundenen Nukleotiden unterscheiden. Die Struktur unterstützt die Theorie, dass sich die drei β Untereinheiten jederzeit in unterschiedlichen Zuständen des katalytischen Zykluses befinden.

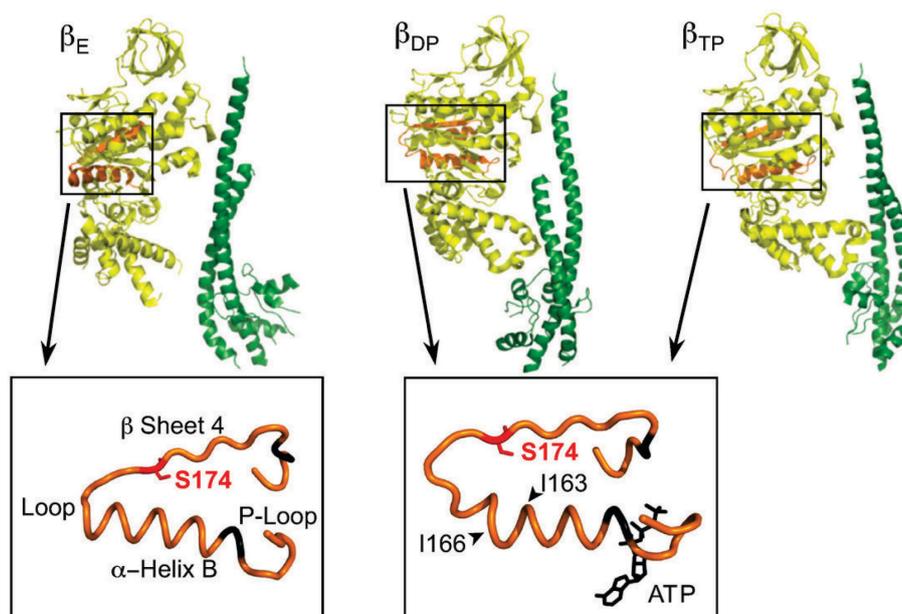


Abbildung 1.6: Struktur der mitochondrialen β und γ Untereinheiten (PDB ID: 2JDI) (Bowler et al, 2007).

Die β Untereinheit ist gelb und die γ Untereinheit ist grün dargestellt. Die katalytisch wirksamen β Untereinheiten nehmen entsprechend ihrer Nukleotidbeladung unterschiedliche Konformationen ein. Die vergrößerte Region (in orange) stellt die Gelenkregion der β Untereinheit (P-Loop/ α -HelixB/Loop/ β -Sheet4, βPhe^{148} - βGly^{186}) und die katalytisch wirksamen

Aminosäurereste (βLys^{155} , βThr^{156} , βGlu^{181} , und βArg^{182}) dar (rote Beschriftung für die mitochondriale ATPase und schwarz beschriftet für die bakterielle ATPase aus *E. coli*) (aus Nakanishi-Matsui et al, 2010).

In der Kristallstruktur bei 2,8 Å nehmen die drei α Untereinheiten nahezu identische Konformationen ein und zeigen gebundenes AMPPNP, ein ATP Analog. β_{TP} zeigt gebundenes AMPPNP, β_{DP} gebundenes ADP und β_{E} zeigt keine gebundenen Nukleotide. Wie in Abbildung 1.6 zu sehen ist, unterscheidet sich die Interaktion der γ Untereinheit mit den drei β Untereinheiten, wobei β_{TP} und β_{DP} geschlossene Konformation einnehmen, während die Interaktion der γ Untereinheit mit β_{E} dergestalt ist, dass die C-terminale Region von β um etwa 30° abwärts bewegt wird, wodurch es zum Öffnen der Bindungstasche kommt.

In der katalytischen Bindungstasche der β Untereinheiten spielen die Aminosäurereste βLys^{155} , βThr^{156} , βGlu^{181} , und βArg^{182} eine wichtige Rolle. Schussfolgernd ist die Konformation der β Untereinheiten von den gebundenen Nukleotiden und von der Orientierung von γ abhängig. Das bedeutet, dass die gebundenen Nukleotide die Orientierung von γ determinieren können und umgekehrt (Yoshida et al, 2001)

Über die Struktur des zentralen Rotors aus Spinat Chloroplasten ist bisher nur wenig bekannt, da es von diesen Untereinheiten noch keine Kristallstruktur gibt. Die Rotation der γ Untereinheit aus dem thermophilen *Bacillus PS3* (TF_1) konnte direkt beobachtet werden, nachdem die γ Untereinheit eines $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplexes mit einem fluoreszierenden Aktinfilament markiert wurde. Zur Immobilisierung des $\alpha_3\beta_3$ Hexamers wurden die β Untereinheiten über His-tags an eine Ni^{2+} -NTA beschichtete Oberfläche fixiert. Durch die Hydrolyse von ATP angetrieben, rotierte das Filament unidirektional, gegen den Uhrzeigersinn (Noji et al, 1997). Die Effizienz mit der das Enzym, die, durch die Hydrolyse von ATP freigewordene Energie in mechanische Rotation umwandelt, ist sehr hoch und lag im Experiment bei etwa 90% (Yasuda et al, 1998). Das gleiche Experiment mit identischen Ergebnissen wurde auch mit den ATP Synthasen aus *E. coli* und Chloroplasten durchgeführt (Noji et al, 1999 und Hisabori et al, 1999). Anstelle des Aktinfilamentes wurden auch schon andere Anhängsel getestet, darunter auch eine Kugel aus Gold (40 nm). Die Hydrolyse von ATP gehorcht einfacher Michaelis-Menten Kinetik und der K_m -Wert lag im Experiment mit den Goldkugeln bei 15 μM (Yasuda et al, 2010).

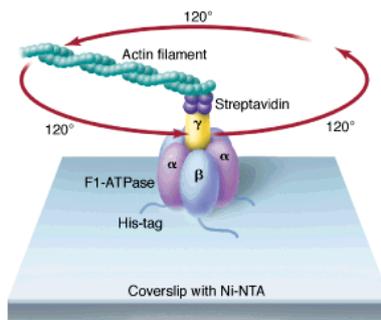


Abbildung 1.7: Verwendetes System zur Visualisierung der Rotation der γ Untereinheit im $\alpha_3\beta_3\gamma$ Subkomplex.

Der His-getaggte F_1 wurde auf der mit Ni^{2+} -NTA beschichteten Oberfläche immobilisiert und ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Aktinfilament wurde über Streptavidin an die γ angebracht. Die Rotation konnte nach Zugabe von ATP unter dem Epifluoreszenzmikroskop beobachtet werden. In Anwesenheit von niedrigen ATP Konzentrationen erfolgte die Rotation in diskreten 120° Schritten (aus Noji et al, 1998).

Dass die ϵ Untereinheit gemeinsam mit der γ Untereinheit rotiert, wurde am thermophilen *Bacillus PS3* (TF_1) bestätigt (Kato-Yamada et al, 1993). Dabei blieb die Richtung der Rotation unverändert.

Während die γ Untereinheit in diskreten 120° Schritten rotiert, rotiert der Proteolipidring in kleineren Schritten, was zur Folge hat, dass γ eine gewisse Flexibilität besitzen muss, um Energie zu speichern (Cherepanov et al, 1999). Ihre hohe Flexibilität lässt sich auch dadurch bestätigen, dass diese Untereinheit in vielen Kristallstrukturen ungeordnet vorliegt.

1.4.2 Struktur des CF_0

Der F_0 Subkomplex setzt sich in den Chloroplasten aus den Untereinheiten a, b, b' und c zusammen. Die 14 c Untereinheiten bilden einen Proteolipidring und die beiden b Untereinheiten sind homolog zueinander (b, b') und stellen zusammen mit den Untereinheiten a und CF_1 - δ den peripheren Stator dar, welcher als Wiederlager dient und verhindert, dass das $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer der Rotation der γ -Untereinheit folgt (Walker et al, 1998).

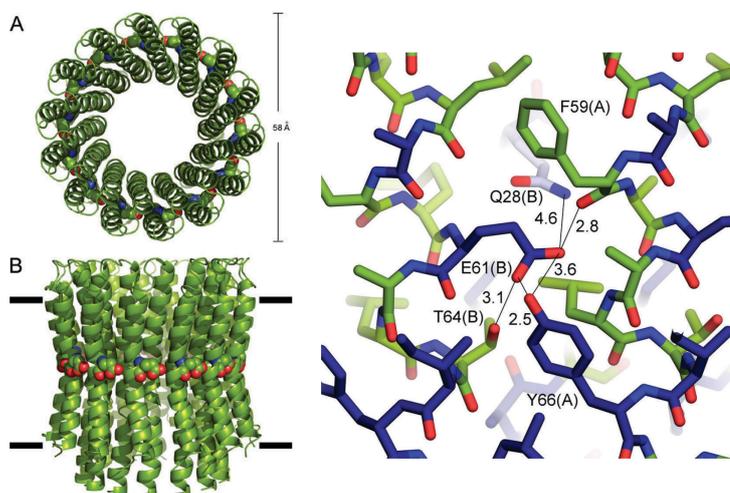
Bis vor kurzem basierte das Wissen über den F_0 Subkomplex hauptsächlich auf Mutagenesestudien, NMR- und *cross-linking* Experimenten. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Proteolipidringe kristallisiert und die Struktur mit der Röntgenkristallographie bei hoher Auflösung bestimmt. Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung vom dem, was bis jetzt erreicht wurde.

Tabelle 1.2: Überblick über die bisher kristallisierten F₀ Subkomplexe.

c-Rotorring	Ursprungsorganismus	Auflösung	PDBID
C ₈ -Rotorring	<i>Bos taurus</i>	3,5 Å	2XND
C ₁₀ -Rotorring	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,01 Å	2XOK
C ₁₁ -Rotorring	<i>Ilyobacter tartaricus</i>	2,35 Å	2WGM
C ₁₃ -Rotorring	<i>Bacillus pseudofirmus</i> of 4	2,5 Å	2X2V
C ₁₄ -Rotorring	<i>Spinacia oleracea</i>	3,8 Å	2W5J
C ₁₅ -Rotorring	<i>Arthrospira platensis</i>	1,84 Å	2XQU

Die erste Kristallstruktur des c-Ringes einer F-Typ ATP Synthase war die der ATPase aus Hefe. In der Struktur des F₁F₀C₁₀ Komplexes (Stock et al, 1999) bei 3.9 Å ist zu sehen, dass die 10 c Untereinheiten einen Ring bilden. Der c Protomer besteht aus zwei transmembranen Helices, die auf der cytoplasmatischen Seite über einen hydrophilen Loop verbunden sind. Die Untereinheiten γ und ϵ , die sich auf der cytoplasmatischen Seite befinden, stehen in Kontakt mit den hydrophilen Loops des c-Ringes. Man geht davon aus, dass Chaperon-ähnliche Proteine bei der korrekten Assemblierung des c-Ringes eine wichtige Rolle spielen (Suzuki et al, 2007; Kol et al, 2008 und Ozaki et al, 2008).

Von der CF₀ ATP Synthase konnte bisher der c₁₄-Rotorring kristallisiert werden und die Struktur mit einer Auflösung von 3,8 Å bestimmt werden (Vollmar et al, 2009).

Abbildung 1.8: Struktur des chloroplastidären c₁₄-Rotorringes aus *Spinacia oleracea*.

A, Sicht senkrecht zur Membran, von der Stromaseite aus gesehen. B, Seitlicher Blick zur Membran. Die Spannweite der Membran wurde hier mit schwarzen Strichen markiert. Die konservierten Carboxylat-Reste Glu⁶¹ sind rot dargestellt. Rechts: Protonbindestelle in einer c Untereinheit. Das konservierte Glu⁶¹ steht im Zentrum der Bindungsstelle. Putative Wasserstoffbrücken bestehen mit Tyr⁶⁶ und dem Rückgradcarbonyl von Phe⁵⁹ im angrenzenden Protomer sowie mit Phe⁵⁹ im gleichen Protomer. Die Distanzen zwischen den ausgewählten Aminosäureresten sind in Å angegeben. Aminosäurereste, die mit *I. tartaricus* identisch sind, sind blau dargestellt. Die Aminosäurereste, die für Spinat Chloroplasten spezifisch sind, sind grün dargestellt. A und B beziehen sich auf zwei verschiedene Protomere (aus Vollmar et al, 2009).

Die Anzahl an c Untereinheiten stimmt mit der mittels Rasterkraftmikroskopie beobachteten Anzahl an Untereinheiten überein. Bei diesem Experiment wurden c Monomere, die sich selbst zu Ringen aus 14 Protomeren organisierten, in Protein Arrays rekonstituiert.

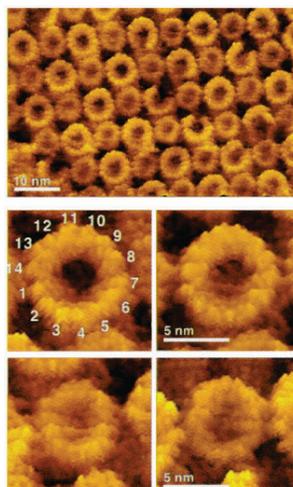


Abbildung 1.9: c Oligomere der chloroplastidären ATP Synthase.

c-Ring visualisiert in 25 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris/HCl pH 7.8 bei RT mittels Rasterkraftmikroskopie (Nanoscope III, Digital Instruments). Zu sehen ist, dass der Rotorring aus 14 c Untereinheiten aufgebaut ist (Seelert et al, 2000).

Der Innenraum des c-Ringes ist auf der Lumenseite mit Phospholipiden gefüllt. Auf dieser Seite befinden sich auch die beiden Termini der c Protomere. Die N-terminalen Helices bilden den inneren, dicht gepackten Ring und die C-terminalen Helices bilden den äußeren Ring, der die konservierten Carboxylat-Reste (Glu^{61}) trägt. Diese konservierten Carboxylat-Reste befinden sich in Abständen von 10.6 \AA zueinander und ragen nach außen in die Umgebung. Vom konservierten Carboxylat-Rest (Glu^{61}) glaubt man, dass er an der Protonenbindung und an der Protonentranslokation durch den CF_o involviert ist. Diese Struktur, die in einer sauren Kristallisationslösung von pH=4,6 erhalten wurde, spiegelt den vollständig protonierten Zustand der Carboxylat-Reste wieder. Wie in Abbildung 1.8 zu sehen ist, zeigen die dem konservierten Glu^{61} benachbarten Aminosäuren vermehrt einen hydrophoben Charakter (Leu^{57} , Phe^{59} , Ala^{62} und Leu^{63}) und reduzierte Protonenbindekapazität. Vielmehr dienen diese Aminosäuren der Stabilisierung des Glu^{61} . Tyr^{66} des benachbarten Protomers bildet mit Glu^{61} eine Wasserstoffbrückenbindung aus und der p-Hydroxyphenylring von Tyr^{66} schirmt den Carboxylat-Rest von der hydrophoben Lipidphase ab. Zusätzlich ist auch das Thr^{64} desselben Protomers an der Stabilisierung des Glu^{61} beteiligt.

Die fassförmige Struktur des c_{14} -Rotorringes zeigt einen äußeren Durchmesser von 58 \AA und einen inneren Durchmesser von 25 \AA im oberen Bereich (Stromaseite) und von 38 \AA im unteren Bereich (Lumenseite). Die Struktur hat eine Taille an den konservierten Glu^{61} mit einem äußeren Durchmesser von 47 \AA . Die Höhe des Komplexes liegt bei 65 \AA , wobei die Membran ungefähr zwischen Arg^{50} und Asn^{78} liegt, was einer Membrandicke von 39 \AA entspricht (Vollmar et al, 2009).

Die a Untereinheit ist sehr hydrophob und von ihr ist noch keine Kristallstruktur bekannt. In Modellen wird sie mit fünf transmembranen Helices dargestellt (Valiyaveetil et al, 1998 und Vik et al, 2005).

Die b Untereinheiten, die von der δ Untereinheit bis zur Membran ragen, sind über ihre N-terminale α -Helices in der hydrophoben Membran verankert (Dunn et al, 2000). Außerdem scheinen sie auch mit dem c-Ring und den Helices 4 und 5 der a Untereinheit in Kontakt zu stehen (Greie et al, 2000). Stabile c-Ring-a Subkomplexe aus *E. coli* konnten gereinigt werden und nach Rekonstitution dieser mit der membranlokalisierten Region der b Untereinheit, waren diese Komplexe zur Ionen-transportation fähig (Greie et al, 2004).

Während die beiden b Untereinheiten in Eubakterien Homodimere sind, findet man in Chloroplasten und Cyanobakterien Heterodimere. Die erste b Untereinheit besteht zu 67% und die zweite b Untereinheit zu 41% aus α -Helices. Für die erste b UE konnten drei helikale Domänen identifiziert werden und bei der kürzeren zweiten b UE geht man von zwei helikalen Domänen aus. Beide b Untereinheiten besitzen eine *coiled-coil* Dimerisierungsregion (Poetsch et al, 2007).

1.5 Reaktionsmechanismen im CF₁ und CF₀

1.5.1 Der katalytische Mechanismus im CF₁

Die drei katalytischen Zentren, in denen die ATP Synthese bzw. Hydrolyse abläuft, befinden sich in den β -Untereinheiten, genauer noch an den Kontaktstellen zwischen den α und β Untereinheiten. In den α -Untereinheiten sind ebenfalls Nukleotidbindestellen zu finden. Diese sind jedoch nicht katalytisch wirksam, fördern aber die Freigabe von inhibitorisch gebundenen ADP (Diez et al, 2004). Die Bindung von Nukleotiden kann nur in Anwesenheit von Magnesiumionen stattfinden (Stock et al, 2000 und Abrahms et al, 1994), die mit den Nukleotiden komplexieren und so für die Stabilität der Moleküle sorgen. Die Existenz von sechs Nukleotidbindestellen konnte auch mit Fluoreszenzresonanzenergietransfermessung bestätigt werden (McCarty und Hammes, 1987).

Der zentrale Stiel wird von den Untereinheiten γ und ϵ gebildet. Er verbindet die beiden Motoren miteinander. Bei der Hydrolyse von ATP oder bei der Protonentranslokation durch den F₀ entlang des Gradienten wird die dabei freiwerdende Energie zur Rotation des zentralen Stiels verwendet. Bei einer vollständigen Umdrehung von 360° werden 3 Moleküle ATP synthetisiert. Somit erfordert die Synthese eines ATP Moleküls die Drehung der γ Untereinheit um 120° (Yasuda et al, 1998), wobei 3-4 Protonen durch den F₀ transportiert werden. Da die Untereinheiten γ und ϵ eine wichtige Rolle in der Regulation des Proteins spielen, werden diese im Kapitel 1.6 näher betrachtet.

Die Asymmetrie der γ Untereinheit bewirkt, dass diese mit den drei katalytisch wirkenden β Untereinheiten unterschiedlich interagiert, weshalb die drei β Untereinheiten zu jedem Zeitpunkt immer unterschiedliche Nukleotidaffinitäten besitzen (Abrahams et al, 1994). Diese drei Konformationsstadien sind energieabhängig und wurden im Modell nach Boyer (1989) als O (*open*), L (*loose*) und T (*tight*) bezeichnet. Dieser Mechanismus ist unter den Namen *binding change mechanism* (Abb. 1.10 und 1.11) bekannt.

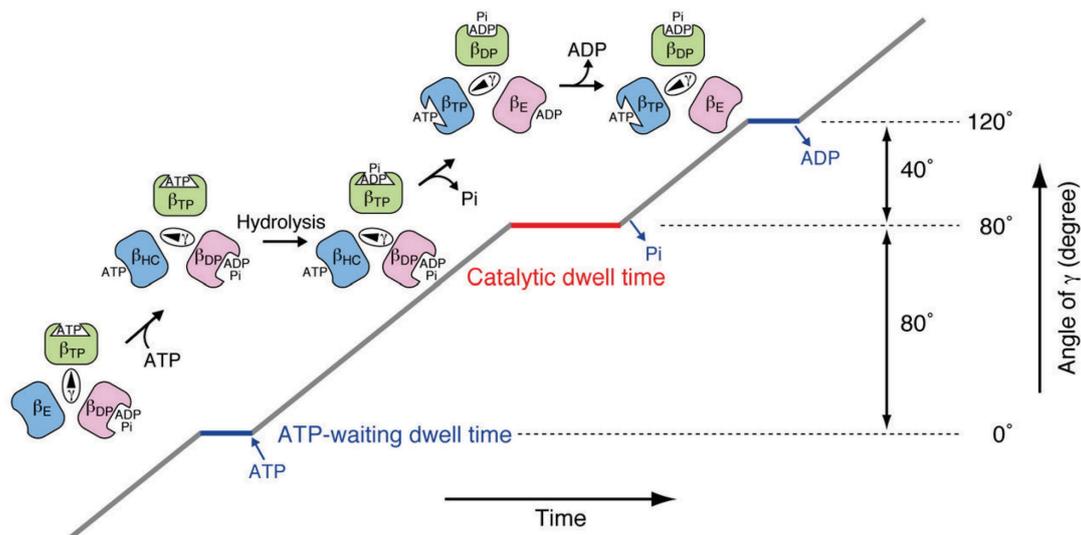


Abbildung 1.10: Modell, das das Verhältnis zwischen chemischen Reaktionen in den drei katalytischen β Untereinheiten und der Rotation der γ Untereinheit bei einer ATP Konzentration unterhalb des K_m widerspiegelt.

Dargestellt ist hier die Hydrolyse von ATP. Die *ATP-binding dwell time* ist definiert, als die Zeit die für die ATP Bindung gebraucht wird (blaue Linie). Die *catalytic dwell time* ist die Zeit, die für die ATP Hydrolyse und Freisetzung von P_i nötig ist (rote Linie). Zu beachten ist, dass γ mit den β Untereinheiten (β_{TP} , β_{DP} , β_E , β_{HC}) unterschiedlich interagiert. β_{TP} , β_{DP} , β_E und β_{HC} bezeichnet die β Untereinheiten mit gebundenen ATP oder ADP, die leere Tasche oder die halb geschlossene Tasche (aus Sekiya et al, 2009 und Nakanishi-Matsui et al, 2010).

Inzwischen bezeichnet man diese drei Zustände auch als β_E , β_{DP} und β_{TP} . Das E steht für *empty* (leer), das DP für ADP-gebunden und das TP für ATP-gebunden. Die Nukleotidaffinität nimmt wie folgt zu: $\beta_E < \beta_{DP} < \beta_{TP}$. Im β_E Zustand ist die Tasche offen und das synthetisierte ATP kann freigesetzt werden oder ADP und P_i können in die Tasche gelangen, während im zweiten Zustand, dem β_{DP} Zustand, das ADP und das anorganische Phosphat locker gebunden vorliegen. Im β_{TP} Zustand wird ATP gebildet und fest gebunden. Dieses Modell konnte bisher aufgrund von mit Inhibitoren kristallisierten F_1 Subkomplexen bestätigt werden. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Wirkung der Inhibitoren.

Tabelle 1.3: Auswirkung von Inhibitoren auf die Konformation der drei katalytisch wirkenden β Untereinheiten.

Inhibitor	Wirkung	ATP Synthase	Publikation
Azid	<ul style="list-style-type: none"> β_{DP} besetzt mit ADP und Azid Unterschiedliche Konformation des katalytisch wirksamen αArg^{373}-Restes in β_{DP} und β_{TP}. Entspricht den ADP inhibierten Zustand. β_{DP} kann sowohl ADP als auch AMPPNP binden. β_{TP} kann nur ATP binden. 	MF ₁ aus Rinderherz	Bowler et al, 2007
Aurovertin B	<ul style="list-style-type: none"> Unkompetitiver Inhibitor. Bindet an β_E und β_{TP}. βArg^{412} ist in der Bindung involviert. Inhibiert den Kontakt der α/β Untereinheiten, so dass die Interkonversion der β Untereinheiten nicht stattfinden kann. 	MF ₁ aus Rinderherz	Van Raaij et al, 1996
Efraeptin	<ul style="list-style-type: none"> Inhibiert den F₁ durch Blockierung der Konversion von β_E zu β_{DP}. 	MF ₁ aus Rinderherz	Abrahams et al, 1996
Reservatol und ähnliche Polyphenole	<ul style="list-style-type: none"> Verhindern die Rotation der γ Untereinheit. Sie binden an eine hydrophobe Tasche zwischen den C-Terminus der γ Untereinheit und β_{TP}. Inhibiert sowohl Synthese als auch Hydrolyse von ATP. 	MF ₁ aus Rinderherz	Gledhill et al, 2007
Tentoxin	<ul style="list-style-type: none"> Unkompetitiver Inhibitor. Bindet an eine spezifische Bindungsstelle, die sich an der Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten α und β befindet. Der Inhibitor ist über eine Wasserstoffbrücke mit βAsp^{83} verbunden und übt hydrophobe Wechselwirkungen zu anderen Aminosäureresten der α Untereinheit aus. Inhibiert die α/β Kontaktfläche und verhindert so die Interkonversion der β Untereinheiten. 	CF ₁ aus Spinat	Groth, 2002
BeF₃⁻:ADP	<ul style="list-style-type: none"> Zwei BeF₃⁻:ADP sind an β_{DP} und β_{TP} wie ATP gebunden. In der Struktur konnte das für den nukleophilen Angriff auf das γ-Phosphat des ATP verantwortliche Wassermolekül aufgelöst werden. Der Abstand zwischen dem γ-Phosphat des ATP und dem Wassermolekül ist im β_{DP} kleiner was schließen lässt, dass β_{DP} die katalytisch aktive Form darstellt. 	MF ₁ aus Rinderherz	Kangawa et al, 2004
MgADP:AlF₄⁻	<ul style="list-style-type: none"> Inhibierter Übergangszustand in dem alle Bindungstaschen mit Nucleotiden beladen sind. Bindet an die Untereinheiten β_{DP} und β_{TP}. Die Struktur zeigt, dass $\alpha\text{Arg}^{375(373)}$ den Übergangszustand des pentakoordinierten Intermediaten während der Reaktion stabilisiert. 	MF ₁ aus Rinderherz	Braig et al, 2000 Menz et al, 2001
Vanadat (V_i)	<ul style="list-style-type: none"> V_i ist ein Analogon zu P_i. Übergangszustand der Katalyse. Das Ala¹⁵⁸ des P-Loops ist viel näher am V_i lokalisiert als das P_i in den bekannten Grundzustandsstrukturen. 	MF ₁ aus Rattenleber	Chen et al, 2006
4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl)	<ul style="list-style-type: none"> NBC-Cl reagiert mit dem phenolischen Sauerstoff des Tyr³¹¹ von β_E und verhindert, dass β_E seine eigentliche Konformation einnimmt. β_{TP} zeigt gebundenes AMPPNP und β_{DP} ADP. 	MF ₁ aus Rinderherz	Orriss et al, 1998

Die 120° Rotationsschritte lassen sich weiter wie folgt unterteilen:

$$120^\circ = 80^\circ (\text{ATP Bindung}) + 40^\circ (\text{ATP Hydrolyse und Freisetzung von ADP und } P_i)$$

Dieser Mechanismus ist in Abbildung 1.11 zu sehen. Nach Bindung von ATP an β_1 vollzieht γ eine Drehung um 80°.

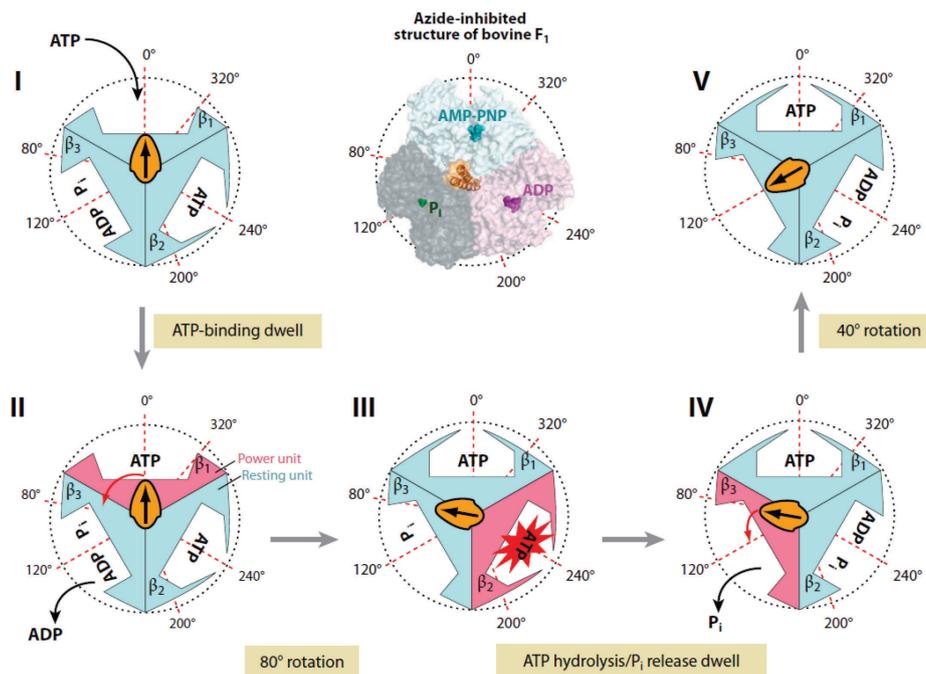


Abbildung 1.11: Model des binding change Mechanismus.

Der F_1 wird hier von der Membran aus betrachtet. β_1 , β_2 und β_3 stellen die α/β Kontaktflächen der katalytischen Untereinheiten dar. Die pinke Untereinheit generiert wahrscheinlich die zur Rotation von γ (orange dargestellt) nötige Energie (aus Ballmoos et al, 2009).

Dabei wird im β_3 -Zustand ADP freigesetzt und anschließend wird das γ -Phosphat des ATPs im β_2 -Zustand gespalten und im β_3 -Zustand wird ein P_i freigesetzt, was eine zweite Rotation von 40° zur Folge hat (Nishizaka et al, 2004 und Adachi et al, 2007). Die Hydrolyse eines ATP Moleküls erfordert daher eine Vollständige Umdrehung von 360°. Bei 0° wird ATP gebunden, bei 200° wird es gespalten, ADP wird bei 240°-320° freigesetzt und P_i verlässt das Enzym bei 320°. Die Rotationsbewegungen von γ im F_1 und im ganzen Enzym sind identisch (Rondelez et al, 2005).

1.5.2 Energetik und Mechanismus des CF_0

Die Anzahl an c Untereinheiten in den verschiedenen F_1F_0 ATP Synthasen ist nicht fix. Rasterkraftmikroskopie, Kryo-Elektronenmikroskopie von zweidimensionalen Kristallen, Massen-

spektrometrie und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese haben gezeigt, dass die Anzahl an c Untereinheiten im c-Ring der verschiedenen Organismen variiert (Meier et al, 2007 und Seelert et al, 2000). In der PDB findet man derzeit Werte zwischen 8 und 15. Die mitochondrialen ATP Synthase aus Rinderherzen besitzt einen c₈-Ring, in Hefe, *Bacillus* PS3 und *E. coli* sind es 10 Monomere bei *I. tartaricus*, *P. modestum* und *C. paradoxum* 11, im thermoalkalophilen *Bacillus* TA2.TA1 13, bei *S. oleracea* 14 und bei dem Cyanobakterium *S. platensis* sind es 15 Protomere. Zudem wird vermutet, dass die Anzahl an c Protomeren im ATPase Komplex nicht nur zwischen den Spezies variiert, sondern auch von den Wachstumsbedingungen und von genetischen Manipulationen abhängen kann (Schemidt et al, 1998 und Tomashek et al, 2000). Wissenschaftlich bewiesen wurde diese Theorie bisher aber noch nicht (Krebsstakics et al, 2008). Diese Unterschiede in der Stöchiometrie sind wichtig, wenn man unterschiedliche ATP Synthasen aus einer bioenergetischen Sicht betrachten möchte. Die Konsequenzen dieser Variabilität liegen darin, dass das Verhältnis von translozierten Protonen zu synthetisiertem ATP Molekül (H⁺:ATP) variiert und somit kommen auch nicht-integrale Verhältnisse zustande. Weiterhin können die 120° Schritte mit denen sich die γ Untereinheit dreht nicht ein Vielfaches von dem sein, was ein c Protomer in einem Schritt rotiert (Yoshida et al, 2001). Dafür spricht auch die Tatsache, dass F₁γ-F₁c_x zusammen rotieren ohne sich dabei zu verschieben, was bei einem γ-ε-F₀c *crosslink* Experiment gezeigt wurde (Tsunoda et al, 2001). Die Differenz in den Rotationsschritten der γ Untereinheit und des c_x-Ringes können also nur dadurch ausgeglichen werden, dass der periphere Stator F₀b₂-F₁δ (Sorgen et al, 1999) und die γ Untereinheit eine Flexibilität besitzen müssen, die diese Energie vorübergehend speichert.

Das Verhältnis von transportierten Protonen zu synthetisiertem ATP kann berechnet werden, indem man die Anzahl an c Untereinheiten durch 3 teilt. Demnach liegt das Verhältnis für die chloroplastidäre ATP Synthase bei H⁺/ATP=4,7 und für *E. coli* errechnet sich ein Wert von 3,3. Der experimentell gemessene Wert liegt jedoch für beide ATP Synthasen bei H⁺/ATP=4. Dieses Experiment zeigt, dass das thermodynamische H⁺/ATP Verhältnis unabhängig von der c-Ring Stöchiometrie ist (Steigmiller et al, 2008). Das chloroplastidäre H⁺/ATP Verhältnis wurde bisher nur von Cyanobakterium *S. platensis* übertroffen (H⁺/ATP=5). Kleinere H⁺/ATP Verhältnisse sind in Mitochondrien und aeroben Bakterien zu finden, während höhere Verhältnisse in photosynthetischen Organismen zu finden sind. Demzufolge könnte die Anzahl an c Untereinheiten eine Adaption an die jeweiligen Umgebungsbedingungen darstellen.

Die Protonentranslokation durch den F₀ wird im Falle der ATP Synthase von einem elektrochemischen Potential angetrieben:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\text{pH (Protonenkonzentrationsgradient)} + \Delta\Psi \text{ (transmembrane elektrische Potentialdifferenz) [Gl. 1]}$$

Entgegen den Gradienten werden Protonen dann gepumpt, wenn die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie zur Rotation von $F_1\gamma$ - F_1c_x führt (Hutcheon et al, 2001). Nur im Falle der ATP Synthese spielen also die in Gleichung 1 dargestellten Faktoren eine wichtige Rolle. Bei Mitochondrien und aeroben Bakterien wird der ΔpH konstant aufrechterhalten. Auch wird $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ maßgeblich von der transmembranen elektrischen Potentialdifferenz ($\Delta\Psi$) konstant gehalten. Anders jedoch sieht dies bei Chloroplasten aus. $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ist hier hauptsächlich von ΔpH abhängig, weshalb eine größere Anzahl an c Untereinheiten im c-Ring hier von Vorteil sein kann. Zudem nutzen Chloroplasten die Lichtenergie als Energiequelle, was ihnen erlaubt, vom thermodynamischen Gleichgewicht weiter entfernt und mit höherem Umsatz zu arbeiten (Ballmoos et al, 2009).

Auch die Rotation des c_x -Ringes konnte experimentell nachgewiesen werden, wobei man sich der gleichen Methode wie beim zentralen Rotor bediente. Hierzu wurde ein Aktinfilament an den N-Terminus einer c Untereinheit angebracht, wie in Abbildung 1.11 dargestellt (Sambongi et al, 1999; Tsunoda et al, 2000 und Pänke et al, 2000).

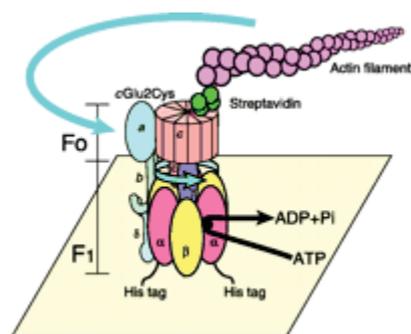


Abbildung 1.12: Direkte Beobachtung der Rotation des c-Rings anhand einer intakten immobilisierten ATP Synthase (aus Sambongi et al, 1999)

Das Experiment belegt, dass die $\gamma\epsilon$ Untereinheiten und der c-Ring während der ATP Hydrolyse rotieren. Genau wie bei der Rotation der γ Untereinheit, wurde auch bei der ganzen ATP Synthase eine Drehkraft von etwa 40 pN nm^{-1} gemessen. Dies suggeriert, dass die γ Untereinheit und der c-Ring während der Hydrolyse oder Synthese von ATP zusammen rotieren (Sambongi et al, 1999 und Kaim et al, 2002). Während der Hydrolyse rotiert das Filament (von F_0 aus betrachtet) gegen den Uhrzeigersinn und im Uhrzeigersinn während der Synthese mit 700 Umdrehungen pro Sekunde (Diez et al, 2004 und Ueno et al, 2005).

An der Protonentranslokation durch die Membran sind der c_{14} -Ring und die a Untereinheit beteiligt. Weil die a Untereinheit noch von keiner F-Typ ATP Synthase kristallisiert wurde, existiert bisher nur ein Modell, das die Protonentranslokation durch den F_0 beschreibt.

Man vermutet, dass die Protonen an der Grenzfläche zwischen der a Untereinheit und den c-Ring transportiert werden. Verschiedene Mutationsstudien an der Untereinheit a mit gefolgt

Aktivitätstests haben gezeigt, dass nur eine kleine Anzahl an Aminosäureresten sich als essentiell für die Funktion der ATP Synthase herausgestellt hat. Der konservierteste Rest ist ein membranlokalisierendes Arginin (*E. coli* Arg²¹⁰) (Cain et al, 1989). Abbildung 1.13 stellt die Modelle der Protonentranslokation dar.

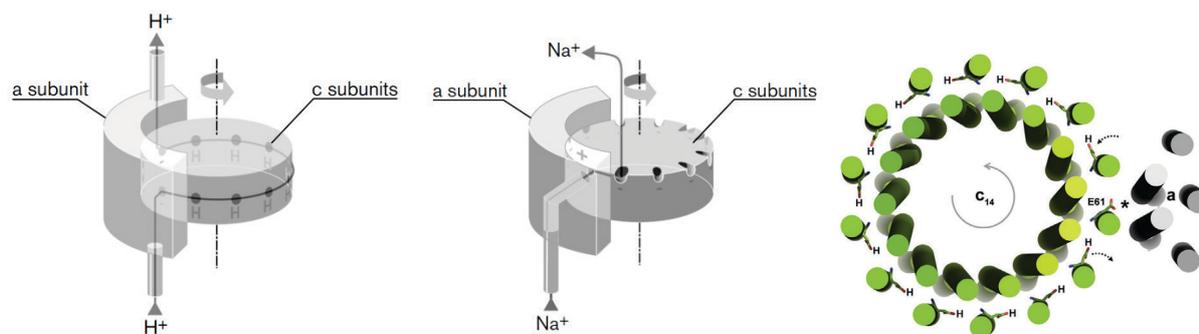


Abbildung 1.13: Vorgeslagene Modelle, die die Translokation der Protonen durch den F₀ beschreiben.

Bild links: Modell, das die Rotation des c-Ringes relativ zur a Untereinheit darstellt. Vorgeschlagen wird ein zwei-Halbkanal Modell (Junge et al, 1997). Ein essentieller Argininrest in der a Untereinheit verhindert, dass die Protonen von einem Kanal direkt in den zweiten gelangen. Die Bindung der Protonen an das konservierte Carboxylat-Rest der c Untereinheit bewirkt die Rotation des c-Ringes. Im zweiten Halbkanal erleichtert das Arginin die Freisetzung der gebundenen Protonen. Bild Mitte: Einkanalmodell (Dimroth et al, 1998) für die Na⁺ transportierende ATP Synthase aus *P. modestum* (aus Stock et al, 2000). Bild rechts: Darstellung von konformationellen Änderungen assoziiert mit der Protonierung und Deprotonierung des konservierten Carboxylates Glu⁶¹ im Chloroplasten c₁₄-Rotorring. Dargestellt ist die Sicht von der Stromaseite. (Vollmar et al, 2009).

Eine Mutation dieser Aminosäure führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Cain et al, 1989). Man glaubt, dass zwischen der a Untereinheit und dem c-Ring zwei Halbkänäle existieren (Junge et al, 1997). Arginin trennt diese beiden Kanäle voneinander und erleichtert die Freisetzung von Protonen im zweiten Halbkanal. Protonen, die durch den ersten Kanal in den a/c Zwischenraum gelangen, binden an ein konserviertes Carboxylat-Rest in der c Untereinheit. Diese c Untereinheit dreht sich, so dass der nächste freie Carboxylat-Rest, der zuvor im zweiten Halbkanal sein Proton abgegeben hatte, erneut ein Proton aufnehmen kann (Wehrle et al, 2002; Elston et al, 1998 und Xing et al, 2004). Nachdem der Carboxylat-Rest sein gebundenes Proton abgegeben hat und bevor es ein neues Proton aufnehmen kann, wird seine negative Ladung vom positiv geladenen Argininrest stabilisiert.

Ein zweites Modell (Dimroth et al, 1998) schlägt vor, dass nur ein Protonenkanal im a/c Zwischenraum existiert. Während im ersten Modell der konservierte Carboxylat-Rest der c Untereinheit von der Wasserphase isoliert ist, ist er im zweiten Modell wasserzugänglich.

Erst eine Kristallstruktur eines a/c Komplexes wird Aufschluss darüber geben können, welches Modell zutrifft.

In Abbildung 1.13 rechts dargestellt ist das vorgeschlagene Modell (Vollmar et al, 2009), das die Konformationsänderung des konservierten Glu⁶¹ im c₁₄-Rotorring aus *S. oleracea* beschreibt. Bei 13 Protomeren befindet sich das Glu⁶¹ protoniert und von der hydrophoben Membran abgeschirmt.

In dem Protomer, das mit der α Untereinheit in Kontakt tritt, dreht sich das Carboxylat-Rest nach außen und ändert seine Konformation. So kann das gebundene Proton an die Stromseite abgegeben werden und von der Lumenseite ein neues Proton gebunden werden. Anders als das Modell nach Junge, schlägt dieses Modell vor, dass zunächst das Arginin protoniert wird und daraufhin sein Proton an das Carboxylat abgegeben wird.

Des Weiteren scheint es eine Aminosäuretriade zu geben (bei *E. coli*: G²¹⁸, E²¹⁹ und H²⁴⁵ lokalisiert auf der periplasmatischen Seite), die als potentielle Protonenfalle gesehen werden kann. Die drei darin involvierten Aminosäurereste scheinen an die Umgebungs-pH-Werte der verschiedenen Organismen angepasst zu sein (Cain et al, 1988; Schwem et al, 2006 und Ballmoos et al, 2008).

Inhibitoren des F_0 Subkomplexes ahmen das Arginine nach. Vom chloroplastidären F_0 ist bekannt, dass er sich von DCCD, Triphenylzinn und Methyltrachyloban-19-oat Ester (Hernández-Terrones et al, 2003) sowie von Venturicidin A (Zhang et al, 1993) inhibieren lässt. DCCD bildet eine N-acyl Bindung mit dem konservierten Carboxylat-Rest der c Untereinheit (Hoppe et al, 1980). Der protonierte Übergangszustand des DCCD ähnelt der Guanidin-Gruppe des Arginins. DCCD bindet vorzugsweise außerhalb der a/c Kontaktfläche und blockiert die Rotation des c -Ringes (Hermolin et al, 1989)

1.6 Regulation der CF_1CF_0 ATP Synthase

F_1F_0 ATP Synthasen sind sowohl zur Synthese, als auch zur Hydrolyse von ATP fähig. In Eubakterien ist diese Prozedur gewollt reversibel und die Hydrolyse von ATP generiert die Rotation der γ Untereinheit, wodurch Protonen zurück durch den F_0 Subkomplex gepumpt werden (Zhang et al, 1994). Die Hydrolyse von ATP findet auch dann statt, wenn der F_1 Subkomplex durch die Zugabe von EDTA, in Rahmen eines Laborexperimentes, vom F_0 Subkomplex getrennt wird. In den Chloroplasten höherer Pflanzen und grünen Algen hingegen wird die Hydrolyse von ATP verhindert. Thioredoxin, eine Oxidoreduktase, reguliert über seinen Redoxzustand die Aktivität vieler Enzyme. Darunter auch die CF_1CF_0 ATP Synthase (Nalin et al, 1984). Thioredoxin besitzt zwei benachbarte Cysteinreste, die entweder reduziert oder oxidiert vorliegen können. In Anwesenheit von Licht liegt die reduzierte Form vor und im Dunkeln, die oxidierte. Auch in der γ Untereinheit existieren zwei Cysteinreste (γ Cys¹⁹⁹ und γ Cys²⁰⁵ in Spinatchloroplasten). Befinden sich diese im reduzierten Zustand, dann ist das Enzym aktiv und ATP kann produziert werden, während im oxidierten Zustand das Protein weder zur ATP Synthese noch zur ATP Hydrolyse fähig ist. Im Dunkeln, wenn der transmembrane Protonengradient zusammenbricht, wird so eine Hydrolyse von ATP verhindert. Man bezeichnet diesen Zustand der chloroplastidären ATP Synthase als latent. Zusätzlich hat sich gezeigt,

dass die C-terminale Helix der ϵ Untereinheit Einfluss auf die Thiolregulierung nimmt (Konno et al, 2004).

In Cyanobakterien (Werener-Gruene et al, 1994) und in thermophilen Bakterien (Bald et al, 2000) findet keine Regulation der ATP Synthase über Thioredoxin statt. Jedoch ist es möglich, durch Einführung der redoxregulierbaren Sequenz in die γ Untereinheit, der ATPase eine Redoxsensitivität zu verleihen.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit ist die feste, nicht kompetitive inhibitorische Bindung von MgADP in der β_{DP} Nukleotidbindestelle, welche bei Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien auftritt (Feniouk et al, 2006). Die Bindung von ATP an die katalytisch nicht aktiven α Untereinheiten erleichtert die Freisetzung des inhibitorisch gebundenen ADP (Jault et al, 1993 und Matsui et al, 1997).

Auch die ϵ Untereinheit hat eine regulatorische Funktion mit der Fähigkeit, die ATP Synthase in ihrer Aktivität zu inhibieren. Folgende Abbildung demonstriert die Konformationsänderungen der ϵ Untereinheit.

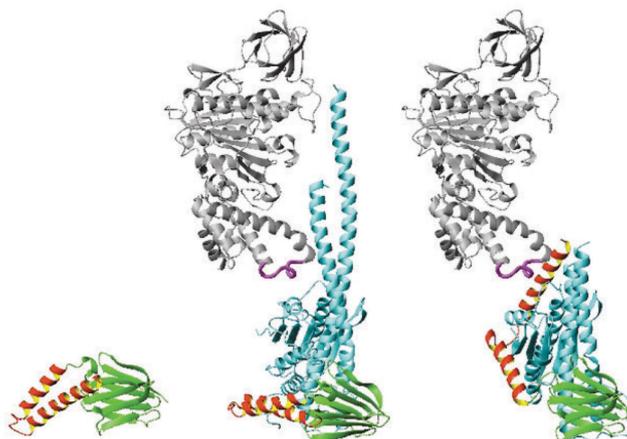


Abbildung 1.14: Konformationsänderungen der ϵ Untereinheit.

Bild links: *down*-Struktur der isolierten ϵ UE aus *E.coli* (Uhlin et al, 1997). Bild Mitte: δ UE (homolog der bakteriellen ϵ UE) aus Rinderherz Mitochondrien (Gibbons et al, 2000). Bild rechts: Struktur der ϵ UE ko-kristallisiert mit einer verkürzten γ UE aus *E.coli* (Rodgers et al, 2000). Hier ist die *up*-Konformation dargestellt. Violett dargestellt ist die DELSEED-Region in der β Untereinheit (aus Yoshida et al, 2001).

Die in Abbildung 1.14 (links) dargestellte *down*-Struktur gibt den nicht-inhibitorischen Zustand wieder, während die rechts abgebildete *up*-Konformation den inhibierten Zustand repräsentiert. Bei der Inhibierung wird die C-terminale α -Helix, die in der *down*-Struktur auf dem c -Ring liegt, angehoben, so dass sie den $(\alpha\beta)_3$ Hexamer erreicht (Rodgers et al, 2000 und Wilkens et al, 1998). Elektrostatische Interaktionen zwischen basischen Aminosäureresten in der C-terminalen α -Helix der ϵ Untereinheit und der konservierten DELSEED-Region der β Untereinheit führen zu einer Blockierung der Rotation (Hara et al, 2001). Die Beladung (ATP bzw. ADP) der zweiten β Untereinheit reguliert wiederum die Bewegung der C-terminalen α -Helix (*up*-to-*down* bzw. *down*-to-*up*) (Kato-Yamada et al, 2000). Bei einem *crosslink* Experiment, bei dem die *up*-Form dauerhaft erhalten blieb,

hat sich gezeigt, dass die Fähigkeit zur ATP Synthese erhalten bleibt, während die Hydrolyse blockiert wird (Tsunoda et al, 2001). So ist auch hier, wie auch schon zuvor bei der Regulation mit Thioredoxin festzustellen, dass ein Katalyseweg blockiert werden kann, ohne dass der umgekehrte Prozess davon beeinflusst wird.

Die ϵ Untereinheit besitzt ein ATP Bindemotiv. Die Bindung von ATP bewirkt eine Konformationsänderung dieser Untereinheit. Beim Cyanobakterium *T. elongatus* existiert kein Bindemotiv. Trotzdem hat auch sie eine regulatorische Funktion, mit der Fähigkeit die ATP Synthase in ihrer Aktivität zu inhibieren.

Weiterhin wird die ATP Synthase über den transmembranen Protonengradienten, durch Hitze, proteolytische Spaltung, Alkohol und milde Detergenzien in ihrer Aktivität beeinflusst (Fremont et al, 2000).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es die intakte chloroplastidäre ATP Synthase ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab b'c_{14}$) aus *Spinacia oleracea* zu kristallisieren und die Struktur mittels Röntgenkristallographie zu lösen. In vorherigen Arbeiten wurden bereits das $\alpha_3\beta_3$ Hexamer (Groth et al, 2001) im latenten Zustand ohne gebundene Nukleotide, sowie das $\alpha_3\beta_3$ Hexamer mit inhibitorisch gebundenen Tentoxin (Groth 2002) und der c_{14} -Rotorring kristallisiert. Die Auflösungen lagen bei 3,2 Å, 3,4 Å und 3,8 Å.

Um die Redoxregulierung der γ Untereinheit in höheren Pflanzen zu studieren, sollte ein heterolog exprimiertes $CF_1\gamma$ -Thioredoxin_{E. coli} Fusionsprotein gereinigt werden und anschließend in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden. Die γ Untereinheit ist bekanntermaßen hoch flexibel was die Kristallisation und Strukturberechnung sehr erschweren. Ziel war es sowohl die oxidierte, als auch die reduzierte Form zu kristallisieren und anhand der Strukturen Rückschlüsse auf den Regulationsprozess zu schließen. Die Strukturen der γ Untereinheiten aus Rinderherz Mitochondrien, Hefe und *E. coli* konnten bereits mittels der Röntgenkristallographie berechnet werden. Von der γ Untereinheit aus Chloroplasten existiert hingegen noch keine Struktur.

Als Alternative zum $CF_1\gamma$ -Thioredoxin_{E. coli} Fusionsprotein sollte auch die thermophile F_1 ATP Synthase aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_{red}\epsilon$) kristallisiert werden. Hierbei handelt es sich um ein chimäres Konstrukt, das die regulatorische, redoxregulierte Sequenz (Aminosäuren 198-222) aus der chloroplastidären ATP Synthase aus *Spinacia oleracea* in der γ Untereinheit trägt. Es sollten wieder die oxidierte sowie die reduzierte Form kristallisiert werden. Von der thermophilen ATP Synthase aus *T. elongatus* sind noch keine Kristallstrukturen bekannt.

Wenn man alle bisher bekannten F_1F_0 ATP Synthase Strukturen betrachtet, dann ist es so, dass alle Untereinheiten bis auf die membranlokalisierte Untereinheit a, bereits kristallisiert wurden. Eine Struktur der intakten ATP Synthase würde Aufschluss über den in der Membran lokalisierten Protonenkanal geben und detailliert erklären, wie die Rotation des c-Rotorringes die Konformation der γ Untereinheit ändert und deren Rotation verursacht.

3 Material und Methoden

Alle genannten Lösungen wurden immer mit H₂O bidest. Hergestellt. Die pH Werte wurden sofern nicht anders angegeben mit HCl oder mit NaOH eingestellt.

Das Arbeiten mit Bakterienstämmen erfolgte immer semi-steril unter der Bunsenbrennerflamme.

Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) wurden nach Gebrauch entweder für 20 min bei 121 °C autoklaviert oder durch Zellaufschluss zerstört.

Alle Kristallisationsansätze wurden manuell pipettiert.

3.1 Materialien

3.1.1 Biologisches Material

Der Spinat, der zur Reinigung der CF₁CF₀ ATP Synthase verwendet wurde, wuchs im Gewächshaus der Universität Düsseldorf.

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysen-/Präzisionswagen	Sartorius
Autoklav	H+P Labortechnik
Automatische Pipetten	Gilson
Avanti™ J-26 XP Zentrifuge	Beckmann Coulter
BioCAD 700 E Workstation Perfusion Chromatography System	Applied Biosystem
Biomek 3000 Laboratory Automation Workstation	Beckmann Coulter
Biosys 2000 FPLC System	Beckmann Coulter
Blendor	Waring Commercial
Branson Sonifier 250	Branson
Brutschränke	Memmert
Spektrophotometer DU 800	Beckmann Coulter
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph

Gelsysteme Myghty Small II	Hoefler
Gelsysteme für große Gele	Zentralwerkstatt, Uni Düsseldorf
Hochdruckhomogenisator (French [®] Pressure Cell Press)	Thermo Scientific
HPLC ÄKTAexplorer [™]	GE Healthcare
FPLC ÄKTAprime [™] plus	GE Healthcare
Inkubationsschüttler INNOVA 44R	New Brunswick
Inkubator Heraeus BK 600	Thermo Scientific
Ultrazentrifuge Optima [™] L-80 XP	Beckmann Coulter
TProfessional Basic Thermocycler	Biometra
System Gold (126 NMP Solvent Module, 168 NM detector)	Beckmann Coulter
Mikrozentrifuge Minispin [®]	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf
Magnetrührer MR 3000 / 3001	Heidolph
Milli-Q-Gradient Wasserfilteranlage	Millipore
Minishaker MS 2	IKA
Rock Imager 1000	Formulatrix
Rotoren: JA-10, JA-25.50, Typ 70.1 TI, SW28	Beckmann Coulter
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf
Umwälzkühler HAAKE WKL 26	Thermo Electron

3.1.3 Säulen und Säulenmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Anionenaustauschmaterial: POROS [®] HQ20 (4,6 mmD/100mL)	Applied Biosystems
Anionenaustauschmaterial: POROS [®] HQ10 (4,6 mmD/100mL)	Applied Biosystems
Ni-NTA Agarose	Qiagen
HiPrep 16/60 Sepharyl S-200 High Resolution	GE Healthcare
HR 10/30 Säule befüllt mit Sephadex S-300	Pharmacia

3.1.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Carl Roth, Boehringer, Fluka, Sigma Aldrich, Pierce, Anatrace, Glycon, VWR, Nu-Check Prep, MERCK, Applichem, Roche, Interchim und Bioaustralis

3.1.5 Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Stammkonzentration	gelöst in
Ampicillin*	100 mg/ml	in H ₂ O
Chloramphenicol*	34 mg/ml	in Ethanol p.a.

*sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

3.1.6 Medium zur Kultivierung von *E. coli*

2YT-Medium: 1,6 % (w/v) Trypton
 1 % (w/v) Hefeextrakt
 0,5 % (w/v) NaCl
 1,5 % (w/v) Agar (nur für Agarplatten)

Die Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor dem Gebrauch wurden die nötigen Antibiotika zugesetzt. Bei 2YT-Agarplatten wurden die Antibiotika nach Abkühlung des Mediums auf 50 °C zugesetzt und die gefüllten Petrischalen wurden nach dem Aushärten des Agars bei 4 °C bis zur Nutzung aufbewahrt.

Die Anzucht transformierter *E. coli* Zellen erfolgte auf Agarplatten. Die Überexpression von Zielproteinen erfolgte in Flüssigkulturen.

3.1.7 Vektoren

pET-32a	<ul style="list-style-type: none"> • Prokaryotischer Expressionsvektor der Firma Novagen (Darmstadt) • Das Laktose-Analogon Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert sowohl die Transkription der T7-RNA-Polymerase als auch den T7-RNA-Polymerase Promotor. • Antibiotika Resistenzgen: Ampicillin • Hexahistidin-tag der aufgrund einer vorhandenen Thrombin-Spaltungsstelle vom exprimierten Zielprotein wieder entfernt werden kann • Kodiert für ein 109 Aminosäuren langes, bakterielles Thioredoxin Fusionsprotein.
pET-32a_y302	<ul style="list-style-type: none"> • Expressionsvektor pET-32a mit dem über die Restriktionsschnittstellen EcoRv und SacI integrierten Gen für die C-terminal auf 302 Aminosäuren verkürzte γ Untereinheit aus <i>Spinacia oleracea</i>.
pRARE	<ul style="list-style-type: none"> • Prokaryotischer Expressionsvektor der Firma Novagen (Darmstadt) • Kodiert für die in <i>E. coli</i> aufgrund der speziestypischen Codonnutzung seltene tRNAs-Gene (Novy et al, 2001). Diese Gene können für die heterologe Expression von Fremdgenen essentiell sein. • Antibiotika Resistenzgen: Chloramphenicol
pTrc99A	<ul style="list-style-type: none"> • Prokaryotischer Expressionsvektor der Firma Pharmacia, Biotech (USA) • IPTG wird zur Induktion der Expression des Zielproteins verwendet. • Antibiotika Resistenzgen: Ampicillin
pTrc99A_ $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ (γ_{redox})	<ul style="list-style-type: none"> • Expressionsvektor pTrc99A mit den Genen für die F_1 ATP Synthase aus dem thermophilen Cyanobakterium <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 wobei das Gen für die γ Untereinheit ein chimäres Konstrukt ist, das die für die Redoxregulierung der γ Untereinheit aus <i>Spinacia oleracea</i> verantwortliche Sequenz (Aminosäuren 198-222) trägt. Am N-Terminus der β UE befindet sich ein Dekahis-tag.
pTrc99A_ $\alpha_3\beta_3\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> • Expressionsvektor pTrc99A mit den Wildtyp-Genen der Untereinheiten α, β und γ aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>

3.1.8 Vektorkarten

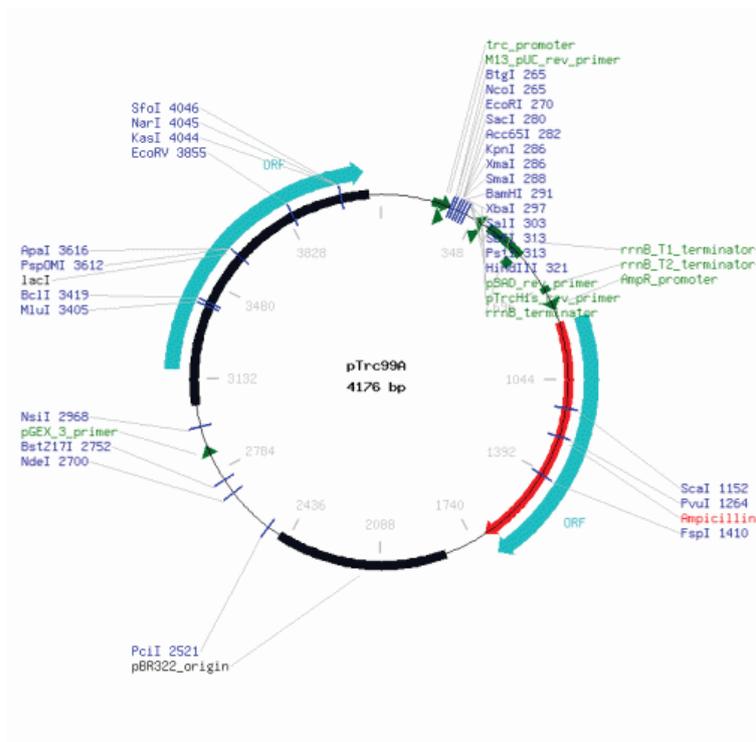


Abbildung 3.1: Vektorkarte des Plasmides pTrc99A. Die F_1 ATPasen $F_1\alpha_3\beta_3\gamma_{\text{redox}}\epsilon$ und $F_1\alpha_3\beta_3\gamma$ wurden über die Schnittstellen *NcoI* und *HindIII* in den Vektor pTrc99A kloniert.

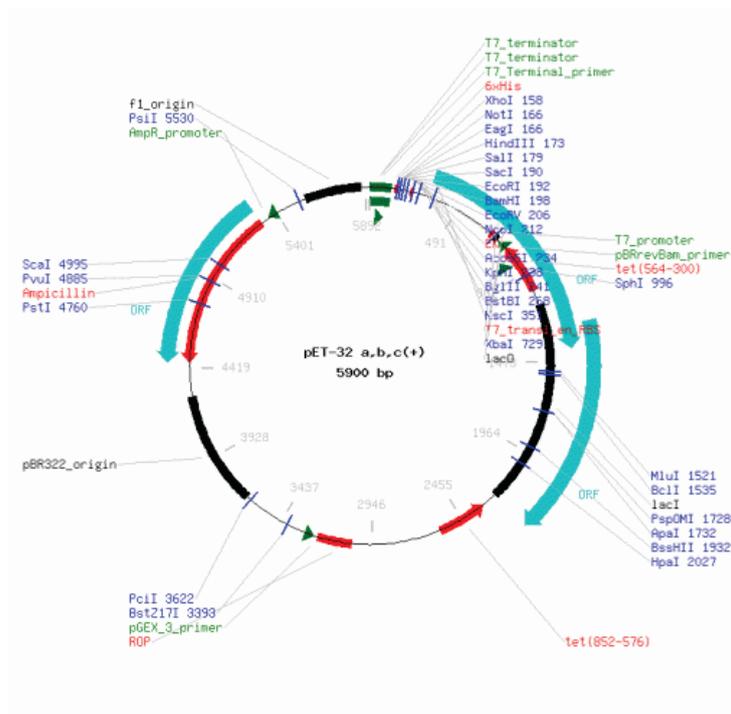


Abbildung 3.2: Vektorkarte des Plasmides pET-32 a. Die C-terminal auf 302 Aminosäuren verkürzte γ -Untereinheit aus Spinat Chloroplasten wurde über die Schnittstellen *EcoRV* und *SacI* in den Vektor pET-32 a integriert.

3.1.9 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> Stamm	Firma	Beschreibung
XL1-Blue	Stratagene, USA	Dieser <i>E. coli</i> Stamm wurde zur Amplifikation und Isolierung von DNA verwendet Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqΔM15 Tn10</i> (Tetr)]
BL21 (DE3)	Novagen, USA	Stamm der für die heterologe Expression der F ₁ ATP Synthase aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i> eingesetzt wurde. Genotyp: F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>
Rosetta-gami TM (DE3)	Novagen, USA	Verwendeter Stamm für die heterologe Expression des CF ₁ γ-Thioredoxin Fusionsproteins. Dieser Stamm ist defizient für die Proteine Thioredoxin-Reduktase und Glutathion-Reduktase, die dafür verantwortlich sind das Enzyme Thioredoxin und das Glutathion im reduzierten Zustand zu erhalten. Durch die Abwesenheit dieser beiden Enzyme im Stamm Rosetta-gami TM (DE3), herrschen oxidierende Bedingungen. Disulfidbrücken können sich unter solchen Bedingungen ausbilden (Derman et al., 1993). Zusätzlich trägt dieser Stamm das pRARE Plasmid, das für die Expression von in <i>E. coli</i> seltenen tRNAs sorgt. Genotyp: <i>Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (SmR)4FI[lac+(lacIq)pro] gor522::Tn10(TcR) trxB::kan (DE3) pRARE (CmR)</i>

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultrafiltrationsröhrchen 100 kDa MWCO, 4 und 15 ml	Millipor
Amicon Ultrafiltrationsröhrchen 30 kDa MWCO, 4 und 15 ml	Millipor
Amicon Ultrafiltrationsröhrchen 10 kDa MWCO, 4 und 15 ml	Millipor
<i>Polyallomer centrifuge tubes, thinwall, 38,5 ml</i>	Beckmann Coulter
Schnappinggläser N 11-01 mit festem Glasmikroeingang 0,2 ml, farblos	Macherey-Nagel
Schnappingkappe N 11, transparent mit Loch und eingelegter Dichtscheibe red rubber/FEP 1.0	Macherey-Nagel

Halbmikroküvetten	Hartenstein
Membranfilter Polyamid (0,2 µm)	Whatman
Petrischalen	Hartenstein
Pipetenspitzen	Brand
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Greiner-Bio One
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Merck

3.1.11 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
<i>Bicinchoninic Acid Assay</i> (BCA)	Pierce
Additive Screens 1, 2 und 3	Hampton Research

3.1.12 Proteingrößenstandard

Bezeichnung	Hersteller
<i>Precision Plus Protein Unstained Standards</i>	Bio-Rad

3.1.13 Materialien für die Kristallisation

Bezeichnung	Hersteller
24 und 15 wells Nextal Platten	Qiagen
72 wells Terasaki Platten	Greiner
96 wells Imp@ct Platten	Greiner
Innovaplate™ SD-2	Innovadyne
NeXtal Evolution µplate	Qiagen
Abdeckfolie	Hartenstein

CryoLoop™

SPINE System für ESRF

Hampton Research

Molecular Dimensions

3.2 Reinigung und Kristallisation der CF₁CF₀ ATP Synthase

3.2.1 Spinaternte

Die chloroplastidäre CF₁CF₀ ATP Synthase wurde aus der Pflanze *Spinacia oleracea* gereinigt, die im Gewächshaus der Universität gepflanzt und nach sechs bis acht Wochen geerntet wurde. 1000 g Blätter, von denen die Mittelrippe entfernt wurde, wurden in destilliertem Wasser gewaschen und bei -20 °C in einer Plastiktüte aufbewahrt. Die Reinigung der ATP Synthase erfolgte durchgehend bei 4 °C.

3.2.2 Isolation der Thylakoidmembranen

Die Isolation der Thylakoidmembranen erfolgte nach einer modifizierten (Groth und Schirwitz, 1999) Methode von Strotmann und Mitarbeiter (1973) um die Kontamination mit Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase zu reduzieren.

1000 g tiefgefrorener Spinatblätter wurden zusammen mit 2 L Puffer A in einem Waring-Blender gemixt und das durch Nylongaze filtrierte Homogenisat wurde für 20 min bei 5700 x g (Beckmann Coulter Avanti J-26, Rotor JA-10) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets dreimal mit Puffer (B, C, B) gewaschen. Hierfür wurden diese in jeweils insgesamt 2 L Puffer resuspendiert, im Glaspotter zusätzlich homogenisiert und erneut wie zuvor zentrifugiert.

Puffer A: 300 mM Saccharose
20 mM Trizin pH 7,4 (NaOH)
10 mM Natriumpyrophosphat pH 7,8 (H₃PO₄)
2 mM DTT
0,002 % (w/v) PMSF

Puffer B: 20 mM Natriumpyrophosphat pH 7,8 (H₃PO₄)
2 mM DTT
0,002 % (w/v) PMSF

Puffer C: 20 mM Natriumchlorid
2 mM DTT
0,002 % (w/v) PMSF

3.2.3 Solubilisierung von CF₁CF₀

Die die Thylakoidmembranen enthaltenden Pellets wurden in Puffer D resuspendiert und gepottert. Dieser Suspension wurde langsam DTT bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugesetzt wobei das Endvolumen 50 ml betrug. Die Lösung wurde 15 min im Dunkeln gerührt und anschließend wurden noch 50 ml Puffer E zugesetzt und weitere 15 min gerührt.

Durch 15 minütige Sonifizierung (Branson Sonifier Typ 250, Stufe 2, 50 % Beschallung), unter Rühren, wurden die ATP Synthasen aus den Thylakoidmembranen herausgelöst und in die Detergens-Mizellen integriert. Das Trennen der gelösten Membranproteinen von den Thylakoidmembranen geschah durch Zentrifugation (Beckmann Coulter Optima L-80 XP, Rotor Ti 70.1, 1 h, 150000 x g). Die sich nun im Überstand befindenden ATP Synthasen wurden weiter durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung gereinigt.

Puffer D: 400 mM Saccharose
20 mM Trizin pH 7.4 (NaOH)
5 mM MgCl₂
0,002 % PMSF

Puffer E: 400 mM Saccharose
20 mM Trizin pH 7.4 (NaOH)
5 mM MgCl₂
0,002 % PMSF
10 % (v/v) Ammoniumsulfat
1 mM ATP
20 % Glyzerin
50 mM DTT
1 % (w/v) Natriumcholat
2 % Dodecyl- β -D-maltosid

3.2.4 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Das Volumen des Überstandes des letzten Zentrifugationsschrittes wurde bestimmt und mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung pH 7-8 bis zu einer Endkonzentration von 38 % (v/v) versetzt. Nach 15 min rühren, wurde die Lösung zentrifugiert (Beckman Coulter Avanti J-26, Rotor Ja 25.50, 20000 x g für 15 min). Das Volumen des Überstandes wurde erneut ermittelt und diesmal mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 48% (v/v) versetzt. Nach 30 min Rühren und erneuter Zentrifugation, wurden die Pellets, die die ATP Synthasen enthielten, weiter durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Dazu wurden diese in Puffer F resuspendiert und gepottert. Das Endvolumen betrug 2 ml. Es wurden noch 8 ml Puffer G sowie DTT (50 mM) und PMSF (0,002 % (w/v)) zugegeben und gerührt.

Puffer F: 50 mM Trizin pH 8 (NaOH)
4 % (w/v) Glyzin
10 % (w/v) Glyzerin
5 mM MgCl₂
5 mM DTT
0,002 % PMSF
0,1 % Dodecyl- β -D-maltosid

Puffer G: 50 mM Trizin pH 8 (NaOH)
0,1 % Dodecyl- β -D-maltosid
5 mM DTT
0,002 % PMSF

3.2.5 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Herstellung der Saccharosedichtegradienten wurden 0,6 M Saccharose in Puffer F gelöst. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit 36 ml gefüllt und bei -20 °C gelagert. Durch das langsame Auftauen bei 4 °C bildet sich der Saccharosedichtegradient wobei die höchste Konzentration an Saccharose am Boden des Röhrchens zu finden ist.

Das durch die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung gereinigte Protein wurde vorsichtig auf 6 Dichtegradienten verteilt und anschließend wurden durch eine 22 bis 24 stündige Zentrifugation bei

104000 x g (Beckman Coulter Optima L-80, Rotor SW28) die Proteine aufgrund ihrer Dichte getrennt. Unter Einfluss der Zentrifugalkraft, wandern die Proteine so weit bis dass ihre Dichte die der umgebenden Saccharose entspricht.

Mit einem Gradientenernter wurden die Röhrchen von unten durchstochen und 500 µl Fraktionen gesammelt. Von jeder zweiten Fraktion wurden 15 µl entnommen und auf einer SDS-PAGE weiter analysiert.

3.2.6 Reinigung von CF₁CF₀ durch Anionenaustauschchromatographie

Die ATP Synthase enthaltenden Fraktionen der Saccharosedichte-zentrifugation wurden vereint und weiter durch eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Jeweils 2 ml Proteinlösung wurden auf die mit Puffer G äquilibrierte Säule (4,6 x 100 mm; POROS® HQ20 Anionenaustauschmaterial von Applied Biosystems) aufgetragen und anschließend mit einem linearen Salzgradient von 0 bis 1,5 M NaCl (Puffer H) eluiert. Es wurden 0,5 ml Fraktionen bei einer Flussrate von 15 ml/min gesammelt. Dieser Lauf wurde so viele Male an der *BioCAD 700 E Perfusion Chromatography Workstation* wiederholt bis die Proteinlösung aufgebraucht war.

Der erste *peak*, der auf dem Profil der HPLC zu sehen war, lag zwischen 0,9 und 1 M NaCl und entsprach der Elution der ATP Synthase. Mittels eines Ultrafiltrationsröhrchens von Amicon/Millipor mit einem Porendurchmesser von 100 kDa wurden diese Fraktionen auf ein Endvolumen von etwa 100 µl konzentriert. Im gleichen Ultrafiltrationsröhrchen wurde der Puffer für die Kristallisationsexperimente ausgetauscht. Das Protein wurde 3-mal gewaschen. Das Endvolumen an Waschpuffer betrug 10 ml. Die Proteinkonzentration wurde mittels des BCA Tests durchgeführt.

Puffer H: 50 mM Trizin pH 8 (NaOH)
0,1 % (w/v) Dodecyl-β-D-maltosid
2 M Natriumchlorid
5 mM DTT
0,002 % (w/v) PMSF

3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes, wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE (modifiziert nach Laemmli, 1970) angewandt. Hierbei werden die Proteine durch die Zugabe des anionischen Detergens SDS denaturiert. Hinzu kommt, dass das SDS

die Eigenladung des Proteins überdeckt, so dass das denaturierte Protein eine negative Nettoladung proportional zu seiner Masse besitzt. Durch die Zugabe eines Reduktionsmittels wie DTT werden Disulfidbrücken reduziert und Proteinuntereinheiten voneinander getrennt.

Es wurden SDS-Gele bestehend aus einem 5%igen Acrylamid-Sammelgel und einem 15%igen Acrylamid-Trenngel gegossen. Die proteinhaltigen Proben wurden mit 4x Probenpuffer versetzt und direkt auf die SDS-PAGE aufgetragen. Um den Banden ein ungefähres Molekulargewicht zuzuordnen zu können, wurde auch immer ein Proteinmarker (*Precision Plus Protein Unstained Standards*, Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Große Gele (32 x 2 cm) liefen über Nacht bei 30 mA und kleine Gele (9 x 10 cm) liefen etwa 1 h bei 50 mA.

	Kleine Gele		Große Gele	
	Sammelgel	Trenngel	Sammelgel	Trenngel
30 % (w/v) Acrylamid	0,5 ml	3,3 ml	5 ml	33,4 ml
0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid				
2,5x Trenngelpuffer		2,7 ml		40 ml
5x Sammelgelpuffer	0,63 ml		6 ml	
Milli-Q-Wasser	1,85 ml	2,15 ml	18,8 ml	26,25 ml
TEMED	3,1 µl	4,13 µl	30 µl	50 µl
10 % (w/s) APS	32,5 µl	28 µl	200 µl	345 µl
4x Probenpuffer:	30 mM Tris			
	30 mM Borsäure			
	0,7 mM EDTA			
	5 mM MgCl ₂			
	50 mM DTT			
	6,7 % (w/v) SDS			
	16,7 % (w/v) Saccharose			
	0,16 % Bromphenolblau			
5x Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/H ₃ PO ₄			
(pH 6,7)	0,5 % (w/v) SDS			

2,5x Sammelgelpuffer: 1,875 M Tris/H₃PO₄
(pH 8,9) 0,25 % (w/v) SDS

10x Elektrodenpuffer: 0,25 M Tris
 1,92 M Glyzin
 0,5 % (w/v) SDS

3.2.8 Silberfärbung von Acrylamidgelen

Nach Beendigung der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteinbanden mittels Silberfärbung (modifiziert nach Heukeshoven und Dernik, 1988) detektiert. Die Nachweisgrenze liegt mit dieser Methode bei 100 pg. Die Proteinbanden erscheinen auf dem Gel braun weil die Silberionen (Ag⁺) mit den Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten der Proteine komplexieren. Die Zugabe von Formaldehyd reduziert die Silberionen dann zu elementarem Silber.

Die Gele wurden von der Gelapparatur entfernt und zunächst 1 h in Fixierlösung auf dem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend weitere 30 min in Inkubationslösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 15 min, erfolgte die Inkubation mit Silbernitrat für 1 h. Nachdem die Gele kurz mit Wasser gewaschen wurden, wurde durch Zugabe des Entwicklers die Reduktion der Silberionen gestartet. Nachdem sich alle Banden gefärbt hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von Zitronensäure gestoppt. Das gefärbte Gel wurde wieder mit Wasser gewaschen, eingeschweißt und digitalisiert. Für kleine Gele reduzierten sich alle Inkubationsschritte auf 10 min.

Fixierlösung: 30% (v/v) Ethanol (technisch)
 10% (v/v) Essigsäure (technisch)

Inkubationslösung: 30% (v/v) Ethanol (technisch)
 0,5% (w/v) Natriumacetat
 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat

Färbelösung: 0,1% (w/v) Silbernitrat

0,01% (v/v) Formaldehyd

Entwickler: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat

0,01% (v/v) Formaldehyd

Stopp-Lösung: 2,3 M Zitronensäure

Größe der Untereinheiten der Chloroplasten ATP Synthase aus Spinat:

α	:	55,4	kDa
β	:	53,8	kDa
γ	:	35,8	kDa
δ	:	20,4	kDa
ϵ	:	14,7	kDa
a	:	25,1	kDa
b	:	20,9	kDa
b'	:	16,4	kDa
c	:	8,1	kDa
CF ₁ CF ₀	:	574,3	kDa

3.2.9 Coomassiefärbung von Acrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blau R-250 bindet unspezifisch an fast alle Proteine. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,1 bis 2 µg Protein. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele aus der Apparatur entfernt und in Färbelösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurden die blau gefärbten Gele anschließend mit Entfärbelösung entfärbt, bis dass die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden waren.

Färbelösung: 0,1 % (v/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
50 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 30 % (v/v) Ethanol
7 % (v/v) Essigsäure

3.2.10 Pufferwechsel und Proteinkonzentrierung

In einem Konzentrationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa wurden die Fraktionen aus der Saccharose-Dichte-zentrifugation bzw. die ATPase haltigen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie bei 4 °C und 5000 x g auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Anschließend erfolgte ein Pufferwechsel im Konzentrador. In drei Schritten wurde dem konzentrierten Protein Waschpuffer I (WPI) oder Waschpuffer II (WPII) zugesetzt und erneut das Volumen durch Zentrifugation reduziert. Die Endverdünnung betrug 1:10.

WPI:

- 25 mM Trizin pH 8.0
- 10 % (w/v) Glyzerin
- 4 % (w/v) Glyzin
- 2 mM MgCl₂
- 0,02 % (w/v) NaN₃
- 0,002 % (w/v) PMSF
- 0,1 % (w/v) β-D-Dodecyl-maltosid
- Sterilfiltriert (0,2 µm)

WPII:

- 25 mM Bis-Tris-Propan pH 6,5
- 10 % (w/v) Glyzerin
- 4 % (w/v) Glyzin
- 2 mM MgCl₂
- 0,02 % (w/v) NaN₃
- 0,002 % (w/v) PMSF
- 35 mM 10-HEGA-C
- Sterilfiltriert (0,2 µm)

3.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit dem BCA Test (Pierce) bestimmt. Bei dieser Methode reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit den Cystein-, Tyrosin- und Tryptophanresten der Proteine zu einwertigen Kupferionen. Zusammen mit der Bicinchoninsäure

entwickelt sich ein violetter Farbstoff, dessen Absorption bei $\lambda = 562$ nm photometrisch bestimmt wird.

Um Aggregate zu entfernen, wurde die Proteinlösung zuvor für 2 min bei 14000 x g zentrifugiert. Von einer 1:5 verdünnte Proteinlösung wurden 5 μ l zur Bestimmung der Konzentration eingesetzt. Ausgehend von einer 2 mg/ml BSA-Stammlösung wurde eine Eichreihe erstellt. Das BCA wurde entsprechend der Gebrauchsanweisung eingesetzt. Die Proben wurden dann bei 37 °C für 20 min inkubiert und anschließend die Intensität der Violettfärbung am UV-Vis Spektrometer (Beckmann Coulter DU800) ermittelt.

3.3 Reinigung von Lamellen-Lipiden aus Spinatchloroplasten

3.3.1 Reinigung von intakten Chloroplasten

10 g frisch gepflückte Spinatblätter wurden gewaschen und zusammen mit 20 ml gekühlten Puffer L1 für 30 s im Mixer homogenisiert und durch Gaze filtriert. Das Filtrat wurde bei 200 x g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wieder bei 600 x g für 12 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer L2 resuspendiert und wieder bei 600 x g für 25 min zentrifugiert.

Puffer L1: 0,5 M Saccharose
 0,1 M K_2HPO_4
 0,01 M EDTA pH 7,2

Puffer L2: 0,5 M Saccharose
 2 mM K_2HPO_4
 0,2 mM EDTA pH 7,2

3.3.2 Entfernung der äußeren und inneren Chloroplastenmembran

Das Chloroplastenpellet wurde in 15 ml hypotonischen Puffer L3 resuspendiert und in einem Glaspotter für 15 min auf Eis gelagert. Es wurde 10 Mal gepottert und wieder für weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Der Suspension wurde das gleiche Volumen an Puffer L4 zugesetzt und gemischt. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 10 min und 4 °C wurden die 30 ml Überstand mit einer Pipette vorsichtig auf 6 ml Puffer L4 gegeben und für 1 h bei 25000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μ l Puffer L3 resuspendiert (nach Poincelot, 1973).

Puffer L3: 50 mM HEPES pH 7,2

Puffer L4: 50 mM HEPES pH 7,2
30 % (w/v) Saccharose

3.3.3 Lipidisolierung nach der Methode von Bligh & Dyer (1959)

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur unter dem Abzug durchgeführt und es wurden nur saubere Glasvials verwendet. Der Lipidlösung wurde wie in folgender Tabelle dargestellt gereinigt:

Probenvolumen	0,5 ml
1:2 Chloroform:Methanol	1.9 ml
Chloroform	0,625 ml
destiliertes Wasser	0,625 ml
<hr/>	
Endvolumen	3,65 ml

Nach jedem Schritt wurde die Probe gevortext und der Deckel zum Entgasen geöffnet. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bildeten sich zwei Phasen. Die untere organische Phase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette entnommen.

In einem zweiten Reinigungsschritt wurde zunächst eine authentische obere Phase hergestellt. Dazu wurden alle Schritte wiederholt und die Probe durch Wasser ersetzt. 1 ml organische Lipidlösung wurden dann zusammen mit 2,25 ml authentische obere Phase gevortext und erneut zentrifugiert. Die untere Phase wurde abermals mit der Glaspipette entnommen.

Das Chloroform wurde im Extinkator entfernt und die Ausbeute errechnet. Die trockenen Lipide wurden unter Stickstoffdampf verschlossen und zusätzlich mit Paraffilm abgedichtet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.3.4 Dünnschicht Chromatographie zur Trennung und qualitativen Bestimmung der Lamellen Lipide

Bei der Dünnschichtchromatographie wandert eine mobile Phase an einer stationären Phase aufwärts wobei es zur Auftrennung von Substanzen aufgrund ihrer funktionellen Gruppen kommt.

Desto stärker die Adsorptionswechselwirkungen zwischen der aufzutrennenden Substanz mit der stationären Phase sind, umso mehr wird die Wanderungsgeschwindigkeit im Bezug zur Lösungsmittelfront geschwächt.

Eine 20 x 10 cm Kieselgel-60-Platte wurde für 10 min bei 110 °C in den Trockenschrank gelegt. Die gereinigten Lipide (gelöst in Chloroform) wurden mit einer Glaskapillare im unteren Bereich der Platte aufgetragen. Mit einem Ventilator wurde die Platte getrocknet. Die Platte wurde in eine äquilibrierte Kammer befüllt mit 85 ml Chloroform, 25 ml Methanol, 15 ml Eisessig und 3 ml H₂O gegeben. Nach 2-3 h, kurz bevor die Lauffront das obere Ende der Platte erreicht hatte, wurde die DC-Platte aus der Kammer entnommen und die Lauffront mit einem Bleistift markiert. Die Platte wurde abermals für 30 min mit dem Ventilator unter dem Abzug getrocknet. Zur Färbung der Banden wurde die Platte in eine äquilibrierte Iodkammer getan. Nach 10 bis 15 min hatten sich die Banden gefärbt und wurden nach dem Herausnehmen mit einem Bleistift markiert. Unter dem Ventilator haben sich die Banden wieder entfärbt. Anhand der R_F-Werte konnten die Banden den Lipiden zugeordnet werden.

3.3.5 Bestimmung der an der CF₁CF₀ ATP synthase gebundenen Lipide

Aus 1 mg Protein wurde nach der unter 3.3.4 beschriebenen Methode die an den Proteinkomplex fest gebundenen Lipide isoliert und anschließend mit der Dünnschicht Chromatographie ausgewertet.

3.4 Kristallisationsversuche mit der CF₁CF₀ ATP Synthase aus Spinat Chloroplasten

3.4.1 Kristallisation des c₁₄-Rotorringes

Für die Kristallisation des c₁₄-Rotorringes wurde das in WPI oder WPII umgepufferte Protein verwendet. Nach der Proteinbestimmung mit dem BCA Test wurde die Proteinkonzentration auf 6 mg/ml (für WPI) bzw. auf 5 mg/ml (für WPII) eingestellt. Der Proteinlösung wurde ADP (pH 7-8) in einer Endkonzentration von 4 mM zugesetzt und nach leichtem Schwenken für 30 min inkubiert.

Kristallisationslösung I: 30 % (v/v) PEG 400
 (für WPI) 100 mM CdCl₂
 100 mM Natriumacetat pH 4,6

Sterilfiltriert (0,2 µm)
(Crystal Screen 2 # 12, Hampton Research)

Kristallisationslösung II: 30 % (v/v) PEG 400
(für WP11) 100 mM CdCl₂
100 mM Natriumacetat pH 4,6
100 mM LiCl₂
Sterilfiltriert (0,2 µm)

Für die Kristallisationsansätze wurde die hanging drop Methode verwendet. 3 µl der Proteinlösung wurden mit 3 µl der Kristallisationslösung leicht vermischt und gegen ein Reservoir von 400 µl aquilibriert. Die Kristallisationsplatten wurden anschließend bei 15 °C im Inkubator gelagert (teilweise aus Vollmar et al, 2009).

3.4.1.1 Optimierungversuche der c₁₄-Rotorring Kristalle

Um die Streuqualität der Kristalle zu verbessern wurde die Komposition der Kristallisationsansätze variiert. Folgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung dar:

ADP Konzentration	1 – 10 mM
Austausch des CdCl₂ durch	CuSO ₄ , CuCl ₂ , LiCl ₂ , NiSO ₄ , CrCl ₂ , FeSO ₄ , FeCl ₂ , MgCl ₂ und Kombinationen
Variation des Volumens des Kristallisationstropfens	1 µl + 1 µl und 2 µl + 2 µl im hanging drop
Kristallisationsmethoden	microbatch (1 µl + 1 µl) und sitting drop (1 µl + 1 µl gegen 60 µl Reservoir)
Proteinkonzentration	1 – 12 mg/ml
partieller Detergensaustausch an der HQ20 Säule	0,075% DDM + 0,025% C ₁₂ E ₁₀ 0,075% DDM + 0,025% C ₁₂ E ₉ 0,075% DDM + 0,025% C ₁₂ E ₈
pH Screening	pH Endwerte im Kristallisationsansatz: 4, 5, 6, 7 und 8
Detergengkonzentration	1 % DDM

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die getesteten Inhibitoren und Additiva:

Inhibitor		Additiv	
0,1 und 25 mM	Triphenylzinn	0,1 und 10 mM	Heptantriol
25 mM	Triphenylblei	10 mM	Spermidin
50 µM	Phloridizin	10 mM	Spermin
0,1 mM	Tentoxin	1 mM	AMPPNP
50 µM	DCCD	5 mM	DTT

Seeding Experimente:

Ein Kristall wurde in einem Eppendorfgesäß mit 25 µl Kristallisationspuffer II und 25 µl WP II für 9 s gevortext. Von dieser Mischung wurden, mit der Kristallisationslösung II, drei Verdünnungen hergestellt: 1:10, 1:100 und 1:1000. 3 µl der Proteinlösung wurden dann mit 3 µl der jeweiligen Kristallisationslösungen vermischt und über 400 µl Reservoir äquilibriert. Die *hanging drop* Platten wurden bei 15 °C gelagert.

3.4.2 Kristallisationsversuche mit der intakten ATP Synthase

3.4.2.1 Kristallisationsversuche mit der lipidic sponge phase Methode

1 µl Proteinlösung (in Waschpuffer III + 1-4 mM ADP) wurden zu einem µl der verschiedenen sponge phase Lösungen aus dem Lipidic-Sponge Phase™ Screen von Molecular Dimensions nach Anleitung pipettiert. Verwendet wurde die hanging drop Methode. Die Platten wurden bei 21 °C gelagert.

WP III:

- 25 mM Trizin pH 8.0
- 5 % (w/v) Glyzerin
- 2 mM MgCl₂
- 0,002 % (w/v) PMSF
- 0,01 % (w/v) Dodecylmaltosid
- Sterilfiltriert (0,2 µm)

Reservoirlösung: 0,1 g/L Na/KPO₄
 0,55 M Natriumacetat
 0,75 M HEPES
 Sterilfiltriert (0,2 µm)

Selbst hergestellte *lipidic sponge phase* Lösungen:

Es wurden 10 g Präzipitanz abgewogen und in 7,5 g Puffer auf dem Taumelschüttler gelöst. Davon wurden 233 mg in ein Glasvial abgewogen. Das Monoolein (Nu-Chek Prep) wurde auf 60 °C erwärmt und 100 mg wurden zur Präzipitanz/Puffer Mischung gegeben. Das Glasvial wurde mit einem Deckel verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Die Mischung wurde dann über Nacht im Roller bei 37 °C homogen gemischt. Am nächsten Tag wurde die *sponge phase* Lösung für 35 min bei 20 °C und 5500 x g zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 21 °C.

getestete Proteinanfängskonzentrationen: 5, 6, 10, 12, 15, 20, 24, 25, 30, 35 und 36 mg/ml

getestete Präzipitanzen: 40 % (w/w) PEG 20000
 40 % (w/w) PEG 1500
 40 % (w/w) PEG 400
 22 % (w/w) PPO
 30 % (w/w) PPO

getestete Puffer: 50 mM HEPES pH 8,5
 50 mM MES pH 6,5
 100 mM BTP, HEPES, Trizin oder Tris pH 8,5 und 9
 sterilfiltriert (0,2 µm)

zusetzte Lipide: 0,1 – 0,5 mg gereinigte Lamellen Lipide aus Spinatchloroplasten
 2,5 mg Lecithin

getestete Inhibitoren:	Triphenylzinn im molaren Verhältnis 1:1 sowie 1 μM 1 μM Triphenylblei DCCD im molaren Verhältnis 14:1 sowie 1 μM Tentoxin im molaren Verhältnis 1:1 sowie 0,1 μM Phloretin im molaren Verhältnis 1:1 sowie 50 μM Phloridizin im molaren Verhältnis 1:1 sowie 50 μM Venturicidin A im molaren Verhältnis 1:1 sowie 1-4 μM 0,02 % (w/v) NaN_3
weitere Nukleotide:	2 mM AMPPNP
getestete Additive:	1,2 M Litiumsulfat 0,01 M Spermin 0,02 M Triethylamin 3 % (v/v) MPD 1 % (v/v) Jeffamine 600 (v/v) gelöst in WPIII
weitere getestete Zusatzstoffe:	100 mM NaCl 5-10 % MPD Arginin im molaren Verhältnis 14:1 Cadmium im molaren Verhältnis 14:1 oxidiertes Glutathion im molaren Verhältnis 4:1
Variation des Volumens des Kristallisationstropfens:	1 μl Protein + 1 μl LSP, 1 μl LSP + 1 μl Protein, 2 μl Protein + 1 μl LSP, 2 μl LSP + 1 μl Protein, 1 μl Protein + 2 μl LSP, 1 μl LSP + 2 μl Protein
zugesetzte Fluorophore:	Lucifer Yellow VS im molaren Verhältnis 1:1

3.4.2.2 Kristallisationsversuche mit Zusatz von Lipiden

Das gereinigte Protein wurde in den Waschpuffern I oder II umgepuffert. Es wurden Lamellen Lipide aus Chloroplasten gereinigt. Davon wurden 0,5 mg in 250 μ l WPI bzw. WPII gelöst. Die Lipidlösungen wurden mit dem gleichen Volumen an Proteinlösung vermennt und es wurden 4 mM ADP zugesetzt. Die getesteten Proteinendkonzentrationen betragen 5 und 12 mg/ml. Kristallisationsansätze wurden mit der *hanging drop* Methode durchgeführt (3 μ l + 3 μ l auf 400 μ l Reservoirlösung). Es wurden zwei Temperaturen getestet: 15 und 21 °C.

Kristallisationslösung I: 30 % (v/v) PEG 400
(für WPI) 100 mM CdCl₂
100 mM Natriumacetat pH 4,6
Sterilfiltriert (0,2 μ m)

Kristallisationslösung II: 30 % (v/v) PEG 400
(für WPII) 100 mM CdCl₂
100 mM Natriumacetat pH 4,6
100 mM LiCl₂
Sterilfiltriert (0,2 μ m)

Kristallisationslösung III: 40 % (w/w) 100 mM Tris pH 9
(für WPI) 30 % (w/w) PEG 1500

getestete Inhibitoren: 1 und 4 μ M Venturicidin A
1 μ M Triphenylzinn

getestete Additive: Additives Screens 1, 2 und 3 (Hampton Research)

3.4.2.3 Kristallisationsversuche mit CF_1CF_0 solubilisiert mit LPD-12

Das gereinigte CF_1CF_0 wurde in WPIII umgepuffert und konzentriert. Nachdem die Proteinkonzentration ermittelt wurde, wurde LPD-12 im molaren Verhältnis 21:1 zugesetzt. Im Konzentrator (MWCO 10 kDa) wurde die Proteinlösung mit WPIII ohne DDM gewaschen und konzentriert. Die Endverdünnung betrug 1:10. Das Konzentrat wurde 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert um Aggregate zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde auf 10 mg/ml eingestellt und mit 10 mM ADP, 1 mM AMPPNP und oxidiertes Glutathion (4:1) oder DTT (1 mM) inkubiert. Zur farblichen Markierung wurde noch Lucifer Yellow VS im molaren Verhältnis 1:1 zugesetzt

Das erste Screening mit kommerziellen Kits erfolgte im Microbatch Verfahren bei 21 °C. Dabei wurde 0,5 µl Proteinlösung mit 0,5 µl der Kristallisationslösungen vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Verwendet wurden Terazaki 72 well Platten.

Die ersten Kristalle wuchsen in der PEGs Suite # 23:

Kristallisationslösung: 0,1 M Tris/HCl pH 8,5
25 % (w/v) PEG 1000

Optimierungsversuche:

zugesetzte Puffer	25 mM BTP, Tris und HEPES
getestete Proteinkonzentration	5 und 10 mg/ml
getestete Präzipitanzen	PEG 400, PEG 4000, Ethylenglycol
getestete pH Werte	7-9
getestete Präzipitanzkonzentrationen	25, 30, 35 und 40 % (w/v)
getestete Inhibitoren	Venturicidin A im molaren Verhältnis 14:1
andere getestete Zusatzstoffe	Arginin im molaren Verhältnis 14:1
Kristallisationsmethoden	Mikrobatch, hanging drop
Kristallisationstemperaturen	21 °C und 15 °C

Kontrollansätze:

Zur Kontrolle wurden Kristallisationsansätze durchgeführt, in denen das DDM nicht gegen das LPD-12 getauscht wurde.

3.5 Heterologe Expression in *E. coli* und Reinigung des CF₁γ-Thioredoxin_{E. coli} Fusionsproteins und der F₁ ATPase aus *T. elongatus*

3.5.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen

Transformationkompetente Zellen sind in der Lage zirkuläre DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Diese Kompetenz kann mit Chemikalien induziert werden. Bei einem Hitzeschock kann die DNA dann durch die in der Membran erzeugten Poren strömen. Auf diese Weise können Proteine heterolog in Wirtsorganismen produziert werden.

Hier wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet. *E. coli* Zellen der Stämme XL1-Blue, BL21 (DE3) und Rosetta-gamiTM (DE3) wurden in 5 ml 2YT-Medium in sterilen Reagenzgläsern über Nacht angezogen (37 °C, 180 UpM). Diese Kulturen dienten der Animpfung von 100 ml 2YT-Medium im Verhältnis 1:100. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5 min, 2000 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem Puffer TFB 1 resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 4 ml Puffer TFB 2 aufgenommen und 30 min auf Eis gelagert. 50 µl wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

TFB 1 (pH 5,8): 30 mM Kaliumacetat pH 5,8

10 mM CaCl₂

100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

15% (w/v) Glycerin

(sterilfiltriert)

TFB 2 (pH 6,5): 10 mM MOPS pH 6,5

75 mM CaCl₂

10 mM RbCl

15% (w/v) Glycerin

(sterilfiltriert)

3.5.2 Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock

Für die transformation kompetenter Zellen mit der Plasmid-DNA, wurden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 µl DNA (100-200 ng) erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Dem Ganzen wurden 300 µl 2YT-Medium zugesetzt und für 30 min bei 37 °C im Thermocycler (700 UpM) geschüttelt. 50 µl wurden entnommen und auf einer 2YT-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Anschließend wurden die Platten immer autoklaviert und entsorgt.

3.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus XL1-Blue erfolgte mit dem *QIAprep® Spin Miniprep-Kit* der Firma Qiagen. Die DNA wurde nach den Angaben im Handbuch gereinigt und die isolierte DNA wurde in 50 µl Wasser (Milli-Q-Wasser) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA kann photometrisch bestimmt werden. Dabei macht man sich das Absorptionsmaximum der aromatischen Basen bei 260 nm zunutze. Es wurde 1 µl der DNA-Lösung eingesetzt und mit Wasser, in einer Mikroquarzküvette (Micro Cell 8mm, Beckman Coulter, Krefeld), auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Die Messung geschah im Spektralphotometer (Beckman Coulter, Krefeld). Einer optischen Dichte von eins entsprechen 50 µg DNA.

3.5.5 Heterologe Expression des CF₁γ-Thioredoxin_{E. coli} Fusionsproteins und der F₁ ATPase aus *T. elongatus*

Die Expression des CF₁γ-Thioredoxin_{E. coli} Fusionsproteins erfolgte in Rosetta-gamiTM (DE3) Zellen und die Expression von der F₁-ATPase aus *T. elongatus* in BL21 (DE3).

Für die Vorkultur wurden 500 ml 2YT-Medium mit Antibiotika versetzt (Rosetta-gamiTM (DE3): 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol; BL21 (DE3): 100 µg/ml Ampicillin) und mit einer Einzelkolonie (transformierte Zellen) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 UpM

kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 1 L 2YT-Hauptkulturen mit 30 ml der Vorkultur angeimpft. Bei 30 °C (Rosetta-gami™ (DE3)) bzw. 37 °C (BL21 (DE3)) wuchsen die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8. Bei dieser optischen Dichte wurde die Expression des Zielproteins dann durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM (Rosetta-gami™ (DE3)) bzw. 0,2 mM (BL21 (DE3)) induziert.

Etwa 4 bis 5 h nach Induktion erfolgte die Zellernte. Hierzu wurden die Zellen für 5 min bei 7.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in einem Greinerröhrchen vereint und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse der Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die mit Probenpuffer versetzten Proteinproben, die ganze Zellen enthielten zuvor für 10 min bei 95 °C gekocht wurden.

Bei Proben von ganzen Zellen wurden folgende Mengen auf die Gele aufgetragen:

Auftragsvolumen für große Gele [μl] = 7,5/OD₆₀₀

Auftragsvolumen für ein Mini-Gel [μl] = (7,5/OD₆₀₀)*3/4

3.5.7 Silberfärbung von Acrylamidgelen

Die Färbung von Acrylamidgelen erfolgte wie unter 3.2.8 bereits beschrieben.

Größe der Untereinheiten der thermophilen F₁ ATP Synthase aus *T. elongatus*:

α	:	54,3	kDa
β	:	53,6	kDa
γ	:	35,9	kDa
ε	:	14,8	kDa
F ₁	:	374,4	kDa

3.5.8 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Bei dieser Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration, komplexiert der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinketten. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 470 nm (ungebunden, kationisch) nach 595 nm (gebunden,

anionisch). Zudem ist der Extinktionskoeffizient der gebundenen Sulfatform sehr viel höher als der des ungebundenen Farbstoffes. Somit erklärt sich die hohe Empfindlichkeit dieses Testes. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 1-200 µg/ml.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay durchgeführt. Das gewählte Volumen an Proteinprobe wurde mit Wasser auf 100 µl gebracht und mit 900 µl des 1:5 verdünnten Bradfordreagenzes versetzt. Parallel dazu wurde eine Eichreihe mit BSA (0 – 10 µg/ml) nach dem gleichen Schema pipettiert. Zusätzlich wurde der Eichreihe noch das gleiche Volumen Puffer wie der Proteinlösung zugesetzt um Störungen (verursacht z.B. durch Detergenzien und Reduktionsmittel) durch den Puffer auszuschließen. Nach 5 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 595 nm photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit der Eichgeraden berechnet.

3.6 Reinigung des CF₁γ-Thioredoxin_{E. coli} Fusionsproteins

3.6.1 Zellaufschluss

50 g Zellen wurden in einem Standzylinder mit Rührfisch und 250 ml Aufschlusspuffer gegeben. Im Kühlraum (4 °C) wurde die Lösung so lange gerührt bis sich die Zellen im Puffer gelöst hatten. Jeweils 30 ml Zellsuspension wurden mit dem Ultraschallstab (Stufe 2, 50 %) aufgeschlossen.

5x {
 1 min Ultraschall
 1 min auf Eis kühlen

Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 20 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Protein befand sich im Überstand.

Aufschlusspuffer pH 7,5: 50 mM K₂HPO₄
 50 mM KCl
 0,002 % (w/v) PMSF

3.6.2 Reinigung über Metallchelatchromatographie

Zur weiteren Reinigung des Proteins wurde die Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie eingesetzt.

Vier Säulen wurden mit jeweils 9 ml Ni-NTA Material (Sigma) befüllt und mit Puffer äquilibriert. Der Überstand nach dem Zellaufschluss wurde gleichmäßig auf die vier Säulen verteilt. Anschließend wurden die Säulen mit 20 Säulenvolumen gewaschen. Das gebundene Protein ist in Form einer intensiv gelb gefärbten Bande auf der Säule zu sehen. Mit dem 2fachen Säulenvolumen an Elutionspuffer wurde das Protein dann von der Säule eluiert. Dabei wurden nur die intensiv gelben Tropfen gesammelt. In einem Konzentrationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa wurden die vereinigten Elutionsfraktionen auf ein Endvolumen von 1 ml reduziert. Die konzentrierte Lösung wurde dreimal im Konzentrator mit Aufschlusspuffer gewaschen um das Imidazol zu entfernen und anschließend mit Proteaseinhibitor der Firma Roche versetzt.

Elutionsspuffer pH 7,5: 50 mM K_2HPO_4
 50 mM KCl
 300 mM Imidazol

3.6.3 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Das Volumen der konzentrierten Proteinlösung wurde genau ermittelt. Anschließend wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 46,5 % zugesetzt. Die Lösung wurde im Kühlraum (4 °C) eine halbe Stunde gerührt und dann zentrifugiert (17700 x g, 20 min und 4 °C). Dem Überstand wurde erneut Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 85 % zugegeben und wieder gerührt und zentrifugiert. Das zweite gelbliche Pellet wurde in Aufschlusspuffer vorsichtig durch Schwenken resuspendiert. Um Aggregate zu entfernen wurde die Proteinlösung für 2 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Um Ammoniumsulfatreste zu entfernen wurde die Proteinlösung in einem Konzentrator mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa mehrmals gewaschen und auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht. Dem Protein wurde erneut Proteaseinhibitor der Firma Roche zugesetzt.

3.6.4 Präparative Gelfiltration

Die konzentrierte Proteinlösung wurde erneut zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde vollständig auf eine mit Puffer G äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiPrep 16/60 Sepharyl S-200 High Resolution) aufgetragen. Die Gelfiltration lief bei einer Flussrate von 0,1 ml/min und einem Druck von 0,2 MPa über Nacht. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen, die

das Protein enthielten waren intensiv gelb gefärbt. Proben dieser Fraktionen wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

Puffer G pH 7,5: 50 mM K_2HPO_4
 200 mM KCl
 0,02 % (w/v) NaN_3
 durch 0,2 μm Filter filtriert und entgast.

3.6.5 Proteinkonzentrierung

Um das Protein für Kristallisationsversuche einsetzen zu können, wurden die Fraktionen aus der präparativen Gelfiltration vereinigt, in einem Konzentrationsröhrchen mit Ausschlussgröße 30 kDa konzentriert und der Puffer durch dreimaliges Waschen (Endverdünnung 1:10) gewechselt.

Puffer K1 pH 7,5: 25 mM Tris/HCl
 0,02 % (w/v) NaN_3
 Sterilfiltriert (0,2 μm)

3.6.6 Analytische Gelfiltration

Zur Determinierung der Homogenität und des Molekulargewichtes des gereinigten Fusionsproteins wurde eine analytische Gelfiltration wie zuvor unter 3.6.4 beschrieben durchgeführt mit dem Unterschied, dass das konzentrierte und gereinigte Protein auf die Säule aufgetragen wurde. Um das Molekulargewicht berechnen zu können, wurde zunächst das Totvolumen der Säule mit Dextranblau (500 μl einer 1-2 mg/ml konzentrierten Lösung) bestimmt und anschließend drei Standardproteine bekannten Molekulargewichtes auf die Säule aufgetragen. Durch Vergleich des Elutionsvolumens der Standardproteine mit dem Elutionsvolumens des Fusionsproteins wurde das Molekulargewicht berechnet.

Standardprotein	Konzentration	aufgetragenes Volumen
Albumin	10 mg/ml	400 μl
Alkoholdehydrogenase	5 mg/ml	400 μl
B-Amylase	4 mg/ml	400 μl

3.6.7 Kristallisationsansätze bei 19 °C

Die Proteinkonzentration wurde mit Bradford ermittelt und auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml mit Puffer K1 gebracht. Proteaseinhibitor der Firma Roche wurde zugesetzt. Für Kristallisationsansätze mit reduziertem Protein wurde DTT in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. 100 µl Fraktionen wurden in Eppendorfhütchen gefüllt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur Kristallisation wurden die Fraktionen bei -80 °C gelagert.

Kristallisationsansätze wurden hauptsächlich in European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Hamburg in Rahmen eines PCube funding bei 19 °C durchgeführt (Mueller-Dieckmann, 2006). Getestet wurden Kristallisationsbedingungen, die identisch sind zu kommerziell erhältlichen Kits, die aber vom Roboter aus Stammlösungen selbst gemischt werden. Es wurden Innovadyne SD2 (MRC) sitting drop Platten verwendet. Die Kristallisationsansätze wurden mit einem Roboter im Nanoliterbereich pipetiert.

3.6.8 Optimierung der Kristallisationsbedingung

Die ersten Kristalle wuchsen in der PEGs II suite # 17:

Kristallisationslösung: 15% (w/v) PEG 1500

Zuerst wurde versucht die Kristalle durch den Zusatz von verschiedenen Salzen zu verbessern. Dazu wurden die Salzlösungen der Opti-Salts Suite 1:10 mit der Kristallisationslösung vermischt und die Kristallisationsansätze wie zuvor pipetiert.

Weiterhin wurde ein pH und PEG-Konzentration Screening durchgeführt. Dazu wurde ein Multipuffer (Newman, 2004) verwendet. 2,6 g Malonsäure, 2,55 g Imidazol und 2,32 g Borsäure wurden in 100 ml H₂O gelöst und der pH Wert mit HCl auf 4 eingestellt. Anschließend wurde die gleiche Lösung nochmal hergestellt und diesmal der pH Wert auf 10 mit NaOH eingestellt. Durch Mischen dieser beiden Puffer wurde ein pH Gradient (von 0 % pH 4 bis 100 % pH 4 in 10 % Schritten) erstellt. Zudem wurde die PEG Konzentration zwischen 5 % und 40 % in 5 % Schritte variiert. Dieses Screening wurde sowohl ohne als auch mit Salz (20 mM NaCl) bei 21 °C und bei 15 °C getestet.

3.6.9 Kristallisationsansätze bei 4 °C

Für das oxidierte wie für das reduzierte Fusionsprotein wurde ein screening mit den unter 4.1.7 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Screens bei 4 °C durchgeführt. Die Kristallisationsversuche wurden mit der Mikrobatch Methode durchgeführt. Es wurden 96 wells Imp@ct Platten verwendet. 0,5 µl Proteinlösung wurden mit 0,5 µl Kristallisationslösung vorsichtig vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Proteinendkonzentration in den Kristallisationsansätzen betrug 5 mg/ml. Die Platten wurden im Rock Imager 1000 (Formulatrix) gelagert und regelmäßig fotografiert.

3.7 Reinigung der F₁ ATP Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus*

3.7.1 Zellaufschluss und Hitzeaktivierung

Die bei -80 °C gelagerten Bakterienpellets wurden in Puffer I resuspendiert (1 ml Puffer auf 0,2 g Pellet), mit PMSF versetzt (Endkonzentration 0,002 % (w/v)) und zweimal mit der French Press aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde für 20 min bei 18 °C und 18.000 g zentrifugiert. Zur Hitzeaktivierung des Proteins, wurde der klare Überstand für 1 h bei 55 °C bei 300 rpm im Thermocycler aktiviert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Protein weiter durch Metallchelatchromatographie gereinigt.

Puffer I:

- 50 mM HEPES pH 8,5
- 100 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 50 mM Imidazol pH 8,5

3.7.2 Reinigung über Metallchelatchromatographie

Die F₁ ATPase wurde weiter über eine Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Dazu wurde eine Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen äquilibriert (Puffer II). Der Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes wurde zum Säulenmaterial gegeben (Überstand von 1,75 g Zellen auf 1 ml Säulenvolumen) und 15 min im Batchverfahren auf dem Taumelschüttler inkubiert. Die Säule wurde mit dem 10-fachen Volumen gewaschen (Puffer I) und mit den 3-fachen Volumen an Puffer II eluiert.

Zur Regenerierung der Säule wurde diese 30 min auf dem Taumelschüttler mit dem 3-fachen Volumen 0,5 M NaOH inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit dem 10-fachen Volumen H₂O gewaschen und das Säulenmaterial in 25% Etanol p.a. gelagert.

Puffer II: 50 mM HEPES pH 8,5
 100 mM KCl
 5 mM MgCl₂
 250 mM Imidazol pH 8,5

3.7.3 Nukleotidbeladung des Komplexes

Das Eluat wurde mit 0,002 % (w/v) PMSF, 0,1 M ADP und 0,1 M ATP versetzt. Das Ganze wurde für 1 h inkubiert. Das Volumen des Eluates wurde mittels eines Konzentrators (MWCO 100 kDa, 20 °C, 5000 g) auf 2,5 ml gebracht. Die nicht gebundenen Nukleotide und das Imidazol wurden über eine PD10 entfernt. Hierzu wurde das Konzentrat auf eine äquilibrierte Säule gegeben (Puffer III) und anschließend nach dem Einlauf mit 3,5 ml Puffer III eluiert.

Puffer III: 50 mM HEPES pH 8,5
 2 mM MgCl₂

3.7.4 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit der BioCad 700 E Workstation Perfusion Chromatography System durchgeführt. Die Reinigung erfolgte über ein quaternäres Puffersystem mit HQ10 Poros Anionenaustauschmaterial (Pharmacia, Säule POROS® HS M-Series, 4,6 mmD/100mmL).

Verwendete Puffer:

Puffer A: 100 mM Tris-Borat, pH 9

Puffer B: 100 mM Bis-Tris-Propan, pH 6,5

Puffer C: H₂O bidest

Puffer D: 2 M NaCl

Alle Puffer wurden filtriert (0,2 µm) und mit PMSF in der Endkonzentration von 0,002 % (w/v) PMSF versetzt. Nach Äquilibration der Säule wurde mit einem 2 ml Loop 2 ml des Eluates, das zuvor auf eine Endkonzentration von 3 mg/ml gebracht und sterilfiltriert (0,2 µm) wurde, aufgetragen und mit einem linearen Gradienten zwischen 0 bis 1,5 M NaCl eluiert. Der End-pH-Wert der Säule betrug 8,5. Diejenigen Fraktionen, die die komplette F₁ ATPase enthielten wurden vereinigt und konzentriert.

3.7.5 Proteinkonzentration

Zur Konzentrierung der Fraktionen aus der HPLC wurde ein Konzentrationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 100 KDa verwendet. Das Volumen der Fraktionen wurde zunächst auf 100 µl eingengt (20 °C, 5000 g) und anschließend erfolgte ein Pufferwechsel durch dreimaliges Waschen (Endvolumen 10 ml) mit Puffer IV. Das Endvolumen betrug 200 bis 300 µl. Die Endkonzentration wurde mit dem BCA Test (siehe 3.2.11) ermittelt. Das Protein wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer IV: 50 mM HEPES pH 8,5
 100 mM KCl
 2 mM MgCl₂
 0,002 % (w/v) PMSF
 0,02 % (w/v) NaN₃
 1 mM EDTA
 Sterilfiltriert (0,2 µm)

3.7.6 Analytische Gelfiltration

Bei der Gelfiltrations-Chromatographie werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes eluiert. Größere Moleküle passieren die Säule schneller als kleinere Moleküle weil letztere in die Poren der hydratisierten Kugeln eindringen können und so eine größere Strecke durchlaufen. Durch den Vergleich des Elutionsvolumens mit dem von Proteinen bekannten Molekulargewichtes, kann das Molekulargewicht des Zielproteins berechnet werden.

Die Größenausschlusschromatographie wurde mit dem Biosys 2000-FPLC-System bei Raumtemperatur durchgeführt. Verwendet wurde eine äquilibrierte Pharmacia HR 10/30 Säule, befüllt mit Sephadex S-300 Material. Es wurde 1 mg (200 µl) Protein aufgetragen und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen.

Puffer G: 50 mM HEPES pH 8,5
200 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,002 % (w/v) PMSF
0,02 % (w/v) NaN₃
filtriert (0,2 µm)
entgast

3.7.7 Kristallisationsansätze

Die im Folgenden beschriebenen Kristallisationsversuche wurden mit Protein durchgeführt, dass wie in dieser Arbeit beschrieben exprimiert und gereinigt wurde. Kristallisationsversuche, die mit Protein durchgeführt wurden, das über ein älteres Protokoll gereinigt wurde, wurden nicht aufgelistet weil in diesen Versuchen keine Proteinkristalle wuchsen.

Kristallisationsversuche wurden mit der chimären F₁ ATPase ($\alpha_3\beta_3\gamma_{\text{redox}}\epsilon$) und der Wildtyp F₁ ATPase ($\alpha_3\beta_3\gamma$) durchgeführt.

Für die Kristallisationsversuche wurde das Protein auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml in Puffer IV gebracht. Der Proteinlösung wurde 1 mM ADP, 1 mM ATP und 0,5 mM CuSO₄ zugesetzt, leicht geschwenkt und für mindestens 30 min inkubiert.

Für die Kristallisationsversuche wurde die Microbatch Methode (in 96 wells Imp@ct Platten) angewandt. Es wurde die unter 4.1.7 beschriebenen kommerziell erhältlichen Kristallisationskits verwendet. Für jede Bedingung wurden 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Kristallisationslösung vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Alle Screens wurden bei 15 °C, 20 °C und 30 °C getestet.

3.7.7.1 Optimierung der Kristallisationsbedingung

Für die Optimierung der Kristalle wurden Kristallisationsversuche im *batch*, *sitting* und *hanging drop* durchgeführt. Oftmals wurden auch Kontrollansätze pipetiert, die alles enthielten bis auf das Protein. Die ersten Kristalle wuchsen in der JCSG+ Suite Bedingung # 53:

Kristallisationslösung: 100 mM CAPS pH 10,5
 40 % (v/v) MPD
 Sterilfiltriert (0,2 µm)
 (JCSG+ Suite # 53)

Diese anfängliche Kristallisationslösung sowie die eingesetzte Proteinkonzentration wurden variiert:

Proteinkonzentration:	5 – 10 mg/ml
Volumen des Tropfens:	1 µl + 1 µl bis 4 µl + 4 µl
Präzipitanzustausch:	20 % (w/v) PEG 3350
pH screening:	100 mM CAPS pH 8,5 bis 12 in 0,5 Schritten
Temperaturscreening:	Gradient von 4 °C bis 44 °C
Salz im Proteinpuffer:	Das KCl wurde aus dem Proteinpuffer genommen
Pufferaustausch:	100 mM Glyzin

Getestete Additiva:

Zusatz der Kristallisationskits:	10 % von den Kits Classics, PEGs II, MPD, JCSG+ und PEGs Suite
Additives Screens 1, 2 und 3 (Hampton Research)	3 µl Proteinlösung + 3 µl Kristallisationslösung + 0,3 % (v/v) der jeweiligen Additivstammlösungen

4 Die Proteinkristallographie

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann mit der Röntgenkristallographie bis zur atomaren Auflösung bestimmt werden. Neben der Strukturaufklärung dient sie auch dem Verständnis der Funktionsweise eines Proteins wie z.B. dem katalytischen Mechanismus und der Interaktion mit anderen Molekülen. Die Schwierigkeit liegt in der Kristallisation des Proteins. Die Bedingung unter der ein gegebenes Protein kristallisiert, lässt sich nicht vorhersagen. Vielmehr müssen viele hunderte Kristallisationsbedingungen getestet werden, bis dass die richtige Bedingung gefunden ist.

4.1 Methoden der Proteinkristallographie

Für die Proteinkristallisation müssen große Mengen eines Proteins exprimiert und anschließend gereinigt werden. Dabei ist es wichtig, dass das Protein in homogener Form vorliegt. Bei dem Prozess der Kristallisation wird zuerst eine Übersättigung im Kristallisationstropfen erzeugt. Dies geschieht durch die Zugabe eines Präzipitantes. Als Präzipitantien dienen Salze, Polyethylenglykole und Alkohole. Bei einer bestimmten Konzentration des Präzipitantes geht das Protein aus einer übersättigten Lösung in einen festen Phasenzustand über. Es kann zur Bildung eines kritischen Nukleationskeimes und zum Kristallwachstum kommen. Weitere wichtige Faktoren sind der pH Wert und die Temperatur.

Methoden der Kristallisation sind die Batch-Methode, die Dampfdiffusion, die Mikrodialyse und die FID. Kristalle können wenige Tage bis Monate brauchen um zu wachsen.

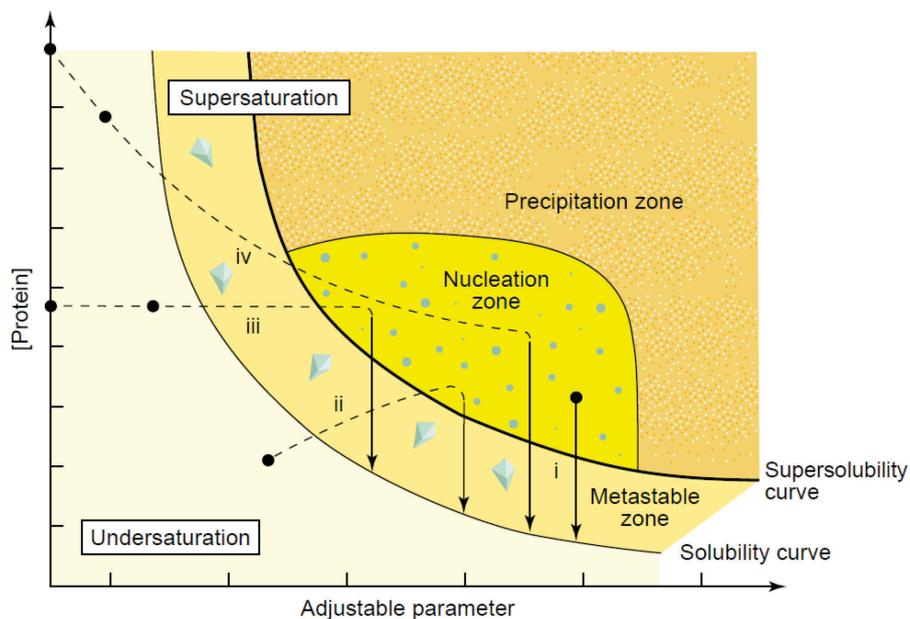


Abbildung 4.1: Phasendiagramm der Proteinkristallisation (Chayen et al, 2004)

Mit der x-Achse sind die Komponenten der Kristallisationslösung (z.B. Präzipitanz- oder Additivkonzentration, pH oder Temperatur) dargestellt. Die Pfeile: (i) Batch, (ii) Dampfdiffusion, (iii) Dialyse und (iv) FID beschreiben die verschiedenen Kristallisationsprozesse. Löslichkeitskurve: thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Lösung und kristalliner Phase. Im Bereich der Untersättigung kann weder Nukleation noch Kristallwachstum stattfinden. In der Nukleationsphase findet de-novo-Keimbildung statt. In der Metastabilen Zone kann nur Kristallwachstum stattfinden. Bei starker Übersättigung findet weder Keimbildung noch Kristallwachstum statt.

4.1.1 Batch Methode

Das Mikrobath-Verfahren ist die Methode, bei der in einem *well* die Proteinlösung mit der Kristallisationslösung im gleichen oder unterschiedlichen Volumenverhältnis vermischt werden. Als Schutz gegen Verdunstung wird der Ansatz mit Öl überschichtet. Mit dieser Methode wird das Protein sofort in den Zustand der Übersättigung gebracht.

4.1.2 Dampfdiffusionsmethode

Bei der Dampfdiffusionsmethode unterscheidet man zwischen der *sitting drop* Methode, der *hanging drop* Methode, der *sandwich drop* Methode, der reversen Dampfdiffusion und der pH Gradient Dampfdiffusion. Im Vergleich zur *batch* Methode werden hier die Tropfen nicht mit Mineralöl überschichtet, sondern gegen ein mit Kristallisationslösung gefülltes Reservoir äquilibriert. Da Anfangs die Proteinkonzentration im Tropfen nur halb so groß ist wie im Reservoir, erhöhen sich die Konzentrationen an Präzipitanz und Protein nur langsam und zwar in dem Maße, wie sich das Volumen des Tropfens durch Diffusion verringert. Bei der *sandwich drop* Methode wird die Oberfläche des Kristallisationstropfens, die mit der Luft in Kontakt steht, reduziert. Auf diese Weise

wird die Diffusionsrate herabgesetzt. Die reverse Dampfdiffusion wird verwendet, wenn das Protein bei geringer Ionenstärke kristallisiert. Das Reservoir hat hier eine niedrigere Konzentration als der Kristallisationstropfen. Die Proteinkonzentration ist zu Beginn sehr hoch und mit der Zeit wird der Tropfen größer und die Proteinkonzentration verringert sich. Die pH Gradient Dampfdiffusion findet Verwendung, wenn der pH-Wert während der Inkubationszeit des Kristallisationsansatzes erhöht oder erniedrigt werden soll. Verwendet werden Acetat-, Ammonium- oder Carbonat-Puffer. Die Essigsäure in der Reservoirlösung erniedrigt den pH-Wert im Kristallisationstropfen mit der Zeit. Ammonium und Natriumcarbonat bewirken eine Erhöhung des pH-Wertes.

4.1.3 Dialyse

Bei der Dialyse wird die Ionenstärke manipuliert. Voraussetzung ist, dass das Protein bei niedrigerer Ionenstärke weniger löslich ist und deshalb kristallisiert. Der umgekehrte Prozess, die Erhöhung der Ionenstärke, ist ebenfalls möglich. Während des Dialyseexperiments bleibt die Proteinkonzentration konstant.

4.1.4 Kristallisation von löslichen Proteinen

Lösliche Proteine sind einfacher zu kristallisieren als Membranproteine. Trotzdem gibt es eine Reihe von Bedingungen, die erfüllt werden müssen bevor ein Protein erfolgreich kristallisiert werden kann. Neben einer Reinheit von mindestens 90 %, ist es wichtig, dass das Protein homogen und monodispers vorliegt. Die Bildung von Aggregaten, Oligomeren oder Clustern erschweren das Vorhaben. Zudem kommt hinzu, dass instabile Konformationen, hohe Flexibilität und Neigungen zum schnellen Denaturieren die Kristallisation vollkommen verhindern können. Es ist wichtig zu ermitteln in welchen pH Bereichen das Protein stabil ist. Wenn das Protein Substrate, Metalle, Liganden oder Inhibitoren bindet, so kann es sein, dass die Ko-Kristallisation mit diesen Stoffen die Kristallisation allgemein erleichtert. Zudem können Glykosylierung, Phosphorylierung, N-terminale Methylierung und His-tags zu Schwierigkeiten führen. Die Stabilität eines Proteins in einem gegeben Puffer ist abhängig von der Ionenstärke, dem pH-Wert, der Temperatur und der Proteinkonzentration.

4.1.5 Kristallisation von Membranproteinen

Membranproteine sind besonders schwer zu kristallisieren, weil diese in Wasser nicht löslich sind und weil die natürliche Lipidmembran Eigenschaften hat, die normale Detergenzien nicht nachahmen können. Häufig verwendete Detergenzien wie Dodecyl- β -D-Maltoside, Oktyl- β -D-

Glukosid, Natriumdodecylsulfat und Lauryldimethylaminoxid (LDAO) schaffen es lediglich, durch Einbettung dieser in eine Detergenzmizelle, die hydrophobe Region des Membranproteins vom Wasser abzuschirmen. Sowohl der laterale Druck, den die Lipidmembran ausübt, als auch die spezifisch gebundene Lipide gehen vollkommen verloren. Zur Folge hat dies, dass es zur Aggregation kommen kann, oder dass die Proteine nicht native Konformationen einnehmen und in Folge dessen auch ihre native Funktion verlieren. Detergenzien bilden oftmals große Mizellen, was dazu führt, dass auch in den Kristallen viel ungeordnetes Detergens enthalten ist. Dies kann erheblich die Streuqualität der Kristalle beeinträchtigen.

Anders hingegen ist die Kristallisation von Membranproteinen in der *lipidic cubic phase* oder in der *lipidic sponge phase*. Bei diesen Methoden kristallisiert das Protein nach Reintegration in eine künstlich geschaffene Membran.

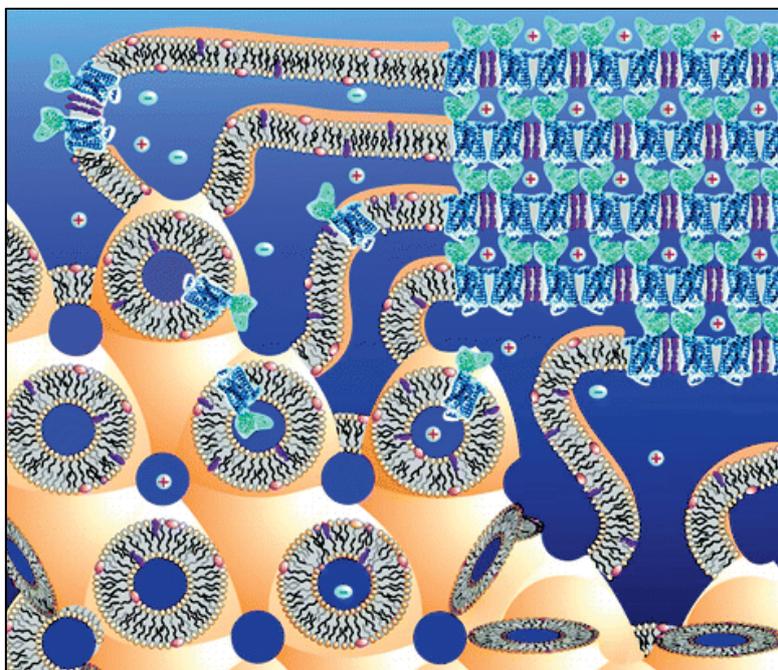


Abbildung 15: Modell, das die Kristallisation von Membranproteinen in einer *lipidic cubic mesophase* erklärt.

Der Prozess beginnt mit der Rekonstitution der gereinigten Proteine in die stark gekrümmte Membran. Die zugesetzten Präzipitantien führen zu einer Verschiebung, die vom Gleichgewicht der kubischen Membranen wegführt. In Folge dessen kann es zu einer Phasenseparation und Kristallisation kommen.

Der Unterschied zwischen der *lipidic cubic phase* und der *lipidic sponge phase* liegt in den Durchmessern der Hohlräume. Die *lipidic cubic phase* eignet sich nur für Membranproteine, die kaum aus der Membran herausragen. Membranproteine mit großen intra- oder extrazellulären Domänen können hingegen nur in der *lipidic sponge phase* kristallisiert werden, da hier die Hohlräume deutlich größer sind.

Annähernd die gleichen Eigenschaften wie eine Membran, übt das Lipopeptiddetergens LPD-12 auf Membranproteine aus. Dieses Detergens besteht aus einer Helix und zwei Fettsäuren

(Abbildung 5.22). Die kritische Mizellenkonzentration des LPD-12 liegt unter 10^{-6} M und kann so leicht gegen ein anderes Detergens wie DDM ausgetauscht werden. Kristallstrukturen von Proteinen, die zuvor mit LPD-12 solubilisiert wurden sind noch keine bekannt, bis auf die Kristallstruktur des Detergenses selber (PDBID 3CBA und 3CAY).

4.1.6 Interpretation des Kristallisationstropfen

Der Kristallisationstropfen kann klar sein, oder es kann zur Ausbildung von Proteinpräzipitat kommen. Bei der Bildung von Präzipitat kann es sein, dass das Protein deshalb präzipitiert, weil es in der Kristallisationslösung instabil ist, oder es kann, infolge der herrschenden Übersättigung, zu einer teilweisen Denaturierung kommen. Im ersten Fall nimmt das Präzipitat eine sehr dunkle Farbe an, andernfalls ist das Präzipitat deutlich heller. In manchen Fällen kommt es zur Ausbildung einer Haut. Wenn das passiert, kommt es für gewöhnlich nicht mehr zu einer Kristallisation. Phasentrennung kann als Vorstufe der Kristallisation erscheinen. Bestenfalls kommt es aber zum Wachstum von Kristallen. Hier muss man zwischen Spheruliten, Kristallen mit unscharfen Kanten, Mikrokristallen, Nadeln, Plättchen und dreidimensionalen Kristallen mit scharfen Kanten unterscheiden.

4.1.8 Analyse von Proteinkristallen

4.1.8.1 Identifizierung von Proteinkristallen

Proteinkristalle werden in erster Linie anhand ihres Streuverhaltens gegenüber Röntgenstrahlung identifiziert. Da Proteine aus sehr vielen Atomen bestehen, sind auch entsprechend viele Reflexe auf dem Diffraktionsbild zu sehen.

Weil Proteinkristalle im Gegensatz zu Salzkristallen große Kanäle zwischen den einzelnen Molekülen besitzen, die mit Pufferlösung gefüllt sind, kann man diese mit dem Farbstoff IZIT Crystal Dye (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) blau färben. Eine Ausnahme stellen Proteinkristalle dar, die eine hydrophobe Oberfläche besitzen. In diesem Fall kann der Farbstoff nicht in die Kristalle hineindiffundieren.

Aufgrund ihres hohen Lösungsmittelgehaltes, das typischerweise zwischen 30-70 % liegt, sind Proteinkristalle gegenüber mechanischer Beanspruchung und Austrocknung sehr empfindlich. Mit einer Kanüle kann in die Kristalle gestochen werden um so auf ihre Stabilität zu schließen.

Eine weitere Methode stellt die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung dar. Dazu werden Kristalle dreimal in Puffer gewaschen und nach Auflösung in SDS-Probenpuffer auf ein Gel aufgetragen. Auf diese Weise kann ermittelt werden, ob das Zielprotein oder eine Verunreinigung kristallisiert wurde. Bei oligomeren Proteinkomplexen kann festgestellt werden welche Untereinheiten des Proteins im Kristall enthalten sind.

4.1.8.2 Frieren von Kristallen

Um die Strahlungsschäden am Kristalle bei einem Röntgenbeugungsexperiment zu minimieren wurden diese zunächst gefroren und während der Messung weiter auf 100 K gekühlt. Damit die Proteinkristalle während des Frierens keinen Schaden nehmen, werden Kryoprotektoren eingesetzt. Diese verhindern, dass sich während des Einfrierens, das Wasser in den Lösungsmittelkanälen des Proteinkristalls ausdehnt. Zu Strahlungsschäden kommt es dann, wenn die Kristalle für einen längeren Zeitraum hinweg der Röntgenstrahlung ausgesetzt sind, wobei es zur Bildung von Radikalen kommt, die eine Kettenreaktion auslösen, die letztlich zur Zerstörung der Proteins führt.

Protein	Proteinkristall	getestete Kryoprotektoren
CF ₁ CF ₀	C ₁₄ -Rotorring Kristalle	100 % PEG 400
CF ₁ CF ₀	Kristalle aus der <i>lipidic sponge phase</i> Methode	Mitegen's LV CryoOil™

CF₁CF₀

Protein solubilisiert mit LPD-12

20 % Glycerin in der Kristallisationslösung

4.1.8.3 Lagerung und Transport von Kristallen

Kristalle, die sich für ein Röntgenbeugungsexperiment eignen, werden mit speziellen Nylon oder Litho Loops aus der Kristallisationslösung entfernt und in ein Kryoprotektor gedippt. Anschließend werden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem *Puck* innerhalb eines Stickstofftanks aufbewahrt. Der Transport findet dann in sogenannten *dry shippern* statt, welche zuvor mit flüssigem Stickstoff gefüllt wurden.

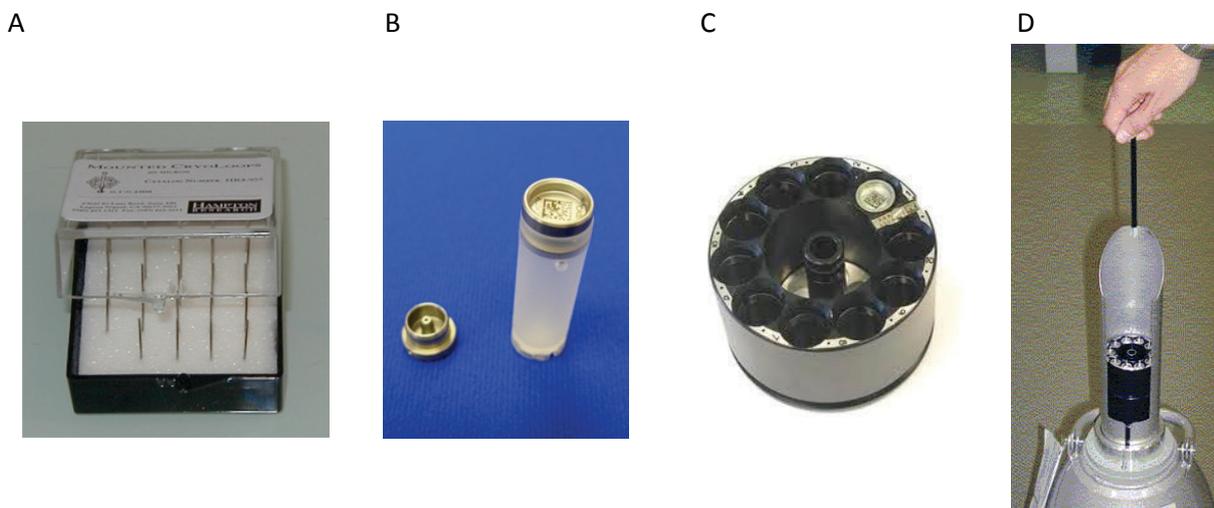


Abbildung 4.3: SPIN System. A: Nylon Loops mit Pin von Hampton Research. B: Cap und vial von Molecular Dimensions. C: Puck von MDL. D: dry shipper von Taylor-Wharton (aus www.esrf.eu)

4.1.9 Theorie der Kristallographie

4.1.9.1 Das Kristallgitter

Kristalle sind geordnete Strukturen, die sich durch Translationssymmetrie in identische Elementarzellen, beschrieben durch drei Basisvektoren (a , b und c) und drei Winkel (α , β , und γ), aufteilen lassen. Durch Translation der Einheitszelle in Richtung der Basisvektoren kann das gesamte Kristallgitter erzeugt werden.

Als asymmetrische Einheit wird für gewöhnlich ein Molekül innerhalb der Elementarzelle definiert, seltener sind es mehrere Moleküle, die sich in ihrer Orientierung unterscheiden.

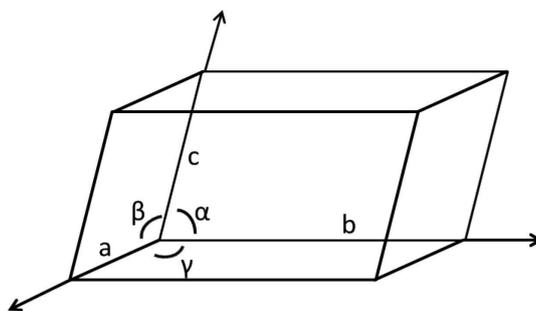


Abbildung 4.4: Elementarzelle

Abgesehen von der dreidimensionalen Periodizität besitzen Proteinkristalle auch eine Symmetrie, die man in sieben Klassen unterteilen kann. Zusätzlich besitzt die Einheitszelle eine interne Symmetrie (Spiegelebenen, Gleitspiegelebene, Inversionszentren, Rotationsachsen und Schraubenachsen), durch die, nach Anwendung der Symmetrieeoperationen aus der asymmetrischen Einheit die Elementarzelle entsteht. Durch die Kombination der sieben Kristallklassen mit einer oder mehreren Symmetrieeoperationen kommt es zur Existenz von 230 möglichen Raumgruppen. Weil Proteine aus L-Aminosäuren bestehen, sind Raumgruppen mit Spiegel- oder Inversionssymmetrien ausgeschlossen, wodurch sich die Anzahl an Raumgruppen für Proteinkristalle auf 65 reduziert.

Tabelle 4.1: Die sieben Kristallsysteme und die Restriktion in ihrer Metrik. P: Primitive Zelle, C: C-zentrierte Zelle, I: Innenzentrierte Zelle, F: Flächenzentrierte Zelle, R: Rhomboedrisch.

Restriktionen in

	Gitterkonstanten	Winkel	mögliche Bravaisgitter
triklin	keine	keine	P
monoklin	keine	$\alpha = \gamma = 90^\circ$	P, C
orthorhombisch	keine	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P, C, I, F
tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P, I
trigonal, hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	P (oder R)
kubisch	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P, I, F

4.1.9.2 Experimentelle Messanordnung

Nach einem Röntgenbeugungsexperiment können die Raumgruppe und die Größe der Einheitszelle bestimmt werden. Dazu wird ein Kristall, umgeben von einem Kryoprotektor, in einem Nylon Loop schockgefroren und zwischen einer Röntgenstrahlungsquelle (heutzutage meistens

Synchrotronstrahlung) und einem Detektor positioniert. Während der Messung wird der Kristall gedreht.

Röntgenstrahlen sind deshalb geeignet, weil sie mit einer Wellenlänge strahlen, die in der Größenordnung der Atomabstände liegt (50 -230 pm). Bei der Röntgenbeugung wird ein Teil der eingehenden Strahlung an einem Kristallgitter durch konstruktive Interferenz abgelenkt, ohne dass es dabei zu einer Änderung der Wellenlänge kommt und auf diese Weise wird ein Bild erzeugt, das die Anordnung der Atome im kristallinen Gitter wiedergibt. Die räumliche Anordnung und Intensität der erzeugten Reflexe dienen der Röntgenstrukturanalyse.

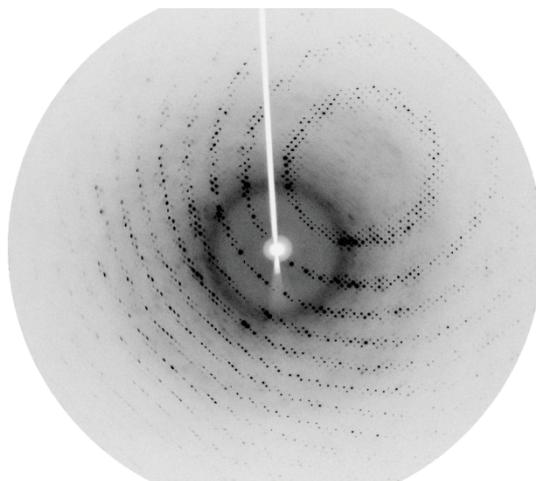
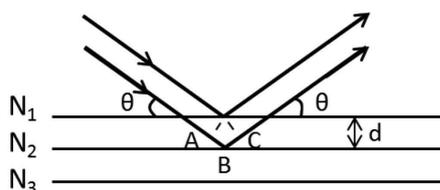


Abbildung 4.5: Diffraktionsbild eines Lysozymkristalls.

4.1.9.3 Das Bragg'sche Gesetz, Millersche Indices und Fourier-Transformation

Die Bragg'sche Gleichung beschreibt die Reflexion von Röntgenstrahlung mit der Wellenlänge λ und dem Winkel θ an einer Ebenenschar aus parallelen Ebenen im Kristall, die zueinander den Abstand d haben.



$$2 d \sin \theta = n \lambda \quad [\text{Gl.2}]$$

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}} \quad [\text{Gl.3}]$$

Abbildung 4.6: Beschreibung des Zusammenhanges zwischen dem Reflektionswinkel θ und dem Netzebenenabstand d im Kristallgitter bei konstruktiver Interferenz.

Weil die Wellenlänge und der Winkel θ bei einem Röntgenbeugungsexperiment bekannte Werte haben, kann der Abstand d berechnet werden (Gleichung 2).

Aufgrund des Auftretens von Fehlordnungen in Proteinkristallen, beugen diese die Röntgenstrahlung nur bis zu einem maximalen Winkel θ (Gleichung 3). Der kleinste messbare Ebenenabstand d_{\min} wird daher als Auflösung des Kristalls bezeichnet.

Die auf dem Diffraktionsbild beobachteten Reflexe entsprechen der an den Ebenenscharen reflektierten Röntgenstrahlung. Die Lage der Ebenenscharen wird mit den Miller-Indices hkl beschrieben, die angeben, wie oft die Achsen a , b und c von den Ebenenscharen geschnitten werden.

Die Fourier-Transformation gibt den mathematischen Zusammenhang zwischen den gemessenen Reflexen und der Position der Atome im Kristall wieder.

4.1.9.4 Das Phasenproblem

Die Beugung der Röntgenstrahlung am kristallinen Gitter enthält die Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome im Kristall. Diese Information ist in der Wellenlänge, der Amplitude und der Phase der elektromagnetischen Welle enthalten. Aufgrund der kohärenten Streuung entspricht die Wellenlänge des reflektierten Strahls der des eingehenden Röntgenstrahls. Die Amplitude ist aufgrund der Intensität des Reflexes auf dem Diffraktionsbild messbar, während die Phase dagegen nicht gemessen werden kann. Methoden die Phase auf indirektem Wege zu ermitteln sind der Isomorphe Ersatz (SIR), der Multiple Isomorphe Ersatz (MIR), die Anomale Dispersion (SAD und MAD) und der Molekulare Ersatz. Bei den Methoden SIR, MIR, SAD und MAD werden Schweratome verwendet während für den Molekularen Ersatz (MR) bekannte Strukturen, die der Zielstruktur ähneln, als Modelle eingesetzt werden.

4.1.10 Messung von Datensätzen und Datenprozessierung

4.1.10.1 Messung von Datensätzen und Integrierung

Datensätze wurden an den *beamlines* ID 23-1 und ID 29 in ESRF in Grenoble gemessen. Für das anschließende Indizieren wurden die Programme XDS (Kabsch, 2010), iMOSFLM (Battye, 2011) und LABELIT (Sauter, 2009) verwendet und integriert wurde mit dem Programm XDS. Weiter wurden die Daten mit den Programmen Pointless (Evans, 2009), Scala (Evans, 2006), matthews_coef (Matthews, 1968 und Kantardjieff, 2003), phenix.xtriage (Zwart, 2005) und der *Self Rotation Function* in Molrep analysiert. Bis auf XDS gehören diese Programme zu den Paketen CCP4 (Potterton et al, 2003) oder PHENIX (Adams et al, 2010).

4.1.10.2 Molekularer Ersatz

Es wurde versucht die Struktur mit den Programmen Phaser (McCoy et al, 2007), Amore (Navaza, 1994), EPMR (Kissinger 1999), CNS (Brüger 1998) und phenix.mr_rosetta (DiMaio et al, 2011) zu lösen. Verwendet wurden existierende Modelle aus der RCSB PDB, die mit dem Programm Chainsaw (Stein, 2008 und Schwarzenbacher, 2004) zuvor optimiert wurden. Für den c-Ring wurden Modelle aus der Proteindatenbank verwendet, die aus 8, 10, 11, 13, 14 und 15 c-Monomeren bestanden, sowie selbst konstruierte Modelle (unter Verwendung der Programme: phenix.superpose pdb, phenix.find ncs operators und phenix.apply ncs operators) aus dem Spinat c-Monomer. Außerdem wurden Modelle aus dem Robetta Server (Kim et al, 2004) verwendet für die Untereinheiten α , γ und ϵ . Hierzu wurden die Aminosäuresequenzen dieser Untereinheiten in den Server eingegeben und bereits existierende Modelle dienten als Vorlage zur Strukturvorhersage.

Tabelle 4.2: Verwendete Modelle für den Molekularen Ersatz.

Modelle für den c-Ring	PDBID
C ₈ -Rotorring	2XND
C ₁₀ -Rotorring	2XOK
C ₁₁ -Rotorring	2WGM
C ₁₃ -Rotorring	2X2V
C ₁₄ -Rotorring	2W5J
C ₁₅ -Rotorring	2XQU
Modelle für γ	3OAA, 2JDI, 2HLD, 1FS0
Modell für α	1C17
Modelle für ϵ	3E5Y, 2RQ6, 2RQ7, 3OAA, 1FS0

5 Ergebnisse

5.1 Reinigung der CF_1CF_0 ATPase aus *Spinacia oleracea*

Die Reinigung der intakten F_1F_0 ATP Synthase aus Spinatblättern erfolgte nach einem bestehenden Protokoll, nach dem zunächst die Thylakoidmembranen isoliert wurden. Mit dem Detergens DDM wurden alle membranintegrierte Proteine aus den Membranen herausgelöst und die Reinigung der ATPase erfolgte dann in drei Schritten: eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, eine Saccharosedichtegradientenzentrifugation und einer Anionenaustauschchromatographie.

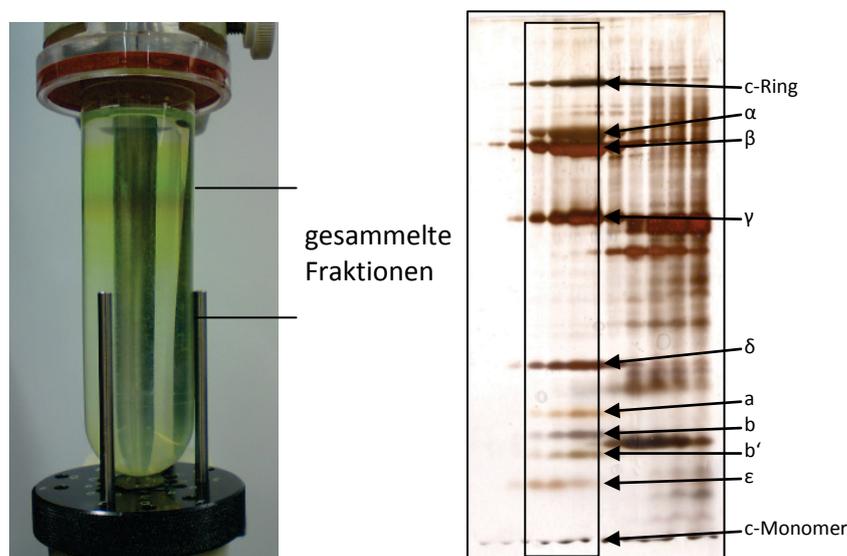


Abbildung 5.1: Reinigung der CF_1CF_0 ATP Synthase aus Spinatblättern. Links: Auftrennung der Proteine nach der Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Rechts: Silbergefärbte 15 %ige SDS-PAGE der gesammelten 0,5 ml Fraktionen der Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Schwarz umrandet sind die zur Kristallisation genutzten Fraktionen.

Die SDS-PAGE in Abbildung 5.1 zeigt, dass in den für die Anionenaustauschchromatographie gesammelten Fraktionen der Saccharosedichtegradientenzentrifugation kaum noch andere Proteinbanden zu sehen sind. Verschiedene Kristallisationsversuche haben bestätigt, dass der letzte Reinigungsschritt für die Kristallisation nicht erforderlich war. Daher wurde auf die Reinigung durch die Anionenaustauschchromatographie verzichtet.

5.2 Reinigung von Lamellen-Lipiden aus Spinatchloroplasten

Es wurden Lamellen-Lipide aus Spinatchloroplasten gereinigt, die später für Kristallisationsversuche eingesetzt wurden.

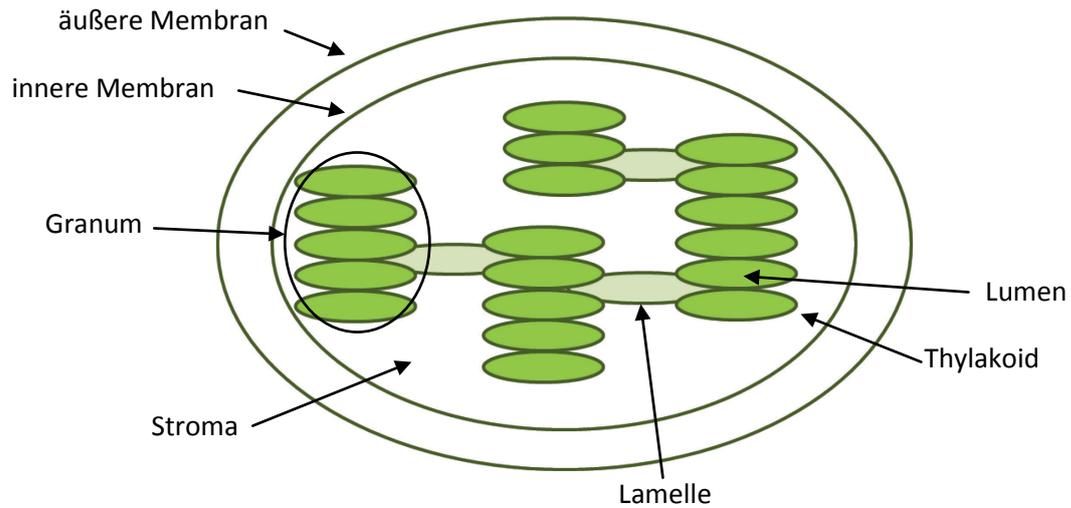


Abbildung 5.2: Aufbau eines Chloroplasten.

Dazu wurden zunächst die Chloroplasten aus frischen Spinatblättern isoliert. In einem hypotonischen Medium wurden diese zum Platzen gebracht, wodurch die äußere und innere Chloroplastenmembran nach einer Saccharosedichte-zentrifugation von den Thylakoidmembranen getrennt werden konnten.

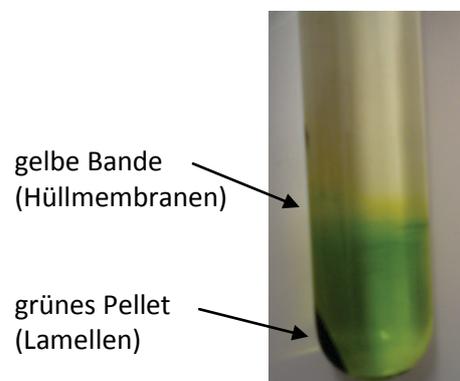


Abbildung 5.3: Saccharosedichte-zentrifugation zur Trennung der Hüllmembranen von den Lamellen nach Suspension der Chloroplasten in einem hypotonischen Medium.

Die Lipidisolierung aus den Lamellen erfolgte nach der Methode von Blight & Dyer. Mittels einer Dünnschichtchromatographie wurden die gereinigten Lipide aufgetrennt und qualitativ bestimmt.

Analog wurde eine Lipidreinigung aus der isolierten ATP Synthase durchgeführt. Diese diente der Bestimmung der, an den Proteinkomplex fest gebundenen Lipide.

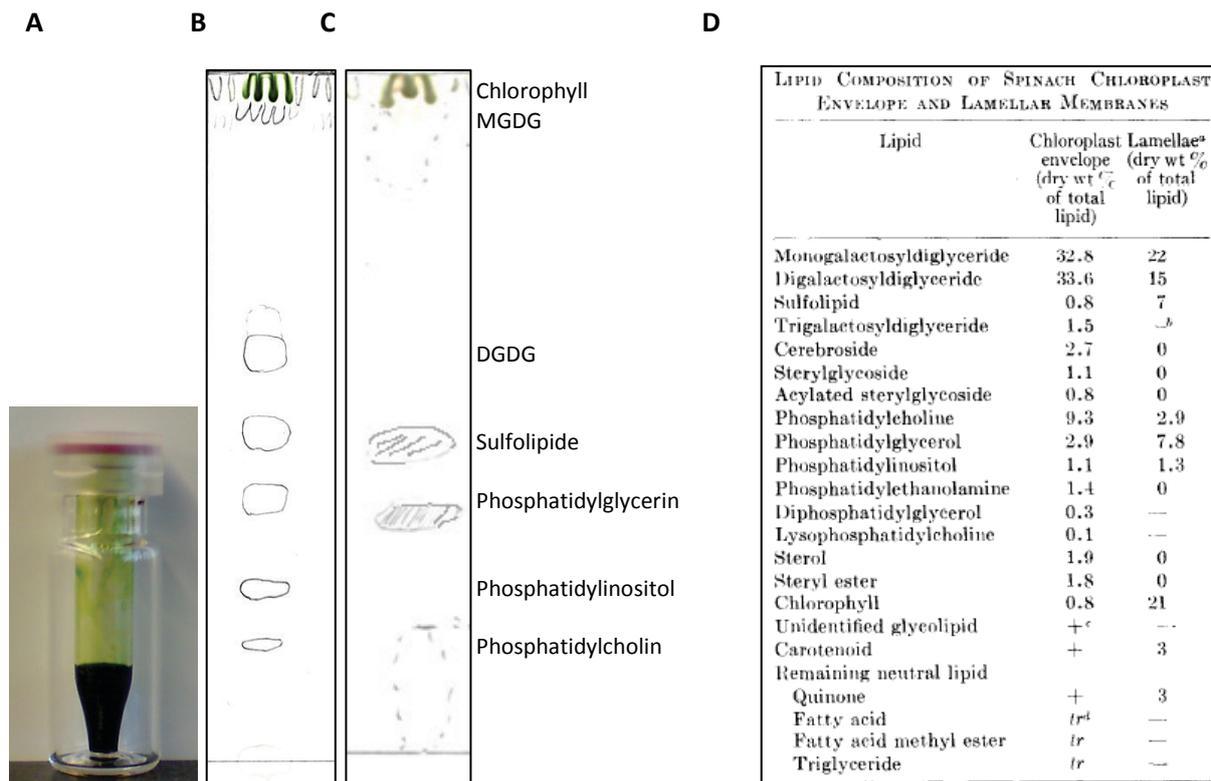


Abbildung 5.4: (A) Gereinigte und getrocknete Lamellen-Lipide. (B) Dünnschichtchromatographische Trennung der isolierten Lamellen-Lipide. (C) Dünnschichtchromatographische Trennung der isolierten Lipide aus der gereinigten CF_1CF_0 ATPase. (D) Tabelle mit der Lipidkomposition aus der Lamelle und den Hüllmembranen (aus Poincelot et al, 1973).

Die gereinigten Lipide (Abbildung 5.4, A und B) beinhalten Lipide, die sowohl in den gestapelten, als auch in den ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran zu finden sind. Die Dünnschichtchromatographie zeigt das Vorhandensein von sechs verschiedenen Lipiden: Monogalaktosyl–Diacylglycerol (MGDG), Digalaktosyl–Diacylglycerol (DGDG), Sulfolipide, Phosphatidylglyzerin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin. Vergleicht man die Bandendicke zueinander, so ist festzustellen, dass hauptsächlich MGDG und DGDG vorhanden sind, gefolgt von Sulfolipiden und Phosphatidylglyzerin. Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin sind nur geringen Mengen vertreten. Dieses Ergebnis entspricht dem, was 1972 von Poincelot und Mitarbeitern veröffentlicht wurde (Abbildung 3.4, D). Eine Kontamination mit Hüllmembranen während der Reinigung hat demzufolge nicht stattgefunden.

Die CF_1CF_0 ATP Synthasen sind ausschließlich in den ungestapelten Membranen lokalisiert und die Isolierung der an den Proteinkomplex fest gebundenen Lipide hat ergeben, dass praktisch nur zwei Lipidarten vorhanden sind: Phosphatidylglyzerin und Sulfolipide. Außerdem sind Spuren von Phosphatidylcholin und Monogalaktosyl–Diacylglycerol zu erkennen.

Das Chlorophyll konnte aufgrund seiner Hydrophobizität nicht von den Lipiden getrennt werden. Daher erscheinen die getrockneten Lipide grün.

5.3 Kristallisation der CF_1CF_0 ATPase aus *Spinacia oleracea*

Was die Kristallisation der CF_1CF_0 ATPase aus *Spinacia oleracea* anbelangt, so wurden zwei Ziele verfolgt. Als erstes wurden Bemühungen unternommen, die Streuqualität der c_{14} -Rotorring Kristalle (Vollmar et al, 2009), die bei 3,8 Å lag, zu verbessern. In weiteren Versuchen wurde der Absicht nachgegangen, die intakte ATP Synthase mit allen Untereinheiten zu kristallisieren.

5.3.1 Optimierungsversuche der c_{14} -Rotorring Kristalle

In einem ersten Schritt wurde versucht, die Streuqualität der c_{14} -Rotorring Kristalle durch Variation der Komposition der Kristallisationsbedingung (Crystal Screen 2 # 12, Hampton Research) zu verbessern. Abbildung 5.5 zeigt ein Foto eines Kristalls, der in dieser Kristallisationsbedingung gewachsen ist. Daneben ist ein typisches Diffraktionsbild dieser Kristalle zu sehen. Abgesehen von der geringen Auflösung, streuen diese Kristalle auch noch sehr anisotrop. Die *Self Rotation Function* zeigt, dass sich der c-Rotorring aus 14 c Monomeren zusammensetzt.

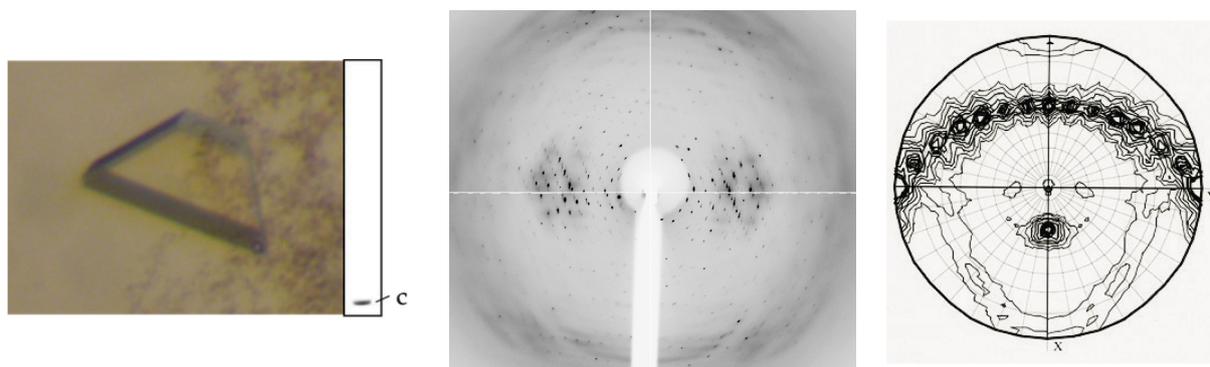
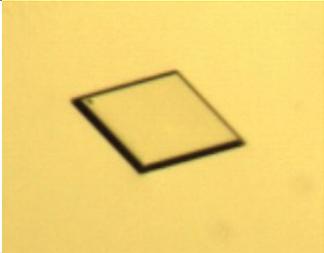
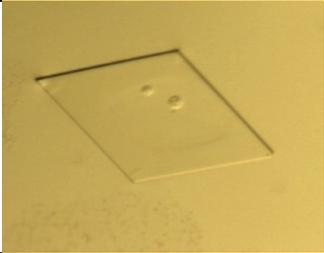
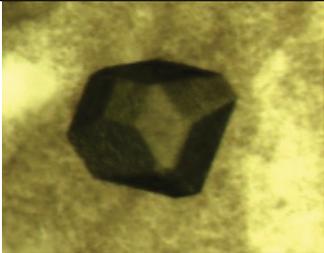
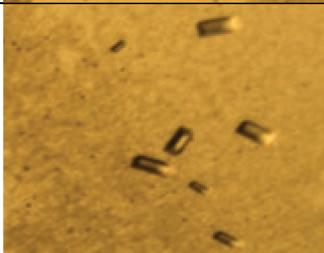


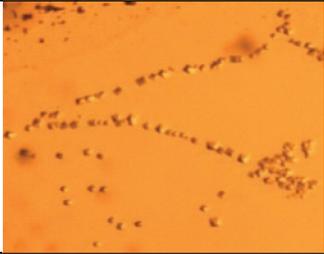
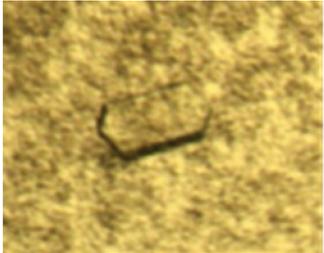
Abbildung 5.5: Links: c_{14} -Rotorring Kristall gewachsen im Crystal Screen 2 # 12 von Hampton Research mit dem Zusatz von 100 mM $LiCl_2$ und silbergefärbte 15 %ige SDS-PAGE eines c_{14} -Rotorring Kristalls. Mitte: Diffraktionsbild eines c_{14} -Rotorring Kristalls. Rechts: *Self Rotation Function* eines Datensatzes.

Im Laufe der Kristallisationsexperimente wurde festgestellt, dass die zugesetzte ADP Konzentration und die Dauer der Inkubation mit ADP Einfluss auf die Form, Größe und Anzahl der Kristalle nahm. Zwar bindet das ADP nicht an den c-Ring, es scheint aber für die Bildung der Nukleationskeime verantwortlich zu sein. Bei einer ADP Konzentration von 2 bis 4 mM und einer Inkubationszeit von fünf Stunden wuchsen viele große und gut geformte Kristalle. Nach vier Tagen waren die ersten Kristalle im Kristallisationstropfen zu sehen. Bei kleineren ADP Konzentrationen oder Inkubationszeiten unter 30 min wuchsen fast keine Kristalle. Bei deutlich längeren Inkubationszeiten von mehr als 5 Stunden, kam es über Nacht zum Wachstum von sehr vielen kleinen und schlecht geformten Kristallen.

Es wurde ein Kationenscreening durchgeführt, wobei das Cadmium in der Kristallisationslösung gegen andere Kationen ausgetauscht wurde. Tabelle 5.1 stellt die getesteten Kationen und die daraus resultierten Kristalle dar.

Tabelle 5.1: Kationenscreening und die daraus resultierten c_{14} -Rotorring Kristalle.

Kristallbild	Getestete Kationen	Waschpuffer	Ideale Protein-konzentration	Kristalleigenschaften
	$CdCl_2$	I	8 mg/ml mit 4 mM ADP	große Kristalle
	$CdCl_2+LiCl_2$	I	6 mg/ml mit 3 mM ADP	wenige flache Kristalle
	$CuSO_4+LiCl_2$	II	5 mg/ml mit 2 mM ADP	große Kristalle
	$CuSO_4+LiCl_2$	I	6 mg/ml mit 3 mM ADP	große Kristalle
	$FeSO_4+LiSO_4$	I	3 mg/ml mit 1 mM ADP (Inkubationszeit < 30 min)	viele kleine Kristalle
	$FeSO_4+LiSO_4+$ $CdCl_2$	I	3 mg/ml mit 1 mM ADP (Inkubationszeit < 30 min)	viele kleine Kristalle

Kristallbild	Getestete Kationen	Waschpuffer	Ideale Proteinkonzentration	Kristalleigenschaften
	FeCl ₂	I		sehr wenige kleine Kristalle
	FeCl ₂ +LiCl ₂	I		viele kleine Kristalle
	NiSO ₄	I	8 mg/ml mit 4 mM ADP	wenige flache Kristalle
	CuCl ₂ + LiCl ₂	I		kein Kristallwachstum
	CuCl ₂	I	6-7 mg/ml mit 3 mM ADP	Kristalle degradieren nach wenigen Tagen
	CrCl ₂ +LiCl ₂	I		amorphe Kristalle
	CoCl ₂	I	> 8 mg/ml mit 4 mM ADP	flache Kristalle

Kristalle, die in der Anwesenheit von Cadmiumchlorid oder in der Kombination von Kupfersulfat mit Lithiumchlorid gewachsen sind, waren am stabilsten. Diese Kristalle waren auch nach einem Jahr optisch noch unverändert. Das Diffraktionsbild (Abb. 5.6, rechts) aber zeigt, dass sich die Streuqualität deutlich verschlechtert hatte.

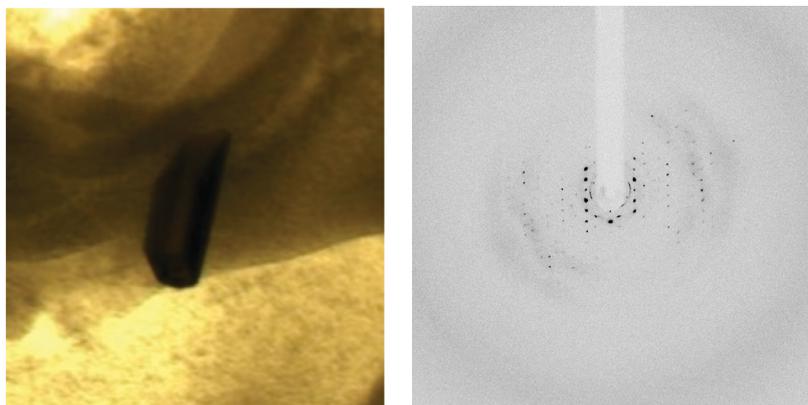


Abbildung 5.6: Links: c_{14} -Rotoring Kristall gewachsen in der Anwesenheit von Cadmium oder Kupfer nach einer 24 monatigen Lagerung bei 15 °C. Rechts: Diffraktionsbild gemessen an der ID 23-2 Microfocus beamline im ESRF in Grenoble.

Diese Kristalle sind alle in der *hanging drop* Methode gewachsen. Im *Mikrobatch* Verfahren wuchsen zwar auch Kristalle, doch waren diese deutlich kleiner und flacher und brauchten für ihr Wachstum erheblich mehr Zeit.

Die Diffraktion der verschiedenen Kristalle, die aus dem Kationenscreening hervorgekommen sind, wurde gemessen. Dabei wurde oftmals 100 % PEG 400 als Kryoprotektor verwendet. Dieser Kryoprotektor dehydriert die Kristalle und führt zur Verbesserung der Auflösung bis zu 2 Å ohne dass die Kristalle davon Schaden erlitten. Alle anderen getestete Kryoprotektoren (Öle und niederprozentige PEG 400 Lösungen) erwiesen sich in dem Sinne als schlechter, als das sie nicht zur Verbesserung der Streuqualität beitrugen.

Die Kristalle aus dem Kationenscreening streuten alle schlechter als 4 Å, weshalb dieser Weg zur Optimierung der Kristalle nicht weiter verfolgt wurde.

Der Zusatz von anderen Detergenzien: $C_{12}E_8$, $C_{12}E_9$ und $C_{12}E_{10}$ führte dazu, dass sich in den Kristallisationsansätzen viel weniger Präzipitat bildete. Auch hier wurde ein Kationenscreening unternommen. In diesen Kristallisationsbedingungen wuchsen jedoch keine Kristalle. Des Weiteren wurde ein Seeding Experiment durchgeführt, das aber, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, nicht zum Wachstum von besseren Kristallen führte.

In einem weiteren Versuch wurde die Detergenzkonzentration von 0,1 % (11,1-fache CMC) auf 1 % erhöht. Die daraus resultierenden Kristalle waren zwar deutlich größer, jedoch auch schlechter geformt. Sie hatten keine scharfen Kanten, sondern waren eher rund, wie in folgender

Abbildung zu sehen ist. Diese Kristalle streuten sehr schlecht. Es ist anzunehmen, dass sie größtenteils aus DDM bestehen.



Abbildung 5.7: Kristalle mit erhöhter Detergengkonzentration gewachsen im Crystal Screen 2 # 12 von Hampton Research.

Es wurden verschiedene Inhibitoren (Triphenylzinn, Triphenylblei, Phloridizin und Tentoxin) und Additiva (Heptantriol, Spermidin, Spermin, AMPPNP, DTT) getestet. Diese Zusätze führten zu keiner Verbesserung der Streuqualität der Kristalle. Aufgrund der geringen Auflösung der Kristalle, die üblicherweise zwischen 6 und 4 Å lag, konnte die Bindung der Inhibitoren (Triphenylzinn, Triphenylblei, Phloridizin) an den c-Ring in der Struktur nicht nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der Additiven führte zudem zum Wachstum von sehr kleinen Kristallen.

Weil das eigentliche Ziel dieser Arbeit darin bestand weitere Untereinheiten der ATP Synthase zu kristallisieren, wurde die Möglichkeit studiert, in dieser Kristallisationslösung auch andere CF₀ Untereinheiten zusammen mit dem c-Ring zu kristallisieren. Aus diesem Grund wurde der pH-Endwert einiger Kristallisationsbedingungen ermittelt.

Tabelle 5.2: Ermittlung der pH Werte. Die Konzentration der Inhaltsstoffe der Kristallisationslösungen ist aus dem Kapitel Material und Methoden zu entnehmen (WP steht für Waschpuffer).

Kristallisationspuffer	pH Wert des Kristallisationspuffers	pH Wert des WP I	End-pH-Wert
PEG 400, Natriumacetat, CdCl ₂	4,28	7,6	4,54
PEG 400, Natriumacetat, CuSO ₄ , LiCl ₂	4,16	7,6	3,57
PEG 400, Natriumacetat, CuCl ₂	3,74	7,6	3,50

Die gemessenen pH Werte lagen zwischen 3,5 und 4,5. Ein pH *Screening* (pH 4-8) hat ergeben, dass Kristalle bis pH 5 wachsen, aber nicht bei höheren pH Werten. Die Bildung von Präzipitat in allen Kristallisationslösungen ist nicht auf eine Übersättigung zurückzuführen, da es bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml auch schon zur Präzipitation kam. Vielmehr

handelt es sich hierbei um die Denaturierung der anderen Untereinheiten des Proteinkomplexes. Dies kann auch dadurch bestätigt werden, dass es beim Pufferaustausch des Proteins im Konzentrator mit einem Puffer, bei dem das Trizin (pH 8) gegen Natriumacetat (pH 4,6) ausgetauscht wurde, zu einem Denaturieren des Proteins (zu erkennen an der Ausbildung eines großen Pellets) und folglich zum Proteinverlust kam.

Eine Ko-Kristallisierung des c-Ringes mit der Untereinheit a oder den Untereinheiten $\gamma\epsilon$ scheint bei diesen pH Werten unwahrscheinlich, weshalb in weiteren Kristallisationsexperimenten andere Kristallisationsbedingungen und Kristallisationsmethoden getestet wurden.

5.3.2 Kristallisationsversuche mit der intakten CF_1CF_0 ATPase

Kristallisationsversuche mit dem F_1F_0 Holoenzym geschahen auf drei verschiedenen Wegen: in der *lipidic sponge phase*, mit Zusatz von Lipiden und mit der ATPase solubilisiert mit Lipopeptiddetergenzien, und werden hier in der Reihenfolge dargestellt mit der sie in Labor getestet wurden.

5.3.2.1 Kristallisationsansätze mit der *lipidic sponge phase* Methode

Mit der *lipidic sponge phase* können Membranproteine innerhalb einer künstlich hergestellten Membran, bestehend aus dem Lipid Monoolein, kristallisiert werden. Die Struktur der *lipidic sponge phase* ist so, dass Membranproteine mit großen intra- oder extrazellulären Domänen in die Membran eingebettet werden können.

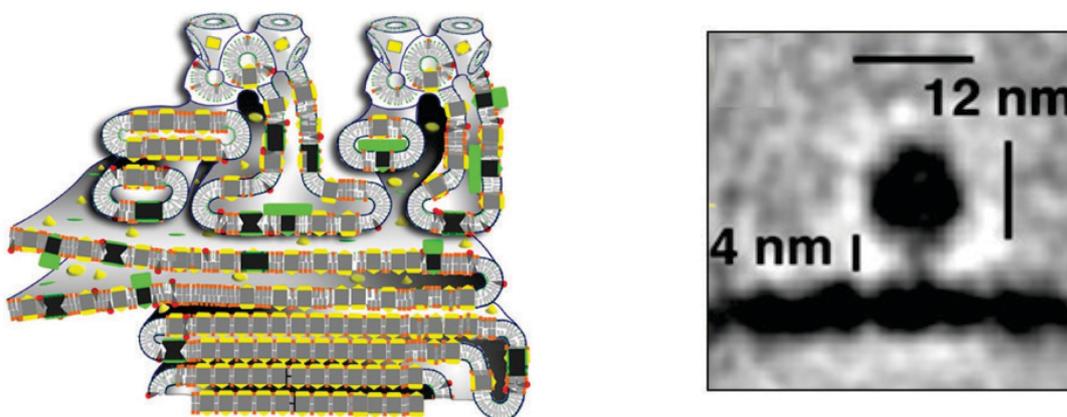


Abbildung 5.8: Links: Abbildung, die den Kristallisationsprozess in einer *lipidic cubic phase* erklärt (aus Kors et al, 2009). Rechts: Visualisierung einer chloroplastidären ATP Synthase mittels Kryoelektronentomographie (Daum et al, 2010).

Die Hohlräume der *lipidic sponge phases* aus dem Kit von Molecular Dimensions besitzen Durchmesser von 100 bis 150 Å. Die chloroplastidäre ATPase aus Spinat erstreckt sich 160 Å aus der Membran, wie in der mittels Kryoelektronentomographie erstellten Abbildung (Abb. 5.8, rechts) dargestellt. Die Qualität der *sponge phase* lässt sich auch anhand ihrer Diffraction bezüglich der Röntgenstrahlung bestimmen. Die *lipidic sponge phase* mit ihren großen Hohlräumen gibt ein klares Diffractionsbild ohne Reflexe oder Ringe wieder (Abb. 5.9, Mitte). Bei der *cubic phase* hingegen, die deutlich kleinere Hohlräume hat, sind viele Ringe zu erkennen (Abb. 5.9, links).

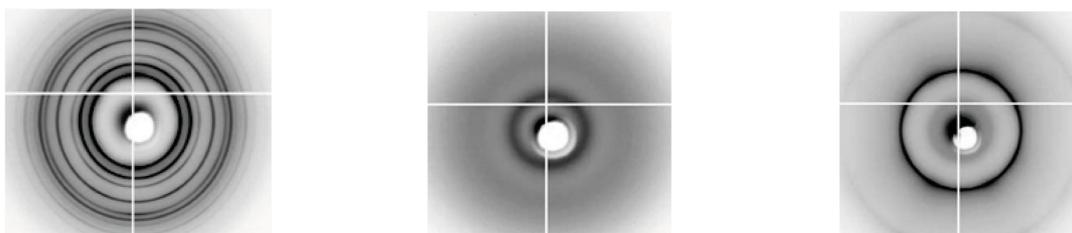


Abbildung 5.9: Links: Diffractionsbild einer *cubic phase*. Mitte: Diffractionsbild einer *sponge phase*. Rechts Koexistenz einer *cubic* und einer *sponge phase* (aus Cherezov et al, 2006).

Zu Anfang wurde das Lipidic-Sponge Phase™ Screen von Molecular Dimensions getestet. Verwendet wurde die *hanging drop* Methode bei 21 °C. Getestet wurden die Proteinkonzentrationen 6, 12, 24 und 36 mg/ml. Oftmals kam es zur Ausbildung von Präzipitat. In vielen Bedingungen waren nach 4 Wochen Kristalle zu sehen.

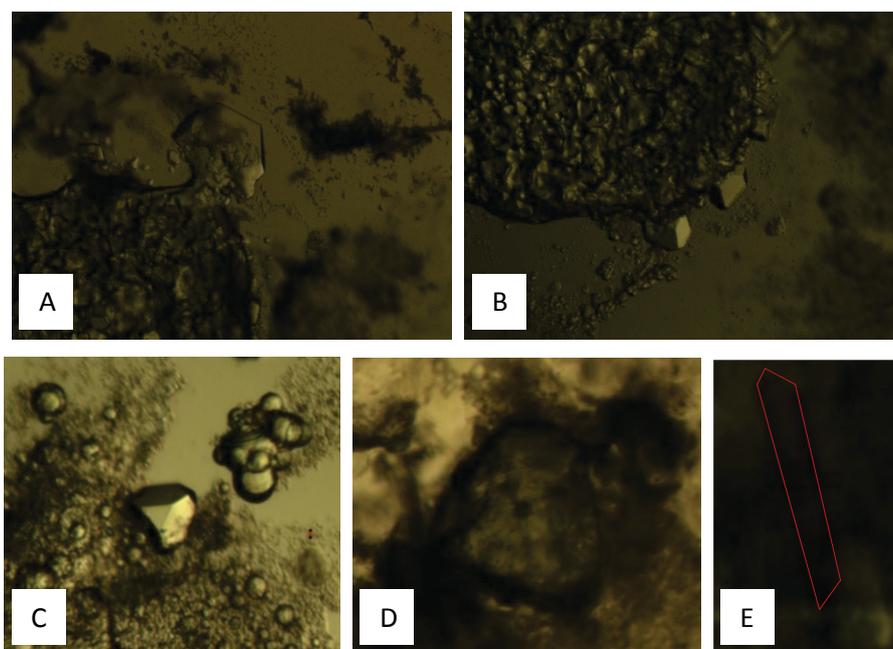


Abbildung 5.10: (A-C) Kristalle, die in dem Lipidic-Sponge Phase™ Screen von Molecular Dimensions gewachsen sind. (D) Kristall, der in der Anwesenheit des Inhibitors Venturicidin A gewachsen ist. (E) Kleiner rot gefärbter Kristall.

Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei zumindest in den meisten Fällen um Lipidkristalle handelte. Diese Kristalle änderten unter dem Polarisator ihre Farbe nicht und lösten sich beim Versuch sie zu fischen schnell auf. Außerdem wuchsen auch gelegentlich kleine rote Kristalle (Abbildung 5.10, Bild E). Hierbei handelte es sich um geringe Mengen einer Verunreinigung, die sich nach der Reinigung des Proteins, ohne Anionenaustauschchromatographie, immer noch in der Proteinlösung befand. Diese Kristalle konnten aufgrund ihrer intensiven Rotfärbung leicht identifiziert werden. Wegen ihres seltenen Vorkommens und ihrer sehr kleinen Größe (ca. 20 μm), wurde ihre Diffraktion jedoch nie gemessen.

Die Diffraktion der Lipidkristalle zeigte weder Reflexe noch Ringe, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um Kristalle mit *sponge phase* Charakter handelte.

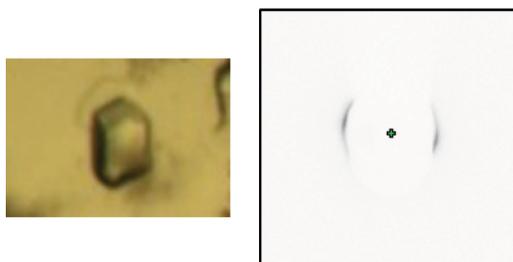


Abbildung 5.11: Diffraktion eines Lipidkristalls aus dem Lipidic-Sponge Phase™ Screen von Molecular Dimensions gemessen an der ID 23-2 Microfocus beamline im ESRF, Grenoble.

Nachdem ein solcher Kristall, der zuvor in Mitegen's LV CryoOil™ mehrmals gewaschen wurde, auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurde, zeigte sich, dass sich in diesen Lipidkristallen die ATP Synthase befand.

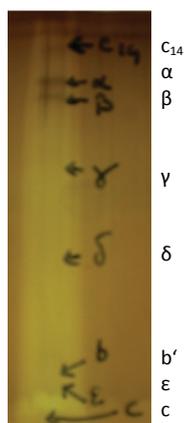


Abbildung 5.12: Silbergefärbte 15 %ige SDS-PAGE eines Lipidkristalls aus dem Lipidic-Sponge Phase™ Screen von Molecular Dimensions.

Die SDS-PAGE zeigt, dass sich ein Proteinkomplex bestehend aus den Untereinheiten α , β , γ , δ , b , ϵ und dem c-Ring in der *sponge phase* integriert hat. Die Untereinheit a , sowie die zweite b Untereinheit fehlen hingegen.

Weiterhin wurde eine große Anzahl an Additiven und Inhibitoren getestet (siehe dazu Material und Methoden), die jedoch nicht zum Wachstum von veränderten Kristallen führten.

Neben dem kommerziell erhältlichen Kit von Molecular Dimensions, wurden auch selbst hergestellte *sponge phases* anderer Kompositionen getestet.

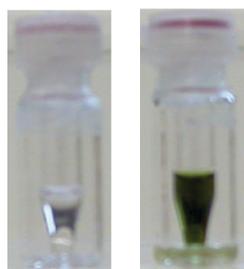


Abbildung 5.13: Selbst hergestellte *lipidic sponge phases*. Links: Zusammengesetzt aus Monoolein, PEG und Puffer oder mit PPO statt PEG. Rechts: mit Zusatz von Lamellen-Lipiden.

Um *sponge phases* mit großen Hohlräumen zu erhalten wurde entweder PEG oder PPO verwendet. Besonders das PPO führt zur Entstehung von besonders großen Hohlräumen von über 160 Å.

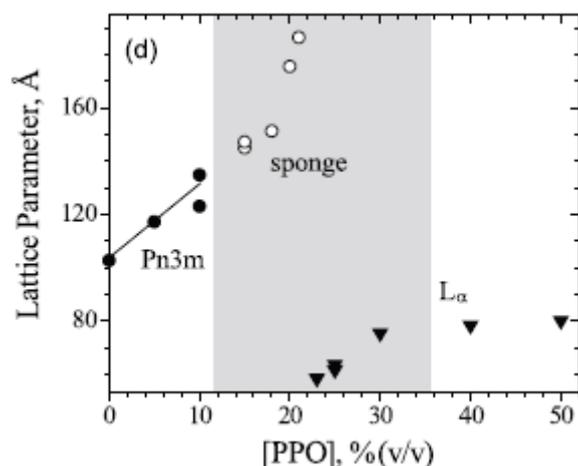


Abbildung 5.14: Einfluss der PPO Konzentration auf den Durchmesser der Hohlräume der *lipidic sponge phase* (aus Cherezov et al, 2006).

Um die Fluidität zu erhöhen wurden oftmals Salze und MPD zugesetzt. Auch hier wurden wieder verschiedene Puffer, Additiva und Inhibitoren getestet. Außerdem wurde der Zusatz von weiteren Lipiden, Lamellen-Lipide und Phosphatidylcholin, ausprobiert. Obwohl auch hier

hauptsächlich Lipidkristalle gewachsen sind, konnten in einer Bedingung auch Proteinkristalle nachgewiesen werden.

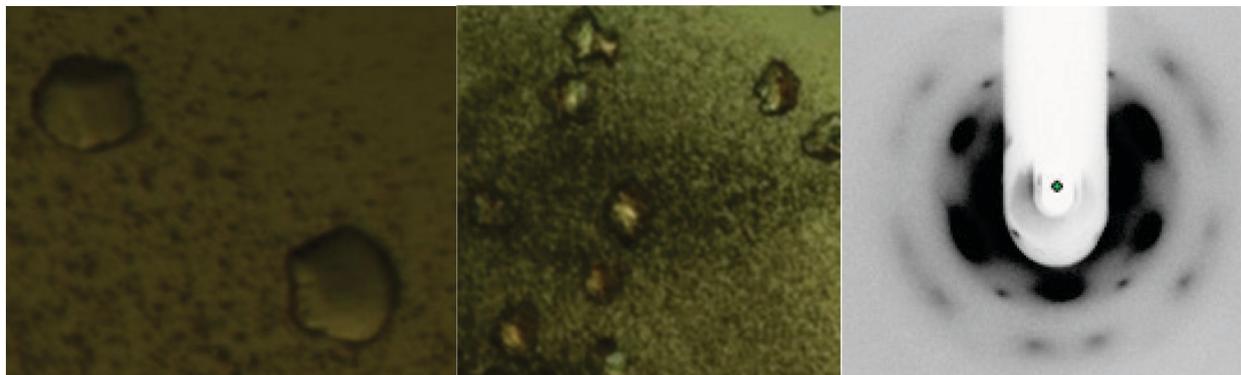
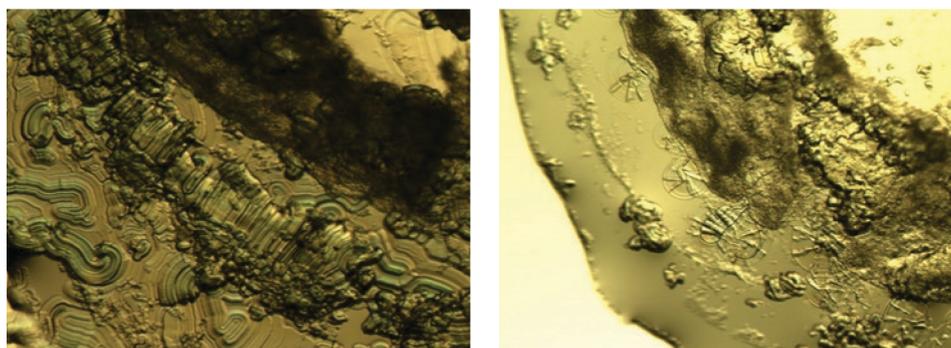


Abbildung 5.15: Links: Proteinkristalle, die innerhalb von wenigen Tagen in einer selbst hergestellten *lipidic sponge phase* bestehend aus PEG 1500, Tris/HCl pH 8 und Monoolein gewachsen sind. Mitte: Degradierung der Kristalle nach wenigen Wochen. Rechts: Diffraktionsbild der bereits degradierten Kristalle.

Diese Kristalle wuchsen innerhalb von einigen Tagen und fingen nach wenigen Wochen an zu degradieren. Im Gegensatz zu den Lipidkristallen wiesen die Proteinkristalle keine scharfen Kanten auf. Unter dem Polarisationsmikroskop war zu erkennen, dass sie doppelbrechend sind und das Diffraktionsbild zeigt deutlich, dass es sich hierbei trotz der fortgeschrittenen Degradation, um Proteinkristalle handelt. Unglücklicherweise konnte die Qualität dieser *sponge phase* nicht reproduziert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die a Untereinheit und eine der b Untereinheiten beim Integrieren in die *sponge phase* vom Komplex dissoziieren, wurde dieser selbst hergestellten *sponge phase* eine geringe Menge Lamellen-Lipide und alternativ auch Phosphatidylcholin zugesetzt. Beim Zusatz von Phosphatidylcholin kam es nach wenigen Wochen zu einer Graufärbung der *sponge phase*, weshalb diese Versuche nicht weitergeführt wurden. Beim Zusatz von Lamellen-Lipiden trat eine massive Veränderung der Struktur der *sponge phase* auf.



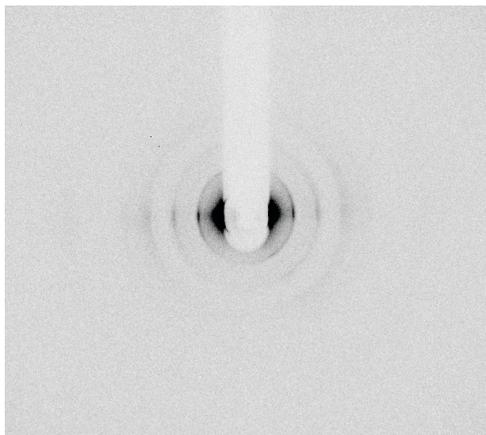


Abbildung 5.16: Einfluss des Zusatzes von Lamellen-Lipide in der Ausbildung der *sponge phase*. Oben: Fotos der *sponge phase*. Unten: Diffraktionsbild dieser Strukturen.

In Abbildung 5.16 ist zu erkennen, dass es zu einer Stapelung der Lipidschichten kam, die an die Thylakoidstapelung erinnert. In Abbildung 5.16 (unten) ist ein Diffraktionsbild dieser Strukturen zu sehen. Die Kreise deuten darauf hin, dass es sich hierbei nicht mehr um eine *sponge phase*, sondern um eine *cubic phase* mit deutlich kleineren Hohlräumen handelte.

In den mit Lamellen-Lipiden zugesetzten Ansätzen, ist ein Kristall gewachsen, von dem stark anzunehmen ist, dass es sich hierbei um ein Proteinkristall handelt. Dieser Kristall zeigt eine bräunliche Färbung. Seine Diffraktion konnte aber leider nicht gemessen werden.

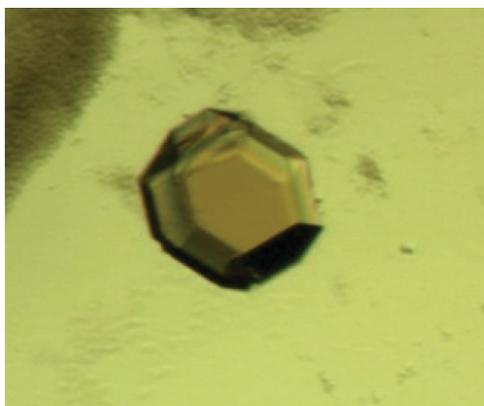


Abbildung 5.17: Kristall gewachsen in einer *lipidic sponge phase* bestehend aus PEG 1500, Tris/HCl pH 8 und Monoolein mit dem Zusatz von Lamellen-Lipiden.

In Kontrollansätzen, in denen entweder auf das Protein oder auf das Monoolein verzichtet wurde, sind gar keine Kristalle gewachsen, auch keine Lipidkristalle.

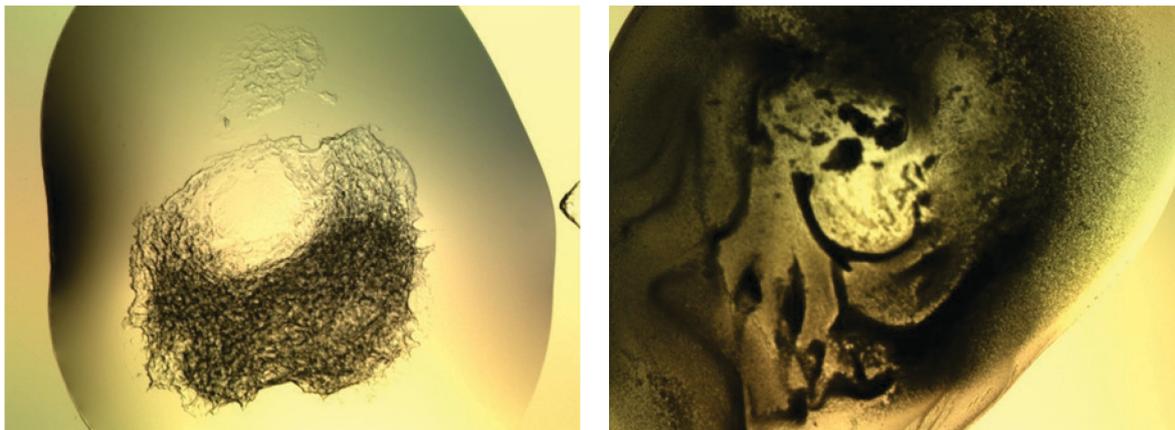


Abbildung 5.18: Kontrollansätze in denen entweder auf das Protein (Bild links) oder auf das Monoolein (Bild rechts) verzichtet wurde.

In Abbildung 5.18 (links) ist die *sponge phase* ohne Zusatz von Protein zu sehen. Im Bild auf der rechten Seite ist Präzipitat zu beobachten. Zum Kristallwachstum kam es hier aber nicht.

Um die Proteinkristalle zukünftig in der *sponge phase* besser von Lipidkristallen unterscheiden zu können, wurde der ATPase ein Fluorophor zugesetzt, das Lucifer Yellow VS, das spezifisch an eine der α Untereinheiten des Proteinkomplexes bindet. Es zeigte sich, dass sich die ganze *sponge phase* gelb färbte.

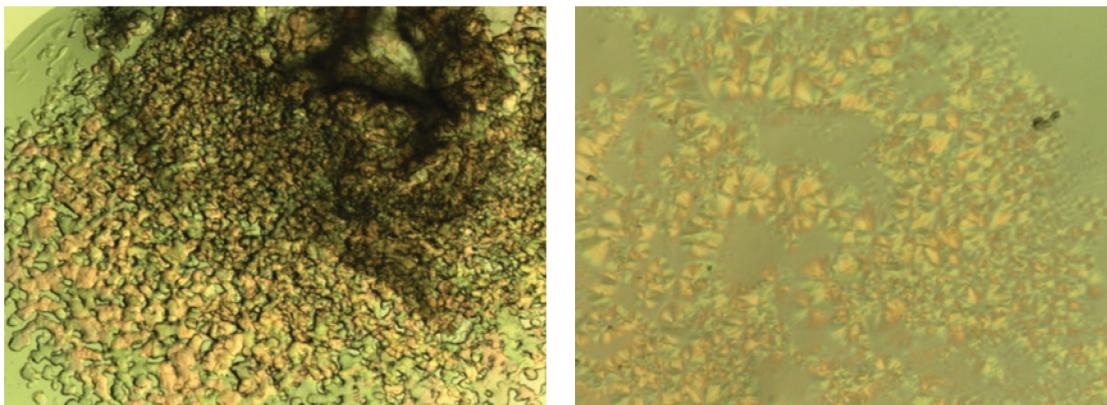


Abbildung 5.19: Selbst hergestellte *lipidic sponge phases*. Links mit PEG und rechts mit PPO als Präzipitantz.

Die regelmäßige Verteilung der Gelbfärbung wenige Tage nach dem Pipettieren der Kristallisationsansätze lässt darauf schließen, dass sich das Protein in die *sponge phase* integrierte und gleichmäßig verteilte. Da das Wachstum von Proteinkristallen in der *lipidic sponge phase* mehrere Monate dauern kann, konnten diese Kristallisationsansätze nicht mehr vollständig ausgewertet werden.

5.3.2.2 Kristallisationsansätze mit dem Zusatz von Lamellen-Lipiden

Da Lipide möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung des membranintegrierten CF_0 Komplexes spielen, wurden der isolierten ATP Synthase gereinigte Lamellen-Lipide zugesetzt. Anschließend wurde die Kristallisation des c_{14} -Ringes in der bekannten Kristallisationsbedingung getestet.

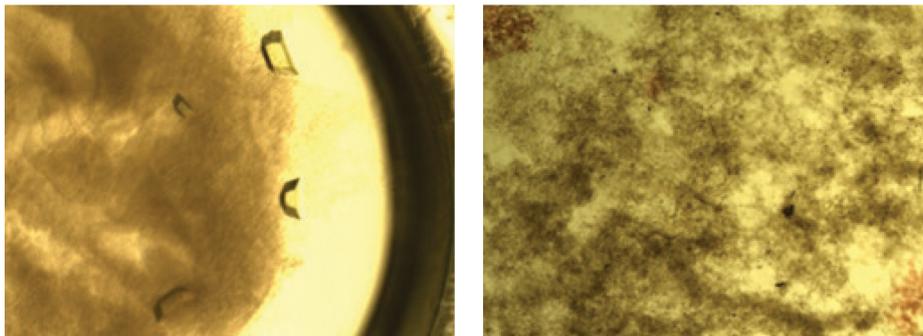


Abbildung 5.20: Links: C_{14} -Rotoring Kristalle gewachsen im Crystal Screen 2 # 12 von Hampton Research mit oder ohne den Zusatz von $LiCl_2$. Rechts: gleiche Kristallisationsbedingungen mit Zusatz von Lamellen-Lipide.

Es stellte sich heraus, dass der Zusatz der Lamellen-Lipide zu den isolierten ATP Synthasen die Kristallisation des c -Ringes verhinderte. Außerdem sah das Präzipitat (Bild 5.20, rechts) nicht mehr wolkig aus.

Es handelte sich hierbei um eine Kristallisationsbedingung mit einem sehr niedrigen pH Wert, der zwischen 3 und 4 liegt, weshalb auch die Kristallisation bei einem deutlich höheren pH Wert getestet wurde. Verwendet wurde die Kristallisationsbedingung, bei der in der *sponge phase* Proteinkristalle gewachsen waren. Die Kristallisation wurde bei 15 °C und bei 21 °C getestet.

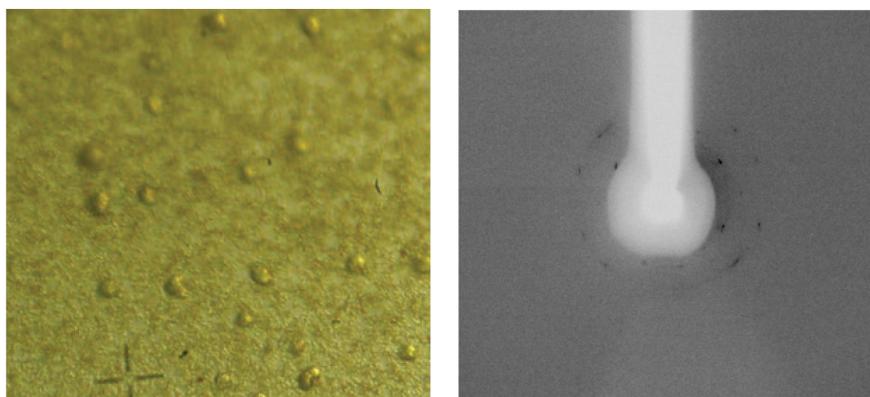


Abbildung 5.21: Links: Proteinkristalle der CF_1CF_0 ATP Synthase gewachsen mit dem Zusatz von 0,1 μ g Lamellen-Lipide, 2 μ M Venturicidin A in 40 % (w/w) in einer Kristallisationslösung bestehend aus Tris/HCl pH 9 und PEG 1500. Rechts: Diffraktionsbild gemessen an der ID 23-1 beamline im ESRF, Grenoble.

Es wuchsen sehr kleine Kristalle bei 15 °C innerhalb von zwei Monaten, welche bei niedriger Auflösung streuen. Die leichte Grünfärbung ist auf das Chlorophyll zurückzuführen, das zusammen mit den Lipiden gereinigt wurde.

5.3.2.3 Kristallisationsansätze mit CF_1CF_0 solubilisiert mit Lipopeptiddetergenzien

Ein weiterer Versuch die intakte chloroplastidäre ATP Synthase zu kristallisieren bestand darin das DDM gegen das Lipopeptiddetergens LPD-12 zu substituieren.

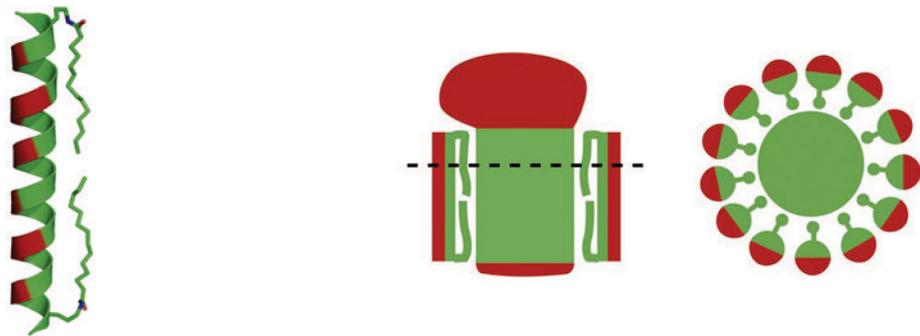


Abbildung 5.22: Links: Abbildung eines Lipopeptiddetergens. Rechts: Solubilisierung eines Membranproteins mit LPD-12 (aus Privé et al, 2009).

Das LPD-12 besteht aus einer Helix und zwei Fettsäuren, über die das Detergens mit der hydrophoben Region des Proteins wechselwirkt. Der äußere Bereich der Helix hingegen besteht aus hydrophilen Aminosäureresten, wodurch dem ganzen Proteinkomplex der Charakter eines löslichen Proteins verliehen wird.

Um Proteinkristalle von Salzkristalle leichter unterscheiden zu können, wurde das Fluorophor Lucifer Yellow VS zugegeben, das spezifisch an eine der α Untereinheiten des ATPase Komplexes bindet. Alle im Kapitel 4 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Kristallisationskits wurden im Mikrobath Verfahren getestet. Proteinkristalle wuchsen nur in einer Bedingung, der PEGs Suite # 23

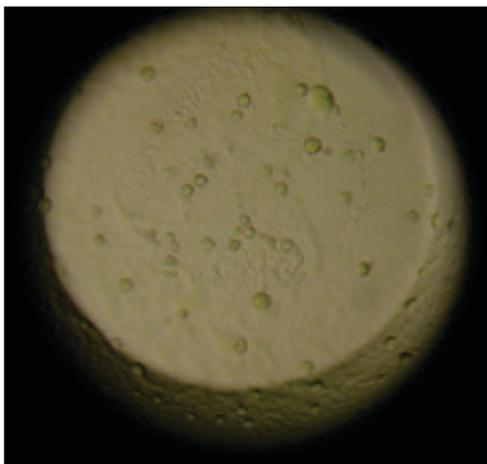


Abbildung 5.23: Phasentrennung in der PEGs Suite # 23 in einer Terazaki Mikrobatch Platte.

Nach einigen Tagen kam es in der PEGs Suite # 23 bei 21 °C zur Ausbildung einer Phasentrennung, die in Abbildung 5.23 zu sehen ist. Die proteinhaltige Phase fluoreszierte gelb, was auf den zugesetzten Fluorophor Lucifer Yellow VS zurückzuführen ist. Nach ungefähr 6-8 Wochen waren die ersten kleinen Kristalle im Kristallisationstropfen zu sehen. Hierbei handelte es sich um dünne kleine Plättchen (Abb. 5.24 links), die nur in geringer Anzahl in den Kristallisationstropfen zu finden waren und bis 4 Å streuten. Im Diffraktionsbild auf der rechten Seite ist zu erkennen, dass es bei gewissen Winkeln zur Überlappung von Reflexen kam.

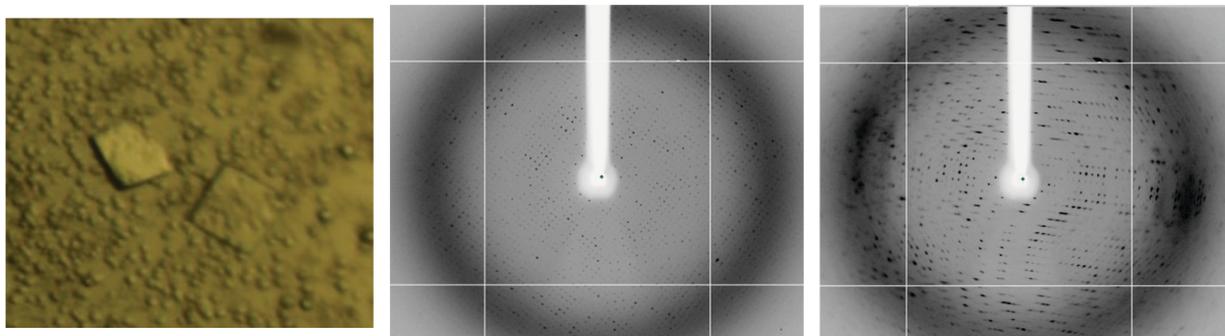


Abbildung 5.24: Links: Erste Kristalle, die in Form von dünnen Plättchen gewachsen sind. Mitte und Rechts: Zwei Diffraktionsbilder bei 0° und 45° gemessen an der ID 23-1 beamline im ESRF, Grenoble. Als Kryoprotektor wurde die Kristallisationslösung mit den Zusatz von 20 % Glycerin verwendet.

Erst nach Erhöhung der PEG Konzentration auf 40 % (w/v) wuchsen nach zwei bis drei Monaten dreidimensionale Kristalle mit scharfen Kanten heran.

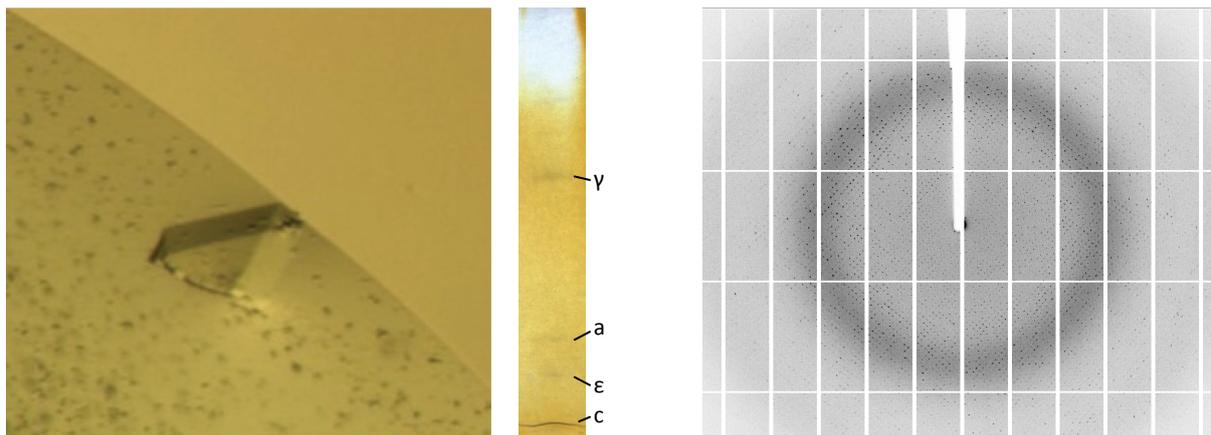


Abbildung 5.25: Dreidimensionaler Kristall nach einer Wachstumszeit von drei Monaten in einer 15 wells Nextal Platte. Mitte: Silbergefärbte 15 %ige SDS-PAGE eines Kristalls. Rechts: Diffraktionsbild. Als Kryoprotektor wurde die Kristallisationslösung mit den Zusatz von 20 % Glycerin verwendet.

Wie die silbergefärbte SDS-PAGE zeigt, befinden sich im Kristall vier Untereinheiten des Proteins: c_x , a, γ und ϵ .

Die Proteinkonzentration und das Volumen des Kristallisationstropfens spielten bei dem Kristallwachstum nur eine untergeordnete Rolle. Beim Versuch das PEG 1000 durch andere Polyethylenglykole auszutauschen, kam es zu einem unerwünscht ungeordneten Wachstum. Ein pH *Screening* ergab, dass der pH Wert von 8,5 in der Kristallisationslösung bereits optimal war. Die Kristalle wuchsen sowohl in Anwesenheit von Glutathion, als auch in Anwesenheit des DTT. Bei einer Kristallisationstemperatur von 15 °C wuchsen sehr viele kleine Kristalle, die nur bei geringer Auflösung streuten.

In Anwesenheit des Inhibitors Venturicidin A sind ebenfalls Kristalle gewachsen. Allerdings nur in Form von flachen Plättchen, was die Messung eines guten Datensatzes erschwerte. Auch waren die Auflösungen dieser Kristalle etwas geringer.



Abbildung 5.26: Kristalle, die in der Anwesenheit des Inhibitors Venturicidin A gewachsen sind.

Der Zusatz von Arginin im molaren Verhältnis von 14:1 verhinderte vollkommen die Kristallisation. Auch sind in den Kontrollansätzen, in denen das Protein in DDM solubilisiert vorlag, keine Kristalle gewachsen.

5.3.2.3.1 Auswertung der Datensätze und Strukturberechnung

Von den dreidimensionalen $c_{\lambda}\gamma e$ Kristallen wurden Datensätze an der ID 29 beamline in Grenoble gemessen. Der beste Kristall streute bis 2 Å. Aufgrund der überlappenden Reflexe (Abbildung 5.27, rechts) wurde der Datensatz mit einer sehr kleinen *oscillation range* gemessen.

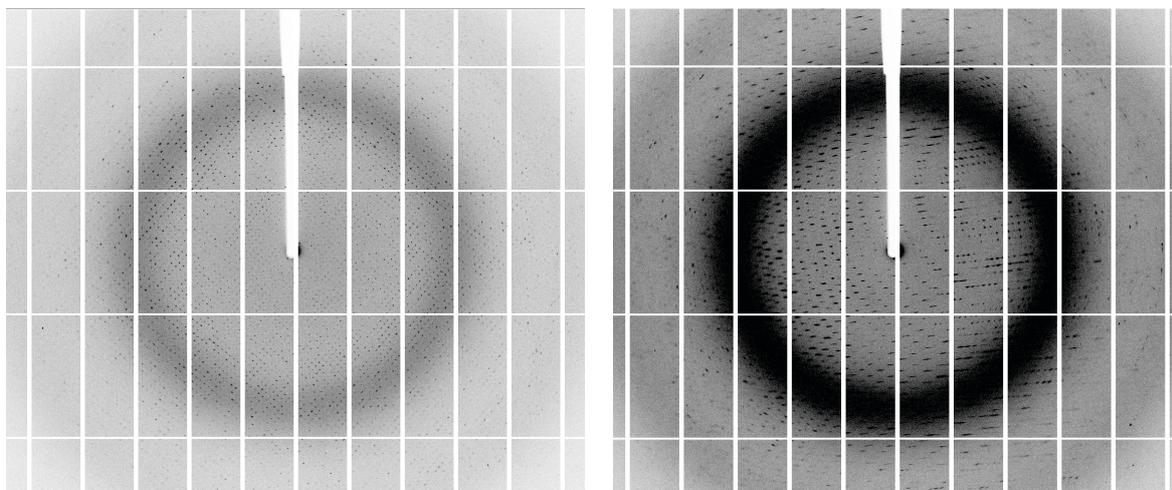


Abbildung 5.27: Diffractionsbilder gemessen an der ID 29 beamline in Grenoble. Reflexe waren bis 2 Å zu sehen.

Das Programm XDS konnte die Datensätze nicht eindeutig indizieren, weshalb es die Raumgruppe erst nach dem Integrieren in P1 bestimmte. Ausgewertet wurde dieser dann mit Xscale.

SUBSET OF RESOLUTION LIMIT	INTENSITY DATA OBSERVED	DATA WITH SIGNAL/NOISE >= -3.0	AS FUNCTION OF RESOLUTION	COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	OF RESOLUTION expected	R-FACTOR COMPARED	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal Corr	SigAno	Nano
11.18	3372	958	982	97.6%	3.8%	4.6%	3370	23.51	4.5%	3.2%	-25%	0.609	647
7.91	5310	1714	1740	98.5%	4.1%	4.5%	5238	22.08	5.0%	3.7%	-17%	0.671	613
6.46	7185	2208	2230	99.0%	5.0%	5.4%	7127	18.24	6.0%	4.9%	-16%	0.718	838
5.59	9009	2616	2634	99.3%	6.2%	6.3%	8994	16.24	7.3%	6.2%	-18%	0.705	1280
5.00	10199	2939	2948	99.7%	6.2%	6.3%	10196	16.21	7.4%	6.3%	-18%	0.678	1387
4.56	10787	3262	3286	99.3%	5.5%	5.6%	10724	17.58	6.6%	5.7%	-26%	0.646	1417
4.23	10363	3480	3556	97.9%	5.7%	5.7%	10202	15.75	7.0%	6.6%	-23%	0.650	930
3.95	12445	3784	3826	98.9%	6.7%	6.4%	12382	15.34	8.1%	7.3%	-13%	0.751	1374
3.73	13770	4030	4066	99.1%	6.8%	6.9%	13726	14.98	8.0%	7.5%	-12%	0.727	1754
3.54	14774	4255	4267	99.7%	8.4%	8.4%	14732	12.71	10.0%	9.4%	-9%	0.751	1909
3.37	15674	4454	4476	99.5%	9.4%	9.5%	15654	11.42	11.2%	11.2%	-7%	0.745	2066
3.23	16773	4705	4711	99.9%	10.9%	11.3%	16765	10.04	12.9%	13.5%	-7%	0.741	2293
3.10	16639	4882	4907	99.5%	12.8%	13.2%	16559	8.54	15.2%	16.8%	-6%	0.731	2165
2.99	15640	5032	5085	99.0%	16.8%	16.7%	15406	6.66	20.2%	24.4%	-6%	0.750	1666
2.89	17464	5206	5243	99.3%	17.8%	18.1%	17337	6.52	21.2%	24.2%	-4%	0.748	2046
2.80	18777	5460	5504	99.2%	21.7%	22.4%	18711	5.59	25.8%	28.8%	-4%	0.742	2237
2.71	19381	5586	5597	99.8%	25.0%	25.3%	19328	5.03	29.7%	32.5%	-4%	0.742	2291
2.64	19875	5737	5763	99.5%	29.8%	31.2%	19828	4.44	35.4%	38.1%	-3%	0.758	2344
2.56	20703	5944	5965	99.6%	36.4%	36.2%	20659	3.75	43.2%	45.7%	-6%	0.747	2520
2.50	21047	6038	6060	99.6%	37.8%	37.7%	21003	3.61	44.8%	49.1%	-5%	0.723	2532
total	279187	82290	82846	99.3%	10.2%	10.4%	277941	9.85	12.2%	15.8%	-9%	0.728	34309

Abbildung 5.28: Auswertung des Datensatzes mit Xscale.

Um durch Pseudotranslationen verursachte Pathologien ausschließen zu können, wurde dieser Datensatz zusätzlich mit dem Programm LABELIT indiziert. Wie das Resultat zeigt, hat dieses Programm den Datensatz mit der gleichen Raumgruppe und den gleichen Zellkonstanten bestimmt.

LABELIT Indexing results:

Beam center x 215.72mm, y 210.81mm, distance 337.89mm ; 80% mosaicity=1.20 deg.

Solution	Metric fit	rmsd	#spots	crystal_system	unit_cell	volume
:)	2	0.1254	dg 0.309	317 monoclinic mC	226.78 111.27 110.96 90.00 116.18 90.00	2512736
:)	1	0.0000	dg 0.293	269 triclinic aP	110.95 111.24 126.27 63.87 66.61 89.89	1255581

MOSFLM Integration results:

Solution	SpaceGroup	Beam x	y	distance	Resolution	Mosaicity	RMS
:)	2	C2	215.78 211.27	337.85	2.78	1.200000	0.235
	1	P1	215.77 210.88	337.60	2.90	1.200000	0.287

Weiter wurden die Daten mit den Programmen Pointless, Scala und xtriage ausgewertet. Die Auswertungen sind im Anhang zu finden. Folgende Tabelle stellt eine Übersicht der wichtigsten Daten dar.

Beamline	ID29, ESRF, Grenoble
Detektor	Pilatus 6M
Wellenlänge (nm)	0,97881
Detektorabstand (mm)	337,98
Auflösung nach dem Prozessieren (Å)	48.2 - 2,5
a (Å)	224
b (Å)	110
c (Å)	109.9
α (°)	90
β (°)	116.3
γ (°)	90
Raumgruppe	C2
Mosaizität (°)	0.37
max. Auflösung (Å)	2,5
Expositionszeit (s)	0,08
Rotationswinkel (°)	0,05
Gemessene Reflexe	279282
Unabhängige Reflexe	82321
I/ σ (I)	9,8 (3,6)
Vollständigkeit der Daten (%)	99,3 (99,6)
Multiplizität	3.4
L-Test	Keine <i>twin</i> Pathologie wurde detektiert

Entsprechend der Programme Scala und xtriage liegt keine *Twin*-Pathologie vor. Dem Programm Matthews Coefficient zufolge besitzt die Asymmetrische Untereinheit ein Molekül mit der Größe von 260 kDa, was dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht von 250 kDa in etwa entspricht.

Programm Matthews Coefficient				
Matthews_Coeff mol weight 261550.				
Nmol/asym	Matthews Coeff	%solvent	P(2.50)	P(tot)
1	2.32	47.00	1.00	1.00

Die *Self Rotation Function* zeigt, wie sie in Abbildung 5.29 zu sehen ist, eine 4fache Pseudosymmetrie.



Abbildung 5.29: Die *Self Rotation Function* in der Raumgruppe C121.

5.3.2.3.2 Molekularer Ersatz

Versuche, Modelle der vier Untereinheiten c-Ring, UE a, γ und ϵ mit den Programmen Phaser, AMoRe, EPMR, CNS und phenix.mr_rosetta zu positionieren, führten zu keiner korrekten Platzierung der Moleküle. Auch die Verwendung von Modellen aus dem RObetta Server half nicht.

Mit der Annahme, dass eine kristallographische Pathologie vorliegen könnte, wurde dieser Datensatz zur genauen Analyse an den Kristallographen Dr. Thomas C. Terwilliger (Los Alamos National Laboratory, USA) geschickt. Es wurden verschiedenen Raumgruppen analysiert, die aufgrund der Zellkonstanten (Die Zellkonstanten b und c sind annähernd gleich lang) in der C2 Raumgruppe ebenfalls möglich wären. Alle diese Raumgruppen wiesen Statistiken auf, die darauf schließen ließen, dass die C2 Raumgruppe wahrscheinlich die richtige ist. Es ist anzunehmen, dass der Molekulare Ersatz nur aufgrund fehlender geeigneter Modelle nicht gelingt.

5.4 Expression, Reinigung und Kristallisation des CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins

5.4.1 Heterologe Expression und Reinigung des CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins

Das CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsprotein wurde nach einem bereits bestehenden Protokoll im *E. coli* Stamm Rosetta-gamiTM (DE3) bei 30 °C exprimiert. Dieser Stamm ist defizient für die Proteine Thioredoxin-Reduktase und Glutathion-Reduktase. In den Zellen herrschen daher oxidierende Bedingungen. Das führt dazu, dass sich Disulfidbrücken ausbilden können (Derman et al, 1993).

Die Reinigung des oxidierten Fusionsproteins (CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox}) erfolgte über eine Metallchelatchromatographie, eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und eine Gelfiltration. Folgende SDS-PAGE stellt die einzelnen Reinigungsschritte dar.

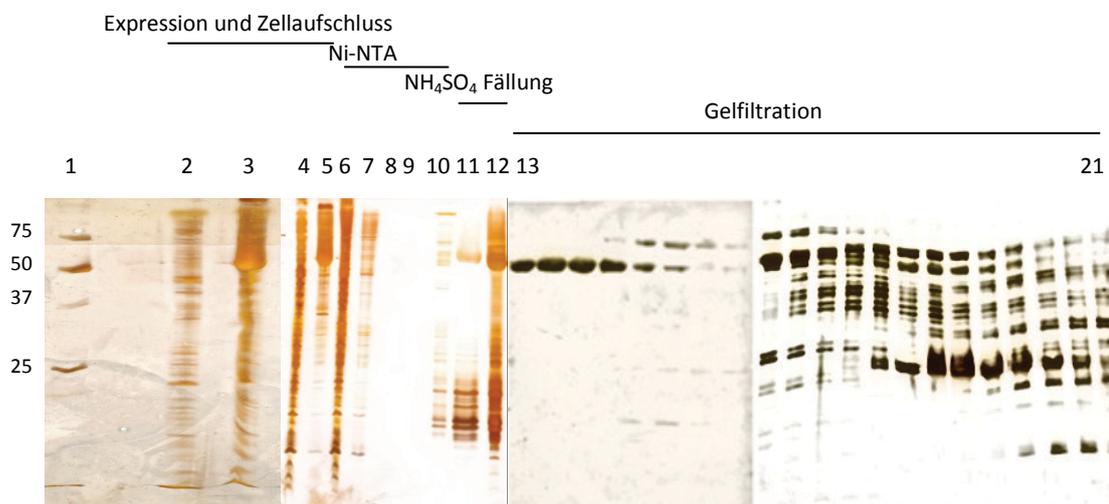


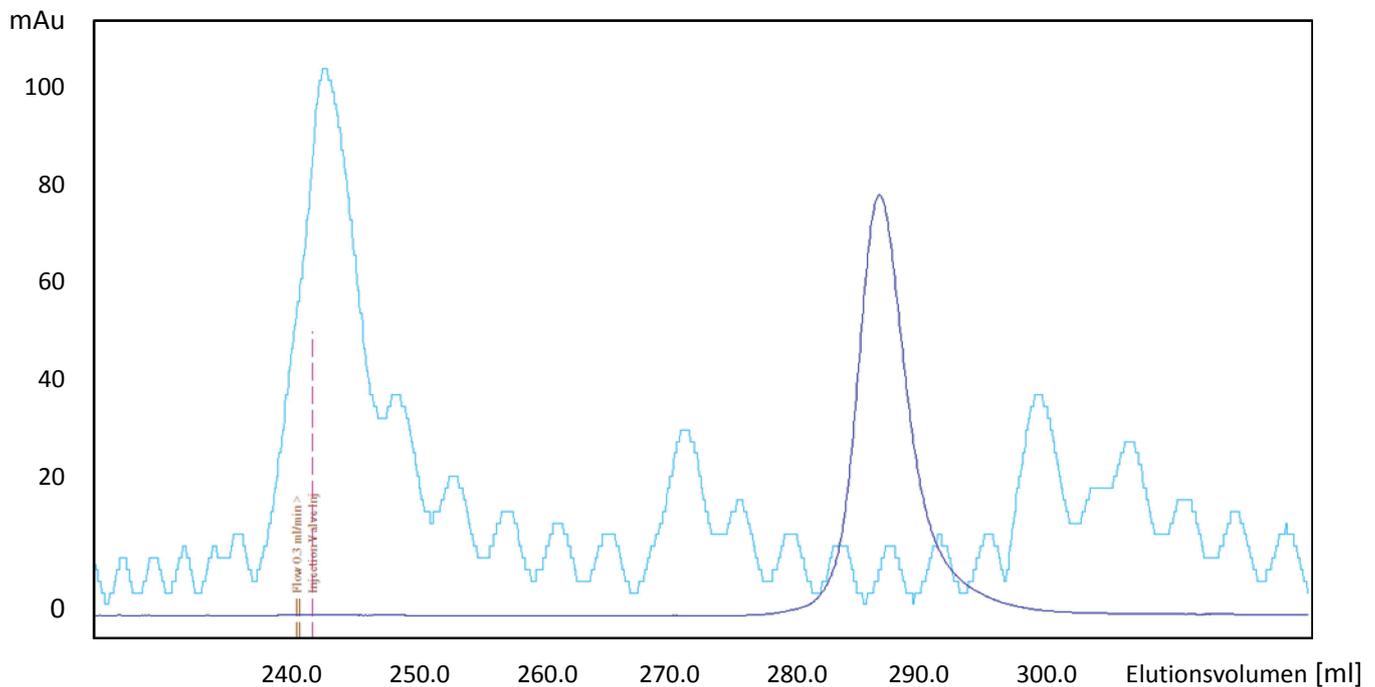
Abbildung 5.30: Expression und Reinigung des CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox} Fusionsproteins. (1) Proteinmarker. Die Molekulargewichte der Proteinstandards sind in kDa angegeben. (2) Vor Induktion der Expression (3) Nach Induktion und Expression (4) Pellet nach Zentrifugation des Zellaufschlusses (5) Überstand nach Zentrifugation des Zellaufschlusses (6) Durchlauf der Ni-NTA Reinigung (7-9) Waschfraktionen (10) Erste Pellet der Ammoniumsulfatfällung (11) Zweite Pellet der Ammoniumsulfatfällung (12) Im Konzentrator (30 kDa MWCO) gewaschenes und konzentriertes Protein (13-30) Fraktionen der Gelfiltration (13-16) gesammelte Fraktionen für die Kristallisation. Verwendet wurde eine HiPrep 16/60 Sepharyl S-200 High Resolution Säule.

Wie in Abbildung 5.30 Reihe 3 zu erkennen ist, hat das exprimierte Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 51 kDa. Nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation ist das Fusionsprotein als lösliches Protein im Überstand (Reihe 5) zu sehen. Einschlusskörper (Reihe 4) sind nicht vorhanden. Die Waschfraktionen (Reihen 7-9) zeigen, dass in diesem Schritt kein Fusionsprotein verloren geht. Nach dem Waschschrift war das Fusionsprotein deutlich als eine intensiv gelbe Bande auf der Säule zu sehen. Es wurde mit 300 mM Imidazol im Waschpuffer eluiert, wobei nur die gelben Tropfen gesammelt wurden. Anschließend wurde zur weiteren Reinigung eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, wobei das Fusionsprotein bei einer 75 %igen

Ammoniumsulfatkonzentration ausfiel. Während der ersten Fällung bei 46,5 % (Reihe 10) geht kein Fusionsprotein verloren. Nach der Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 85 % wurde das Fusionsprotein vollständig gefällt (Reihe 11). Das zweite Pellet zeigte eine intensive Gelbfärbung. Wie das wieder gelöste und konzentrierte Fusionsprotein (Reihe 12) zeigt, befinden sich noch viele andere *E. coli* Proteine im Konzentrat. Im nächsten Schritt wurde das oxidierte Fusionsprotein weiter über eine Gelfiltration (Sephadex S-200) gereinigt. Es eluierte als erstes gefolgt von den Verunreinigungen kleineren Molekulargewichtes. Die ersten gesammelten Fraktionen der Gelfiltrationen zeigten eine intensive Gelbfärbung und konnten daher auch ohne eine SDS-PAGE identifiziert werden. Diese Fraktionen wurden vereint und konzentriert. Wie in der SDS-PAGE zu sehen ist, war das Fusionsprotein sehr rein und konnte für Kristallisationsexperimente genutzt werden. Die Ausbeute lag bei 0,16 mg Fusionsprotein pro Gramm ausgeschlossener Zellen.

5.4.2 Analytisch Gelfiltration des CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox} Fusionsproteins

Bei der analytischen Gelfiltration des isolierten und konzentrierten Fusionsproteins eluierte ein homogener Peak.



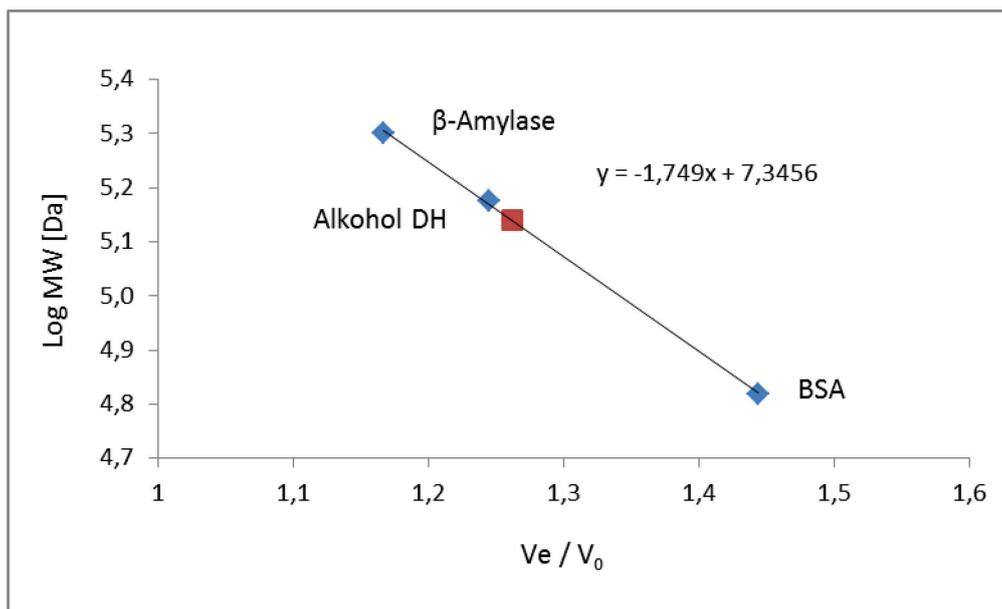


Abbildung 5.31: Oben: Elutionsprofil der Gelfiltration des isolierten und konzentrierten CF_1Y_{ox} -Thioredoxin_{E.coli ox} Fusionsproteins bei 4 °C. Unten: Eichung der S-200 Säule mit Standardproteinen. Verwendet wurde eine HiPrep 16/60 Sepharyl S-200 High Resolution Säule. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Die Elution des CF_1Y_{ox} -Thioredoxin_{E.coli ox} ist in der Eichgerade als roter Punkt gekennzeichnet.

Das berechnete Molekulargewicht lag bei 137681,3 Da und das theoretische Molekulargewicht liegt bei 51000 Da. Das Verhältnis dieser beiden Werte ist 2,7. Demzufolge handelt es sich hierbei um langgestreckte Dimere. Mit diesem Protein wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt.

5.4.3 Kristallisation des $CF_1\gamma$ -Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins

Die ersten Kristallisationsexperimente wurden im European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Hamburg bei 19 °C mit der *sitting drop* Methode durchgeführt. Getestet wurden die im Kapitel 4 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Kristallisationskits. Die ersten Kristalle wuchsen in der PEGs II Suite # 17 innerhalb von 6 Tagen.



Abbildung 5.32: Kristalle des CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox} Fusionsproteins gewachsen in der PEGs II Suite # 17 bei 19 °C in einer 96 well sitting drop Platte (Innovaplate™ SD-2).

Die Kristalle des CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox} Fusionsproteins sind gelb und zeigten keine scharfen Kanten.

Für die Kristallisationsansätze mit dem reduzierten Fusionsprotein wurde das CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox} mit 50 mM DTT reduziert. Dabei änderte die Proteinlösung ihre Farbe von gelb nach grau. Nach dem Zentrifugieren bildete sich kein Pellet, was darauf schließen lässt, dass das Protein stabil war. Auf Eis gelagert färbte sich die Proteinlösung nach einigen Stunden wieder vollständig gelb.

Auch mit dem reduzierten Fusionsprotein (CF₁γ_{red}-Thioredoxin_{E. coli red}) wurden die kommerziell erhältlichen Kristallisationskits ausprobiert. Zum Kristallwachstum kam es jedoch nicht.

5.4.4 Optimierungsversuche der CF₁γ_{ox}-Thioredoxin_{E. coli ox} Kristalle

Die anfänglichen Kristalle konnten nicht reproduziert werden. Der Zusatz von verschiedenen Salzen zur Optimierung der Kristalle führte dazu, dass keine Kristalle wuchsen. Es wurde ein pH und PEG Konzentration Screening ausgehend von der anfänglichen Kristallisationsbedingung bei 21 °C und 15 °C unternommen. Kristalle wuchsen in einer Bedingung, ohne Präzipitatbildung, nach drei Wochen (Abb. 5.33) bei 21 °C.

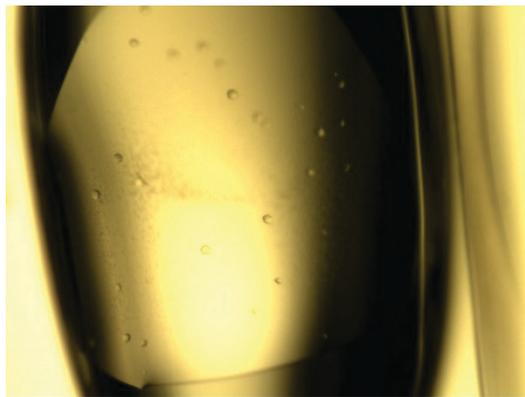


Abbildung 5.33: Kristalle des $CF_1\gamma_{ox}$ -Thioredoxin_{E. coli ox} Fusionsproteins bei 21 °C in einer 96 well sitting drop Platte (NeXtal Evolution μ plate). Gewachsen in 30 % (w/v) PEG 1500, 30 % pH 4 (Malonsäure, Imidazol, Borsäure), 70 % pH 10 (Malonsäure, Imidazol, Borsäure).

Die Kristalle wuchsen sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von 20 mM NaCl. Diese Kristalle zeigten ebenfalls eine deutliche Gelbfärbung. Sie zeigten keine scharfen Kanten sondern waren eher rund. Auch diese Kristalle konnten nicht reproduziert werden. Daher wurde erneut ein Kristallisationscreening, diesmal bei 4 °C, durchgeführt. Verwendet wurden wieder die kommerziell erhältlichen Kristallisationskits. Das Screening wurde sowohl mit oxidiertem, als auch mit reduziertem Protein durchgeführt. Kristalle sind jedoch keine gewachsen.

5.4.5 Diffraktionsmessung der $CF_1\gamma_{ox}$ -Thioredoxin_{E. coli ox} Kristalle

Die im pH und PEG Konzentrations *Screening* gewachsenen Kristalle (Abb. 5.33) wurden an der beamline X12 im DESY, Hamburg gemessen.

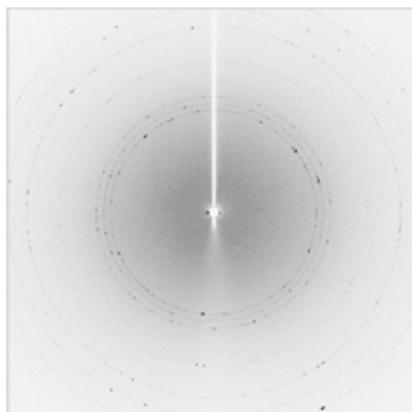
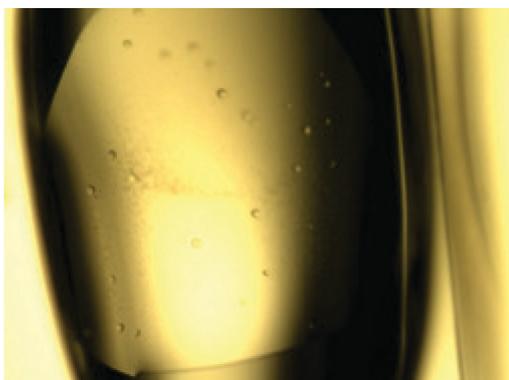


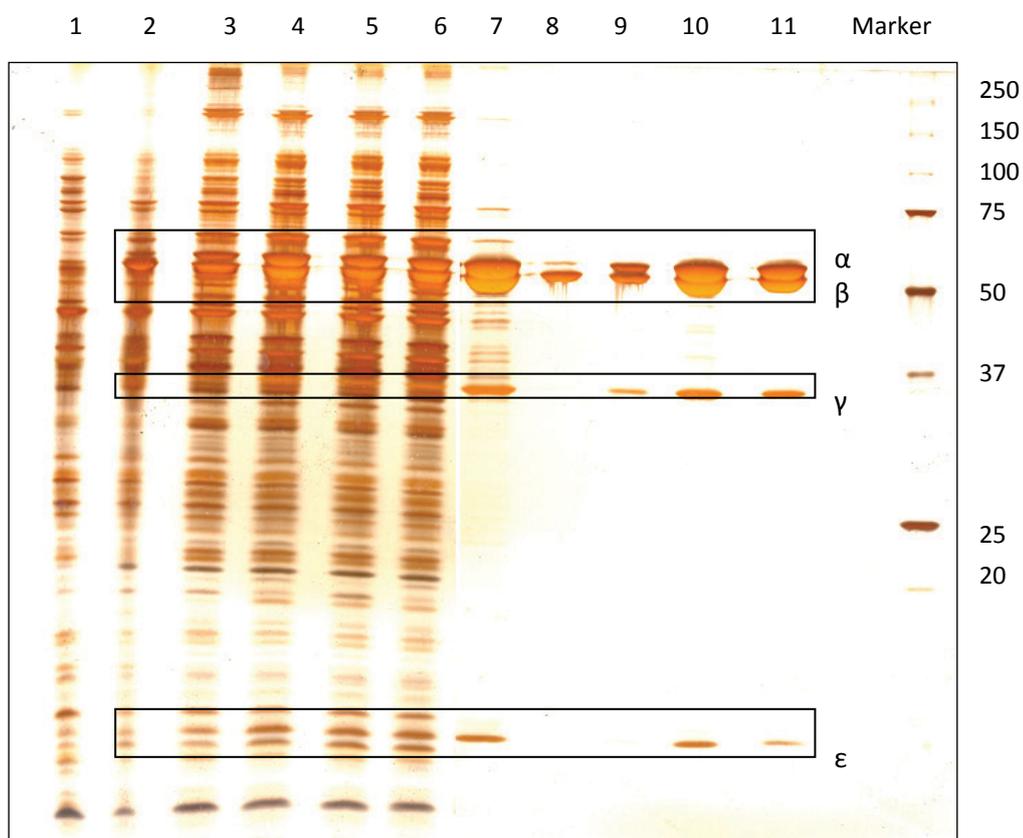
Abbildung 5.34: Diffraktionsmessung der $CF_1\gamma_{ox}$ -Thioredoxin_{E. coli ox} Kristalle an der X12 beamline im DESY, Hamburg. Als Kryoprotektor wurde die Kristallisationslösung verwendet.

Wie das Diffraktionsbild in Abbildung 5.34 (rechts) zeigt, sind, abgesehen von Eisingen, keine Reflexe auf dem Diffraktionsbild zu sehen.

5.5 Expression, Reinigung und Kristallisation der F₁ ATPase aus *T. elongatus*

5.5.1 Expression und Reinigung der F₁ ATPase aus *T. elongatus*

Die Expression der F₁ ATPase aus *T. elongatus* erfolgte zu Anfang über ein bereits bestehendes Protokoll. Die heterologe Expression fand in *E. coli* Zellen des Stammes BL21 (DE3) bei 37 °C statt. Das Protein wurde zunächst über ein Protokoll gereinigt, nach dem die F₁ ATPase über eine Metallchelatchromatographie und über eine Anionenaustauschchromatographie isoliert wurde.



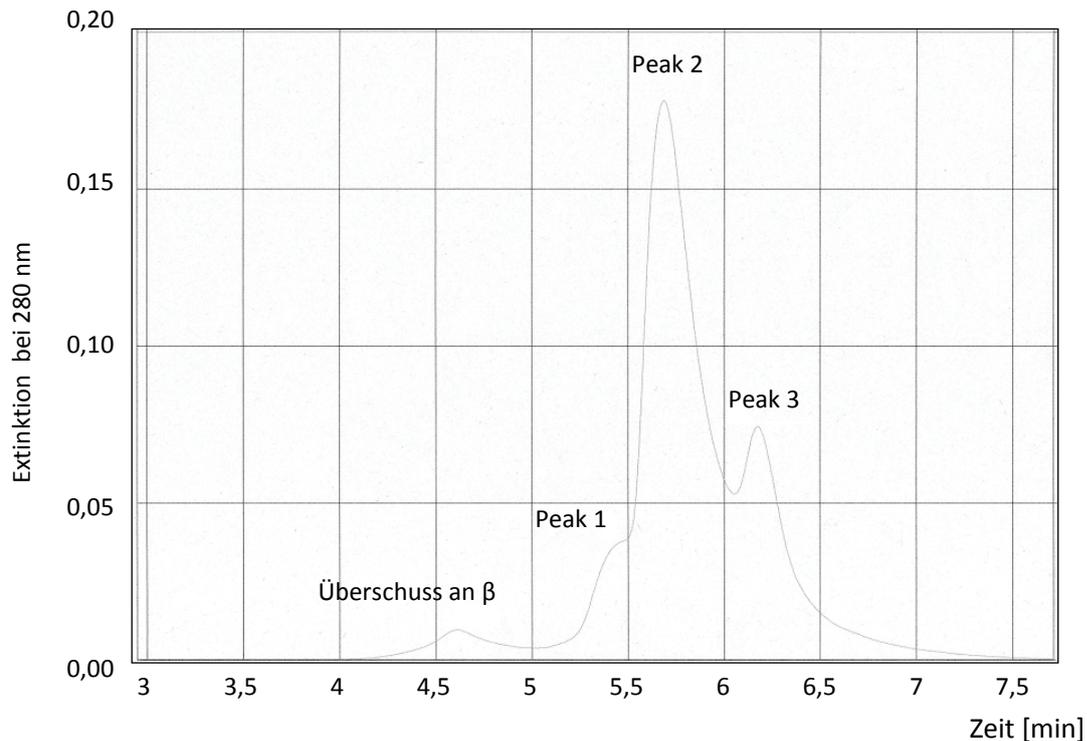


Abbildung 5.35: Oben: Silbergefärbte 15%ige SDS-PAGE der anfänglichen Expression und Reinigung der F_1 ATPase aus *T. elongatus*. Unten: Profil der Anionenaustauschchromatographie.

(1) Vor Induktion der Expression (2) Nach Induktion und Expression (3) Zellaufschluss mit der French-Press (4) Überstand nach Zentrifugation des Zellaufschlusses (5) Durchlauf der Ni^{2+} -NTA Reinigung (6) Waschfraktion (7) Eluat (8) Überschuss an β (9) Peak 1 des HPLC-Profiles (10) Peak 2 des HPLC-Profiles (11) Peak 3 des HPLC-Profiles. Rechts ist der verwendete Marker dargestellt. Die Molekulargewichte der Proteinstandards sind in kDa angegeben.

Das Profil der Anionenaustauschchromatographie zeigte vier Proteinkomplexe, die bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen von der Säule eluierten. Aus der Coomassie gefärbten SDS-PAGE ist zu entnehmen, dass die *peaks* 1, 2 und 3 alle Untereinheiten des Komplexes enthielten. Bei keinem der drei *peaks* ist die erwartete Stöchiometrie von 3:3:1:1 gegeben. Die ϵ Untereinheit färbt sich in allen Komplexen schwächer als die γ Untereinheit.

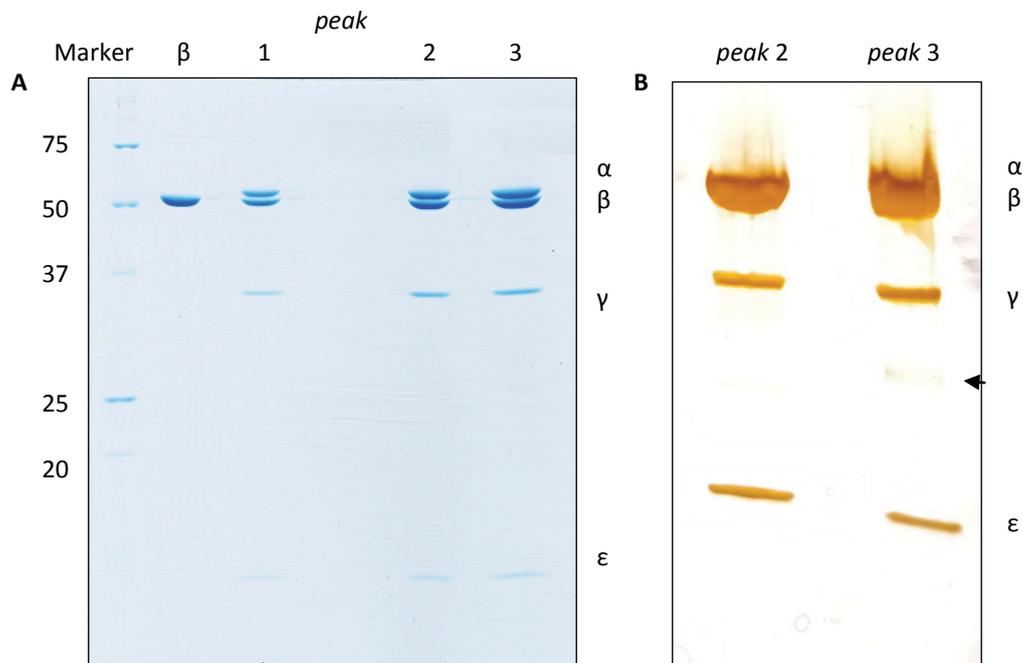
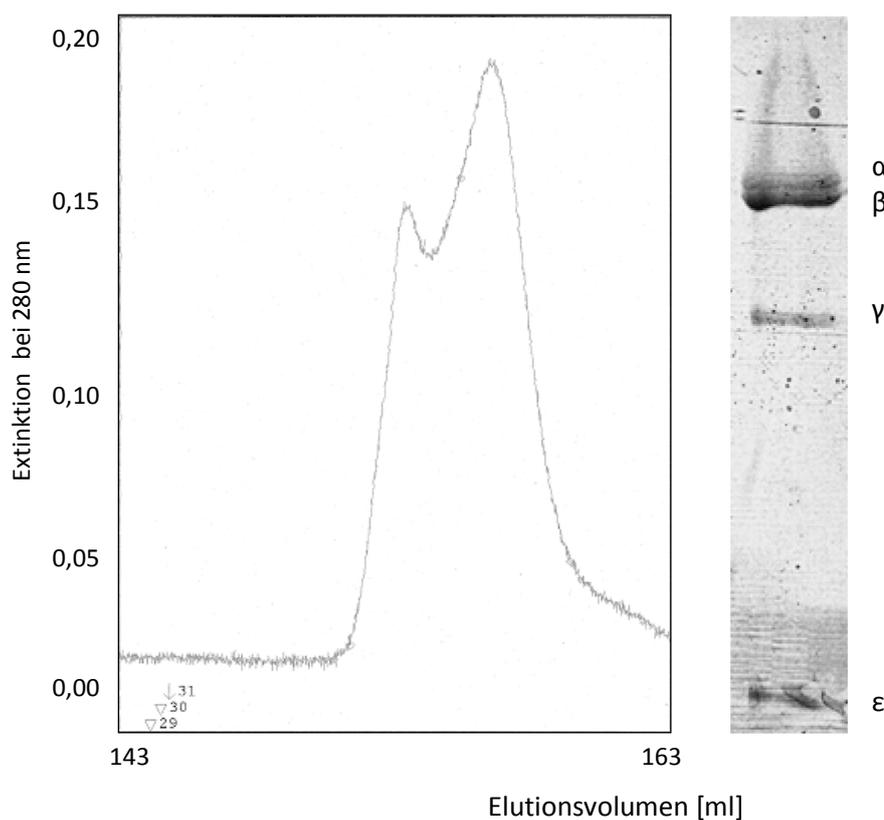


Abbildung 5.36: (A) Coomassie gefärbte 15%ige SDS-PAGE der vier *peaks* des HPLC Profils. **(B)** Silbergefärbte 15%ige SDS-PAGE der konzentrierten F₁-Komplexe der *peaks* 2 und 3 aus dem HPLC-Profil. Rechts ist der verwendete Marker dargestellt. Die Molekulargewichte der Proteinstandards sind in kDa angegeben.

Das Profil der Gelfiltration des konzentrierten Proteins des dritten *peaks* zeigt, dass es sich um ein Gemisch aus Monomeren und Dimeren handelt, wobei die Monomere überwiegen. Bei der Coomassie gefärbten SDS-PAGE der Monomere ist die erwartete Stöchiometrie von 3:3:1:1 gegeben.



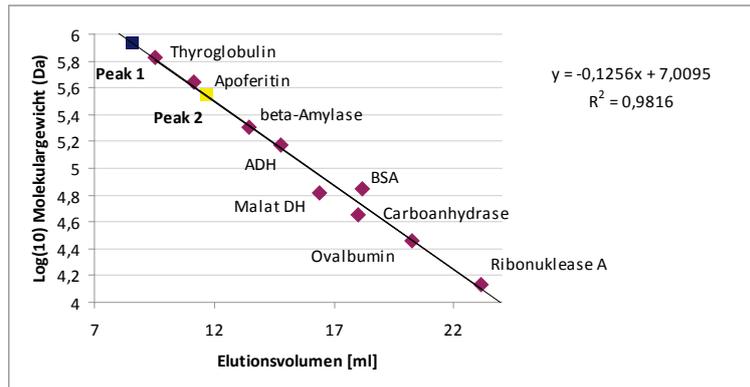


Abbildung 5.37: Oben: Elutionsprofil der Gelfiltration des gereinigten und konzentrierten F_1 -Komplexes bei RT. Die Coomassie gefärbte 15%ige SDS-PAGE entspricht der konzentrierten rechten abfallenden Flanke des zweiten Peaks. Unten: Eichung der S-300 Säule mit Standardproteinen. Verwendet wurde eine Pharmacia HR 10/30-Säule, befüllt mit Sephadex S-300-Material. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Aufgetragen wurde 1 mg des F_1 Komplexes. In der Eichgerade ist *peak 1* blau markiert und *peak 2* ist gelb markiert.

Kristallisationsansätze wurden zunächst mit dem konzentrierten Protein aus dem zweiten *peak* durchgeführt, weil dieser im Profil der HPLC die Hauptmenge darstellte. Diese führten jedoch nicht zum Wachstum von Proteinkristallen. Die Ausbeute lag bei 2 mg F_1 pro Gramm aufgeschlossener Zellen.

In den folgenden Schritten wurde versucht die Reinigung zu optimieren. Ziel war es, statt der drei Proteinkomplexe nur einen homogenen Komplex mit korrekter Stöchiometrie zu erhalten.

Die F_1 ATPase aus *T. elongatus* ist ein thermophiles Protein, weshalb der Einfluss der Temperatur auf die Stöchiometrie des Komplexes näher untersucht wurde. Dazu wurde das Eluat der Metallchelatchromatographie für 30 min bei 40 °C inkubiert. Das Profil der darauf folgenden Anionenaustauschchromatographie zeigte, dass der dritte *peak* fast vollständig verschwunden war. Der zweite *peak* hingegen war dementsprechend größer geworden.

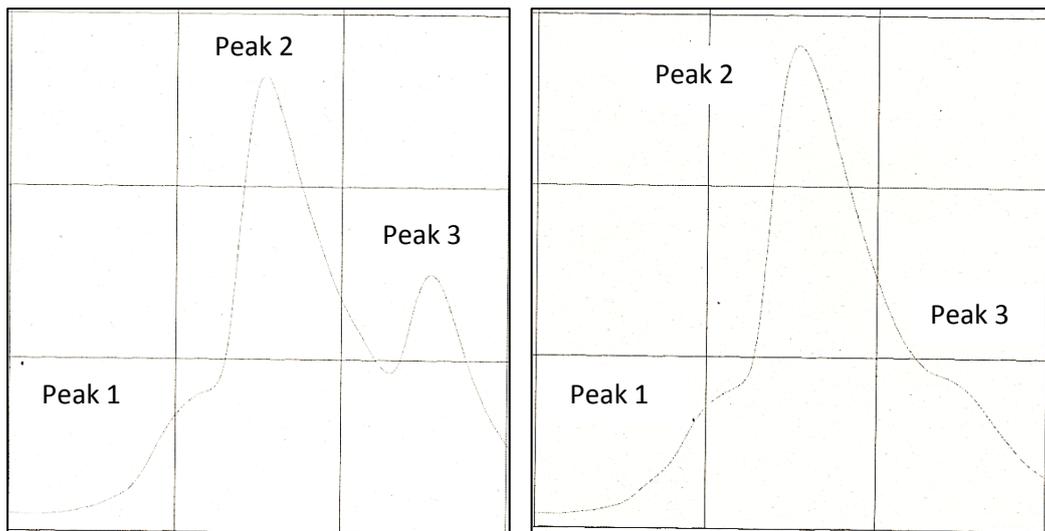


Abbildung 5.38: Links: Profil der Anionenaustauschchromatographie bei Raumtemperatur und einem pH Wert von 6,5. Rechts: Profil der Anionenaustauschchromatographie nach Inkubation des Eluates bei 40 °C für 30 min bei dem gleichen pH Wert.

Ließ man hingegen das erwärmte Eluat wieder vollständig abkühlen bevor es auf die Säule aufgetragen wurde, dann war keine Veränderung des HPLC Profils zu sehen.

Alle zur Reinigung verwendeten Puffer hatten einen pH Wert von 7 und die HPLC wurde bei einem pH Wert von 6,5 durchgeführt. In einem zweiten Versuch wurde deshalb der Einfluss des pH Wertes auf die Stabilität des Komplexes untersucht. Zur Feststellung des optimalen pH Wertes wurde eine kleine Menge des stark konzentrierten Proteins (*peak2*, wildtyp F_1) in je 1 ml Puffer¹ mit verschiedenen pH Werten gegeben (pH 4 bis 9,5 in 0,5 Schritten). Die Eppendorfhütchen wurden sofort sowie nach 24h und 96h zentrifugiert². Bei den pH Werten 4 und 4,5 war sofort ein Pellet zu sehen. Bei pH 5 und 5,5 sowie 7,5 denaturierte das Protein innerhalb von 24h und bei den pH Werten 6 bis 7 innerhalb von 96 h. Bei den pH Werten 8 bis 9,5 war auch nach 4 Tagen noch kein Pellet zu sehen.

Aufgrund dieser Feststellungen wurde der pH-Wert aller Puffer auf 8,5 geändert und vor der Reinigung fand eine Hitzeaktivierung bei 55 °C (optimale Wachstumstemperatur für *T. elongatus*) für eine Stunde statt. Zur zusätzlichen Stabilisierung des Komplexes wurde dieser mit Nukleotiden beladen und durch die Zugabe von Azid inhibiert.

All diese Veränderungen führten dazu, dass sich das Profil der HPLC änderte. Es eluierte nur ein homogener Komplex. Die Erhöhung des pH Wertes hatte zur Folge, dass das Protein nicht wie sonst zwischen 0,5 und 1 M NaCl sondern verschoben, zwischen 1 und 1,5 M NaCl eluierte.

¹ 50 mM Natriumacetat pH 4-5,5 oder HEPES pH 6-7,5 oder Tris/Acetat pH 8-9,5, 2 mM MgCl₂ 100 mM KCl, 0,002 % (w/v) PMSF

² 2 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur

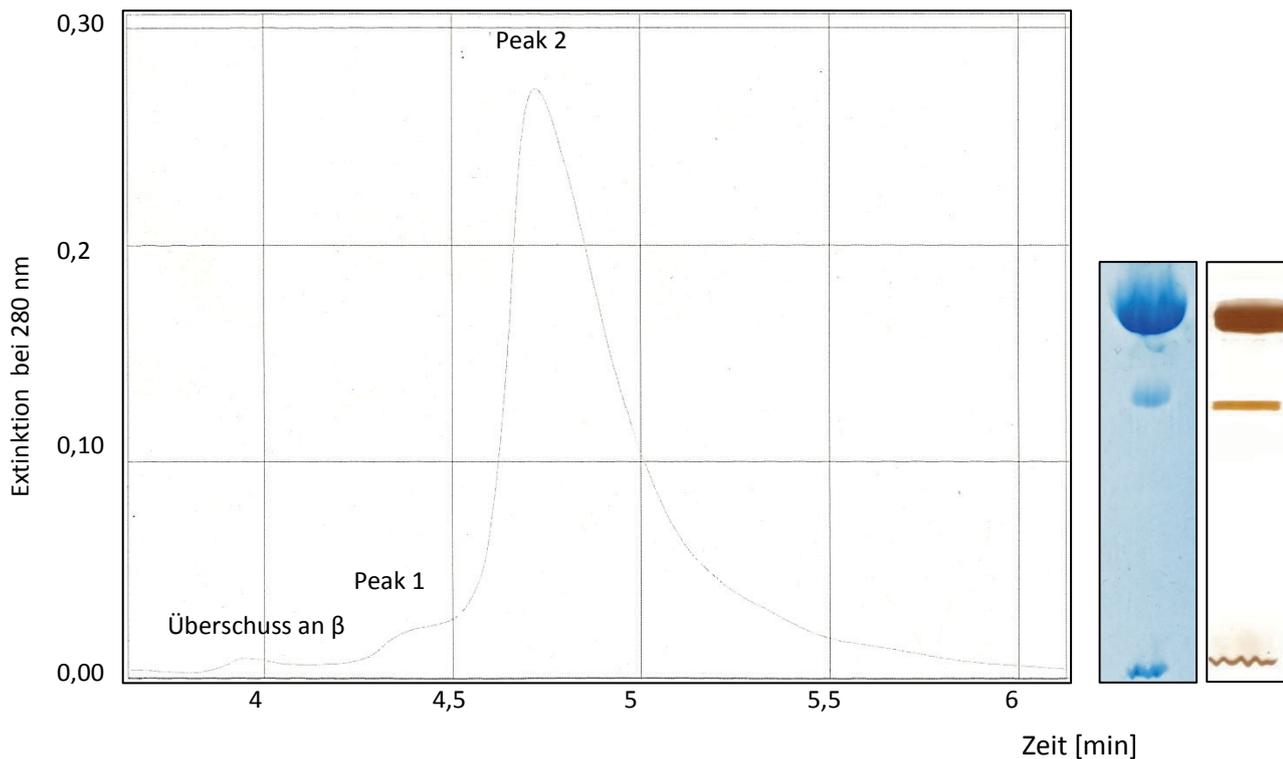


Abbildung 5.39: Profil der Anionenaustauschchromatographie bei pH 8,5. Links: Coomassie- und silbergefärbte 15%ige SDS-PAGE.

Zwar sind in der Coomassie- und silbergefärbten SDS-PAGE (Abb. 5.39) die Untereinheiten α und β nicht deutlich aufgelöst, trotzdem ist klar zu erkennen, dass sich die ϵ Untereinheit genauso stark färbt wie die γ Untereinheit. Die Stöchiometrie des Komplexes entspricht also dem erwarteten von 3:3:1:1.

Eine Gelfiltration dieses homogenen *peaks* zeigte, dass es sich immer noch um eine Mischung aus Monomeren und Dimeren handelte. Auch blieb das Verhältnis unverändert (identisch mit Abbildung 5.37).

5.5.2 Kristallisation der F_1 ATPase aus *T. elongatus*

Mit den konzentrierten Fraktionen (*peak 2*) aus der HPLC wurden Kristallisationsansätze bei 15, 20 und 30 °C durchgeführt. Getestet wurden die kommerziell erhältlichen Kristallisationskits. Proteinkristalle wuchsen nur in einer Bedingung: der Qiagen JCSG+ Suite # 53 bei 15 und 30 °C.

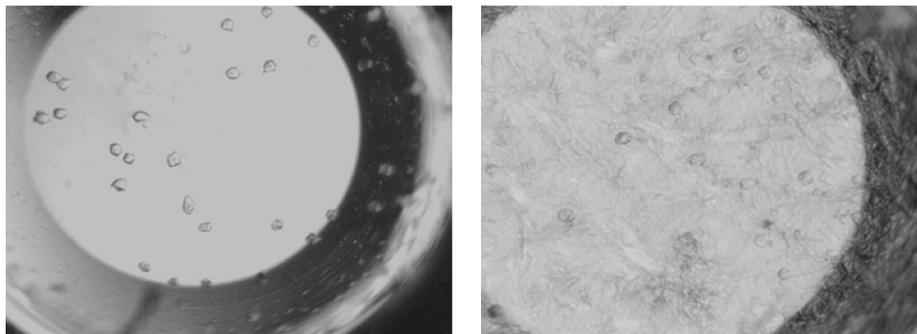


Abbildung 5.40: Proteinkristalle des $F_1\alpha_3\beta_3\gamma_{red}\epsilon$ Komplexes gewachsen in der JCSG+ Suite # 53 bei 15 °C (links) und 30 °C (rechts) in einer Terasaki Mikrobath Kristallisationsplatte.

Diese Proteinkristalle konnten mit der chimären F_{1L} , sowie mit der reduzierten Variante und dem Wildtyp F_1 bei 15 °C reproduziert werden, wobei die Kristalle optisch nicht zu unterscheiden waren. Die Kristalle wuchsen innerhalb von 24 h und konnten mit dem Farbstoff IZIT Crystal Dye von Hampton Research blau gefärbt werden. Die Blaufärbung schließt aus, dass es sich hierbei um Salzkristalle handelt. Zur Ausbildung von Präzipitat kam es nicht. In Kristallisationsversuchen, in denen das Salz aus der Kristallisationsbedingung genommen wurde, wuchsen die gleichen Kristalle.

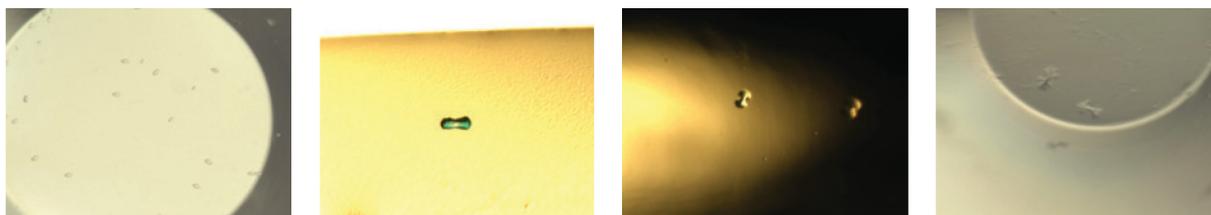


Abbildung 5.41: Proteinkristalle des $F_1\alpha_3\beta_3\gamma_{red}\epsilon$ Komplexes gewachsen in der JCSG+ Suite # 53 bei 15 °C.

Links sind die Kristalle zu sehen, die innerhalb von 24 h gewachsen sind. Die darauf folgenden Bilder stellen das Wachstum und die damit verbundene Veränderung der Morphologie der Kristalle innerhalb einer Woche dar. Das zweite Bild von links zeigt einen Kristall, der mit IZIT Crystal Dye blau gefärbt wurde.

Die anfangs sehr kleinen Kristalle entwickelten innerhalb einer Woche eine Schmetterlingsmorphologie. Diese Morphologie ist für Röntgenbeugungsexperimente ungünstig. Daher wurde versucht die Morphologie der Kristalle durch Optimierung der Kristallisationsbedingung zu verbessern.

Die Kristallisationsversuche bei 30 °C wurden nicht weiter fortgesetzt, weil bei dieser Temperatur die Kristalle optisch nicht von denen bei 15 °C zu unterscheiden waren und weil kein Inkubator bei 30 °C zu Verfügung stand.

Zunächst wurde das MPD durch PEG ausgetauscht, wodurch sich die Morphologie leicht änderte. Mit der Zeit nahmen aber auch diese Kristalle eine ungünstige Morphologie an.



Abbildung 5.42: Proteinkristalle des $F_1\alpha_3\beta_3\gamma_{red}\epsilon$ Komplexes gewachsen in der Anwesenheit von PEG 3350 bei 15°C.

Links sind die Kristalle zu sehen, die innerhalb von 24 h gewachsen sind. Die darauf folgenden Bilder stellen das Wachstum und die damit verbundene Veränderung der Morphologie der Kristalle innerhalb einer Woche dar. Das zweite Bild von links zeigt einen Kristall, der mit Izit Crystal Dye blau gefärbt wurde.

Weitere Optimierungsversuche bestanden darin verschiedene Kristallisationsmethoden, wie die *hanging drop* und die *sitting drop* Methode, zu testen. Es ergab sich, dass die Kristalle in der *sitting drop* Methode optisch etwas besser aussahen (Abbildung 5.42, zweites und drittes Bild), aber immer noch eine Schmetterlingsmorphologie zeigten.

Die unter 3.7.7.1 aufgelisteten Variationen der Kristallisationsbedingung: Proteinkonzentration, Volumen des Kristallisationstropfen, pH- und Temperatur-Screening, Pufferaustausch und Zusatz von Additiven führten zu keiner Veränderung der Morphologie der Kristalle. Bei dem Zusatz von Additiven war es so, dass die Kristallisation verhindert wurde. Kristalle wuchsen zwischen pH 9,5 und 10,5. 15 °C erwies sich als die beste Kristallisationstemperatur.

6 Diskussion

6.1 Reinigung und Kristallisation der CF_1CF_0 ATP aus *Spinacia oleracea*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Struktur und die Funktion der chloroplastidären ATP Synthase aus *Spinacia oleracea* studiert. Dieses Enzym gehört dem F-Typ der ATP Synthasen an und transportiert Protonen entlang eines elektrochemischen Gradienten.

Das primäre Ziel war es, die intakte CF_1CF_0 ATP Synthase zu kristallisieren und die Struktur mittels der Röntgenkristallographie bis in den atomaren Aufbau zu lösen. Dazu wurde eine Vielzahl von Kristallisationsbedingungen getestet in denen das Holoenzym eingesetzt wurde. Des Weiteren wurde versucht die Auflösung der c_{14} -Rotorring Kristalle (Vollmar et al, 2009), die bei 3,8 Å lag, zu verbessern.

Die Reinigung der ATP Synthase erfolgte aus Spinatblättern über ein bereits bestehendes Protokoll. Der letzte Reinigungsschritt, über die Anionenaustauschchromatographie, wurde aus zwei Gründen weggelassen: Zum einem, weil dieser letzte Schritt für die Kristallisation nicht erforderlich ist und zum anderen, weil während der Anionenaustauschchromatographie schnell, an den Proteinkomplex spezifisch gebundene Lipide verloren gehen können, welche bei der Kristallisation der intakten ATP Synthase in dem Sinne eine entscheidende Rolle spielen können, dass sie den Komplex stabilisieren.

6.1.1 Kristallisationsversuche mit der intakten CF_1CF_0 ATP Synthase

Die Schwierigkeit in der Kristallisation der ATP Synthase liegt darin, dass es sich hierbei um ein sehr großes Protein von insgesamt 570 kDa handelt, das aus 26 Untereinheiten besteht und zudem teilweise in der Membran integriert ist. Um die intakte ATPase zu kristallisieren, ist daher eine Kristallisationsbedingung erforderlich, in der das Protein stabil ist, seine native Konformation einnimmt und in der die hydrophobe Region des Proteins entweder in eine Membran eingebettet werden kann, oder als hydrophil maskiert wird. Während der Reinigung der ATPase wurde das Detergens Dodecyl- β -D-maltosid verwendet. Dieses Detergens ist sehr effektiv darin, die ATP Synthase in großer Anzahl aus der Thylakoidmembran zu lösen und es während der folgenden Reinigungsschritte stabil zu halten. Auch ist es das meist verwendete Detergens für die Kristallisation von Membranproteinen. Allerdings hat dieses Detergens auch Nachteile: es bildet große Mizellen, in denen das Membranprotein integriert wird. Die an das Protein spezifisch gebundenen Lipide gehen größtenteils verloren und das Detergens ist nicht fähig, Druck auf die Membran auszuüben, wie es die Lipiddoppelschicht tut. Aufgrund dieser wichtigen Aspekte wurden drei unterschiedliche

Methoden ausprobiert, die ATPase zu kristallisieren: Die lipidic sponge phase, der Zusatz von Thylakoidlipiden und die Verwendung des Lipopeptiddetergens LPD-12 zur Solubilisierung des Komplexes.

6.1.2 Kristallisation der CF_1CF_0 ATPase solubilisiert in LPD-12

Obwohl an diesem Projekt zuletzt gearbeitet wurde, wird es hier zuerst diskutiert, weil diese Methode die besten Ergebnisse geliefert hat. Das zur Solubilisierung des Proteins verwendete LPD-12 besteht aus einer Helix und zwei Fettsäuren, über die dieses Detergens mit der hydrophoben Region der ATP Synthase interagiert. Der äußere Teil der Helix besteht aus hydrophilen Aminosäureresten, wodurch dem Proteinkomplex der Charakter eines löslichen Proteins verliehen wird. Eine erfolgreiche Solubilisierung mit diesem Detergens beschränkt die Schwierigkeit der Kristallisation dieses Komplexes auf die Tatsache, dass es sich hier um ein sehr großes Protein handelt, das aus insgesamt 26 Untereinheiten besteht.

Die durch LPD-12 gebildete Mizelle sollte, analog zur Lipidmembran, einen lateralen Druck auf den Komplex ausüben und dadurch dazu beitragen, dass das Protein eine Konformation annimmt, die der nativen Konformation in der Lipiddoppelschicht sehr nahe kommt. Anders als herkömmliche Detergenzien wird das LPD-12 nur in dem Maße zugesetzt, wie es auch tatsächlich zur Solubilisierung der Proteine gebraucht wird. Anbetracht der Tatsache, dass die Herstellung dieses Detergenses sehr teuer ist, wurde das molare Verhältnis von LPD-12 zum Protein, das zur Solubilisierung aller Proteinkomplexe in der Lösung benötigt wird, nicht experimentell bestimmt, sondern es wurde ein molares Verhältnis von 21:1 gewählt, das ausreichend sein sollte. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass es zum einem beim Detergensaustausch nicht zum Proteinverlust kam und zum anderen weil es zur Kristallisation des Proteins kam, während in den Kontrollansätzen, in denen das Protein in DDM solubilisiert vorlag, gar keine Kristalle wuchsen.

Durch ein breites Screening konnte eine Kristallisationsbedingung identifiziert werden, in der es zum Kristallwachstum kam. Die Identifizierung dieser Bedingung wurde dadurch erleichtert, dass dem Protein ein Fluorophor zugesetzt wurde, das spezifisch an eine der α Untereinheiten bindet und gelb fluoresziert. In dieser Kristallisationsbedingung kam es anfänglich zu einer Phasentrennung. Erst sehr viel später wuchsen kleine, flache Kristalle, die bis 4 Å streuten. Durch Erhöhung der PEG Konzentration wuchsen in der gleichen Zeitspanne, in der die Plättchen gewachsen waren, dreidimensionalen Kristalle, welche bis 2 Å streuten. Die bessere Auflösung ist demnach auf das schnellere Kristallwachstum und auf die dreidimensionale Morphologie zurückzuführen.

Es wurden zwei Temperaturen für das Kristallwachstum getestet: 21 °C und 15 °C. Bei beiden Temperaturen kam es zum Wachstum von Kristallen, mit dem Unterschied, dass die Kristalle bei 15 °C deutlich kleiner waren und nur bei niedriger Auflösung streuten.

Die silbergefärbte SDS-PAGE eines Kristalls zeigt das Vorhandensein von vier Untereinheiten der CF_1CF_0 ATP Synthase: c-Ring, UE a, γ und ϵ . Durch den Einsatz des LPD-12 konnte also erstmals die Untereinheit a kristallisiert werden, die zuvor noch von keiner F-ATPase kristallisiert werden konnte. Auch ist dies vermutlich das erste Mal, dass in Anwesenheit dieses Detergens ein Membranprotein kristallisiert werden konnte. Es ist wahrscheinlich, dass das LPD-12 den Zusammenhalt der F_0 Untereinheiten fördert und verhindert, dass spezifisch gebundene Lipide, zwischen dem c-Ring und der UE a, in der Kristallisationslösung dissoziieren. Dass die anderen Untereinheiten ($\alpha_3\beta_3\delta bb'$) des Proteinkomplexes beim Kristallisieren dissoziierten, muss mit der Kristallisationsbedingung zusammenhängen. Wahrscheinlich dissoziiert das $(\alpha\beta)_3$ Hexamer und reißt dabei einen Teil des peripheren Stators ($\delta bb'$) mit sich. Was die Dissoziation des $(\alpha\beta)_3$ Hexamers bewirkt, ist aus der Kristallisationsbedingung nicht zu erschließen.

Diese Kristalle wuchsen auch in Anwesenheit des Inhibitors Venturicidin. Die Bindung des Venturicidins kann indirekt durch das veränderte Kristallwachstum bestätigt werden. Anders als erwartet kam es zum Wachstum von Plättchen und das in sehr viel größerer Anzahl als ohne Inhibitor. Interessant ist, dass die Anwesenheit von Arginin im molaren Verhältnis von 14:1 das Wachstum der Kristalle vollkommen verhindert. Zwar ist Arginin eine chaotrope Substanz, jedoch ist anzunehmen, dass sie in geringen Mengen eingesetzt, eher eine Wirkung auf die Konformation des c-Ringes ausübt. In der Untereinheit a existiert ein konservierter Argininrest, von dem man glaubt, dass er den konservierten Carboxylat-Rest im c Monomer stabilisiert, wenn dieser gerade kein Proton bindet. Die natürlich Konformation des c-Ringes ist also die, in der der Carboxylat-Rest ein Proton bindet. Es ist denkbar, dass es zur Konformationsänderung des c Monomers kommt, damit das Carboxylat in die Nähe des konservierten Argininrestes kommt, um so stabilisiert zu werden. Zwar kann die chaotrope Wirkung des Arginins bei geringer Konzentration nicht ausgeschlossen werden, jedoch kann es auch sein, dass das Arginin zu einer Konformationsänderung der c-Monomere führte, oder aber zur Dissoziation der a Untereinheit beitrug, wodurch die Kristallisation verhindert wurde.

6.1.2.1 Auswertung der Datensätze und Strukturlösung

Es wurden mehrere Datensätze gemessen, deren Auswertung ergab, dass diese nicht eindeutig indiziert werden konnten. Es scheint wahrscheinlich, dass die durch XDS bestimmte C2 Raumgruppe richtig ist sofern keine kristallographische Pathologie vorliegt. Die Schwierigkeit bei der Raumgruppenbestimmung ist damit zu erklären, dass innerhalb der Asymmetrischen Untereinheit

eine 4fache Pseudosymmetrie existiert, weshalb das Programm XDS gelegentlich die Raumgruppe nicht als C2, sondern stattdessen als I422 bestimmt. Diese 4fache Symmetrie ist in der *Self Rotation Function* der C2 Raumgruppe zu erkennen. Da die *Self Rotation Function* oftmals schwer zu interpretieren ist, ist es schwer zu erklären, wodurch diese 4fache Symmetrie zustande kommt.

Raumgruppen können dann von Programmen wie XDS und iMOSFLM falsch bestimmt werden, wenn hohe Mosaizitäten oder kristallographische Pathologien vorliegen. Die Mosaizität wird erst dann als sehr hoch eingeschätzt, wenn sie über 2° liegt. Dies ist hier nicht der Fall und kann daher von einem Programm wie XDS leicht korrigiert werden. Die Anwesenheit einer Pseudotranslation konnte durch das Programm LABELIT ausgeschlossen werden und nach dem L-Test scheint eine *Twin*-Phatologie unwahrscheinlich.

Dem Programm *Matthews Coefficient* zufolge befindet sich in der Asymmetrischen Untereinheit ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 260 kDa, was in etwa dem theoretisch erwarteten entspricht.

Der Molekulare Ersatz mit den, in der Proteindatenbank deponierten Modellen und den gängigen Kristallographischen Programmen (siehe Kapitel 4.1.10.2), führte zu keiner korrekten Positionierung der Modelle in die Elektronendichte. Zusätzlich wurde zur Optimierung der Modelle der Robetta Server verwendet, sowie das Programm phenix.mr_rosetta, das die Modelle zusätzlich verbessern kann. Aber auch dieser Weg führte nicht zu einer korrekten Platzierung.

Für die Modelle der Untereinheiten α , γ und ϵ war durchaus zu erwarten, dass es keine geeigneten Modelle gibt, zumal für die α Untereinheit nur ein NMR Modell existiert und die Untereinheiten γ und ϵ sehr flexibel sind. Schwerer zu erklären ist die Tatsache, dass der c_{14} -Ring, der eine Sequenzhomologie von 100% besitzt, nicht von den kristallographischen Programmen platziert werden konnte. Eine Möglichkeit ist die, dass der c-Ring nicht aus 14 Monomeren besteht, sondern aus einer anderen Anzahl. Weil sich aber in der ASU noch andere Untereinheiten der ATP Synthase befinden, kann die Nicht Kristallographische Symmetrie (ncs) des c-Ringes nicht in der *Self Rotation Function* abgelesen werden, wie es bei den c_{14} -Rotorring Kristallen der Fall war. Daher wurden auch c-Ring-Modelle mit unterschiedlicher Anzahl an c Monomeren (8, 10, 11, 13, 15) getestet. Keines dieser Modelle konnte in die Elektronendichte positioniert werden (für c_9 , c_{12} und c_{16} gibt es noch keine Modelle). Eine zweite Möglichkeit ist die, dass der c-Ring aufgrund des hohen pH Wertes und/oder aufgrund der Anwesenheit der α UE eine andere Konformation annimmt. Eine dritte und sehr wahrscheinliche Begründung ist die, dass der durch die LPD-Mizelle verursachte laterale Druck, den c-Ring dazu zwingt, eine andere, vielleicht auch natürlichere, Konformation einzunehmen.

Zu beachten ist jedoch, dass die Struktur des c-Ringes, in den $c_x\gamma\epsilon$ -Kristallen, sich in dem Sinne von der veröffentlichten c_{14} -Rotorring Struktur (Vollmar et al, 2009) unterscheidet, dass der pH Wert der beiden Kristallisationslösungen sehr unterschiedlich ist. Der c_{14} -Rotorring kristallisierte in

einer sauren Kristallisationsbedingung (pH 4,6). Eingesetzt wurde auch hier das Holoenzym. Bis auf den c-Ring denaturieren alle anderen Untereinheiten in dieser Kristallisationslösung. Es ist schwer abzuschätzen, ob der c-Ring intakt bleibt oder, während des Denaturierungsprozesses der anderen Untereinheiten, dissoziiert und später erneut assembliert und kristallisiert. Die hier eingesetzte Kristallisationslösung besitzt einen pH-Wert von 8,5 und liegt somit im basischen. Die Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\delta b b'$ denaturieren nicht, sondern dissoziieren vom Komplex. Zwar ist stark anzunehmen, dass der pH-Wert einen Einfluss auf der Konformation des c-Ringes nimmt, jedoch sollte dieser Einfluss durch das eingesetzte Detergens stark abgeschwächt sein, da die Fettsäuren des LPD-12 die hydrophobe Region des c-Ringes (und der a Untereinheit) schützen.

Dass die Kristalle eine Pathologie besitzen scheint unwahrscheinlich, weshalb es möglich sein sollte die Struktur nach Erhalt einer experimentellen Phaseninformation zu lösen. Beispielsweise könnte durch Dampfdiffusion Iod in die Kristalle eingelagert werden. Es wäre wünschenswert dies zu tun, jedoch war dies aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war.

6.1.3 Reinigung von Lamellenlipiden und Analyse der an der ATPase spezifisch gebundene Lipide

Bei der Reinigung von Proteinen gehen oftmals spezifisch gebundene Lipide, die für die Stabilisierung des Komplexes entscheidend sein können, verloren. Eine Methode dem entgegenzuwirken besteht darin, diese Lipide bei der Kristallisation wieder zuzusetzen. Für diesen Zweck, wurden Lamellen-Lipide aus den Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten gereinigt. Dazu wurden zunächst die Chloroplasten aus frischen Spinatblättern isoliert und anschließend die Hüllmembranen der Chloroplasten in einem hypotonischen Medium entfernt. Aus den Thylakoidmembranen konnten daraufhin die Lipide isoliert werden. Eine qualitative Analyse mittels Dünnschichtchromatographie ergab, dass sich die Thylakoidmembran aus sechs verschiedenen Lipiden zusammensetzt: Monogalaktosyl-Diacylglycerol, Digalaktosyl-Diacylglycerol, Sulfolipiden, Phosphatidylglyzerin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin in unterschiedlichen Mengen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem, was 1973 von Poincelot und Mitarbeitern veröffentlicht wurde, weshalb ausgeschlossen werden kann, dass eine Kontamination mit Hüllmembranlipiden stattfand, da hier noch andere Lipidarten vertreten sind.

Was die Thylakoidmembran betrifft, so unterscheidet man zwischen der gestapelten Region und den ungestapelten Bereichen. Die Stapelung dient dazu, die Lichtabsorption in einem gegebenen Volumen zu maximieren. Man geht davon aus, dass an der Krümmung und an der Stapelung der Thylakoide sowohl Proteine, als auch Lipide involviert sind. Die ATP Synthase hingegen befindet sich nur in den ungestapelten Regionen, also physikalisch betrachtet von den anderen Proteinkomplexen,

die an der Photosynthese teilnehmen, entfernt. Diese ist nicht an der Lichtabsorption involviert und könnte sich schon aufgrund der Größe des F_1 Komplexes nicht in den gestapelten Bereich integrieren. Folglich unterscheiden sich die Lipidkompositionen der gestapelten und der ungestapelten Regionen. Die Isolierung der an der gereinigten ATP Synthase gebundenen Lipide ergab, dass hauptsächlich zwei Lipidarten anwesend sind: Sulfolipide und Phosphatidylglycerin. Ansonsten waren Spuren von Phosphatidylcholin und Monogalaktosyl-Diacylglycerol auf der DC-Platte zu erkennen. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss beachtet werden, dass sich die, an den Proteinkomplex gebundenen Lipide hauptsächlich innerhalb des c-Ringes befinden und diesen stabilisieren. Ob genau dieselben Lipide an den Kontaktflächen zwischen dem c-Ring und der membranintegrierten Untereinheiten a und b beteiligt sind, kann aus diesen Ergebnissen nicht geschlossen werden.

6.1.4 Kristallisationsversuche in der Lipidic sponge phase

Die *lipidic sponge phase* eignet sich deshalb für die Kristallisation der ATP Synthase, weil das Protein in einer künstlich hergestellten Membran aus dem Lipid Monoolein eingebettet wird und in diesem natürlichen Zustand kristallisieren kann. Zusätzlich besitzt die *lipidic sponge phase* große Hohlräume, die ein Integrieren der in Dodecyl- β -D-maltosid solubilisierten ATPase zulassen.

Die chloroplastidäre ATP Synthase aus *Spinacia oleracea* erstreckt sich 160 Å aus der Membran heraus. Zunächst wurde das Lipidic-Sponge PhaseTM Screen von Molecular Dimensions getestet, deren *sponge phases* Hohlräume mit einem Durchmesser von 100 bis 150 Å besitzen. In vielen Bedingungen kam es zum Wachstum von Kristallen, wobei es sich in den meisten Fällen um Lipidkristalle handelte. Diese Kristalle hatten scharfe Kanten und waren auf den ersten Blick nicht von Proteinkristallen zu unterscheiden. Das Diffraktionsbild hingegen zeigte, dass weder Reflexe noch Ringe zu sehen waren, weshalb geschlussfolgert werden darf, dass es sich bei diesen Kristallen um Lipidkristalle handelte. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es in Kontrollansätzen, in denen nur auf das Protein verzichtet wurde, nicht zum Wachstum von Lipidkristallen kam, ist anzunehmen, dass das Protein eine zusätzliche Übersättigung erzeugt, die das Wachstum von Lipidkristallen begünstigt.

Diese Lipidkristalle waren nur im Mitegen's LV CryoOilTM stabil und konnten in diesem Öl gewaschen werden. Die Auftragung eines solchen Kristalls auf eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung hat ergeben, dass sich ein Proteinkomplex bestehend aus den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon b'c_x$ in die *lipidic sponge phase* integriert hat. Demzufolge sind zwei Untereinheiten der ATPase, die Untereinheit a und die Untereinheit b, während der Integration dissoziiert. Es existieren zwei Möglichkeiten diese Dissoziation zu erklären. Zum einem kann die Dissoziation dieser beiden membranlokalisierten Untereinheiten durch das Fehlen von Lamellen-Lipiden begründet werden. In

diesem Fall könnte geschlossen werden, dass an dem Zusammenhalt der F_0 Untereinheiten bestimmte Lipide beteiligt sind. Zum anderen ist denkbar, dass die Dissoziation der beiden F_0 Untereinheiten mit der Tatsache verbunden ist, dass die Hohlräume der *lipidic sponge phase* mit einem maximalen Durchmesser von 150 Å etwas kleiner sind als für die ATP Synthase erforderlich und dass dadurch ein Druck auf den Komplex ausgeübt wird, der dazu führt, dass der periphere Stator durch Dissoziation der Untereinheiten a und b diesem Druck nachgibt.

Abgesehen vom Lipidic-Sponge Phase™ Screen von Molecular Dimensions wurden auch *sponge phases* selbst hergestellt. Dazu wurden anfänglich Polyethylenglycole und später auch Pentaerythritolpropoxylat (PPO) als Präzipitanzien verwendet, da diese zu einem stärkeren Anschwellen der *sponge phase* führen und folglich auch zur Entstehung von größeren Hohlräumen. Mit PPO können *sponge phases* mit besonders großen Hohlräumen hergestellt werden, die mit bis zu 190 Å größer sind als der CF_1 Komplex.

In einer der selbst hergestellten *sponge phases* bestehend aus PEG 1500, Puffer und Monoolein sind Proteinkristalle gewachsen. Diese Kristalle waren bereits nach einigen Tagen im Kristallisationstropfen zu sehen und fingen nach wenigen Wochen an, sich zu degradieren. Unter dem Polarisator änderten sie ihre Farbe und die Diffraktion dieser Kristalle zeigte deutlich, dass es sich hierbei um Proteinkristalle handelte, trotz der Tatsache, dass die Degradation der Kristalle zu diesem Zeitpunkt schon fortgeschritten war. Leider konnten diese Kristalle nicht reproduziert werden, was damit zu begründen ist, dass die Herstellung von *sponge phases* sehr schwer ist und somit die manuelle Herstellung der exakt gleichen *sponge phase* nahezu unmöglich ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Untereinheiten a und b während der Integration des Komplexes in die *sponge phase* dissoziieren und unter der Annahme, dass diese Dissoziation mit dem Fehlen von spezifisch gebundenen Lipiden zusammenhängen könnte, wurden *sponge phases* hergestellt, denen gereinigte Lamellen-Lipide zugesetzt wurden. Die Herstellung dieser *sponge phase* war zunächst einfacher als die der *sponge phases*, die nur aus Monoolein bestanden. Dies ist damit zu erklären, dass diese Lamellen-Lipide die Fluidität der *sponge phase* bei Temperaturen über 37 °C (Temperatur, die zur Herstellung verwendet wird) erhöht. Weil das Chlorophyll bei der Reinigung der Lamellen-Lipide aufgrund seiner Hydrophobizität nicht von den Lipiden getrennt werden kann, erschien auch die *sponge phase* grün. Nach dem Pipettieren der Kristallisationsansätze nahm die *sponge phase* unter dem Mikroskop die gewohnte Gestalt an. Mit der Zeit kam es jedoch durch die Lagerung der Platten bei 21 °C zu einer Änderung der Struktur der *sponge phase*. Wie im Kapitel Ergebnisse (Abb. 5.16) dargestellt, kam es zur Stapelung von Lipidschichten, die an die Thylakoidstapelung erinnert. Dieser Effekt kann nur durch die zugesetzten Lamellen-Lipide verursacht worden sein. Dass diese Stapelung unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist, kann dadurch erklärt werden, dass nur eine geringe Menge der Lamellen-Lipide der *sponge phase* zugesetzt wurde.

Wie das Diffraktionsbild dieser Strukturen zeigt, handelt es sich hierbei nicht mehr um eine *sponge phase* sondern um eine *cubic phase* mit kleineren Hohlräumen. In einer dieser *sponge phases* kam es dennoch zum Wachstum eines Kristalls, vom dem stark anzunehmen ist, dass es ein Proteinkristall war. Dieser Kristall hatte scharfe Kanten und war bräunlich gefärbt. Wahrscheinlich sind hier nur F_0 Untereinheiten kristallisiert. Nur konnte leider die Diffraktion dieses einen Kristalls nicht gemessen werden. Um diese Idee weiter zu verfolgen, wäre es sinnvoll, nicht das gesamte Gemisch aus Thylakoid-Lipiden der *sponge phase* zuzusetzen, sondern einen weiteren Reinigungsschritt einzuführen, durch den die Lipide, die ausschließlich in der ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran zu finden sind, isoliert würden.

Sporadisch kam es zum Wachstum von kleinen dreidimensionalen rot gefärbten Kristallen in den *sponge phases*, die ohne den Zusatz von Lamellen-Lipiden hergestellt wurden. Diese Kristalle hatten scharfe Kanten und waren aufgrund ihrer Farbe leicht in der *sponge phase* zu entdecken. Aufgrund ihrer Rarität und ihrer extrem kleinen Größe wurde ihre Diffraktion jedoch nie gemessen. Es wurde aber geschlussfolgert, dass die ATPase-Kristalle viel leichter von den Lipidkristallen zu unterscheiden wären, könnte man ihnen eine Farbe verleihen. Zu dieser Finalität wurde der ATP Synthase ein Fluorophor zugesetzt, das *Lucifer Yellow SV*, das spezifisch an eine der drei α Untereinheiten bindet. Als Resultat kam es, wenige Tage nach dem Pipettieren der Kristallisationsansätze, zu einer regelmäßigen Gelbfärbung der *sponge phase*. Dies bedeutet, dass sich die ATPase in die *sponge phase* integriert und gleichmäßig verteilt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem, was die silbergefärbte SDS-PAGE eines Lipidkristalls ergeben hatte.

Das Präzipitat in den Kristallisationsansätzen ist auf die Übersättigung zurückzuführen und war bei niedrigeren Proteinkonzentrationen nicht zu beobachten. Getestete Additive und Inhibitoren hatten keinen positiven Einfluss.

6.1.5 Kristallisationsversuche unter dem Zusatz von Lipiden

Zuerst wurde versucht den c_{14} -Rotorring durch Zusatz von Lipiden zu kristallisieren. Dafür wurde die bereits bekannte Kristallisationsbedingung (Vollmar et al, 2009) verwendet, mit dem Unterschied, dass der isolierten ATP Synthase Lipide zugesetzt wurden. In dieser Bedingung sind jedoch keine Kristalle gewachsen, weshalb geschlussfolgert werden kann, dass die Lipide an das Protein gebunden haben und entweder trotz des niedrigen pH Wertes, eine stabilisierende Wirkung auf den F_0 Komplex ausübten, oder die Kristallisation dadurch verhindert haben, dass sie die Molekülkontakte im Kristall hinderten.

Zusätzlich wurde versucht die ATPase mit Zusatz von Lipiden bei einem höheren pH Wert zu kristallisieren. Dazu wurde die Bedingung verwendet, bei der in der *sponge phase* Proteinkristalle

gewachsen waren, mit dem Unterschied, dass das Monoolein weggelassen wurde und zusätzlich der Inhibitor Venturicidin A zugesetzt wurde. In dieser Bedingung sind Proteinkristalle gewachsen, wie die Diffraktion dieser Kristalle beweist. Allerdings hatten diese Kristalle keine scharfen Kanten und streuten die Röntgenstrahlung nur schwach. Diese Methode zur Kristallisation der ATP Synthase ist also möglich, erfordert aber noch ein intensives Optimierungsscreening. Auch käme man wahrscheinlich zu besseren Kristallen, wenn man nur die Lipide zusetzen würde, die in den ungestapelten Bereichen der Thylakoidmembran lokalisiert sind. Aufgrund der Tatsache, dass diese Kristalle sehr klein waren und nicht vom umgebenden Präzipitat zu trennen waren, wurden sie nicht zur Analyse auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

6.1.6 Optimierungsversuche der c_{14} -Rotorring Kristalle

Die veröffentlichte Struktur des c_{14} -Rotorringes stammt aus Kristallen, die in dem Crystal Screen 2 # 12 von Hampton Research gewachsen sind. Diese saure Kristallisationsbedingung besteht aus Polyethylenglykol, Kadmiumchlorid und dem Puffer Natriumacetat. Die daraus resultierten Kristalle streuten, je nach Kristall, zwischen 5 und 3,8 Å, nach Dehydrierung der Kristalle in einer 100 %igen PEG 400 Lösung. Ohne Dehydrierung war die Auflösung bis zu 2 Å schlechter. Zudem zeigten die Kristalle ein stark anisotropes Streuverhalten. Die *Self Rotation Function* zeigt, dass sich 14 Monomere in der Asymmetrischen Untereinheit der Kristalle befinden, eine Anzahl, die mit vorherigen Studien über die chloroplastidäre ATPase aus Spinat, übereinstimmt. Abgesehen vom c-Ring ko-kristallisieren keine weiteren Untereinheiten des Komplexes. Es ist sehr wahrscheinlich, dass alle anderen Untereinheiten in dieser Kristallisationsbedingung denaturieren. Diese Annahme ist dadurch zu bestätigen, dass es im Kristallisationstropfen zur starken Ausbildung von Präzipitat kommt, die nicht auf die Übersättigung zurückzuführen ist und zum anderen ist es so, dass die ATPase in einem sauren Puffer (pH4,6), in Abwesenheit von Polyethylenglykol und Kadmiumchlorid, stark denaturiert und es folglich zur Ausbildung eines Pellets kommt.

Bei diesem End-pH Werten von 3,5-4,5 in den Kristallisationsansätzen ist zu erwarten, dass sich die konservierten Carboxylat-Reste der c Monomere alle im protonierten Zustand befinden, nur dass diese bei einer Auflösung von 3,8 Å in der Struktur nicht aufgelöst sind. Eine Struktur bei höherer Auflösung würde zum einen die Bindung der Protonen nachweisen und zum anderen könnte die Bindung von verschiedenen Inhibitoren an den c-Ring durch Ko-Kristallisation gezeigt werden.

Die unternommenen Optimierungsversuche bestanden darin, die Komposition der Kristallisationsbedingung leicht zu verändern. Einen großen Einfluss auf die Größe und Form der Kristalle hatte die Konzentration und Inkubationsdauer des zugesetzten ADP. Dieses bindet zwar nicht an den c-Ring, aber es ist anzunehmen, dass es die Bildung der Nukleationskeime fördert.

Belegt werden konnte dies durch die Tatsache, dass eine Zentrifugation der Proteinlösung nach der Inkubation der Proteinlösung mit ADP zur Entfernung der Nukleationskeime und folglich zur Hinderung der Kristallisation führte. Unklar ist, ob dieser Effekt durch das ADP verursacht wird oder durch das Natriumhydrogencarbonat mit dem der pH Wert des ADP eingestellt wurde.

Ein Kationenscreening hat ergeben, dass nur in Anwesenheit von Kadmium oder Kupfer, in der Kristallisationslösung große und widerstandsfähige Kristalle wuchsen, die anschließend in PEG 400 dehydriert werden konnten. Alle anderen Kationen führten zum Wachstum von kleineren oder flachen Kristallen, die deutlich schlechter streuten. Die Tatsache, dass dieselben Kristalle auch in der MemStart # 20 von Molecular Dimensions wachsen, bestehend aus dem gleichen Polyethylenglykol, dem gleichen Puffer und Magnesiumchlorid, demonstriert, dass die Anwesenheit eines Schwermetalls für die Kristallisation nicht Voraussetzung ist, aber durchaus einen Einfluss auf die Stabilität des Kristalls hat, so dass solche Kristalle selbst nach einer Lagerungszeit von einem Jahr noch optisch unverändert waren. Die Streuqualität dieser Kristalle hatte sich jedoch deutlich verschlechtert, auch wenn die Reflexe noch klar definiert waren.

Von den zwei getesteten Kristallisationsmethoden: Mikrobatch und *hanging drop*, erwies sich die *hanging drop* Methode als die bessere. Hier wuchsen die Kristalle innerhalb von wenigen Tagen zu großen Kristallen heran. Bei der Mikrobatch Methode hingegen dauerte das Kristallwachstum mehrere Wochen und es wuchsen kleine flache Kristalle.

Über ein Kationenscreening und über die eingesetzte Kristallisationsmethode konnte die Streuqualität der Kristalle nicht verbessert werden. In einem weiteren Versuch wurde ein partieller Detergensaustausch unternommen und die gleichen Kristallisationsbedingungen wie zuvor getestet. Diese Detergenzien, C₁₂E₈, C₁₂E₉ und C₁₂E₁₀, verhinderten vollkommen die Kristallisation. Es ist anzunehmen, dass diese die Molekülkontakte im Kristall durch ihre Gegenwart hinderten. Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein erneutes Screening mit allen kommerziell erhältlichen Kits, dazu führt, dass es zur Kristallisation des Proteins in einer anderen Kristallisationsbedingung kommt. Positiv war, dass der Zusatz dieser Detergenzien die Präzipitatbildung in der Kristallisationsansätzen deutlich reduzierte. Es ist daher anzunehmen, dass diese Detergenzien einen stabilisierenden Effekt auf den Komplex ausüben und die Dissoziation der Untereinheiten möglicherweise erschweren.

Da es schon Fälle gab, in der die Streuqualität der Kristalle, durch Erhöhung der Detergenzkonzentration deutlich verbessert werden konnte, so wurde auch dies hier ausprobiert. Es wuchsen viel größere Kristalle, die aber eher rund waren. Es ist stark anzunehmen, dass diese Kristalle hauptsächlich aus dem verwendeten Detergens Dodecyl-β-D-maltosid bestanden. Wie die Diffraktion dieser Kristalle zeigte, streuten diese Kristalle eher in Kreisen und bei geringer Auflösung.

Zuletzt wurde versucht, die Qualität der c_{14} -Rotorring Kristalle durch Zusatz von Additiva oder Inhibitoren zu verbessern. Aber auch dies führte nicht zu einer Verbesserung der Auflösung. Auch konnte aufgrund der geringen Auflösung, die Bindung der Inhibitoren an den c-Ring nicht nachgewiesen werden.

Weil all diese Versuche zu keinen weiterbringenden Erkenntnissen führten, wurde in weiteren Experimenten das eigentliche Ziel dieser Arbeit weiter verfolgt, nämlich die Kristallisation des Holoenzym.

6.2 Reinigung und Kristallisation des CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins und der chimären F₁ ATPase aus *T. elongatus*

Es sollte die, durch Thioredoxin vermittelte Regulation der γ Untereinheit in Spinat Chloroplasten näher betrachtet werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt: Zum einem wurde ein CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert und zum anderen wurde eine thermophile chimäre ATPase, die die redoxregulierte Sequenz aus CF₁- γ enthielt, ebenfalls heterolog exprimiert, gereinigt und in Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Ziel war es, jeweils den oxidierten und den reduzierten Zustand zu kristallisieren, um so Rückschlüsse auf den Regulationsprozess zu ziehen.

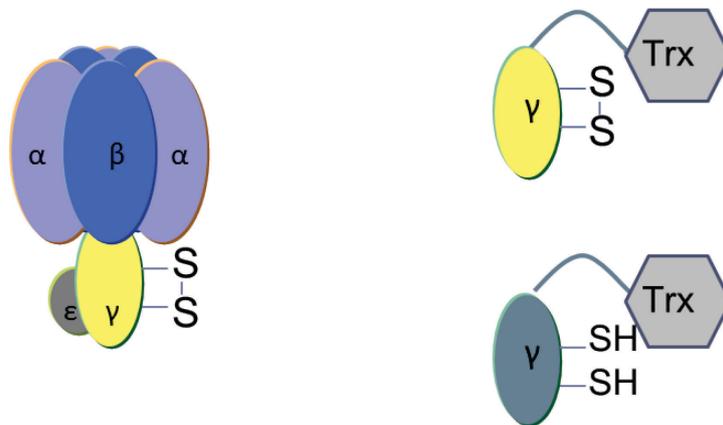


Abbildung 6.1: Links: chimäre ATP Synthase aus *T. elongatus* mit der regulatorischen Sequenz aus *Spinacia oleracea* in der γ Untereinheit. Rechts: CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsprotein im oxidierten (oben) und im reduzierten (unten) Zustand.

6.2.1 Reinigung und Kristallisation des CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins

Die heterologe Expression des CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins erfolgte über ein bereits bestehendes Protokoll in *E. coli* Zellen des Stammes Rosetta-gami. Dieser Stamm eignet sich deshalb weil er eine verbesserte Codonnutzung aufweist und für die Proteine Thioredoxin-Reduktase und Glutathion-Reduktase defizient ist. Somit herrschen keine reduzierenden Bedingungen in den *E. coli* Zellen, weshalb das Fusionsprotein im oxidierten Zustand exprimiert und gereinigt werden kann. Die isolierte γ Untereinheit neigt aufgrund ihrer *coiled-coiled* Struktur an den Termini zur Aggregation. Die Löslichkeit konnte jedoch durch Fusion von Thioredoxin aus *E. coli* an den N-Terminus der γ Untereinheit und durch Kürzung des C-Terminus erhöht werden. Zudem existiert von Thioredoxin eine hochaufgelöste Kristallstruktur (PDBID 2TRX), die als Modell zur Strukturlösung, über Molekularen Ersatz, eingesetzt werden könnte.

Die Expression erfolgte bei 30 °C und aufgrund der geringen Ausbeute von 0,16 mg pro Gramm aufgeschlossener Zellen, geschah die Reinigung immer aus einer größeren Menge an Zellen. Zur Ausbildung von Einschlusskörpern kam es nicht. Die Reinigung erfolgte über drei Schritte: eine Affinitätschromatographie, eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und eine Gelfiltration. Am Ende war das Protein sehr sauber und in der mit Silber gefärbten SDS-PAGE waren keine Verunreinigungen zu sehen.

Die analytische Gelfiltration zeigte einen homogenen Peak, was für Kristallisationsexperimente wünschenswert ist, jedoch handelt es sich hierbei um langgestreckte Dimere. Wie es zur Dimerisierung kommen konnte ist unklar. Wahrscheinlich aber ist, dass entweder zwei γ Untereinheiten dimerisieren, möglicherweise über die Region, über die die γ Untereinheit normalerweise mit dem c-Ring in Kontakt steht, oder dass die Dimerisierung mit der Ausbildung der Disulfidbrücken in Zusammenhang steht. Es ist denkbar, dass sich die Disulfidbrücken nicht innerhalb der γ Untereinheit und innerhalb des Thioredoxins bildeten, sondern zwischen zwei Fusionsproteinen, wie in folgender Abbildung dargestellt.

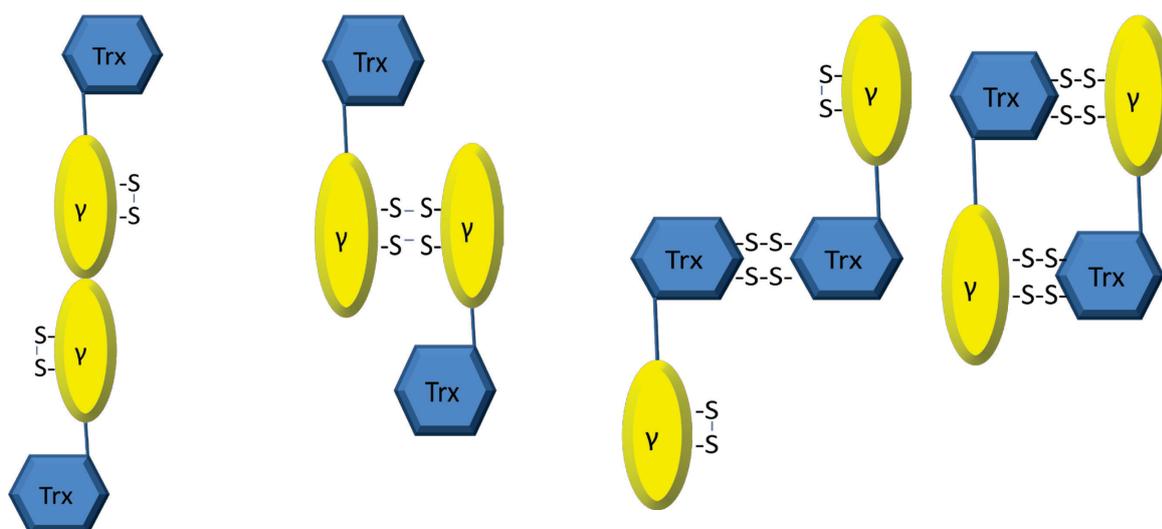


Abbildung 6.2: Mögliche Dimerisierungen des CF₁γ-Thioredoxin_{E.coli} Fusionsproteins.

Kristallisationsansätze mit dem oxidierten Zustand führten zum Wachstum von Kristallen bei 19 °C. Diese Kristalle zeigten eine intensive Gelbfärbung, wie auch schon das gereinigte Protein. Scharfe Kanten hatten diese Kristalle jedoch nicht und die Röntgenstrahlung beugten sie auch nicht. Die Reproduktion gelang nur manchmal, weshalb die Optimierungsversuche nicht vorankamen.

Der reduzierte Zustand hingegen konnte nicht kristallisiert werden. Zu beobachten war, dass nach der Zugabe von 50 mM DTT zur Reduktion der Disulfidbrücken, es zur Entfärbung der Proteinlösung kam. Bereits nach wenigen Stunden, als die Reduktionskraft des DTT nach lies, färbte sich die Proteinlösung wieder vollständig gelb. Die Entfärbung ist nur mit der Monomerisierung des

Fusionsproteins zu erklären. Die Gelbfärbung wird also durch die Dimerisierung zweier Fusionproteine verursacht. Aufgrund dieser Feststellung ist ein Proteinkomplex, in dem die Cysteinbrücken zwischen benachbarten Fusionsproteinen gebildet werden, wahrscheinlicher. Wenn dem so ist, dann wurde natürlich nicht der oxidierte Zustand der γ Untereinheit kristallisiert, sondern ein γ -Thioredoxin Komplex, wie er in der Natur nicht vorkommt.

Außerdem wurde ein weites Screening bei 4 °C durchgeführt. Hier wuchsen gar keine Kristalle.

All diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die verwendete Konstruktion nicht ideal ist, für die Kristallisation des oxidierten und des reduzierten Zustandes. Um den reduzierten Zustand zu kristallisieren wird es nötig sein die beiden Cysteinreste in der γ Untereinheit zu mutieren, so dass die Disulfidbrücke gar nicht erst entstehen kann. Um den oxidierten Zustand zu kristallisieren wird es das Beste sein, die Cysteine im Thioredoxinmolekül zu mutieren, so dass sich die Disulfidbrücke nur innerhalb der γ Untereinheit bilden kann.

6.2.2 Reinigung und Kristallisation der F_1 ATPase aus *Thermosynechococcus elongatus*

Die ersten Kristallisationsexperimente wurden mit der F_1 ATPase durchgeführt die nach einem älteren Protokoll gereinigt wurde. Dazu wurden eine Affinitätschromatographie und eine Anionenaustauschchromatographie verwendet. Ungewöhnlich dabei war, dass die drei *peaks*, die von der Anionenaustauschsäule bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluierten, alle Untereinheiten der F_1 ATPase mit unterschiedlichen Stöchiometrien bezüglich der ϵ Untereinheit beinhalteten. Allein die ϵ Untereinheit ist aber nicht für die Unterschiede der drei Peaks verantwortlich. Die Reinigung der $F_1\alpha_3\beta_3\gamma$ Wildtyp ATPase liefert das gleiche Profil obwohl in diesem Komplex die ϵ Untereinheit fehlt.

Die ersten Kristallisationsexperimente wurden mit dem Protein aus dem zweiten dieser drei *peaks* durchgeführt, weil dieser die Hauptfraktion darstellte. Eine analytische Gelfiltration dieser Fraktion hat ergeben, dass es sich um ein Gemisch aus Monomeren und Dimeren handelt wobei die Monomere überwiegen. Die Monomere konnten von den Dimeren getrennt werden, ohne dass es erneut zur Dimerisierung kam.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die verwendete Expressionsmethode und/oder Reinigungsmethode nicht zu einer korrekten Faltung und/oder Assemblierung des F_1 Komplexes (Chimäre oder Wildtyp) führen. Zudem stellt Inhomogenität ein großes Problem bei der Kristallisation von Proteinen dar.

Das Cyanobakterium *T. elongatus* ist ein thermophiler Organismus, der heiße Quellen besiedelt und eine optimale Wachstumstemperatur von 55 °C besitzt. Es ist durchaus möglich, dass eine korrekte Faltung und Assemblierung der F_1 ATPase nur bei dieser hohen Temperatur möglich ist. Der zur

Expression eingesetzte Wirtsorganismus *E. coli* ist nicht geeignet für die heterologe Expression über 37 °C, allerdings ist diese Temperatur schon deutlich höher als die Temperatur unter der die Anionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde. Unter der Annahme, dass das Problem der Faltung und Assemblierung mit Veränderungen am Reinigungsprotokoll behoben werden könnten, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt.

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss der Temperatur auf die Faltung und Assemblierung der F₁ ATPase studiert. Dazu wurde das Eluat aus der Affinitätschromatographie für 30 min bei 40 °C inkubiert, was in etwa der Expressionstemperatur entspricht und sofort die Reinigung über die Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Zu beobachten war, dass der letzte *peak* verschwand, während der zweite *peak*, der die Hauptfraktion darstellte, dementsprechend größer wurde. Da vom dritten *peak* nie eine Gelfiltration durchgeführt wurde (dieser kann nicht vollständig vom zweiten *peak* getrennt werden) ist unklar, ob die Temperatur einen Einfluss auf die Faltung oder auf die Dimerisierung nahm.

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluss des pH Wertes auf die Stabilität des Proteins getestet. Dazu wurde ein sehr simpler Test durchgeführt (beschrieben in 5.5.1), bei dem festzustellen war, dass der bei der Reinigung eingesetzte pH Wert von 7 nicht ideal war. Tatsächlich ist der F₁ Komplex bei pH Werten über 8 sehr stabil. Bei einem pH Wert von 7,5 ist er fast genauso instabil, wie bei pH Werten unter 5,5. Daraufhin wurde der pH Wert aller Puffer auf 8,5 erhöht.

Zur Optimierung der Proteinfaltung und Komplex-Assemblierung wurde das Reinigungsprotokoll entsprechend dieser Erkenntnisse geändert. Es wurde eine Hitzeaktivierung des Komplexes bei 55 °C vor der Affinitätschromatographie eingeführt, was keineswegs zum Verlust von Protein führte und der pH Wert aller verwendeten Puffer wurde auf 8,5 eingestellt. Zusätzlich wurde der Komplex durch die Inkubation mit Nukleotiden (ADP und ATP) und durch die Inhibierung durch Azid stabilisiert.

Das Resultat war, dass der erste *peak* deutlich reduziert wurde und der dritte *peak* vollkommen verschwand. Wegen des höheren pH Wertes, und der dadurch bedingten negativeren Nettoladung, eluierte der Komplex verschoben bei einer höheren Natriumchlorid Konzentration. Die Coomassie gefärbte SDS-PAGE dieses Peaks zeigte, dass die Stöchiometrie des Komplexes der erwarteten von 3:3:1:1 entsprach. Eine analytische Gelfiltration dieses Peaks jedoch lies darauf schließen, dass immer noch ein Gemisch aus Dimeren und Monomeren vorhanden war.

Die Monomere können vollständig von den Dimeren getrennt werden, ohne dass es erneut zur Dimerisierung kommt. Dazu braucht man aber eine S-400 Säule, die zu dem Zeitpunkt in dem diese Experimente durchgeführt wurden, nicht zur Verfügung stand, weshalb Kristallisationsansätze mit dem Gemisch aus Monomeren und Dimeren durchgeführt wurden. Trotz dieser Inhomogenität kam es zum Wachstum von Proteinkristallen, in einer Bedingung bestehend aus MPD und dem Puffer CAPS. Tatsächlich war schon in früheren Kristallisationsexperimenten aufgefallen, dass das MPD

einen positiven Einfluss auf die Proteinlösung ausübt. In diesen Kristallisationsansätzen kam es nicht zur Ausbildung von Präzipitat, sondern zur Phasentrennung, auch wenn es nach dem alten Reinigungsprotokoll dennoch nicht zum Kristallwachstum kam. Diese Kristallisationsbedingung ist auch dadurch charakterisiert, dass sie einen sehr hohen pH Wert von 10,5 besitzt. Der End-pH Wert dieses Kristallisationsansatzes sollte nach dem Mischen der Proteinlösung mit der Kristallisationslösung niedriger liegen und zwar innerhalb dessen was zuvor als ideal bezeichnet wurde (zwischen pH 8 und 9,5). Wie erwartet wuchsen diese Proteinkristalle nicht bei 21 °C, was in etwa der Raumtemperatur entspricht, sondern nur bei 30 °C und 15 °C. Optimierungsversuche wurden ausschließlich bei 15 °C durchgeführt weil kein Inkubator bei 30 °C zur Verfügung stand.

Die Proteinkristalle konnten eindeutig als solche identifiziert werden, weil diese sich mit dem Farbstoff Igit Crystal Dye blau färben ließen. Für Diffraktionsmessungen hingegen konnten sie, aufgrund ihrer Schmetterlings-Morphologie, nicht eingesetzt werden.

Es wurden alle gängigen Optimierungsmethoden ausprobiert, ohne dass es jedoch zu einer deutlichen Verbesserung der Morphologie kam.

Beobachtet wurde, dass Proteinkristalle nur dann wuchsen, wenn das Profil der Anionenaustauschchromatographie dem, im Kapitel Ergebnisse (Abbildung 5.39) dargestellten entsprach. Sobald es auch nur ansatzweise zur Bildung eines dritten Peaks kam, konnte das gereinigte Protein nicht kristallisiert werden.

Eine Verbesserung der Morphologie der Kristalle wird wahrscheinlich erst dann möglich sein, wenn man zuvor die Monomere von den Dimeren trennt.

7 Anhang

Programm Pointless	
Best Solution:	space group C 1 2 1
Reindex operator:	[h,k,l]
Laue group probability:	0.825
Systematic absence probability:	1.000
Total probability:	0.825
Space group confidence:	0.732
Laue group confidence:	0.732
Unit cell:	224 110 109.9 90 116.3 90
Resolution range selected on input:	48.22 to 2.50
Number of batches in file:	3599
The data do not appear to be twinned, from the L-test	

Programm Scala			
	Overall	InnerShell	OuterShell
Low resolution limit	48.22	48.22	2.64
High resolution limit	2.50	7.91	2.50
Rmerge	0.108	0.042	0.372
Rmerge in top intensity bin	0.044	-	-
Rmeas (within I+/-)	0.129	0.050	0.441
Rmeas (all I+ & I-)	0.129	0.050	0.441
Rpim (within I+/-)	0.069	0.027	0.235
Rpim (all I+ & I-)	0.069	0.027	0.235
Fractional partial bias	0.000	0.000	0.000
Total number of observations	279282	8682	41762
Total number unique	82321	2672	11985
Mean(I)/sd(I)	9.2	19.8	3.5
Completeness	99.6	99.1	99.8
Multiplicity	3.4	3.2	3.5
Anomalous completeness	95.2	93.1	97.9
Anomalous multiplicity	1.7	1.7	1.7
DelAnom correlation between half-sets	-0.119	-0.274	-0.063
Mid-Slope of Anom Normal Probability	0.963	-	-
Outlier rejection and statistics assume that there is no anomalous scattering			
Average unit cell:	224.03 109.96 109.87 90.00 116.30 90.00		
Space group:	C 1 2 1		
Average mosaicity:	0.37		
Minimum and maximum SD correction factors:	Fulls	0.66	2.56
Maximum resolution:	2.50 Å		

```
#####
##                               phenix.xtriage                               ##
##                               ##
##          P.H. Zwart, R.W. Grosse-Kunstleve & P.D. Adams          ##
##                               ##
#####
#phil __OFF__
```

Date 2011-09-05 Time 21:08:37 CEST +0200 (1315249717.37 s)

```
##-----##
## WARNING:                               ##
## Number of residues unspecified         ##
##-----##
##-----##
## Unit cell defined manually, will ignore
## specification in reflection file:
## From file : (224.031, 109.957, 109.874, 90, 116.299, 90)
## From input: (224.031, 109.957, 109.874, 90, 116.299, 90)
##-----##
##-----##
## Space group defined manually, will ignore
## specification in reflection file:
## From file : C 1 2 1
## From input: C 1 2 1
##-----##
Converting ['IMEAN_XDSdataset,SIGIMEAN_XDSdataset'] to amplitudes
```

Symmetry, cell and reflection file content summary

```
Miller array info:
/home/mariana/Dokumente/pointgroup_scala1.mtz:IMEAN_XDSdataset,SIGIMEAN
_XDSdataset
Observation type: xray.amplitude
Type of data: double, size=82308
Type of sigmas: double, size=82308
Number of Miller indices: 82308
Anomalous flag: False
Unit cell: (224.031, 109.957, 109.874, 90, 116.299, 90)
Space group: C 1 2 1 (No. 5)
Systematic absences: 0
Centric reflections: 2673
Resolution range: 47.4855 2.50005
Completeness in resolution range: 0.995633
Completeness with d_max=infinity: 0.995428
```

```
##-----##
##                               Basic statistics                               ##
##-----##
```

Matthews coefficient and Solvent content statistics

Number of residues unknown, assuming 50% solvent content

```
-----
|                               Best guess : 2220 residues in the asu                               |
-----
```

Completeness and data strength analyses

The following table lists the completeness in various resolution ranges, after applying a $I/\sigma I$ cut. Miller indices for which individual $I/\sigma I$ values are larger than the value specified in the top row of the table, are retained, while other intensities are discarded. The resulting completeness profiles are an indication of the strength of the data.

Res. Range	$I/\sigma I > 1$	$I/\sigma I > 2$	$I/\sigma I > 3$	$I/\sigma I > 5$	$I/\sigma I > 10$	$I/\sigma I > 15$
47.49 - 6.16	98.7%	96.8%	94.8%	90.8%	79.3%	64.3%
6.16 - 4.89	98.7%	95.1%	91.4%	85.5%	69.4%	50.4%
4.89 - 4.27	97.0%	93.8%	90.8%	86.1%	70.4%	52.3%
4.27 - 3.88	97.2%	93.5%	90.6%	84.0%	66.4%	47.9%
3.88 - 3.61	97.3%	92.3%	88.6%	80.9%	61.1%	41.5%
3.61 - 3.39	96.9%	89.2%	83.6%	73.2%	51.0%	31.2%
3.39 - 3.22	96.5%	88.0%	80.9%	67.8%	42.1%	22.7%
3.22 - 3.08	94.5%	83.0%	73.7%	58.3%	31.9%	14.7%
3.08 - 2.96	92.2%	77.6%	67.5%	49.8%	22.0%	8.1%
2.96 - 2.86	93.2%	77.7%	65.4%	47.0%	21.0%	8.0%
2.86 - 2.77	92.9%	73.8%	60.0%	41.0%	14.5%	4.7%
2.77 - 2.69	92.0%	72.2%	57.1%	38.1%	12.4%	3.6%
2.69 - 2.62	91.3%	70.9%	54.5%	33.7%	9.1%	1.8%
2.62 - 2.56	90.0%	64.1%	46.5%	26.0%	6.5%	0.9%

The completeness of data for which $I/\sigma(I) > 3.00$, exceeds 85% for resolution ranges lower than 3.61Å.

As we do not want to throw away too much data, the resolution for analyzing the intensity statistics will be limited to 3.50Å.

Maximum likelihood isotropic Wilson scaling

ML estimate of overall B value of None:

22.19 Å²

Estimated -log of scale factor of None:

-3.51

Maximum likelihood anisotropic Wilson scaling

ML estimate of overall B_{cart} value of None:

35.91, 0.00, 9.99

14.36, 0.00

19.62

Equivalent representation as U_{cif}:

0.51, -0.00, 0.22

0.18, 0.00

0.25

Eigen analyses of B_{cart}:

Value Vector

Eigenvector 1 : 40.657 (0.90, 0.00, 0.43)

Eigenvector 2 : 14.875 (-0.43, 0.00, 0.90)

Eigenvector 3 : 14.359 (0.00, 1.00, 0.00)

ML estimate of -log of scale factor of None:

-3.53

----- Anisotropy analyses -----

Anisotropy ([MaxAnisoB-MinAnisoB]/[MaxAnisoB]) : 6.468e-01
 Anisotropic ratio p-value : 0.000e+00

The p-value is a measure of the severity of anisotropy as observed in the PDB.

The p-value of 0.000e+00 indicates that roughly 100.0 % of datasets available in the PDB have an anisotropy equal to or worse than this dataset.

For the resolution shell spanning between 2.52 - 2.50 Angstrom, the mean I/sigI is equal to 3.51. 42.1 % of these intensities have an I/sigI > 3. When sorting these intensities by their anisotropic correction factor and analysing the I/sigI behavior for this ordered list, we can gauge the presence of 'anisotropy induced noise amplification' in reciprocal space.

The quarter of Intensities *least* affected by the anisotropy correction show

<I/sigI> : 3.87e+00
 Fraction of I/sigI > 3 : 4.76e-01 (Z = 2.49)

The quarter of Intensities *most* affected by the anisotropy correction show

<I/sigI> : 2.42e+00
 Fraction of I/sigI > 3 : 2.56e-01 (Z = 7.47)

The combined Z-score of 7.88 indicates that there probably is no significant systematic noise amplification.

Z-scores are computed on the basis of a Bernoulli model assuming independence of weak reflections wrst anisotropy.

Correcting for anisotropy in the data

Some basic intensity statistics follow.

Low resolution completeness analyses

The following table shows the completeness of the data to 5 Angstrom.

unused:	- 47.4876	[0/17]	0.000
bin 1:	47.4876 - 10.7352	[1081/1084]	0.997
bin 2:	10.7352 - 8.5370	[1043/1058]	0.986
bin 3:	8.5370 - 7.4625	[1056/1061]	0.995
bin 4:	7.4625 - 6.7824	[1033/1041]	0.992
bin 5:	6.7824 - 6.2974	[1046/1050]	0.996
bin 6:	6.2974 - 5.9269	[1032/1037]	0.995
bin 7:	5.9269 - 5.6305	[1043/1045]	0.998
bin 8:	5.6305 - 5.3858	[1047/1048]	0.999

```
bin 9: 5.3858 - 5.1787 [1030/1031] 0.999
bin 10: 5.1787 - 5.0002 [1021/1023] 0.998
unused: 5.0002 - [ 0/0 ]
```

Mean intensity analyses

Analyses of the mean intensity.

Inspired by: Morris et al. (2004). J. Synch. Rad.11, 56-59.

The following resolution shells are worrisome:

d_spacing	z_score	compl.	<Iobs>/<Iexp>
3.410	4.63	1.00	0.882
3.333	4.55	1.00	0.888
3.131	4.73	1.00	0.884
3.071	8.67	0.99	0.795
2.500	6.62	1.00	1.166

Possible reasons for the presence of the reported unexpected low or elevated mean intensity in a given resolution bin are :

- missing overloaded or weak reflections
- suboptimal data processing
- satellite (ice) crystals
- NCS
- translational pseudo symmetry (detected elsewhere)
- outliers (detected elsewhere)
- ice rings (detected elsewhere)
- other problems

Note that the presence of abnormalities in a certain region of reciprocal space might confuse the data validation algorithm throughout a large region of reciprocal space, even though the data are acceptable in those areas.

Possible outliers

Inspired by: Read, Acta Cryst. (1999). D55, 1759-1764

Acentric reflections:

d_space	H	K	L	E	p(wilson)	p(extreme)
2.714	-82,	4,	20	4.10	5.16e-08	4.06e-03
3.753	-26,	4,	29	4.06	6.84e-08	5.38e-03
3.756	-3,	29,	4	4.03	8.50e-08	6.67e-03
5.766	3,	19,	0	3.81	5.14e-07	3.97e-02
2.891	53,	9,	12	3.68	1.28e-06	9.60e-02
2.934	59,	19,	0	3.87	3.08e-07	2.40e-02
2.945	67,	7,	0	3.98	1.33e-07	1.04e-02
2.662	67,	19,	0	3.76	7.42e-07	5.68e-02
2.871	69,	1,	1	3.72	9.43e-07	7.16e-02
2.854	70,	4,	0	3.84	4.02e-07	3.12e-02
2.517	70,	20,	1	3.72	9.63e-07	7.31e-02
2.525	75,	13,	1	3.71	1.05e-06	7.98e-02
2.525	79,	5,	0	3.79	5.66e-07	4.36e-02

$p(\text{wilson}) : 1 - (1 - \exp[-|E|^2])$
 $p(\text{extreme}) : 1 - (1 - \exp[-|E|^2])^{(n_{\text{acentrics}})}$
 $p(\text{wilson})$ is the probability that an E-value of the specified value would be observed if it were selected at random the given data set.
 $p(\text{extreme})$ is the probability that the largest $|E|$ value is larger or equal than the observed largest $|E|$ value.

Both measures can be used for outlier detection. $p(\text{extreme})$ takes into account the size of the dataset.

Centric reflections:

d_space	H	K	L	E	p(wilson)	p(extreme)
2.891	-34,	0,	38	4.87	1.13e-06	2.87e-03
4.207	-28,	0,	26	4.45	8.53e-06	2.15e-02
4.215	-20,	0,	26	4.42	1.00e-05	2.52e-02
3.862	52,	0,	0	4.49	7.28e-06	1.84e-02
3.043	66,	0,	0	4.19	2.83e-05	6.96e-02
2.789	72,	0,	0	7.76	8.66e-15	2.21e-11
2.643	76,	0,	0	5.07	3.88e-07	9.88e-04

$p(\text{wilson}) : 1 - (\text{erf}[|E|/\sqrt{2}])$
 $p(\text{extreme}) : 1 - (\text{erf}[|E|/\sqrt{2}])^{(n_{\text{acentrics}})}$
 $p(\text{wilson})$ is the probability that an E-value of the specified value would be observed when it would selected at random from the given data set.
 $p(\text{extreme})$ is the probability that the largest $|E|$ value is larger or equal than the observed largest $|E|$ value.

Both measures can be used for outlier detection. $p(\text{extreme})$ takes into account the size of the dataset.

Ice ring related problems

The following statistics were obtained from ice-ring insensitive resolution ranges

mean bin z_score : 2.55
 (rms deviation : 1.82)
 mean bin completeness : 0.99
 (rms deviation : 0.01)

The following table shows the z-scores and completeness in ice-ring sensitive areas. Large z-scores and high completeness in these resolution ranges might be a reason to re-assess your data processing if ice rings were present.

d_spacing	z_score	compl.	Rel. Ice int.
3.897	0.12	0.99	1.000
3.669	3.79	1.00	0.750
3.441	4.63	1.00	0.530
2.671	1.50	1.00	0.170

Abnormalities in mean intensity or completeness at resolution ranges with a relative ice ring intensity lower than 0.10 will be ignored.

No ice ring related problems detected.
If ice rings were present, the data does not look worse at ice ring related `d_spacings` as compared to the rest of the data set.

\$TABLE: Intensity plots:

\$GRAPHS

:Intensity plots :A:1,2,3,4:

\$\$

1/resol^2 <I>_smooth_approximation <I>_via_binning <I>_expected

\$\$

\$\$

0.010002	1040778.965365	1102674.956105	912744.630033
0.014002	835213.848953	804957.336112	719289.611280
0.018002	635065.445812	620279.443265	528297.592305
0.022002	515833.554074	504690.147805	452669.155080
0.026002	479673.213457	464419.791511	452496.160742
0.030002	513536.066124	536880.129914	498028.078572
0.034002	608381.533557	576753.256361	605061.311526
0.038002	752311.500179	722799.111876	775465.643924
0.042002	919345.068416	960240.985439	968552.367291
0.046002	1069528.523983	1223945.299759	1127230.762744
0.050002	1166259.691166	1187510.189323	1216271.584121
0.054002	1196455.702456	1115958.423467	1237202.231920
0.058002	1173649.405266	1126609.303502	1216668.495351
0.062002	1123939.624827	1143436.913785	1184612.295626
0.066002	1070328.368282	1162669.346943	1158508.390042
0.070002	1025451.134902	1271012.337424	1139934.187798
0.074002	991687.745531	996737.135911	1120526.453454
0.078002	964287.545514	977169.062149	1090692.572554
0.082002	935140.079656	985944.948925	1045724.657558
0.086002	896651.175120	870854.157085	987352.806982
0.090002	845137.454952	818790.584187	921700.392437
0.094002	782458.095176	807570.470452	855890.078826
0.098002	715003.613089	759985.263467	795297.922121
0.102002	650776.014430	656113.356638	742413.266317
0.106002	596440.747890	554436.054471	697209.467895
0.110002	555736.883697	592864.070595	658322.014729
0.114002	529298.856207	557190.863942	624249.774123
0.118002	515178.186420	628856.514082	594073.236530
0.122002	509533.248426	530444.545369	567571.093462
0.126002	507522.578680	526306.988948	544914.552594
0.130002	504689.904626	504610.345011	526238.168907
0.134002	498691.636272	522265.608852	511340.356300
0.138002	490434.844586	513302.333678	499629.867854
0.142002	483582.609595	508801.299645	490290.776314
0.146002	482381.094451	519495.550933	482547.410029
0.150002	488970.598642	463173.008311	475893.037365
0.154002	502564.207778	500068.603832	470188.493219
0.159994	551366.375558	540769.457107	463843.586316

\$\$

\$TABLE: Z scores and completeness:

\$GRAPHS

:Data sanity and completeness check :A:1,2,3:

\$\$

1/resol^2	Z_score	Completeness	\$\$
-----------	---------	--------------	------

\$\$

0.010002	2.343666	0.986216	
0.014002	1.800404	0.992505	
0.018002	3.030037	0.992516	
0.022002	2.579893	0.995660	
0.026002	0.621567	0.994479	
0.030002	1.758490	0.998527	
0.034002	1.191612	0.999315	
0.038002	1.802427	0.997977	
0.042002	0.219536	0.998757	
0.046002	2.079950	0.991617	
0.050002	0.612826	0.976531	
0.054002	2.819025	0.986652	
0.058002	2.328523	0.992501	
0.062002	1.164275	0.993846	
0.066002	0.122115	0.991521	
0.070002	3.686536	0.995614	
0.074002	3.995857	0.997608	
0.078002	3.793397	0.999540	
0.082002	2.081721	0.999094	
0.086002	4.627680	0.995567	
0.090002	4.552325	1.000000	
0.094002	2.252837	0.999576	
0.098002	1.757878	0.999587	
0.102002	4.734288	0.995146	
0.106002	8.672630	0.991225	
0.110002	4.014233	0.990687	
0.114002	4.498360	0.994229	
0.118002	2.307081	0.995444	
0.122002	2.924117	0.994163	
0.126002	1.520237	0.996361	
0.130002	1.826255	0.998182	
0.134002	0.898254	0.998596	
0.138002	1.113030	0.996511	
0.142002	1.496917	0.997576	
0.146002	2.973450	0.998297	
0.150002	1.125732	0.997682	
0.154002	2.609035	0.998674	
0.159994	6.622682	0.997031	

\$\$

\$TABLE: <I/sigma_I>:

\$GRAPHS

:Signal to noise :N:1,2:

\$\$

1/resol^2	<I/sigma_I>;_Signal_to_noise	\$\$
-----------	------------------------------	------

\$\$

0.002443	19.010709	
0.006443	20.485513	
0.010443	22.051944	
0.014443	18.321078	
0.018443	16.711045	
0.022443	15.145191	
0.026443	14.772984	

```

0.030443  14.355810
0.034443  14.649710
0.038443  15.322518
0.042443  16.839958
0.046443  16.132654
0.050443  15.032234
0.054443  14.603640
0.058443  14.364260
0.062443  14.650352
0.066443  14.260748
0.070443  14.300931
0.074443  12.263844
0.078443  11.796881
0.082443  11.354421
0.086443  10.236148
0.090443  9.754290
0.094443  9.481986
0.098443  8.797171
0.102443  7.458935
0.106443  6.302051
0.110443  6.697166
0.114443  6.220097
0.118443  6.499056
0.122443  5.581170
0.126443  5.443809
0.130443  5.109991
0.134443  5.062086
0.138443  4.687100
0.142443  4.359729
0.146443  4.305019
0.150443  3.675463
0.154443  3.929186
0.158443  3.782635

```

\$\$

Basic analyses completed

```

##-----##
##                               Twinning Analyses                               ##
##-----##

```

Using data between 10.00 to 3.50 Angstrom.

Determining possible twin laws.

```

  0 merohedral twin operators found
  0 pseudo-merohedral twin operators found
In total,  0 twin operator were found

```

Splitting data in centrics and acentrics

```

Number of centrics  : 1192
Number of acentrics : 27621

```

Patterson analyses

Largest Patterson peak with length larger than 15 Angstrom

```

Frac. coord.      :   -0.000    0.164    0.113
Distance to origin :   21.952
Height (origin=100) :    3.207
p_value(height)   :    1.000e+00

```

The reported p_value has the following meaning:

The probability that a peak of the specified height or larger is found in a Patterson function of a macro molecule that does not have any translational pseudo symmetry is equal to 1.000e+00.

p_values smaller than 0.05 might indicate weak translational pseudo symmetry, or the self vector of a large anomalous scatterer such as Hg, whereas values smaller than 1e-3 are a very strong indication for the presence of translational pseudo symmetry.

Systematic absences

The following table gives information about systematic absences.

For each operator, the reflections are split in three classes:

Absent : Reflections that are absent for this operator.
 Non Absent: Reflection of the same type (i.e. (0,0,1)) as above, but they should be present.
 Complement: All other reflections.

For each class, the $\langle I/\text{sigI} \rangle$ is reported, as well as the number of 'violations'. A 'violation' is designated as a reflection for which a I/sigI criterion is not met. The criteria are

Absent violation : $I/\text{sigI} > 3.0$
 Non Absent violation : $I/\text{sigI} < 3.0$
 Complement violation : $I/\text{sigI} < 3.0$

Operators with low associated violations for *both* absent and non absent reflections, are likely to be true screw axis or glide planes. Both the number of violations and their percentages are given. The number of violations within the 'complement' class, can be used as a comparison for the number of violations in the non-absent class.

Operator	absent under operator $\langle I/\text{sigI} \rangle$ (violations)	n absent	not absent under operator $\langle I/\text{sigI} \rangle$ (violations)	n not absent	all other reflections $\langle I/\text{sigI} \rangle$ (violations)	n compl	Score
2_0 (b)	0.00 (0, 0.0%)	0	9.79 (2, 22.2%)	9	14.97 (2388, 8.3%)	28804	9.38e-01
2_1 (b)	0.00 (0, 0.0%)	0	9.79 (2, 22.2%)	9	14.97 (2388, 8.3%)	28804	9.38e-01

Analyses of the absences table indicates a number of likely space group candidates, which are listed below. For each space group, the number of absent violations are listed under the '+++' column. The number of present

violations (weak reflections) are listed under '---'. The last column is a likelihood based score for the particular space group. Note that enantiomorphic spacegroups will have equal scores. Also, if absences were removed while processing the data, they will be regarded as missing information, rather than as enforcing that absence in the space group choices.

space group	n absent	<Z>_absent	<Z/sigZ>_absent	+++	---	score
C 1 2 1	0	0.00	0.00	0	4	0.000e+00

Wilson ratio and moments

Acentric reflections

$\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$: 2.136 (untwinned: 2.000; perfect twin 1.500)
 $\langle F \rangle^2 / \langle F^2 \rangle$: 0.775 (untwinned: 0.785; perfect twin 0.885)
 $\langle |E^2 - 1| \rangle$: 0.760 (untwinned: 0.736; perfect twin 0.541)

Centric reflections

$\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$: 3.513 (untwinned: 3.000; perfect twin 2.000)
 $\langle F \rangle^2 / \langle F^2 \rangle$: 0.626 (untwinned: 0.637; perfect twin 0.785)
 $\langle |E^2 - 1| \rangle$: 1.006 (untwinned: 0.968; perfect twin 0.736)

NZ test ($0 \leq z < 1$) to detect twinning and possible translational NCS

Z	Nac_obs	Nac_theo	Nc_obs	Nc_theo
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.1	0.095	0.095	0.258	0.248
0.2	0.189	0.181	0.360	0.345
0.3	0.271	0.259	0.430	0.419
0.4	0.347	0.330	0.497	0.474
0.5	0.413	0.394	0.537	0.520
0.6	0.469	0.451	0.570	0.561
0.7	0.523	0.503	0.604	0.597
0.8	0.568	0.551	0.637	0.629
0.9	0.610	0.593	0.674	0.657
1.0	0.646	0.632	0.710	0.683
Maximum deviation acentric			: 0.020	
Maximum deviation centric			: 0.026	
<NZ(obs)-NZ(twinned)>_acentric			: +0.013	
<NZ(obs)-NZ(twinned)>_centric			: +0.013	

L test for acentric data

using difference vectors (dh,dk,dl) of the form:
(2hp,2kp,2lp)

where hp, kp, and lp are random signed integers such that
 $2 \leq |dh| + |dk| + |dl| \leq 8$

Mean |L| :0.488 (untwinned: 0.500; perfect twin: 0.375)
Mean L² :0.318 (untwinned: 0.333; perfect twin: 0.200)

The distribution of |L| values indicates a twin fraction of 0.00. Note that this estimate is not as reliable as obtained via a Britton plot or H-test if twin laws are available.

\$TABLE: NZ test:

\$GRAPHS

:NZ test, acentric and centric data :A:1,2,3,4,5:

\$\$

z	Acentric_observed	Acentric_untwinned	Centric_observed	Centric_untwinned	\$\$
---	-------------------	--------------------	------------------	-------------------	------

0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
0.100000	0.095036	0.095200	0.257550	0.248100	
0.200000	0.188842	0.181300	0.359899	0.345300	
0.300000	0.271170	0.259200	0.429530	0.418700	
0.400000	0.346512	0.329700	0.496644	0.473800	
0.500000	0.412585	0.393500	0.536913	0.520500	
0.600000	0.469244	0.451200	0.569631	0.561400	
0.700000	0.522972	0.503400	0.604027	0.597200	
0.800000	0.567684	0.550700	0.636745	0.628900	
0.900000	0.609536	0.593400	0.673658	0.657200	
1.000000	0.645849	0.632100	0.709732	0.683300	

\$\$

\$TABLE: L test,acentric data:

\$GRAPHS

:L test, acentric data :A:1,2,3,4:

\$\$

l	Observed	Acentric_theory	Acentric_theory,_perfect_twin	\$\$
---	----------	-----------------	-------------------------------	------

0.000000	0.002459	0.000000	0.000000	
0.020000	0.022661	0.020000	0.029996	
0.040000	0.044462	0.040000	0.059968	
0.060000	0.064500	0.060000	0.089892	
0.080000	0.085563	0.080000	0.119744	
0.100000	0.107282	0.100000	0.149500	
0.120000	0.126911	0.120000	0.179136	
0.140000	0.146703	0.140000	0.208628	
0.160000	0.166455	0.160000	0.237952	
0.180000	0.185592	0.180000	0.267084	
0.200000	0.204811	0.200000	0.296000	
0.220000	0.226325	0.220000	0.324676	
0.240000	0.246486	0.240000	0.353088	
0.260000	0.267262	0.260000	0.381212	
0.280000	0.286891	0.280000	0.409024	
0.300000	0.308855	0.300000	0.436500	

0.320000	0.329427	0.320000	0.463616
0.340000	0.349711	0.340000	0.490348
0.360000	0.369545	0.360000	0.516672
0.380000	0.389092	0.380000	0.542564
0.400000	0.409581	0.400000	0.568000
0.420000	0.429742	0.420000	0.592956
0.440000	0.451092	0.440000	0.617408
0.460000	0.471745	0.460000	0.641332
0.480000	0.492972	0.480000	0.664704
0.500000	0.514527	0.500000	0.687500
0.520000	0.534893	0.520000	0.709696
0.540000	0.554891	0.540000	0.731268
0.560000	0.576200	0.560000	0.752192
0.580000	0.595951	0.580000	0.772444
0.600000	0.616113	0.600000	0.792000
0.620000	0.638241	0.620000	0.810836
0.640000	0.657542	0.640000	0.828928
0.660000	0.677540	0.660000	0.846252
0.680000	0.698808	0.680000	0.862784
0.700000	0.717371	0.700000	0.878500
0.720000	0.737614	0.720000	0.893376
0.740000	0.758472	0.740000	0.907388
0.760000	0.778716	0.760000	0.920512
0.780000	0.798099	0.780000	0.932724
0.800000	0.818588	0.800000	0.944000
0.820000	0.839569	0.820000	0.954316
0.840000	0.860960	0.840000	0.963648
0.860000	0.880998	0.860000	0.971972
0.880000	0.898947	0.880000	0.979264
0.900000	0.919354	0.900000	0.985500
0.920000	0.938450	0.920000	0.990656
0.940000	0.956030	0.940000	0.994708
0.960000	0.973241	0.960000	0.997632
0.980000	0.990534	0.980000	0.999404

\$\$

 Twinning and intensity statistics summary (acentric data):

Statistics independent of twin laws

$\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$: 2.136

$\langle F \rangle^2 / \langle F^2 \rangle$: 0.775

$\langle |E^2 - 1| \rangle$: 0.760

$\langle |L| \rangle, \langle L^2 \rangle$: 0.488, 0.318

Multivariate Z score L-test: 0.709

The multivariate Z score is a quality measure of the given spread in intensities. Good to reasonable data are expected to have a Z score lower than 3.5.

Large values can indicate twinning, but small values do not necessarily exclude it.

No (pseudo)merohedral twin laws were found.

Patterson analyses

- Largest peak height : 3.207
(corresponding p value : 1.00000)

The largest off-origin peak in the Patterson function is 3.21% of the height of the origin peak. No significant pseudotranslation is detected.

The results of the L-test indicate that the intensity statistics behave as expected. No twinning is suspected.

8 Literaturverzeichnis

- Abergel, C., 2004. Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(8), S.1413-1416.
- Abrahams, J.P. u. a., 1996. The structure of bovine F1-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), S.9420-9424.
- Abrahams, J.P. u. a., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370(6491), S.621-628.
- Adachi, K. u. a., 2007. Coupling of rotation and catalysis in F(1)-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell*, 130(2), S.309-321.
- Adachi, K. u. a., 2000. Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), S.7243 - 7247.
- Adams, Paul D. u. a., 2010. PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66, S.213-221.
- Aggeler, R, Haughton, M.A. & Capaldi, R A, 1995. Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the beta subunits and the gamma and epsilon subunits of the Escherichia coli F1-ATPase. Structural implications and functional consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(16), S.9185-9191.
- Allen, C.F. u. a., 1972. Chlorophyll, glycerolipid and protein ratios in spinach chloroplast grana and stroma lamellae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(4), S.907-913.
- André, F & Pinet, E., 1997. [Tentoxin: structure-activity relationship. Application to the study of its action on chloroplast ATP-synthase]. *Comptes Rendus Des Séances De La Société De Biologie Et De Ses Filiales*, 191(3), S.401-432.
- Ariga, T., 2008. The concerted nature between three catalytic subunits driving the F1 rotary motor. *Bio Systems*, 93(1-2), S.68-77.
- Ariga, T., Muneyuki, Eiro & Yoshida, Masasuke, 2007. F1-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(9), S.841-846.
- Arnold, I. u. a., 1997. Yeast mitochondrial F1F0-ATPase: the novel subunit e is identical to Tim11. *FEBS Letters*, 411(2-3), S.195-200.
- Arnold, I. u. a., 1999. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), S.36-40.
- Arnold, I. u. a., 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO Journal*, 17(24), S.7170-7178.

- Arsenieva, D. u. a., 2010. Crystal structures of mutant forms of the yeast F1 ATPase reveal two modes of uncoupling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), S.36561-36569.
- Aufurth, S., Schägger, H & Müller, V., 2000. Identification of subunits a, b, and c1 from *Acetobacterium woodii* Na⁺-F1F0-ATPase. Subunits c1, c2, AND c3 constitute a mixed c-oligomer. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), S.33297-33301.
- Austin, J.R., 2nd & Staehelin, L.A., 2011. Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiology*, 155(4), S.1601-1611.
- Avital, S. & Gromet-Elhanan, Z, 1991. Extraction and purification of the beta subunit and an active alpha beta-core complex from the spinach chloroplast CFoF1-ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(11), S.7067-7072.
- Bahl, J., 1977. Chlorophyll, carotenoid, and lipid content in *Triticum sativum* L. plastid envelopes, prolamellar bodies, stroma lamellae, and grana. *Planta*, 136(1), S.21-24.
- Bakels, R.H. u. a., 1996. The effect of sulfite on the ATP hydrolysis and synthesis activities in chloroplasts and cyanobacterial membrane vesicles can be explained by competition with phosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332(1), S.170-174.
- Bald, D, Noji, H, u. a., 2000. ATPase activity of a highly stable alpha(3)beta(3)gamma subcomplex of thermophilic F(1) can be regulated by the introduced regulatory region of gamma subunit of chloroplast F(1). *The Journal of Biological Chemistry*, 275(17), S.12757-12762.
- Bald, D u. a., 2001. Redox regulation of the rotation of F(1)-ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), S.39505-39507.
- Bald, Dirk u. a., 1998. ATP Synthesis by F0F1-ATP Synthase Independent of Noncatalytic Nucleotide Binding Sites and Insensitive to Azide Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), S.865 -870.
- Bald, Dirk, Noji, Hiroyuki, u. a., 2000. ATPase Activity of a Highly Stable $\alpha\beta\gamma$ Subcomplex of Thermophilic F1 Can Be Regulated by the Introduced Regulatory Region of γ Subunit of Chloroplast F1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), S.12757 -12762.
- von Ballmoos, C. & Dimroth, Peter, 2007. Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry*, 46(42), S.11800-11809.
- von Ballmoos, C., Cook, G.M. & Dimroth, Peter, 2008. Unique Rotary ATP Synthase and Its Biological Diversity. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), S.43-64.
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. & Dimroth, Peter, 2009. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, S.649-672.
- Balmer, Y. u. a., 2006. Thioredoxin target proteins in chloroplast thylakoid membranes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), S.1829-1834.
- Battye, T.G.G. u. a., 2011. iMOSFLM : a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 67, S.271-281.

- Benz, M. u. a., 2009. Alb4 of Arabidopsis promotes assembly and stabilization of a non chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF1CF0-ATP synthase. *Molecular Plant*, 2(6), S.1410-1424.
- Berger, G. & Girault, G., 2001. Comparison of different cations (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) on the hydrolytic activity of chloroplast ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(2), S.93-98.
- Berzborn, R J & Finke, W., 1989a. Localization and orientation of subunit delta of spinach chloroplast ATP-synthase within the CF0 CF1 complex. 2. Identification of C-terminal residues of delta, exposed on the thylakoid membrane. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 44(5-6), S.480-486.
- Berzborn, R J & Finke, W., 1989b. Localization and orientation of subunit delta of spinach chloroplast ATP-synthase within the CF0CF1 complex. 1. Distinction of shielded and exposed surfaces of delta on the thylakoid membrane. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 44(1-2), S.153-160.
- Biaudet, P. & Haraux, Francis, 1987. [Delta]pH-dependent activation of chloroplast coupling factors and external pH effects on the 9-aminoacridine response in lettuce and spinach thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 893(3), S.544-556.
- Bienert, R. u. a., 2009. Subunit movements in single membrane-bound H^{+} -ATP synthases from chloroplasts during ATP synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(52), S.36240-36247.
- Bill, R.M. u. a., 2011. Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature Biotechnology*, 29(4), S.335-340.
- Bird, C.R. u. a., 1985. The wheat chloroplast gene for CF(0) subunit I of ATP synthase contains a large intron. *The EMBO Journal*, 4(6), S.1381-1388.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), S.911-917.
- Blow, D.M., 2006. Noncrystallographic symmetry. In S. 263.
- Boekema, E J u. a., 1988. Structure of the ATP-synthase from chloroplasts and mitochondria studied by electron microscopy. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 43(3-4), S.219-225.
- Bolle, C. u. a., 1996. The spinach AtpC and AtpD genes contain elements for light-regulated, plastid-dependent and organ-specific expression in the vicinity of the transcription start sites. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 9(1), S.21-30.
- Boltz, K.W. & Frasch, Wayne D, 2005. Interactions of gamma T273 and gamma E275 with the beta subunit PSAV segment that links the gamma subunit to the catalytic site Walker homology B aspartate are important to the function of Escherichia coli F1F0 ATP synthase. *Biochemistry*, 44(27), S.9497-9506.
- Börsch, M. u. a., 2002. Stepwise rotation of the gamma-subunit of EF(0)F(1)-ATP synthase observed by intramolecular single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *FEBS Letters*, 527(1-3), S.147-152.

- Bosco, C.D. u. a., 2004. Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2), S.1060-1069.
- Böttcher, B u. a., 2000. Direct visualisation of conformational changes in EF(0)F(1) by electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 296(2), S.449-457.
- Böttcher, B, Schwarz, L. & Gräber, P, 1998. Direct indication for the existence of a double stalk in CF0F1. *Journal of Molecular Biology*, 281(5), S.757-762.
- Bowler, Matthew W u. a., 2007. Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(19), S.14238-14242.
- Bowler, Matthew W u. a., 2006. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), S.8646-8649.
- Boyer, P D, 1997. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66, S.717-749.
- Boyer, P D, 2001. Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 66(10), S.1058-1066.
- Boyer, P D, 1998. Energy, life, and ATP. *Bioscience Reports*, 18(3), S.97-117.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, S.248-254.
- Braig, K u. a., 2000. Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase inhibited by Mg(2+) ADP and aluminium fluoride. *Structure (London, England: 1993)*, 8(6), S.567-573.
- Brünger, A.T. u. a., 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 54(Pt 5), S.905-921.
- Buchert, F. & Forreiter, C., 2010. Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF1CFo. *FEBS Letters*, 584(1), S.147-152.
- Bullough, D.A. u. a., 1989. Inhibition of the bovine-heart mitochondrial F1-ATPase by cationic dyes and amphipathic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), S.377-383.
- Burkey, K.O. & Mathis, J.N., 1998. Identification of a novel isoform of the chloroplast-coupling factor alpha-subunit. *Plant Physiology*, 116(2), S.703-708.
- Burkovski, A., Deckers-Hebestreit, G & Altendorf, K, 1990. Expression of subunit III of the ATP synthase from spinach chloroplasts in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 271(1-2), S.227-230.
- Buy, C., Girault, G. & Zimmermann, J.L., 1996. Metal binding sites of H(+)-ATPase from chloroplast and *Bacillus PS3* studied by EPR and pulsed EPR spectroscopy of bound manganese(II). *Biochemistry*, 35(30), S.9880-9891.
- Cabezón, E u. a., 2000. Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(37), S.28353-28355.

- Cabezón, E. u. a., 2000. Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F1-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by pH. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), S.25460 -25464.
- Cabezón, Elena u. a., 2003. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature Structural Biology*, 10(9), S.744-750.
- Caffrey, M., 2009. Crystallizing Membrane Proteins for Structure Determination: Use of Lipidic Mesophases. *Annual Review of Biophysics*, 38(1), S.29-51.
- Caffrey, M., 2003. Membrane protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142(1), S.108-132.
- Caffrey, M., 2008. On the Mechanism of Membrane Protein Crystallization in Lipidic Mesophases†. *Crystal Growth & Design*, 8(12), S.4244-4254.
- Cain, B D & Simoni, R.D., 1988. Interaction between Glu-219 and His-245 within the a subunit of F1F0-ATPase in Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(14), S.6606-6612.
- Cain, B D & Simoni, R.D., 1989. Proton translocation by the F1F0ATPase of Escherichia coli. Mutagenic analysis of the a subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(6), S.3292-3300.
- Capaldi, R A & Schulenberg, 1999. The epsilon subunit of the F(1)F(0) complex of Escherichia coli. cross-linking studies show the same structure in situ as when isolated. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(40), S.28351-28355.
- Capaldi, R A & Schulenberg, B., 2000. The epsilon subunit of bacterial and chloroplast F(1)F(0) ATPases. Structure, arrangement, and role of the epsilon subunit in energy coupling within the complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.263-269.
- Capaldi, Roderick A & Aggeler, Robert, 2002. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(3), S.154-160.
- Carmeli, C. & Racker, E., 1973. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XIV. Reconstitution of chlorophyll-deficient vesicles catalyzing phosphate-adenosine triphosphate exchange. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(23), S.8281-8287.
- Carot, Senovilla, J.M.M. & Vera, R., 1999. On the definition of cylindrical symmetry. *Quantum*, 3025, S.12.
- Center for History and New Media, Schnelleinstieg. Available at: http://zotero.org/support/quick_start_guide.
- Chayen, N.E., 2004. Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(5), S.577-583.
- Chen, C. u. a., 2006. Mitochondrial ATP synthase. Crystal structure of the catalytic F1 unit in a vanadate-induced transition-like state and implications for mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), S.13777-13783.
- Chen, M.-F., Wang, J.-D. & Su, T.-M., 2009. Concentration gradient effects of sodium and lithium ions and deuterium isotope effects on the activities of H⁺-ATP synthase from chloroplasts. *Biophysical Journal*, 96(6), S.2479-2489.

- Chen, R. u. a., 2011. [Effects of physical environments on nucleation of protein crystals: a review]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 27(1), S.9-17.
- Chen, W. & Frasch, W D, 2001. Interaction of the catch-loop tyrosine beta Y317 with the metal at catalytic site 3 of Chlamydomonas chloroplast F1-ATPase. *Biochemistry*, 40(25), S.7729-7735.
- Chen, W. u. a., 2000. Characterization of the metal binding environment of catalytic site 1 of chloroplast F1-ATPase from Chlamydomonas. *Biochemistry*, 39(31), S.9393-9400.
- Chen, Z u. a., 1992. Over-expression and refolding of beta-subunit from the chloroplast ATP synthase. *FEBS Letters*, 298(1), S.69-73.
- Cherepanov, D A, Mulkidjanian, A Y & Junge, W, 1999. Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase. *FEBS Letters*, 449(1), S.1-6.
- Cherezov, V. u. a., 2006. Room to move: crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), S.1605-1618.
- Chow, W.S. u. a., 2005. Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 4(12), S.1081-1090.
- Christie, W.W., 1993. Preparation of lipid extracts from tissues. *Methodology*, pp, S.195-213.
- Claggett, S.B. u. a., 2007. Functional incorporation of chimeric b subunits into F1Fo ATP synthase. *Journal of Bacteriology*, 189(15), S.5463-5471.
- Claggett, S.B. u. a., 2009. The b subunits in the peripheral stalk of F1F0 ATP synthase preferentially adopt an offset relationship. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(24), S.16531-16540.
- Collinson, I.R., van Raaij, M.J., u. a., 1994. ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F1-ATPase and in its absence. *Journal of Molecular Biology*, 242(4), S.408-421.
- Collinson, I.R., Runswick, M J, u. a., 1994. Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry*, 33(25), S.7971-7978.
- Crampton, D.J., LoBrutto, R. & Frasch, W D, 2001. Identification of the P-loop lysine as a metal ligand in the absence of nucleotide at catalytic site 3 of chloroplast F1-ATPase from Chlamydomonas reinhardtii. *Biochemistry*, 40(12), S.3710-3716.
- Cruz, J A u. a., 1995. Molecular dissection of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase of spinach. *Plant Physiology*, 109(4), S.1379-1388.
- Cruz, J A u. a., 2001. Contribution of electric field ($\Delta\psi$) to steady-state transthylakoid proton motive force (pmf) in vitro and in vivo. control of pmf parsing into $\Delta\psi$ and ΔpH by ionic strength. *Biochemistry*, 40(5), S.1226-1237.
- Cruz, J. A., Radkowski, C.A. & McCarty, R. E., 1997. Functional Consequences of Deletions of the N Terminus of the [epsilon] Subunit of the Chloroplast ATP Synthase. *Plant Physiology*, 113(4), S.1185-1192.

- Cui, Y.-L. u. a., 2011. The GDC1 gene encodes a novel ankyrin domain-containing protein that is essential for grana formation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155(1), S.130-141.
- Cunningham, K.M. & McCarty, R E, 2000. Influences of energization and nucleotide binding on the reaction of Lucifer Yellow vinyl sulfone with the alpha subunits of the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry*, 39(15), S.4391-4398.
- Czarnecki, J.J., Abbott, M.S. & Selman, B.R., 1983. Localization of the tight ADP-binding site on the membrane-bound chloroplast coupling factor one. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 136(1), S.19-24.
- Datiles, M.J., Johnson, Eric A & McCarty, Richard E, 2008. Inhibition of the ATPase activity of the catalytic portion of ATP synthases by cationic amphiphiles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1777(4), S.362-368.
- Daum, B. & Kühlbrandt, W., 2011. Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), S.2393-2402.
- Daum, B. u. a., 2010. Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea. , 22(4), S.1299-1312.
- Dautant, A., Velours, Jean & Giraud, M.-F., 2010. Crystal structure of the Mg·ADP-inhibited state of the yeast F1c10-ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(38), S.29502-29510.
- Derman, A. u. a., 1993. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli. *Science*, 262(5140), S.1744 -1747.
- Deshpande, N.N., Hollingsworth, M. & Herrin, D.L., 1995. The atpF group-II intron-containing gene from spinach chloroplasts is not spliced in transgenic Chlamydomonas chloroplasts. *Current Genetics*, 28(2), S.122-127.
- Dickson, V.K. u. a., 2006. On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *The EMBO Journal*, 25(12), S.2911-2918.
- Diez, M. u. a., 2004. Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F0F1-ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol*, 11(2), S.135-141.
- Digel, J.G. & McCarty, R E, 1995. Two tight binding sites for ADP and their interactions during nucleotide exchange in chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry*, 34(44), S.14482-14489.
- Digel, J.G., Hightower, K.E. & McCarty, R E, 1996. Subunit movement during catalysis by F1-F0-ATP synthases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(5), S.439-442.
- Digel, J.G., Kishinevsky, A., u. a., 1996. Differences between two tight ADP binding sites of the chloroplast coupling factor 1 and their effects on ATPase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(33), S.19976-19982.
- Digel, J.G., Moore, N.D. & McCarty, R E, 1998. Influence of divalent cations on nucleotide exchange and ATPase activity of chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry*, 37(49), S.17209-17215.
- DiMaio, F. u. a., 2011. Improved molecular replacement by density- and energy-guided protein structure optimization. *Nature*, 473(7348), S.540-543.

- Dimroth, P, Kaim, G & Matthey, U, 2000. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *The Journal of Experimental Biology*, 203(Pt 1), S.51-59.
- Dimroth, P u. a., 1999. Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), S.4924-4929.
- Dimroth, Peter, von Ballmoos, C. & Meier, Thomas, 2006. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. *EMBO Reports*, 7(3), S.276-282.
- Dmitriev, O., Jones, Phil C., u. a., 1999. Structure of the Membrane Domain of Subunit b of the *Escherichia coli* F0F1 ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), S.15598 - 15604.
- Dmitriev, O.Y., Jones, P C & Fillingame, R H, 1999. Structure of the subunit c oligomer in the F1Fo ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), S.7785-7790.
- Dong, H., Ni, Z.-L. & Wei, J.-M., 2005. Substitutions of the conserved Gly47 affect the CF1 inhibitor and proton gate functions of the chloroplast ATP synthase epsilon subunit. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 37(7), S.453-462.
- Drapier, Dominique u. a., 2007. Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. *The EMBO Journal*, 26(15), S.3581-3591.
- Drew, D. u. a., 2006. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Meth*, 3(4), S.303-313.
- Du, Z. u. a., 2001. Assembled F1-(alpha beta) and Hybrid F1-alpha 3beta 3gamma -ATPases from *Rhodospirillum rubrum* alpha, wild type or mutant beta, and chloroplast gamma subunits. Demonstration of Mg²⁺-versus Ca²⁺-induced differences in catalytic site structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), S.11517-11523.
- Dudkina, N.V. u. a., 2010. Imaging of organelles by electron microscopy reveals protein-protein interactions in mitochondria and chloroplasts. *FEBS Letters*, 584(12), S.2510-2515.
- Duncan, T M u. a., 1995. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F1-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), S.10964 -10968.
- Dunn, S D, McLachlin, D T & Revington, M, 2000. The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.356-363.
- Dunn, S D, Revington, M, u. a., 2000. The b subunit of *Escherichia coli* ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(4), S.347-355.
- Düser, M.G. u. a., 2009. 36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in FoF1-ATP synthase. *The EMBO Journal*, 28(18), S.2689-2696.
- Dyer, W.J. & Bligh, E.G., 1959. Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer. *Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology*, 2, S.1959-1959.
- Elston, T., Wang, H & Oster, G, 1998. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, 391(6666), S.510-513.

- Engelbrecht, S u. a., 1998. Fluorescence resonance energy transfer mapping of subunit delta in spinach chloroplast F1 ATPase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 252(2), S.277-283.
- Engström, S. u. a., 1998. Solvent-induced sponge (L 3) phases in the solvent-monoolein-water system. In B. Lindman & B. W. Ninham, hrsg. *The Colloid Science of Lipids*. Darmstadt: Steinkopff, S. 93-98. Available at: <http://www.springerlink.com/content/4929m77308823843/> [Zugegriffen August 27, 2011].
- Enoki, S. u. a., 2009. Single-molecule Study on the Temperature-sensitive Reaction of F1-ATPase with a Hybrid F1 Carrying a Single β (E190D). *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), S.23169 -23176.
- Evans, P., 2005a. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62, S.72-82.
- Evans, P., 2005b. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62, S.72-82.
- Evron, Y. & McCarty, R E, 2000. Simultaneous measurement of Δp H and electron transport in chloroplast thylakoids by 9-aminoacridine fluorescence. *Plant Physiology*, 124(1), S.407-414.
- Evron, Y. & Pick, U., 1997. Modification of Sulfhydryl Groups in the $[\gamma]$ -Subunit of Chloroplast-Coupling Factor 1 Affects the Proton Slip through the ATP Synthase. *Plant Physiology*, 115(4), S.1549-1555.
- Evron, Y., Johnson, E A & McCarty, R E, 2000. Regulation of proton flow and ATP synthesis in chloroplasts. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(5), S.501-506.
- Feniouk, B.A. & Yoshida, Masasuke, 2008. Regulatory Mechanisms of Proton-Translocating FOF1-ATP Synthase. In G. Schäfer & Harvey S. Penefsky, hrsg. *Bioenergetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 279-308. Available at: <http://www.springerlink.com/content/8281n60663042653/> [Zugegriffen August 27, 2011].
- Feniouk, B.A. u. a., 2010. Conformational transitions of subunit epsilon in ATP synthase from thermophilic Bacillus PS3. *Biophysical Journal*, 98(3), S.434-442.
- Feniouk, B.A. u. a., 2004. The proton-driven rotor of ATP synthase: ohmic conductance (10 fS), and absence of voltage gating. *Biophysical Journal*, 86(6), S.4094-4109.
- Feniouk, B.A., Mulkidjanian, Armen Y & Junge, Wolfgang, 2005. Proton slip in the ATP synthase of Rhodobacter capsulatus: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1706(1-2), S.184-194.
- Feniouk, B.A., Suzuki, Toshiharu & Yoshida, Masasuke, 2006. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1757(5-6), S.326-338.
- Fessenden, J.M. & Racker, E., 1966. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XI. Stimulation of oxidative phosphorylation by coupling factors and oligomycin; inhibition by an antibody against coupling factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(10), S.2483-2489.

- Fischer, S., Graber, P & Turina, P, 2000. The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(39), S.30157-30162.
- Frasch, W D, 2000. The participation of metals in the mechanism of the F(1)-ATPase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.310-325.
- Fromme, 1998. Improved isolation and crystallization of Photosystem I for structural analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1365(1-2), S.175-184.
- Fuks, B. & Homblé, F., 1996. Mechanism of proton permeation through chloroplast lipid membranes. *Plant Physiology*, 112(2), S.759-766.
- Galetskiy, D. u. a., 2011. Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 25(1), S.184-190.
- Galkin, M.A. & Vinogradov, A.D., 1999. Energy-dependent transformation of the catalytic activities of the mitochondrial F₀ x F₁-ATP synthase. *FEBS Letters*, 448(1), S.123-126.
- Gertz, M. u. a., 2007. Interactions of rotor subunits in the chloroplast ATP synthase modulated by nucleotides and by Mg²⁺. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1774(5), S.566-574.
- Gibbons, C. u. a., 2000. The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol*, 7(11), S.1055-1061.
- Girvin, M.E. u. a., 1994. Determination of local protein structure by spin label difference 2D NMR: the region neighboring Asp61 of subunit c of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry*, 34, S.1635-1645.
- Girvin, M.E. u. a., 1998. Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry*, 37(25), S.8817-8824.
- Gledhill, J.R., Montgomery, Martin G, Leslie, A.G.W. & Walker, John E, 2007a. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), S.15671-15676.
- Gledhill, J.R., Montgomery, Martin G, Leslie, A.G.W. & Walker, John E, 2007b. Mechanism of inhibition of bovine F₁-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), S.13632-13637.
- Green, C.D. & Hollingsworth, M.J., 1992. Expression of the Large ATP Synthase Gene Cluster in Spinach Plastids during Light-Induced Development. *Plant Physiology*, 100(3), S.1164-1170.
- Green, C.D. & Hollingsworth, M.J., 1994. Tissue-specific expression of the large ATP synthase gene cluster in spinach plastids. *Plant Molecular Biology*, 25(3), S.369-376.
- Greie, J.C., Deckers-Hebestreit, G & Altendorf, K, 2000. Subunit organization of the stator part of the F₀ complex from *Escherichia coli* ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(4), S.357-364.
- Greie, J.-C., Heitkamp, T. & Altendorf, Karlheinz, 2004. The transmembrane domain of subunit b of the *Escherichia coli* F₁F₀(O) ATP synthase is sufficient for H⁽⁺⁾-translocating activity together with subunits a and c. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 271(14), S.3036-3042.

- Gresser, M.J., Myers, J.A. & Boyer, P D, 1982. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. *Journal of Biological Chemistry*, 257(20), S.12030 -12038.
- Grey, J. & Thompson, D., 2010. Challenges and Opportunities for New Protein Crystallization Strategies in Structure-Based Drug Design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(11), S.1039-1045.
- Groth, G & Pohl, E., 2001. The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), S.1345-1352.
- Groth, G & Schirwitz, K., 1999. Rapid purification of membrane extrinsic F1-domain of chloroplast ATP synthase in monodisperse form suitable for 3D-crystallization. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 260(1), S.15-21.
- Groth, G u. a., 2000. Characterization of a phosphate binding domain on the alpha-subunit of chloroplast ATP synthase using the photoaffinity phosphate analogue 4-azido-2-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry*, 39(45), S.13781-13787.
- Groth, Georg, 2002. Structure of spinach chloroplast F1-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), S.3464-3468.
- Groth, Georg u. a., 2002. Substitution of a single amino acid switches the tentoxin-resistant thermophilic F1-ATPase into a tentoxin-sensitive enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(23), S.20117-20119.
- Grotjohann, I. & Gräber, Peter, 2002. The H⁺-ATPase from chloroplasts: effect of different reconstitution procedures on ATP synthesis activity and on phosphate dependence of ATP synthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1556(2-3), S.208-216.
- Grubmeyer, C., Cross, R L & Penefsky, H S, 1982. Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. Rate constants for elementary steps in catalysis at a single site. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(20), S.12092-12100.
- Gulick, A.M. u. a., 2002. Pentaerythritol propoxylate: a new crystallization agent and cryoprotectant induces crystal growth of 2-methylcitrate dehydratase. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 58(Pt 2), S.306-309.
- Günther, S. & Huchzermeyer, B., 1998. Kinetic properties of a single nucleotide binding site on chloroplast coupling factor 1 (CF1). *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 258(2), S.710-715.
- Günther, S. & Huchzermeyer, B., 2000. Nucleotide binding of an ADP analog to cooperating sites of chloroplast F1-ATPase (CF1). *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(2), S.541-548.
- Hackney, D D, Rosen, G & Boyer, P D, 1979. Subunit interaction during catalysis: alternating site cooperativity in photophosphorylation shown by substrate modulation of [¹⁸O]ATP species formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(8), S.3646-3650.
- Hackney, David D., Rosen, Gary & Boyer, Paul D., 1979. Subunit Interaction during Catalysis: Alternating Site Cooperativity in Photophosphorylation Shown by Substrate Modulation of

- [18O]ATP Species Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(8), S.3646-3650.
- Hamasur, B. & Glaser, E., 1992. Plant mitochondrial F₀F₁ ATP synthase. Identification of the individual subunits and properties of the purified spinach leaf mitochondrial ATP synthase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 205(1), S.409-416.
- Hanstein, S. u. a., 2011. Changes in cytosolic Mg²⁺ levels can regulate the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in maize. *The Biochemical Journal*, 435(1), S.93-101.
- Hara, K.Y. u. a., 2001. The Role of the β DELSEED Motif of F₁-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), S.23969 -23973.
- Hartzog, P.E. & Cain, B D, 1993. Mutagenic analysis of the α subunit of the F₁F₀ ATP synthase in *Escherichia coli*: Gln-252 through Tyr-263. *Journal of Bacteriology*, 175(5), S.1337-1343.
- Häsler, K, Engelbrecht, S & Junge, W, 1998. Three-stepped rotation of subunits gamma and epsilon in single molecules of F-ATPase as revealed by polarized, confocal fluorometry. *FEBS Letters*, 426(3), S.301-304.
- Häsler, K, Pänke, O & Junge, W, 1999. On the stator of rotary ATP synthase: the binding strength of subunit delta to (alpha beta)₃ as determined by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry*, 38(41), S.13759-13765.
- Hausrath, A C, Capaldi, R A & Matthews, B W, 2001. The conformation of the epsilon- and gamma-subunits within the *Escherichia coli* F(1) ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), S.47227-47232.
- Hausrath, Andrew C. u. a., 1999. Structural features of the γ subunit of the *Escherichia coli* F₁ ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), S.13697-13702.
- Hayashi, Kumiko u. a., 2010. Fluctuation theorem applied to F₁-ATPase. *Physical Review Letters*, 104(21), S.218103.
- He, F. u. a., 2008. C-Terminal mutations in the chloroplast ATP synthase gamma subunit impair ATP synthesis and stimulate ATP hydrolysis. *Biochemistry*, 47(2), S.836-844.
- He, F. u. a., 2007. Mutations within the C-terminus of the gamma subunit of the photosynthetic F₁-ATPase activate MgATP hydrolysis and attenuate the stimulatory oxyanion effect. *Biochemistry*, 46(9), S.2411-2418.
- He, X. u. a., 2000. Mechanism of activation of the chloroplast ATP synthase. A kinetic study of the thiol modulation of isolated ATPase and membrane-bound ATP synthase from spinach by *Escherichia coli* thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), S.13250-13258.
- Heineke, D., Stitt, M. & Heldt, H.W., 1989. Effects of inorganic phosphate on the light dependent thylakoid energization of intact spinach chloroplasts. *Plant Physiology*, 91(1), S.221-226.
- Helliwell, J.R., 2005. Protein crystal perfection and its application. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 61(Pt 6), S.793-798.
- Hennig, J. & Herrmann, Reinhold G., 1986. Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two

- operons in a phylogenetically conserved arrangement. *MGG Molecular & General Genetics*, 203(1), S.117-128.
- Herbert, S.K., 2002. A new regulatory role for the chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), S.12518-12519.
- Hermolin, J. & Fillingame, R H, 1989. H⁺-ATPase activity of Escherichia coli F1F0 is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the F0 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(7), S.3896-3903.
- Hermolin, J. u. a., 1999. Defining the domain of binding of F1 subunit epsilon with the polar loop of F0 subunit c in the Escherichia coli ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(24), S.17011-17016.
- Hernández-Terrones, M.G. u. a., 2003. Interference of methyl trachyloban-19-oate ester with CF(0) of spinach chloroplast H(+)-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 418(1), S.93-97.
- Herrmann, R G u. a., 1993. The nuclear-encoded polypeptide Cfo-II from spinach is a real, ninth subunit of chloroplast ATP synthase. *FEBS Letters*, 326(1-3), S.192-198.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R., 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1), S.28-32.
- Hightower, K.E. & McCarty, R E, 1996a. Influence of nucleotides on the cold stability of chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry*, 35(31), S.10051-10057.
- Hightower, K.E. & McCarty, R E, 1996b. Structural stability of chloroplast coupling factor 1 determined by differential scanning calorimetry and cold inactivation. *Biochemistry*, 35(15), S.4852-4857.
- Hirono-Hara, Yoko u. a., 2001. Pause and rotation of F1-ATPase during catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), S.13649 -13654.
- Hisabori, T u. a., 1997. The regulatory functions of the gamma and epsilon subunits from chloroplast CF1 are transferred to the core complex, alpha3beta3, from thermophilic bacterial F1. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 247(3), S.1158-1165.
- Hisabori, T, Kondoh, A. & Yoshida, M, 1999. The gamma subunit in chloroplast F(1)-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Letters*, 463(1-2), S.35-38.
- Hisabori, T u. a., 1998. The formation or the reduction of a disulfide bridge on the gamma subunit of chloroplast ATP synthase affects the inhibitory effect of the epsilon subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), S.15901-15905.
- Hisabori, Toru u. a., 2002. Molecular devices of chloroplast F(1)-ATP synthase for the regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1555(1-3), S.140-146.
- Hisabori, Toru u. a., 2003. Molecular evolution of the modulator of chloroplast ATP synthase: origin of the conformational change dependent regulation. *FEBS Letters*, 545(1), S.71-75.
- Ho, D.N. u. a., 2008. Crystal structure of a self-assembling lipopeptide detergent at 1.20 Å. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), S.12861-12866.

- Hochman, Y. u. a., 2000. Role of metal ions in coupling between chemical catalysis and conformational changes in ATP synthase. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 37(6), S.459-469.
- Holm-Hansen, O. u. a., 1959. Uptake and Distribution of Radioactive Carbon from Labelled Substrates by Various Cellular Components of Spinaeb Leaves. *Physiologia Plantarum*, 12(3), S.475-501.
- Hong, S. & Pedersen, Peter L, 2003. ATP synthases: insights into their motor functions from sequence and structural analyses. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35(2), S.95-120.
- HOPPE, J., SCHAIRER, H.U. & SEBALD, W., 1980. Identification of Amino-Acid Substitutions in the Proteolipid Subunit of the ATP Synthase from Dicyclohexylcarbodiimide-Resistant Mutants of Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*, 112(1), S.17-24.
- Hosokawa, H. u. a., 2005. ATP-dependent Rotation of Mutant ATP Synthases Defective in Proton Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), S.23797 -23801.
- Hu, D. u. a., 1998. The C. reinhardtii CF1 with the mutation betaT168S has high ATPase activity. *FEBS Letters*, 421(1), S.65-68.
- Hudson, G.S. u. a., 1987. A gene cluster in the spinach and pea chloroplast genomes encoding one CF1 and three CF0 subunits of the H⁺-ATP synthase complex and the ribosomal protein S2. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), S.283-298.
- Hutcheon, Marcus L. u. a., 2001. Energy-driven subunit rotation at the interface between subunit a and the c oligomer in the FO sector of Escherichia coli ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), S.8519 -8524.
- Iino, R. u. a., 2009. Mechanism of Inhibition by C-terminal α -Helices of the ϵ Subunit of Escherichia coli FoF1-ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), S.17457 -17464.
- Iino, R. u. a., 2005. Real-time Monitoring of Conformational Dynamics of the ϵ Subunit in F1-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), S.40130 -40134.
- Imashimizu, M. u. a., 2011. Regulation of F0F1-ATPase from Synechocystis sp. PCC 6803 by {gamma} and {epsilon} Subunits Is Significant for Light/Dark Adaptation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(30), S.26595-26602.
- Ishmukhametov, R. u. a., 2010. Direct observation of stepped proteolipid ring rotation in E. coli F₀F₁-ATP synthase. *The EMBO Journal*, 29(23), S.3911-3923.
- Itoh, Hiroyasu u. a., 2004. Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*, 427(6973), S.465-468.
- Jagendorf, A T & Uribe, E., 1966. ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), S.170-177.
- Jagendorf, Andre T. & Smith, M., 1962. Uncoupling Phosphorylation in Spinach Chloroplasts by Absence of Cations. *Plant Physiology*, 37(2), S.135-141.

- Jault, J.M. & Allison, W S, 1993. Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(3), S.1558-1566.
- Jiang, W, Hermolin, J. & Fillingame, R H, 2001. The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), S.4966-4971.
- Jiang, W & Fillingame, R H, 1998. Interacting helical faces of subunits a and c in the F1Fo ATP synthase of Escherichia coli defined by disulfide cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), S.6607-6612.
- Jiao, S., Hilaire, E. & Guikema, J.A., 2004. Identification and differential accumulation of two isoforms of the CF1-beta subunit under high light stress in Brassica rapa. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française De Physiologie Végétale*, 42(11), S.883-890.
- Johansson, L.C. u. a., 2009. Membrane protein crystallization from lipidic phases. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(4), S.372-378.
- Johnson, E A, Evron, Y. & McCarty, R E, 2001. Resonance energy transfer between tryptophan 57 in the epsilon subunit and pyrene maleimide labeled gamma subunit of the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry*, 40(6), S.1804-1811.
- Johnson, Eric A, 2008. Altered expression of the chloroplast ATP synthase through site-directed mutagenesis in Chlamydomonas reinhardtii. *Photosynthesis Research*, 96(2), S.153-162.
- Johnson, Eric A & McCarty, Richard E, 2002. The carboxyl terminus of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase is exposed during illumination. *Biochemistry*, 41(7), S.2446-2451.
- Johnson, Eric A, Rosenberg, J. & McCarty, Richard E, 2007. Expression by Chlamydomonas reinhardtii of a chloroplast ATP synthase with polyhistidine-tagged beta subunits. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1767(5), S.374-380.
- Jones, P C & Fillingame, R H, 1998. Genetic fusions of subunit c in the F0 sector of H⁺-transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(45), S.29701-29705.
- Jones, P C, Jiang, W & Fillingame, R H, 1998. Arrangement of the multicopy H⁺-translocating subunit c in the membrane sector of the Escherichia coli F1F0 ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(27), S.17178-17185.
- Jordan, P. u. a., 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411(6840), S.909-917.
- Jr, K.K. u. a., 2000. A Rotary Molecular Motor That Can Work at near 100% Efficiency. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 355(1396), S.473-489.
- Junge, W, Lill, H & Engelbrecht, S, 1997. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11), S.420-423.
- Kabaleeswaran, V. u. a., 2006. Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase. *The EMBO Journal*, 25(22), S.5433-5442.
- Kabaleeswaran, V. u. a., 2009. Asymmetric structure of the yeast F1 ATPase in the absence of bound nucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), S.10546-10551.

- Kabsch, W., 2010a. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), S.133-144.
- Kabsch, W., 2010b. XDS. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), S.125-132.
- Kaftan, D. u. a., 2002. From chloroplasts to photosystems: in situ scanning force microscopy on intact thylakoid membranes. *The EMBO Journal*, 21(22), S.6146-6153.
- Kagawa, R. u. a., 2004. The structure of bovine F1-ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride. *The EMBO Journal*, 23(14), S.2734-2744.
- KAGAWA, Y. u. a., 1976. Proton Translocating ATPase of a Thermophilic Bacterium. *Journal of Biochemistry*, 80(1), S.141 -151.
- Kaim, G & Dimroth, P, 1999. ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. *The EMBO Journal*, 18(15), S.4118-4127.
- Kaim, Georg, Dimroth, Peter & Wehrle, F., 2002. Molecular mechanism of the ATP synthase's F(o) motor probed by mutational analyses of subunit a. *Journal of Molecular Biology*, 322(2), S.369-381.
- Kaim, Georg, Prummer, M., u. a., 2002. Coupled rotation within single F0F1 enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis. *FEBS Letters*, 525(1-3), S.156-163.
- Kanazawa, Atsuko & Kramer, David M, 2002. In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), S.12789-12794.
- Kanazawa, H. u. a., 1981. Nucleotide sequence of genes coding for dicyclohexylcarbodiimide-binding protein and the [alpha] subunit of proton-translocating ATPase of Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 100(1), S.219-225.
- Kanekatsu, M. u. a., 1998. The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF0CF1-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 46(1), S.99-105.
- Kantardjieff, K.A. & Rupp, B., 2003. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 12(9), S.1865-1871.
- Karrasch, S. & Walker, J E, 1999. Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *Journal of Molecular Biology*, 290(2), S.379-384.
- Kato, Yasuyuki u. a., 1997. Thermophilic F1-ATPase Is Activated without Dissociation of an Endogenous Inhibitor, ϵ Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), S.24906 -24912.
- Kato-Yamada, Y u. a., 1998. Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(31), S.19375-19377.
- Kato-Yamada, Yasuyuki, 2009. [On the regulatory role of the epsilon subunit in ATP synthase]. *Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society*, 81(11), S.943-951.
- Kato-Yamada, Yasuyuki, Yoshida, Masasuke & Hisabori, Toru, 2000. Movement of the Helical Domain of the ϵ Subunit Is Required for the Activation of Thermophilic F1-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), S.35746 -35750.

- Kavermann, H. u. a., 1999. The proteolipid of the A(1)A(0) ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(36), S.25281-25284.
- Kayalar, C., Rosing, J. & Boyer, P D, 1977. An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions. *Journal of Biological Chemistry*, 252(8), S.2486 -2491.
- Kelly, E., Privé, G.G. & Tieleman, D.P., 2005. Molecular models of lipopeptide detergents: large coiled-coils with hydrocarbon interiors. *Journal of the American Chemical Society*, 127(39), S.13446-13447.
- Kern, J., Loll, B., u. a., 2005. Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706(1-2), S.147-157.
- Kern, Jan, Saenger, Wolfram, u. a., 2005. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438(7070), S.1040-1044.
- Ketcham, S.R. u. a., 1984. Role of the gamma subunit of chloroplast coupling factor 1 in the light-dependent activation of photophosphorylation and ATPase activity by dithiothreitol. *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), S.7286 -7293.
- Kim, D., Chivian, D. & Baker, D., 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue). Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh468> [Zugegriffen Oktober 24, 2011].
- Kim, Y. u. a., 2011. Redox regulation of rotation of the cyanobacterial F₁-ATPase containing thiol regulation switch. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11), S.9071-9078.
- Kiselyova, O.I. u. a., 2005. Crystallization of F₁F₀-ATP synthase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of Crystal Growth*, 275(1-2), S.e1447-e1452.
- Kissinger, C.R., Gehlhaar, D.K. & Fogel, D.B., 1999. Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 55(Pt 2), S.484-491.
- Kluge, C. & Dimroth, P, 1992. Studies on Na⁺ and H⁺ translocation through the F_o part of the Na⁽⁺⁾-translocating F₁F_o ATPase from *Propionigenium modestum*: discovery of a membrane potential dependent step. *Biochemistry*, 31(50), S.12665-12672.
- Kol, S., Nouwen, N. & Driessen, A.J.M., 2008. Mechanisms of YidC-mediated insertion and assembly of multimeric membrane protein complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(46), S.31269-31273.
- Komatsu-Takaki, M., 1996. Energizing effects of illumination on the reactivities of lysine residues of the gamma subunit of chloroplast ATP synthase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 236(2), S.470-475.
- Komatsu-Takaki, M., 1989. Energy-dependent conformational changes in the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase (CF₀CF₁). *The Journal of Biological Chemistry*, 264(30), S.17750-17753.

- Konno, H u. a., 2000. Inverse regulation of F1-ATPase activity by a mutation at the regulatory region on the gamma subunit of chloroplast ATP synthase. *The Biochemical Journal*, 352 Pt 3, S.783-788.
- Konno, Hiroki u. a., 2011. Characterization of the relationship between ADP- and epsilon-induced inhibition in cyanobacterial F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), S.13423-13429.
- Konno, Hiroki u. a., 2006. The regulator of the F1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the epsilon subunit. *The EMBO Journal*, 25(19), S.4596-4604.
- Konno, Hiroki u. a., 2004. Significance of the epsilon subunit in the thiol modulation of chloroplast ATP synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(1), S.17-24.
- Kors, C.A. u. a., 2009. Effects of impurities on membrane-protein crystallization in different systems. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 65, S.1062-1073.
- Krah, A. u. a., 2010. On the structure of the proton-binding site in the F(o) rotor of chloroplast ATP synthases. *Journal of Molecular Biology*, 395(1), S.20-27.
- Kramer, David M, Cruz, Jeffrey A & Kanazawa, Atsuko, 2003. Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends in Plant Science*, 8(1), S.27-32.
- Krebstakies, T. u. a., 2008. The stoichiometry of subunit c of Escherichia coli ATP synthase is independent of its rate of synthesis. *Biochemistry*, 47(26), S.6907-6916.
- Krenn, B.E. u. a., 1995. ATP synthase from a cyanobacterial Synechocystis 6803 mutant containing the regulatory segment of the chloroplast gamma subunit shows thiol modulation. *Biochemical Society Transactions*, 23(4), S.757-760.
- Krenn, B.E. u. a., 1997. The ATP synthase gamma subunit provides the primary site of activation of the chloroplast enzyme: experiments with a chloroplast-like Synechocystis 6803 mutant. *The Biochemical Journal*, 323 (Pt 3), S.841-845.
- Kulkarni, C.V. u. a., 2011. Monoolein: a magic lipid? *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 13(8), S.3004-3021.
- Kumar, A. u. a., 2010. The critical roles of residues P235 and F236 of subunit A of the motor protein A-ATP synthase in P-loop formation and nucleotide binding. *Journal of Molecular Biology*, 401(5), S.892-905.
- Kuo, K.H., 1987. Quasicrystals and noncrystallographic symmetry. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 7(4), S.277-282.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), S.680-685.
- Lapaille, M. u. a., 2010. Loss of mitochondrial ATP synthase subunit beta (Atp2) alters mitochondrial and chloroplastic function and morphology in Chlamydomonas. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1797(8), S.1533-1539.
- Lawrence, R.M. u. a., 2011. Recombinant production and purification of the subunit c of chloroplast ATP synthase. *Protein Expression and Purification*, 76(1), S.15-24.

- Lebowitz, M.S. & Pedersen, P L, 1996. Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 330(2), S.342-354.
- Lee, L.K. u. a., 2010. The structure of the peripheral stalk of *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(3), S.373-378.
- LICHTENTHALER, H.K. & PARK, RODERIC B., 1963. Chemical Composition of Chloroplast Lamellae from Spinach. *Nature*, 198(4885), S.1070-1072.
- Lieberman, R.L. u. a., 2011. Crystallization chaperone strategies for membrane proteins. *Methods (San Diego, Calif.)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854852> [Zugegriffen August 24, 2011].
- Lill, H u. a., 1996. Cross-linking of engineered subunit delta to (alpha)3 in chloroplast F₁-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(51), S.32737-32742.
- Linke, D., 2009. Detergents: an overview. *Methods in Enzymology*, 463, S.603-617.
- Long, Julie C., Wang, S. & Vik, Steven B., 1998. Membrane Topology of Subunit a of the F₁F₀ ATP Synthase as Determined by Labeling of Unique Cysteine Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), S.16235 -16240.
- Lowe, K.M. & McCarty, R E, 1998. Asymmetry of the alpha subunit of the chloroplast ATP synthase as probed by the binding of Lucifer Yellow vinyl sulfone. *Biochemistry*, 37(8), S.2507-2514.
- Ma, X.H. & Shi, Y.L., 1997. Effects of ADP, DTT, and Mg²⁺ on the ion-conductive property of chloroplast H⁺-ATPase(CF₀-CF₁) reconstituted into bilayer membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(2), S.461-463.
- le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J.V., 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1508(1-2), S.86-111.
- Majeran, W. u. a., 2001. The light sensitivity of ATP synthase mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 126(1), S.421-433.
- Malyan, A N, 2002. ATP binding to noncatalytic sites of chloroplast coupling factor CF₁. *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(11), S.1253-1257.
- Malyan, A N, 2007. Interaction of ADP and ATP with noncatalytic sites of isolated and membrane-bound chloroplast coupling factor CF₁. *Biochemistry. Biokhimiia*, 72(7), S.728-734.
- Malyan, A N, 2005. Light-dependent incorporation of adenine nucleotide into noncatalytic sites of chloroplast ATP synthase. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(11), S.1245-1250.
- Malyan, A N, 2010. Role of short conserved segments of alpha- and beta-subunits that link F₁-ATPase catalytic and noncatalytic sites. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(1), S.81-84.
- Malyan, A N & Vitseva, O.I., 2001. Interaction of sulfite with the noncatalytic and catalytic sites of chloroplast coupling factor cf₁. *Biochemistry. Biokhimiia*, 66(4), S.410-414.
- Malyan, A N, Vitseva, O.I. & Strotmann, H, 1999. Study of the structure of the thylakoid membrane-bound chloroplast coupling factor CF₁. *Biochemistry. Biokhimiia*, 64(9), S.1000-1004.

- Malyan, A. & Allison, W., 2002. Properties of noncatalytic sites of thioredoxin-activated chloroplast coupling factor 1. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1554(3), S.153-158.
- Malyan, Alexander N, 2006. ADP and ATP binding to noncatalytic sites of thiol-modulated chloroplast ATP synthase. *Photosynthesis Research*, 88(1), S.9-18.
- Malyan, Alexander N, 2003. Interaction of oxyanions with thioredoxin-activated chloroplast coupling factor 1. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1607(2-3), S.161-166.
- Malyan, Alexander N, 2010. Nucleotide binding to noncatalytic sites is essential for ATP-dependent stimulation and ADP-dependent inactivation of the chloroplast ATP synthase. *Photosynthesis Research*, 105(3), S.243-248.
- Mason, J G & Whitfeld, P R, 1990. The gamma-subunit of spinach chloroplast ATP synthase: isolation and characterisation of cDNA and genomic clones. *Plant Molecular Biology*, 14(6), S.1007-1018.
- Matsui, T. u. a., 1997. Catalytic Activity of the $\alpha\beta\gamma$ Complex of F1-ATPase without Noncatalytic Nucleotide Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), S.8215 - 8221.
- Matthews, B W, 1968. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, 33(2), S.491-497.
- McCallum, J.R. & McCarty, Richard E, 2007. Proton flux through the chloroplast ATP synthase is altered by cleavage of its gamma subunit. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1767(7), S.974-979.
- McCarty, R E, 1997. Applications of fluorescence resonance energy transfer to structure and mechanism of chloroplast ATP synthase. *Methods in Enzymology*, 278, S.528-538.
- McCarty, R. E., Evron, Y. & Johnson, E. A., 2000. THE CHLOROPLAST ATP SYNTHASE: A Rotary Enzyme? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, S.83-109.
- McCarty, Richard E, 2005. ATP synthase of chloroplast thylakoid membranes: a more in depth characterization of its ATPase activity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(5), S.289-297.
- McCarty, Richard E, 2006. The decay of the ATPase activity of light plus thiol-activated thylakoid membranes in the dark. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(1), S.67-74.
- McCoy, A.J., 2006. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 63, S.32-41.
- McCoy, A.J. u. a., 2007. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40, S.658-674.
- McGregor, C.-L. u. a., 2003. Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins. *Nature Biotechnology*, 21(2), S.171-176.
- McMillan, D.G.G. u. a., 2007. A specific adaptation in the a subunit of thermoalkaliphilic F1FO-ATP synthase enables ATP synthesis at high pH but not at neutral pH values. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), S.17395-17404.

- Meier, Thomas u. a., 2007. A tridecameric c ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase from the thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2.A1 facilitates ATP synthesis at low electrochemical proton potential. *Molecular Microbiology*, 65(5), S.1181-1192.
- Meier, Thomas u. a., 2006. Structural Investigations of the Membrane-Embedded Rotor Ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. *J. Bacteriol.*, 188(22), S.7759-7764.
- Meier, Thomas u. a., 2009. Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na⁺-dependent F-ATP synthases. *Journal of Molecular Biology*, 391(2), S.498-507.
- Meier, Thomas u. a., 2003. Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases. *Journal of Molecular Biology*, 325(2), S.389-397.
- Meier, Thomas, Polzer, P., u. a., 2005. Structure of the Rotor Ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science*, 308(5722), S.659 -662.
- Meier, Thomas, Yu, J., u. a., 2005. Structural evidence for a constant c11 ring stoichiometry in the sodium F-ATP synthase. *The FEBS Journal*, 272(21), S.5474-5483.
- Melkikh, A.V., Seleznev, V.D. & Chesnokova, O.I., 2010. Analytical model of ion transport and conversion of light energy in chloroplasts. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3), S.702-710.
- Mellwig, C. & Böttcher, Bettina, 2003. A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), S.18544-18549.
- Menz, R I, Leslie, A G & Walker, J E, 2001. The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide. *FEBS Letters*, 494(1-2), S.11-14.
- Menz, R I, Walker, J E & Leslie, A G, 2001. Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*, 106(3), S.331-341.
- Menz, R.Ian, Walker, John E. & Leslie, A.G.W., 2001. Structure of Bovine Mitochondrial F1-ATPase with Nucleotide Bound to All Three Catalytic Sites. *Cell*, 106(3), S.331-341.
- Meury, M. u. a., 2011. Structure determination of channel and transport proteins by high-resolution microscopy techniques. *Biological Chemistry*, 392(1-2), S.143-150.
- Miki, J. u. a., 1988. The gamma-subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts. Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence. *FEBS Letters*, 232(1), S.221-226.
- Miller, M.J., Oldenburg, M. & Fillingame, R H, 1990. The essential carboxyl group in subunit c of the F1F0 ATP synthase can be moved and H(+)-translocating function retained. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), S.4900-4904.
- Mills, D.A. u. a., 1995. ADP binding induces long-distance structural changes in the beta polypeptide of the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry*, 34(18), S.6100-6108.
- Minoletti, C. u. a., 2002. Rebuilt 3D structure of the chloroplast fl ATPase-tentoxin complex. *Proteins*, 49(3), S.302-320.
- Mitchell, E., Kuhn, P. & Garman, E., 1999. Demystifying the synchrotron trip: a first time user's guide. *Structure (London, England: 1993)*, 7(5), S.R111-121.

- Mitchell, P., 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science (New York, N.Y.)*, 206(4423), S.1148-1159.
- MITCHELL, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature*, 191(4784), S.144-148.
- Mitome, N. u. a., 2010. Essential arginine residue of the F(o)-a subunit in F(o)F(1)-ATP synthase has a role to prevent the proton shortcut without c-ring rotation in the F(o) proton channel. *The Biochemical Journal*, 430(1), S.171-177.
- Mitome, N. u. a., 2004. Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: Indication of noninteger 10:3 H⁺/ATP ratio and permissive elastic coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), S.12159 -12164.
- Mnatsakanyan, N. u. a., 2009. ATP synthase with its gamma subunit reduced to the N-terminal helix can still catalyze ATP synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(39), S.26519-26525.
- Mochimaru, M. & Sakurai, H., 1997. Three kinds of binding site for tentoxin on isolated chloroplast coupling factor 1. *FEBS Letters*, 419(1), S.23-26.
- Moroney, J., Fullmer, C. & McCarty, R., 1984. Characterization of the cysteinyl-containing peptides of the gamma subunit of coupling factor 1. *J. Biol. Chem.*, 259(11), S.7281-7285.
- Mueller-Dieckmann, J., 2006. The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62, S.1446-1452.
- Muench, S.P., Trinick, J. & Harrison, M.A., 2011. Structural divergence of the rotary ATPases. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44(3), S.311-356.
- Müller, D J u. a., 2001. ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor. *FEBS Letters*, 504(3), S.219-222.
- Nakamoto, R K, Ketchum, C.J. & al-Shawi, M.K., 1999. Rotational coupling in the F₀F₁ ATP synthase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, S.205-234.
- Nakanishi-Matsui, M. u. a., 2010. The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1797(8), S.1343-1352.
- Nakano, T. u. a., 2004. solution structure TF₁F_o subunit c. *To be Published*, S.-.
- Nam, H.-J., Jeon, J. & Kim, S., 2009. Bioinformatic approaches for the structure and function of membrane proteins. *BMB Reports*, 42(11), S.697-704.
- Nath, S. & Jain, S., 2000. Kinetic modeling of ATP synthesis by ATP synthase and its mechanistic implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(3), S.629-633.
- Navaza, J., 1994. AMoRe : an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, 50, S.157-163.
- Neff, D. & Dencher, N A, 1999. Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF₁-ATP synthase, CF_o and CF₁ by blue native electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(3), S.569-575.
- Neff u. a., 1997. Chloroplast F₀F₁ ATP Synthase Imaged by Atomic Force Microscopy. *Journal of Structural Biology*, 119(2), S.139-148.

- Nespolo, M., Souvignier, B. & Litvin, D.B., 2008. About the concept and definition of “noncrystallographic symmetry. *Zeitschrift für Kristallographie*, 223(9), S.605-606.
- Newman, J., 2004. Novel buffer systems for macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(3), S.610-612.
- Ni, Z.-L., Dong, H. & Wei, J.-M., 2005. N-terminal deletion of the gamma subunit affects the stabilization and activity of chloroplast ATP synthase. *The FEBS Journal*, 272(6), S.1379-1385.
- Ni, Z.-L., Shi, X.-B. & Wei, J.-M., 2004. Functional consequences of N- or C-terminal deletions of the delta subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochemistry*, 43(8), S.2272-2278.
- Nishizaka, T. u. a., 2004. Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat Struct Mol Biol*, 11(2), S.142-148.
- Noji, H u. a., 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622), S.299-302.
- Noji, Hiroyuki u. a., 1999. Rotation of Escherichia coli F1-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(3), S.597-599.
- Novy R., Drott D., Yaeger K., Mierendorf R., 2001. Overcoming the codon bias of C. coli for enhanced protein expression. *inNovation*, 12, S.1-3.
- Nowak, K.F. & McCarty, Richard E, 2004. Regulatory role of the C-terminus of the epsilon subunit from the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry*, 43(11), S.3273-3279.
- Nowak, K.F., Tabidze, V. & McCarty, Richard E, 2002. The C-terminal domain of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase is not required for ATP synthesis. *Biochemistry*, 41(51), S.15130-15134.
- Oberfeld, B., Brunner, J. & Dimroth, Peter, 2006. Phospholipids occupy the internal lumen of the c ring of the ATP synthase of Escherichia coli. *Biochemistry*, 45(6), S.1841-1851.
- Ogilvie, I., Aggeler, R & Capaldi, R A, 1997. Cross-linking of the delta subunit to one of the three alpha subunits has no effect on functioning, as expected if delta is a part of the stator that links the F1 and F0 parts of the Escherichia coli ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), S.16652-16656.
- Okuno, D., Iino, R. & Noji, Hiroyuki, 2011. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *Journal of Biochemistry*, 149(6), S.655-664.
- Okuno, D., Ikeguchi, M. & Noji, Hiroyuki, 2010. Measurement of the conformational state of F(1)-ATPase by single-molecule rotation. *Methods in Enzymology*, 475, S.279-296.
- Omote, H u. a., 1999. The gamma-subunit rotation and torque generation in F1-ATPase from wild-type or uncoupled mutant Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), S.7780-7784.
- Ono, S. u. a., 2004. ATP synthase that lacks Foa subunit; isolation, properties and indication of Fob2subunits as an anchor-rail of rotating c-ring. *J. Biol. Chem.*, S.M404993200.
- Orriss, G.L. u. a., 1998. Bovine F1-ATPase covalently inhibited with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: the structure provides further support for a rotary catalytic mechanism. *Structure (London, England: 1993)*, 6(7), S.831-837.

- Oster, G & Wang, H, 2000. Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.482-510.
- Oster, George & Wang, Hongyun, 2003. Rotary protein motors. *Trends in Cell Biology*, 13(3), S.114-121.
- Ozaki, Y. u. a., 2008. UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of FoF1-ATP synthase in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(3), S.663-666.
- Pan, W., Ko, Y H & Pedersen, P L, 1998. Delta subunit of rat liver mitochondrial ATP synthase: molecular description and novel insights into the nature of its association with the F1-moiety. *Biochemistry*, 37(19), S.6911-6923.
- Panke & Rumberg, 1999. Kinetic modeling of rotary CF0F1-ATP synthase: storage of elastic energy during energy transduction. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1412(2), S.118-128.
- Pänke, O & Rumberg, B., 1996. Kinetic modelling of the proton translocating CF0CF1-ATP synthase from spinach. *FEBS Letters*, 383(3), S.196-200.
- Pänke, Oliver u. a., 2000. F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EFoEF1. *FEBS Letters*, 472(1), S.34-38.
- PARK, R B & PON, N.G., 1961. Correlation of structure with function in Spinacea oleracea chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 3, S.1-10.
- Pavlova, P. u. a., 2004. Complete inhibition and partial Re-activation of single F1-ATPase molecules by tentoxin: new properties of the re-activated enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), S.9685-9688.
- Penefsky, H S, 1985. Energy-dependent dissociation of ATP from high affinity catalytic sites of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(25), S.13735-13741.
- Penefsky, H S & Garrett, N.E., 1975. Interaction of adenine nucleotides with multiple binding sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(17), S.6640-6647.
- PENEFSKY, H.S. u. a., 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine tolphosphatase in oxidative phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, S.3330-3336.
- Penefsky, Harvey S., 1974. Differential Effects of Adenylyl Imidodiphosphate on Adenosine Triphosphate Synthesis and the Partial Reactions of Oxidative Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(11), S.3579 -3585.
- Petitjean, M., 2008. A DEFINITION OF SYMMETRY. *Science*, 18(1952), S.99-119.
- Pinet, E., Cavelier, F., u. a., 1996. Synthesis, structure, and properties of MeSer1-tentoxin, a new cyclic tetrapeptide which interacts specifically with chloroplast F1 H(+)-ATPase differentiation of inhibitory and stimulating effects. *Biochemistry*, 35(39), S.12804-12811.
- Pinet, E., Gomis, J.M., u. a., 1996. Tentoxin has at least two binding sites on CF1 and epsilon-depleted CF1 ATPases isolated from spinach chloroplast. *FEBS Letters*, 395(2-3), S.217-220.

- Poetsch, A u. a., 2000. Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H(+)-ATP synthase purified by blue native electrophoresis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1466(1-2), S.339-349.
- Poetsch, A u. a., 1999. Detergent effect on anion exchange perfusion chromatography and gel filtration of intact chloroplast H(+)-ATP synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(2), S.520-524.
- Poetsch, Ansgar u. a., 2007. Biophysics and bioinformatics reveal structural differences of the two peripheral stalk subunits in chloroplast ATP synthase. *Journal of Biochemistry*, 141(3), S.411-420.
- Poetsch, Ansgar u. a., 2003. Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1618(1), S.59-66.
- Pogoryelov, D. u. a., 2010. Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F(o) complex of ATP synthases. *Nature Chemical Biology*, 6(12), S.891-899.
- Pogoryelov, D. u. a., 2007. The Oligomeric State of c Rings from Cyanobacterial F-ATP Synthases Varies from 13 to 15. *J. Bacteriol.*, 189(16), S.5895-5902.
- Pogoryelov, D. u. a., 2009. High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(10), S.1068-1073.
- Pogoryelov, D. u. a., 2005. The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO Reports*, 6(11), S.1040-1044.
- Poincelot, R.P., 1973. Isolation and lipid composition of spinach chloroplast envelope membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159(1), S.134-142.
- Poincelot, R.P. & Day, P.R., 1974. An Improved Method for the Isolation of Spinach Chloroplast Envelope Membranes. *Plant Physiology*, 54(5), S.780-783.
- Ponomarenko, S., Volfson, I. & Strotmann, H, 1999. Proton gradient-induced changes of the interaction between CF0 and CF1 related to activation of the chloroplast ATP synthase. *FEBS Letters*, 443(2), S.136-138.
- Ponomarenko, S.V., 2007. [Evolutionary modifications of molecular structure of ATP-synthase gamma-subunit]. *Zhurnal Evoliutsionnoï Biokhimii I Fiziologii*, 43(5), S.391-397.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. & Dodson, E., 2003a. A graphical user interface to the CCP 4 program suite. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 59, S.1131-1137.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. & Dodson, E., 2003b. A graphical user interface to the CCP 4 program suite. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 59, S.1131-1137.
- Preiss, L. u. a., 2010. A new type of proton coordination in an F(1)F(o)-ATP synthase rotor ring. *PLoS Biology*, 8(8), S.e1000443.
- Privé, G.G., 2007. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods (San Diego, Calif.)*, 41(4), S.388-397.
- Privé, G.G., 2009. Lipopeptide detergents for membrane protein studies. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(4), S.379-385.

- Priya, R. u. a., 2009. Solution structure, determined by nuclear magnetic resonance, of the b30-82 domain of subunit b of Escherichia coli F1Fo ATP synthase. *J.Bacteriol.*, 191, S.7538-7544.
- Pronin, A.S. & Malyan, A N, 2009. Interaction of pyrophosphate with catalytic and noncatalytic sites of chloroplast ATP synthase. *Biochemistry. Biokhimiia*, 74(7), S.775-780.
- PULLMAN, M.E. u. a., 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, S.3322-3329.
- Qiu, H. & Caffrey, M., 2000. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. *Biomaterials*, 21(3), S.223-234.
- Rastogi, V.K. & Girvin, M.E., 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*, 402(6759), S.263-268.
- Rees, D.M., Leslie, A.G.W. & Walker, John E, 2009. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), S.21597-21601.
- Ren, H & Allison, W S, 2000. On what makes the gamma subunit spin during ATP hydrolysis by F(1). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.221-233.
- Ren, H.M. & Allison, W S, 1997. Photoinactivation of the F1-ATPase from spinach chloroplasts by dequalinium is accompanied by derivatization of methionine beta183. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), S.32294-32300.
- Ren, Huimiao u. a., 1999. Oxidation of the $\alpha 3(\beta D311C/R333C)3\gamma$ Subcomplex of the Thermophilic Bacillus PS3 F1-ATPase Indicates That Only Two β Subunits Can Exist in the Closed Conformation Simultaneously. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44), S.31366 - 31372.
- Revington, Matthew u. a., 1999. The Dimerization Domain of the b Subunit of the Escherichia coli F1F0-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), S.31094 -31101.
- Rexroth, S. u. a., 2004. Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1658(3), S.202-211.
- Ribeiro, A.S. u. a., 2007. Inhibition of spinach chloroplast F0F1 by an Fe²⁺/ascorbate/H₂O₂ system. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française De Physiologie Végétale*, 45(10-11), S.750-756.
- Richter, M L & Gao, F, 1996. The chloroplast ATP synthase: structural changes during catalysis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(5), S.443-449.
- Richter, M L, Hein, R. & Huchzermeyer, B., 2000. Important subunit interactions in the chloroplast ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.326-342.
- Richter, M. u. a., 2004. Light-induced proton slip and proton leak at the thylakoid membrane. *Journal of Plant Physiology*, 161(12), S.1325-1337.
- Richter, Mark L, 2004. Gamma-epsilon Interactions Regulate the Chloroplast ATP Synthase. *Photosynthesis Research*, 79(3), S.319-329.
- Richter, Mark L u. a., 2005. Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6), S.467-473.

- del Riego, G. u. a., 2006. Multiple phosphorylation sites in the beta subunit of thylakoid ATP synthase. *Photosynthesis Research*, 89(1), S.11-18.
- Del Rizzo, P.A. u. a., 2002. The „second stalk“ of Escherichia coli ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry*, 41(21), S.6875-6884.
- Rodgers, A.J. & Wilce, M.C., 2000. Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nature Structural Biology*, 7(11), S.1051-1054.
- Rodriguez, D.D. u. a., 2009. Crystallographic ab initio protein structure solution below atomic resolution. *Nat Meth*, 6(9), S.651-653.
- Romanowska, E. u. a., 2008. High light induced accumulation of two isoforms of the CF1 alpha-subunit in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of C4 plants. *Acta Biochimica Polonica*, 55(1), S.175-182.
- Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., u. a., 2005. Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature*, 433(7027), S.773-777.
- Rondelez, Y., Tresset, G., Tabata, K.V., u. a., 2005. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nature Biotechnology*, 23(3), S.361-365.
- van Roon, H. u. a., 2000. Solubilization of green plant thylakoid membranes with n-dodecyl-alpha,D-maltoside. Implications for the structural organization of the Photosystem II, Photosystem I, ATP synthase and cytochrome b6 f complexes. *Photosynthesis Research*, 64(2-3), S.155-166.
- Ross, S.A., Zhang, M.X. & Selman, B.R., 1996. A role for the disulfide bond spacer region of the Chlamydomonas reinhardtii coupling factor 1 gamma-subunit in redox regulation of ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(1), S.49-57.
- Roth, L.E. & Tezcan, F.A., 2011. X-ray crystallography. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 766, S.147-164.
- Rott, M. u. a., 2011. ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO2 assimilation, and plant growth by overacidification of the thylakoid lumen. *The Plant Cell*, 23(1), S.304-321.
- Rubinstein, J.L., Walker, John E & Henderson, R., 2003. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *The EMBO Journal*, 22(23), S.6182-6192.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S & Junge, W, 1997. Functional and idling rotatory motion within F1-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), S.4401-4405.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S & Junge, W, 1996. Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature*, 381(6583), S.623-625.
- Sage, J.T. u. a., 2011. Infrared protein crystallography. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1814(6), S.760-777.
- Saita, E.-ichiro u. a., 2010. Activation and Stiffness of the Inhibited States of F1-ATPase Probed by Single-molecule Manipulation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), S.11411 -11417.
- Sambongi, Yoshihiro u. a., 1999. Mechanical Rotation of the c Subunit Oligomer in ATP Synthase (F0F1): Direct Observation. *Science*, 286(5445), S.1722 -1724.

- Samra, H.S. u. a., 2006. Structural analysis of the regulatory dithiol-containing domain of the chloroplast ATP synthase gamma subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(41), S.31041-31049.
- Samra, H.S. u. a., 2008. The role of specific beta-gamma subunit interactions in oxyanion stimulation of the MgATP hydrolysis of a hybrid photosynthetic F1-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(2), S.69-76.
- Sanchez-Weatherby, J. u. a., 2008. Improving Diffraction by Humidity Control: A Novel Device Compatible with X-Ray Beamlines. *Acta Crystallogr., Sect. D*, 65, S.1237-1246.
- Santolini, J. u. a., 1999. Kinetic analysis of tentoxin binding to chloroplast F1-ATPase. A model for the overactivation process. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(2), S.849-858.
- Santolini, J. u. a., 1998. Interrelation between high and low affinity tentoxin binding sites in chloroplast F1-ATPase revealed by synthetic analogues. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(6), S.3343-3350.
- Santolini, Jérôme u. a., 2002. An insight into the mechanism of inhibition and reactivation of the F(1)-ATPases by tentoxin. *Biochemistry*, 41(19), S.6008-6018.
- Saraste, Matti, 1999. Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283(5407), S.1488 - 1493.
- Sauter, N.K. & Zwart, Peter H., 2009. Autoindexing the diffraction patterns from crystals with a pseudotranslation. , 65(Pt 6), S.553-559.
- Schägger, Hermann, 2002. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1555(1-3), S.154-159.
- Schmidt, R.A. u. a., 1998. Effects of Carbon Source on Expression of Fo Genes and on the Stoichiometry of the c Subunit in the F1Fo ATPase of Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 180(12), S.3205-3208.
- Schmelz, E.A. u. a., 2007. Cowpea chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory. *Plant Physiology*, 144(2), S.793-805.
- Schmidt, G., 1992. Expression of subunit II of chloroplast H(+)-ATPase in an Escherichia coli mutant lacking subunit b of its H(+)-ATPase. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 607, S.275-278.
- Schulenberg, B. u. a., 1999. The gammaepsilon-c subunit interface in the ATP synthase of Escherichia coli. cross-linking of the epsilon subunit to the c subunit ring does not impair enzyme function, that of gamma to c subunits leads to uncoupling. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), S.34233-34237.
- Schulenberg, B. u. a., 1997. Cross-linking of chloroplast F0F1-ATPase subunit epsilon to gamma without effect on activity. Epsilon and gamma are parts of the rotor. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 249(1), S.134-141.
- Schwarz, O., Schürmann, P. & Strotmann, H, 1997. Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H+-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(27), S.16924-16927.

- Schwarzenbacher, R. u. a., 2004. The importance of alignment accuracy for molecular replacement. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60, S.1229-1236.
- Schwassmann, H.J. u. a., 2007. Metabolism controls dimerization of the chloroplast FoF1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 581(7), S.1391-1396.
- Schwem, B.E. & Fillingame, Robert H, 2006. Cross-linking between helices within subunit a of *Escherichia coli* ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(49), S.37861-37867.
- Seelert, H, Poetsch, A, Dencher, N A, u. a., 2000. Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature*, 405(6785), S.418-419.
- Seelert, H, Poetsch, A, Rohlf, M., u. a., 2000. Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes: application to the chloroplast H⁺-FoF1-ATP synthase. *The Biochemical Journal*, 346 Pt 1, S.41-44.
- Seelert, Holger & Dencher, Norbert A, 2011. ATP synthase superassemblies in animals and plants: Two or more are better. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1807(9), S.1185-1197.
- Seelert, Holger, Dencher, Norbert A & Müller, Daniel J, 2003. Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *Journal of Molecular Biology*, 333(2), S.337-344.
- Shen, H., Walters, D.E. & Mueller, D.M., 2008. Introduction of the chloroplast redox regulatory region in the yeast ATP synthase impairs cytochrome c oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(47), S.32937-32943.
- Shi, D.-J. u. a., 2004. [Bioinformatics studies on photosynthetic system genes in cyanobacteria and chloroplasts]. *Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica*, 31(6), S.627-633.
- Shi, X, Wei, J & Shen, Y, 2000. Using yeast two-hybrid system to detect interactions of ATP synthase subunits from *Spinacia oleracea*. *Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences*, 43(2), S.169-175.
- Shi, X.B., Wei, J.M. & Shen, Y.K., 2001. Effects of sequential deletions of residues from the N- or C-terminus on the functions of epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry*, 40(36), S.10825-10831.
- Shimabukuro, K. u. a., 2003. Catalysis and rotation of F1 motor: Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40° substep rotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), S.14731 -14736.
- Shirakihara, Y. u. a., 1997. The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer. *Structure*, 5, S.825-836.
- Sielaff, H. u. a., 2008. Functional halt positions of rotary FOF1-ATPase correlated with crystal structures. *Biophysical Journal*, 95(10), S.4979-4987.
- Sigalat, C, Pitard, B & Haraux, F, 1995. Proton coupling is preserved in membrane-bound chloroplast ATPase activated by high concentrations of tentoxin. *FEBS Letters*, 368(2), S.253-256.

- Smith, J.B. & Sternweis, P.C., 1977. Purification of membrane attachment and inhibitory subunits of the proton translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 16(2), S.306-311.
- Smith, L.T., Rosen, G & Boyer, P D, 1983. Properties of ATP tightly bound to catalytic sites of chloroplast ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(18), S.10887-10894.
- Sokolov, M. & Gromet-Elhanan, Z, 1996. Spinach chloroplast coupling factor CF1-alpha 3 beta 3 core complex: structure, stability, and catalytic properties. *Biochemistry*, 35(4), S.1242-1248.
- Sokolov, M. u. a., 1999. The 20 C-terminal amino acid residues of the chloroplast ATP synthase gamma subunit are not essential for activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(20), S.13824-13829.
- Sone, N u. a., 1977. Adenosine triphosphate synthesis by electrochemical proton gradient in vesicles reconstituted from purified adenosine triphosphatase and phospholipids of thermophilic bacterium. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(9), S.2956-2960.
- Soong, R.K. u. a., 2000. Powering an Inorganic Nanodevice with a Biomolecular Motor. *Science*, 290(5496), S.1555 -1558.
- Sorgen, P.L., Bubb, M.R. & Cain, Brian D., 1999. Lengthening the Second Stalk of F1F0 ATP Synthase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), S.36261 -36266.
- Sorgen, P.L. u. a., 1998. Deletions in the Second Stalk of F1F0-ATP Synthase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), S.27873 -27878.
- Soubannier, V. u. a., 1999. The second stalk of the yeast ATP synthase complex: identification of subunits showing cross-links with known positions of subunit 4 (subunit b). *Biochemistry*, 38(45), S.15017-15024.
- Souza, M.O. u. a., 2004. High hydrostatic pressure perturbs the interactions between CF(0)F(1) subunits and induces a dual effect on activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(5), S.920-930.
- Spetea, C. & Schoefs, B., 2010. Solute transporters in plant thylakoid membranes: Key players during photosynthesis and light stress. *Communicative & Integrative Biology*, 3(2), S.122-129.
- Stahlberg, H u. a., 2001. Bacterial Na(+)-ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Reports*, 2(3), S.229-233.
- Stahlberg, Henning, Engel, Andreas & Philippsen, A., 2002. Assessing the structure of membrane proteins: combining different methods gives the full picture. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 80(5), S.563-568.
- Stalz, W.-D. u. a., 2003. Direct interaction of subunits a and b of the F0 complex of *Escherichia coli* ATP synthase by forming an ab2 subcomplex. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(29), S.27068-27071.
- Standish, R.K., 2008. Concept and Definition of Complexity. *English*, 805, S.1-12.
- Steigmiller, S., Turina, Paola & Gräber, Peter, 2008. The thermodynamic H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATPsynthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), S.3745-3750.

- Stein, N., 2008. CHAINSAW : a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography*, 41, S.641-643.
- Steinberg-Yfrach, G. u. a., 1998. Light-driven production of ATP catalysed by F₀F₁-ATP synthase in an artificial photosynthetic membrane. *Nature*, 392(6675), S.479-482.
- Steinemann, D. & Lill, H, 1995. Sequence of the gamma-subunit of *Spirulina platensis*: a new principle of thiol modulation of F₀F₁ ATP synthase? *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1230(1-2), S.86-90.
- Sternweis, P.C. & Smith, J.B., 1980. Characterization of the inhibitory (.epsilon.) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 19(3), S.526-531.
- Stock, D., Leslie, A.G. & Walker, J.E., 2010. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science*, 286, S.1700-1705.
- Stock, Daniela u. a., 2000. The rotary mechanism of ATP synthase. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), S.672-679.
- Stocker, A. u. a., 2007. The structural basis for unidirectional rotation of thermoalkaliphilic F₁-ATPase. *Structure (London, England: 1993)*, 15(8), S.904-914.
- Strotmann, H., Hesse, H. & Edlmann, K., 1973. Quantitative determination of coupling factor CF₁ of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 314(2), S.202-210.
- Stumpp, M T, Motohashi, K & Hisabori, T, 1999. Chloroplast thioredoxin mutants without active-site cysteines facilitate the reduction of the regulatory disulphide bridge on the gamma-subunit of chloroplast ATP synthase. *The Biochemical Journal*, 341 (Pt 1), S.157-163.
- Sugiyama, K. & Hisabori, Toru, 2003. Conformational change of the chloroplast ATP synthase on the enzyme activation process detected by the trypsin sensitivity of the gamma subunit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), S.311-316.
- Suhai, T. u. a., 2008. Remarkable stability of the proton translocating F₁F₀-ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1778(4), S.1131-1140.
- Sunamura, E.-I. u. a., 2010. Physiological impact of intrinsic ADP inhibition of cyanobacterial FoF₁ conferred by the inherent sequence inserted into the gammasubunit. *Plant & Cell Physiology*, 51(6), S.855-865.
- Suzuki, Toshiharu u. a., 2003. F₀F₁-ATPase/Synthase Is Geared to the Synthesis Mode by Conformational Rearrangement of ϵ Subunit in Response to Proton Motive Force and ADP/ATP Balance. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), S.46840 -46846.
- Suzuki, Toshiharu u. a., 2002. F₀ of ATP Synthase Is a Rotary Proton Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), S.13281 -13285.
- Suzuki, Toshiharu u. a., 2011. Modulation of Nucleotide Specificity of Thermophilic FoF₁-ATP Synthase by ϵ -Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), S.16807 -16813.

- Suzuki, Toshiharu u. a., 2007. The product of *uncI* gene in F₁F_o-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), S.20776-20781.
- Takeyasu, K. u. a., 1996. Molecular imaging of Escherichia coli F₀F₁-ATPase in reconstituted membranes using atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 392(2), S.110-113.
- Takizawa, K., Kanazawa, Atsuko & Kramer, David M, 2008. Depletion of stromal P(i) induces high „energy-dependent“ antenna exciton quenching (q(E)) by decreasing proton conductivity at CF(O)-CF(1) ATP synthase. *Plant, Cell & Environment*, 31(2), S.235-243.
- Tanabe, M. u. a., 2001. Rotation of a Complex of the γ Subunit and c Ring of Escherichia coli ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), S.15269 -15274.
- Tang, C. & Capaldi, R A, 1996. Characterization of the interface between gamma and epsilon subunits of Escherichia coli F₁-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(6), S.3018-3024.
- Tang, C., Capaldi, R A & Watts, S.D., 1996. The stalk region of the Escherichia coli ATP synthase. Tyrosine 205 of the gamma subunit is in the interface between the F₁ and F₀ parts and can interact with both the epsilon and c oligomer. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45), S.28341-28347.
- Tatarintsev, N.P. & Mal'ian, A.N., 2006. [Covalent binding of 1,N(6)-ethenoadenosine diphosphate to catalytic and noncatalytic sites of chloroplast ATP-synthase]. *Biofizika*, 51(2), S.282-287.
- Thomas, D.R., Morgan, D.G. & DeRosier, D.J., 1999. Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), S.10134-10139.
- Tiburzy, H.J. & Berzborn, R J, 1997. Subunit II (b') and not subunit I (b) of photosynthetic ATP synthases is equivalent to subunit b of the ATP synthases from nonphotosynthetic eubacteria. Evidence for a new assignment of b-type F₀ subunits. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 52(11-12), S.789-798.
- Tiburzy, H.J. u. a., 1999. Heterologous overexpression of membrane-anchored subunit II of spinach chloroplast ATP synthase and its detergent-free purification as a soluble protein. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 54(3-4), S.230-238.
- Tikhonov, A N, Pogrebnaia, A.F. & Romanovskii, I.M., 2003. [Electrostatic interactions in catalytic centers of F₁-ATPase]. *Biofizika*, 48(6), S.1052-1070.
- Tomashek, J.J. & Brusilow, W.S., 2000. Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(5), S.493-500.
- Tosi, G. u. a., 2008. Crystallization of proteins on functionalized surfaces. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 64(10), S.1054-1061.
- Tsunoda, S P u. a., 2000. Observations of rotation within the F(o)F(1)-ATP synthase: deciding between rotation of the F(o)c subunit ring and artifact. *FEBS Letters*, 470(3), S.244-248.
- Tsunoda, S P u. a., 1999. Cross-linking of two beta subunits in the closed conformation in F₁-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9), S.5701-5706.

- Tsunoda, S P, Rodgers, A.J., u. a., 2001. Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), S.6560-6564.
- Tsunoda, Satoshi P., Aggeler, Robert, u. a., 2001. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F1Fo ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), S.898 -902.
- Tucker, W C, Du, Z., Hein, R., u. a., 2001. Role of the ATP synthase alpha-subunit in conferring sensitivity to tentoxin. *Biochemistry*, 40(25), S.7542-7548.
- Tucker, W C, Du, Z., Gromet-Elhanan, Z, u. a., 2001. Formation and properties of hybrid photosynthetic F1-ATPases. Demonstration of different structural requirements for stimulation and inhibition by tentoxin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(7), S.2179-2186.
- Tucker, W C u. a., 2000. Hybrid *Rhodospirillum rubrum* F(0)F(1) ATP synthases containing spinach chloroplast F(1) beta or alpha and beta subunits reveal the essential role of the alpha subunit in ATP synthesis and tentoxin sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(2), S.906-912.
- Turina, Paola, Samoray, D. & Gräber, Peter, 2003. H⁺/ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF0F1-liposomes. *The EMBO Journal*, 22(3), S.418-426.
- Ubarretxena-Belandia, I. & Stokes, D.L., 2010. Present and future of membrane protein structure determination by electron crystallography. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 81, S.33-60.
- Ueno, H. u. a., 2005. ATP-driven stepwise rotation of FoF1-ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), S.1333 -1338.
- Ueoka-Nakanishi, H. u. a., 2004. Inverse regulation of rotation of F1-ATPase by the mutation at the regulatory region on the gamma subunit of chloroplast ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16), S.16272-16277.
- Uhlin, U, Cox, G B & Guss, J M, 1997. Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure (London, England: 1993)*, 5(9), S.1219-1230.
- Uhlin, Ulla, Cox, Graeme B & Guss, J Mitchell, 1997. Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure*, 5(9), S.1219-1230.
- Valiyaveetil, F.I. & Fillingame, Robert H., 1998. Transmembrane Topography of Subunit a in the *Escherichia coli* F1F0 ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), S.16241 - 16247.
- Varco-Merth, B. u. a., 2008. Crystallization of the c14-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1777(7-8), S.605-612.
- Vellieux, F.M. & Read, R J, 1997. Noncrystallographic symmetry averaging in phase refinement and extension. *Methods in Enzymology*, 277, S.18-53.

- Velours, J u. a., 2000. Organisation of the yeast ATP synthase F(0):a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.443-456.
- Vershubskii, A.V. u. a., 2011. Functional and topological aspects of pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts in silico. *Bio Systems*, 103(2), S.164-179.
- Vershubskii, A.V., Priklonskiĭ, V.I. & Tikhonov, A N, 2001. [Electron and proton transport in chloroplasts taking into account lateral heterogeneity of thylakoids. Mathematical model]. *Biofizika*, 46(3), S.471-481.
- Vik, S B & Antonio, B.J., 1994. A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 269(48), S.30364 -30369.
- Vik, S B u. a., 2000. A model for the structure of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1458(2-3), S.457-466.
- Vik, Steven B & Ishmukhametov, R.R., 2005. Structure and function of subunit a of the ATP synthase of Escherichia coli. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6), S.445-449.
- Vollmar, M. u. a., 2009. Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(27), S.18228-18235.
- Vonck, J. u. a., 2002. Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na⁺-ATP synthase. *Journal of Molecular Biology*, 321(2), S.307-316.
- Wächter, A. u. a., 2011. Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), S.3924-3929.
- Wada, Takaaki u. a., 1999. A Novel Labeling Approach Supports the Five-transmembrane Model of Subunit a of the Escherichia coli ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), S.17353 -17357.
- Wadsten, P. u. a., 2006. Lipidic sponge phase crystallization of membrane proteins. *Journal of Molecular Biology*, 364(1), S.44-53.
- Wakabayashi, T. u. a., 1977. Structure of ATPase (coupling factor TF1) from a thermophilic bacterium. *Journal of Molecular Biology*, 117(2), S.515-519.
- Walker, J E u. a., 1985. Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 184(4), S.677-701.
- Walker, John E, 1998. ATP Synthesis by Rotary Catalysis (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 37(17), S.2308-2319.
- Van Walraven, H S u. a., 1996. The H⁺/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. *FEBS Letters*, 379(3), S.309-313.
- Van Walraven, Hendrika S, Scholts, M.J.C., Lill, Holger, u. a., 2002. Introduction of a carboxyl group in the loop of the F0 c-subunit affects the H⁺/ATP coupling ratio of the ATP synthase from Synechocystis 6803. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34(6), S.445-454.

- Van Walraven, Hendrika S, Scholts, M.J.C., Zakharov, S.D., u. a., 2002. pH-dependent Ca²⁺ binding to the F₀ c-subunit affects proton translocation of the ATP synthase from *Synechocystis* 6803. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34(6), S.455-464.
- Watanabe, R., Iino, R. & Noji, Hiroyuki, 2010. Phosphate release in F₁-ATPase catalytic cycle follows ADP release. *Nature Chemical Biology*, 6(11), S.814-820.
- Watanabe, R. u. a., 2008. Temperature-sensitive reaction intermediate of F₁-ATPase. *EMBO Reports*, 9(1), S.84-90.
- Watt, I.N. u. a., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), S.16823 -16827.
- Watts, S.D. & Capaldi, R A, 1997. Interactions between the F₁ and F₀ parts in the *Escherichia coli* ATP synthase. Associations involving the loop region of C subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24), S.15065-15068.
- Weber, J u. a., 1993. Specific placement of tryptophan in the catalytic sites of *Escherichia coli* F₁-ATPase provides a direct probe of nucleotide binding: maximal ATP hydrolysis occurs with three sites occupied. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(27), S.20126-20133.
- Weinreich, F., Capaldi, Roderick A & Aggeler, Robert, 1995. Arrangement of the epsilon subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase from the reactivity of cysteine residues introduced at different positions in this subunit. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1230(1-2), S.62-8.
- Weisbeek, P. u. a., 1989. Import of proteins into the chloroplast lumen. *Journal of Cell Science. Supplement*, 11, S.199-223.
- Werkö, 1994. Scientific fraud. Disagreement about definition of the concept. *Lakartidningen*, 91(9), S.856-858.
- Werner-Grüne, S. u. a., 1994. Insertion of a „chloroplast-like“ regulatory segment responsible for thiol modulation into gamma-subunit of F₀F₁-ATPase of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 by mutagenesis of atpC. *Molecular & General Genetics: MGG*, 244(2), S.144-150.
- Wetzel, C.M. & McCarty, R. E., 1993a. Aspects of Subunit Interactions in the Chloroplast ATP Synthase (I. Isolation of a Chloroplast Coupling Factor 1-Subunit III Complex from Spinach Thylakoids). *Plant Physiology*, 102(1), S.241-249.
- Wetzel, C.M. & McCarty, R. E., 1993b. Aspects of Subunit Interactions in the Chloroplast ATP Synthase (II. Characterization of a Chloroplast Coupling Factor 1-Subunit III Complex from Spinach Thylakoids). *Plant Physiology*, 102(1), S.251-259.
- Wiedenmann, A., Dimroth, Peter & von Ballmoos, C., 2008. Deltapsi and DeltapH are equivalent driving forces for proton transport through isolated F(0) complexes of ATP synthases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1777(10), S.1301-1310.
- Wiedenmann, A., Dimroth, Peter & Von Ballmoos, C., 2009. Functional asymmetry of the F₀ motor in bacterial ATP synthases. *Molecular Microbiology*, 72(2), S.479-490.
- Wiener, M.C., 2004. A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods*, 34(3), S.364-372.
- Wilkens, S u. a., 1997. Solution structure of the N-terminal domain of the delta subunit of the *E. coli* ATPsynthase. *Nature Structural Biology*, 4(3), S.198-201.

- Wilkins, S u. a., 2000. Localization of the delta subunit in the Escherichia coli F(1)F(0)-ATP synthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F(1). *Journal of Molecular Biology*, 295(3), S.387-391.
- Wilkins, Stephan & Capaldi, Roderick A., 1998a. ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature*, 393(6680), S.29.
- Wilkins, Stephan & Capaldi, Roderick A., 1998b. Solution Structure of the ϵ Subunit of the F1-ATPase from Escherichia coli and Interactions of This Subunit with β Subunits in the Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), S.26645 -26651.
- Wöhri, A.B. u. a., 2008. A Lipidic-Sponge Phase Screen for Membrane Protein Crystallization. *Structure*, 16(7), S.1003-1009.
- Wöhri, A.B. u. a., 2009. Lipidic sponge phase crystal structure of a photosynthetic reaction center reveals lipids on the protein surface. *Biochemistry*, 48(41), S.9831-9838.
- Wu, G. & Ort, D.R., 2008. Mutation in the cysteine bridge domain of the gamma-subunit affects light regulation of the ATP synthase but not photosynthesis or growth in Arabidopsis. *Photosynthesis Research*, 97(2), S.185-193.
- Wu, G. u. a., 2007. A point mutation in atpC1 raises the redox potential of the Arabidopsis chloroplast ATP synthase gamma-subunit regulatory disulfide above the range of thioredoxin modulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(51), S.36782-36789.
- Xing, J. u. a., 2004. Torque Generation by the Fo motor of the Sodium ATPase. *Biophysical Journal*, 87(4), S.2148-2163.
- Yaghmur, A., Sartori, B. & Rappolt, M., 2011. The role of calcium in membrane condensation and spontaneous curvature variations in model lipidic systems. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 13(8), S.3115-3125.
- Yagi, H u. a., 1999. Functional conformation changes in the TF(1)-ATPase beta subunit probed by 12 tyrosine residues. *Biophysical Journal*, 77(4), S.2175-2183.
- Yagi, Hiromasa u. a., 2007. Structures of the thermophilic F1-ATPase epsilon subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), S.11233-11238.
- Yagi, Hiromasa u. a., 2010. Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit epsilon of F1-ATPase from photosynthetic organisms. *The Biochemical Journal*, 425(1), S.85-94.
- Yamori, W. u. a., 2011. The roles of ATP synthase and the cytochrome b6/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiology*, 155(2), S.956-962.
- Yasuda, R u. a., 1998. F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell*, 93(7), S.1117-1124.
- Yasuda, R u. a., 2001. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature*, 410(6831), S.898-904.
- Yoshida, M, Muneyuki, E & Hisabori, T, 2001. ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(9), S.669-677.

- Yoshida, M u. a., 1975. A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. Purification, properties, and reconstitution. *Journal of Biological Chemistry*, 250(19), S.7910-7916.
- Yoshida, Masasuke, Muneyuki, Eiro & Hisabori, Toru, 2001. ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(9), S.669-677.
- Zeng, X. u. a., 2005. Effects of site-directed mutation on the function of the chloroplast ATP synthase epsilon subunit. *Photosynthesis Research*, 83(3), S.307-315.
- Zhang, S., Letham, D.D. & Jagendorf, A. T., 1993. Inhibition of Thylakoid ATPase by Venturicidin as an Indicator of CF1-CF0 Interaction. *Plant Physiology*, 101(1), S.127-133.
- Zhou, Yuantai, Duncan, Thomas M. & Cross, Richard L., 1997. Subunit rotation in Escherichia coli FoF1-ATP synthase during oxidative phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), S.10583-10587.
- Zhu, 2007. Extraction of lipids from samples. *Bioresource Technology*, 3(1), S.3-5.
- Zimmermann, J.L. u. a., 2000. The role of the Mg²⁺ cation in ATPsynthase studied by electron paramagnetic resonance using VO₂⁺ and Mn²⁺ paramagnetic probes. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 56A(2), S.285-299.
- Zoleo, A. u. a., 2004. High-affinity metal-binding site in beef heart mitochondrial F1ATPase: an EPR spectroscopy study. *Biochemistry*, 43(41), S.13214-13224.
- Zwart, P H, Grosse-Kunstleve, R W & Adams, P D, 2005. Xtriage and Fest: automatic assessment of X-ray data and substructure structure factor estimation. *CCP4 Newsletter Winter*, Winter, S.Contribution 7.
- Zwart, Peter H. u. a., 2008. Surprises and pitfalls arising from (pseudo)symmetry. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 64(Pt 1), S.99-107.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Georg Groth, Abteilung für Biochemische Pflanzenphysiologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, dass ich an diesem sehr interessanten und herausfordernden Projekt arbeiten durfte.

Ich danke Herrn Professor Dr. Lutz Schmitt, Institut für Biochemie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, für die Übernahme des Koreferates und für die positiven Anreize bei den jährlichen Treffen.

Ich danke Herrn Dr. Thomas C. Terwilliger, Los Alamos National Laboratory, USA, für die Hilfe bei der Analyse und Auswertung des Datensatzes.

Ich bedanke mich bei allen momentanen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Biochemische Pflanzenphysiologie für das angenehme und oftmals lustige Arbeitsklima.

Ich danke Herrn Dr. Jakub Gruszczyk für seine Hilfe an der beamline.

Ich danke meinem Bruder, Raul Alexander, für seine Hilfsbereitschaft bei computertechnischen Fragen und seiner Freundin, Sabrina Bennegger, für das Lesen und Korrigieren dieser Arbeit.

Ich danke meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung während der letzten drei Jahre und dafür, dass Sie mir das Studieren ermöglicht haben.

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Angaben, die veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche gekennzeichnet.

Mariana Grieben

Mülheim an der Ruhr, im November 2011