# Strukturuntersuchungen an der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase aus *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Claudia Schnick

aus Salzkotten

Düsseldorf

2002

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

Referent: Prof. Dr. Heinrich Strotmann Korreferent: Priv. Doz. Dr. Georg Groth Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2003

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitı	ung	1
	1.1 Über	1	
1.2 Der protonentranslozierende F <sub>0</sub> -Komplex			3
	1.2.1	Untereinheit a	3
	1.2.2	Untereinheit b	4
	1.2.3	Untereinheit c	5
	1.2.4	Modelle des Proteolipidringes	8
	1.2.5	Mechanismus der Protonentranslokation	12
	1.3 Der	katalytische F <sub>1</sub> -Komplex	13
	1.3.1	Das $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer	13
	1.3.2	Untereinheiten $\gamma$ und $\epsilon$	16
	1.3.3	Untereinheit δ	18
	1.3.4	Katalytische Reaktionsmechanismen	18
	1.4 Ziels	setzung	20
2 Material und Methoden 21			21
2.1 Molekularbiologische Methoden 2		21	
	2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	21
	2.1.2	Nährmedien zur Anzucht von E. coli	22
	2.1.3	Herstellung Transformations-kompetenter E. coli Zellen	24
	2.1.4	Transformation von E. coli	25
	2.1.5	Isolierung von Plasmid DNA	26
	2.1.6	DNA Fällung mit Ethanol	27
	2.1.7	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA	27
	2.1.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
	2.1.9	Auftrennung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese	28
	2.1.10	Alkalische Phosphatase Behandlung	29
	2.1.11	Ligation	29
	2.1.12	Tryptophan-Substitutionsmutagenese	30
	2.1.13	Mutationen im Bereich der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit	32
	2.2 Bioc	hemische Methoden	34
	2.2.1	Isolierung invertierter Membranvesikel	34
	2.2.2	Proteinbestimmung	34

Ι

	2.2.3	ATPase Aktivitätsmessungen	35
	2.2.	3.1 Wachstum auf Succinat-/Minimalmedium	35
	2.2.	3.2 Nachweis der Protonentranslokation	36
	2.2.	3.3 ATP-Hydrolysemessungen	37
	2.2.	3.4 ATP Synthesemessungen	38
	2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
	2.2.5	Silberfärbung von Proteingelen	41
	2.2.6	Westernblot Analyse	42
	2.2.7	Reinigung der ATPase über Dichtegradientenzentrifugation	44
	2.2.8	Reinigung der ATPase über Metallchelatchromatographie	45
	2.2.9	Gelfiltrationschromatographie	47
	2.2.10	Kristallisationsansätze	48
3 ]	Ergebn	isse	50
3	8.1 India	rekte Strukturanalyse: Mutagenesestudien am Proteolipid	50
	3.1.1	Prinzip der Tryptophan-Substitutionsmutagenese	50
	3.1.2	Immunologischer Nachweis der Untereinheit c	52
	3.1.3	Wachstum der Tryptophanmutanten auf Minimalmedium	53
	3.1.4	Auswirkung der Tryptophanmutationen auf die Protonentranslokation	54
	3.1.5	Auswirkung der Tryptophanmutationen auf die ATP-Hydrolyse	56
	3.1.6	Übertragung der Ergebnisse auf die Struktur des c-Monomers	57
3	3.2 Dire	kte Strukturanalyse: Kristallisation des EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	61
	3.2.1	Reinigung des $EF_0F_1$ über Dichtegradientenzentrifugation	61
	3.2.2	Reinigung des $EF_0F_1$ über Metallchelatchromatographie	63
	3.2.3	Gelfiltrationschromatographie des gereinigten EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Komplexes	66
	3.2.4	Optimierung der Reinigung des EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	67
	3.2.5	Überprüfung der Aktivität des gereinigten EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Komplexes	69
	3.2.6	Kristallisationsansätze mit gereinigtem EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	70
	3.2.7	Kristallisationsansätze von $EF_0F_1$ komplexiert mit Inhibitoren	72
3	8.3 Mod	lifikation der EF <sub>1</sub> -Struktur	76
	3.3.1	Sequenzvergleich tentoxinresistenter und -sensitiver Spezies	76
	3.3.2	Aktivität der $EF_0F_1$ -Mutanten $\alpha$ Q49A, $\alpha$ L95A/E96Q, $\alpha$ I273M und	
		βG58S/S59A/S60T	78
	3.3.3	Überlagerung der CF <sub>1</sub> /TTX -Struktur mit einem <i>E. coli</i> Homologiemodell	80
	3.3.4	Effekt des Austauschs αL64A	81
	3.3.5	Kombination der Mutationen der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit	82

	3.3.6	Reaktivierung der ATP-Hydrolyse bei hohen Tentoxinkonzentrationen	84
	3.3.7	Bestimmung der K <sub>I</sub> -Werte	85
	3.3.8	Einfluss von Tentoxin auf die $K_M$ - und $v_{max}$ -Werte	86
	3.3.9	Einfluss der Substitutionen auf die ATP-Synthese	87
	3.3.10	Einfluss der Modifikationen auf die Protonentranslokation	89
4 I	Diskus	sion	92
4	.1 Indir	ekte Strukturuntersuchungen am c-Oligomer	92
	4.1.1	Einfluss der Tryptophansubstitutionen auf die Aktivität der ATPase	94
	4.1.2	Einfluss von Seitenkettenvolumen, Hydrophobizität und Konformation au	uf die
		Aktivität der Tryptophanmutanten	97
	4.1.3	Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit molekularen Strukturmode	llen
		des c-Oligomers	98
	4.1.4	Verifikation des "N-außen"-Modells: Vergleich mit Literaturdaten	101
	4.1.5	Kristallstrukturen des c-Oligomers aus Hefe und Ilyobacter tartaricus	104
	4.1.6	Stöchiometrie des c-Oligomers	106
4	.2 Rein	igung des EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Komplexes und Kristallisationsexperimente	107
	4.2.1	Reinigung eines homogenen, intakten ATPase Komplexes	107
	4.2.2	Kristallisationsexperimente	109
	4.2.3	Weitere Überlegungen zur Kristallisation des EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Komplexes	111
4	.3 Gezi	elte Modifikationen des EF1-Komplexes zur Tentoxinbindung	112
	4.3.1	Grundlagen für die Modifikationen des EF <sub>1</sub> -Komplexes	112
	4.3.2	Tentoxinsensitivität nach Austausch einzelner Aminosäurereste	115
	4.3.3	Steigerung der Tentoxinsensitivität durch kombinierte Substitutionen	117
	4.3.4	Charakterisierung der tentoxinsensitiven EF1-Mutanten	118
	4.3.	4.1 Einfluss der Substitutionen auf die K <sub>I</sub> -Werte	118
	4.3.	4.2 Einfluss des Tentoxin auf $K_{M}$ - und $v_{max}$ -Werte der Mutanten	119
	4.3.	4.3 ATP-Synthese und Protonentranslokation	120
	4.3.	4.4 Reaktivierung der ATP-Hydrolyse	122
	4.3.5	Rückschlüsse auf die strukturellen Zusammenhänge	122
5 2	Zusami	menfassung	124
6 I	Literatu	arverzeichnis	125

# Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
А	Ampère
Abb.	Abbildung
ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AFM	Atomic Force Microscopy
AMP-PNP	5'-Adenylyl-imidodiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -Subkomplex der chloroplastidären ATPase
CFo	F <sub>0</sub> -Subkomplex der chloroplastidären ATPase
Cip	"calf intestinal phosphatase"
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
dNTP	2-Desoxyribonucleosidtriphosphat
Dodecylmaltosid	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DTT	1-4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$\mathrm{EF}_1$	<i>Escherichia coli</i> F <sub>1</sub> -Subkomplex der ATPase
EFo	Escherichia coli F <sub>0</sub> -Subkomplex der ATPase
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
g <sub>max</sub>	maximales Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IMAC	immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie
1	Liter
М	molar
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Octylglucosid	Octyl- B-D-glucopyranosid
p.a.	pro analysi
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid

S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
TF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> der thermophilen ATPase aus <i>Bacillus</i> PS3
TID	3-Trifluoromethyl-m-(iodophenyl)diazurin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tentoxin
U	Enzymeinheit (µmol Substrat/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen

# Aminosäuren

А	Alanin	М	Methionin
С	Cystein	Ν	Asparagin
D	Aspartat	Р	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
Н	Histidin	Т	Threonin
Ι	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

# 1 Einleitung

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase ist ein Schlüsselenzym im Stoffwechsel von Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und Tieren. Sie katalysiert die Bildung von Adenosintriphosphat, dem universellen Energieträger lebender Zellen. Die Energie für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat wird durch die Atmung oder die Photosynthese erzeugt. Die katalytische Reaktion wird dabei durch einen transmembranen elektrochemischen Gradienten von Protonen oder, bei einigen Bakterien, Natrium-Ionen angetrieben. In umgekehrter Reaktion kann das Enzym ATP hydrolysieren. Diese Reaktion wird im bakteriellen System genutzt, um Protonen über die Membran zu pumpen und über den Protonengradienten Metaboliten in die Zelle zu schleusen.

# 1.1 Übersicht über den Aufbau der ATP-Synthase

ATP-Synthasen sind in Bakterien in der Plasmamembran lokalisiert, während sie in höheren Organismen in der inneren Membran der Mitochondrien und in der Thylakoidmembran der Chloroplasten zu finden sind. Sowohl die komplexe Struktur als auch die Wirkungsweise der ATP-Synthasen ist innerhalb dieser evolutionär weit entfernten Organismen hochkonserviert. Neben Unterschieden in der Primärstruktur stimmen die Strukturmerkmale auf der Ebene der Tertiär- und Quartärstruktur soweit überein, dass es möglich ist, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe mit Untereinheiten aus verschiedenen Organismen zu erzeugen. So sind chimäre Konstrukte mit Untereinheiten der ATP-Synthase aus Spinat-Chloroplasten oder Cyanobakterien in Kombination mit Untereinheiten des E. coli Enzyms funktionell (Lill et al., 1993). Diese Homologie in Aufbau und Wirkungsweise macht es möglich, Daten der unterschiedlichen Organismen zu einem allgemein gültigen Modell der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase zusammenzufassen. Die E. coli ATP-Synthase kann als Grundmodell stellvertretend für alle F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPasen dienen, denn sie ist im Vergleich zu anderen ATPasen, die zusätzliche Untereinheiten aufweisen, aus einer minimalen Anzahl an Untereinheiten zusammengesetzt. Daher soll im Folgenden der Aufbau der E. coli ATP-Synthase diskutiert werden.



Abbildung 1.1-1: Modell der E. coli ATP-Synthase

Der hydrophile  $F_1$ -Komplex setzt sich aus den Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$  zusammen. Die Untereinheiten ab<sub>2</sub>c<sub>9-12</sub> bilden den membranständigen  $F_0$ -Bereich.

Die E. coli ATP-Synthase (oder ATPase) besteht aus acht verschiedenen Untereinheiten in einer Stöchiometrie von  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{9-12}$  (siehe Abbildung 1.1-1), die sich in zwei strukturell und funktionell verschiedene Komplexe F<sub>1</sub> und F<sub>0</sub> unterteilen lassen. Der peripher angeordnete hydrophile F<sub>1</sub>-Bereich trägt die katalytischen Bindungsstellen für die ATP-Synthese bzw. Hydrolyse. Sie besteht aus den Untereinheiten  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ , die in der Reihenfolge ihrer Größe benannt wurden. Die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sind alternierend als Hexagon angeordnet, in dessen Zentrum die  $\alpha$ -Helices der Untereinheit  $\gamma$  hineinragen (Abrahams et al., 1994). Die β-Untereinheiten tragen die katalytischen Bindungsstellen, die nach der "binding change" Hypothese nacheinander verschiedene Konformationszustände mit unterschiedlicher Substrataffinität durchlaufen können (Boyer, 1989). Es wird angenommen, dass eine Rotation von  $\gamma$  relativ zum  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer diese Konformationsänderungen bewirkt, ähnlich wie Kurbelwelle und Kolben in einem Motor. Diese Hypothese wird durch den Nachweis der Rotation der y-Untereinheit und der angrenzenden  $\varepsilon$ -Untereinheit im F<sub>1</sub>-Komplex gestützt (Noji et al., 1997; Sabbert et al., 1997; Bulygin et al., 1998; Kato-Yamada et al., 1998; Yasuda et al., 1998). Die Untereinheiten  $\gamma$  und  $\varepsilon$  bilden eine Art zentralen Stiel, der bereits im Elektronenmikroskop als Verbindung der katalytischen F<sub>1</sub>-Region mit dem membranständigen F<sub>0</sub>-Bereich beobachtet wurde (Gogol et al., 1987). Die Rotationsbewegung von  $\gamma$  und  $\varepsilon$  relativ zum statischen  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer macht eine weitere Verbindung zwischen dem F<sub>1</sub>- und F<sub>0</sub>-Bereich erforderlich, die den Gesamtkomplex stabilisiert. ebenfalls Dieser zweite Stiel wurde

elektronenmikroskopisch identifiziert (Wilkens & Capaldi, 1998). Die Verbindung wird durch die Untereinheit  $\delta$ , die peripher an der  $\alpha$ -Untereinheit lokalisiert ist (Wilkens et al., 2000), mit den beiden b-Untereinheiten erreicht (Rodgers & Capaldi, 1998). Die N-terminalen Helices der b-Untereinheiten sind in der Membran verankert und stehen mit Untereinheit a in Wechselwirkung (Dmitriev et al., 1999a; McLachlin et al., 2000). Die protonentranslozierende Eigenschaft der hauptsächlich hydrophoben F<sub>0</sub>-Region ist auf die Untereinheiten a und c zurückzuführen. Es gibt Modelle, die eine Drehbewegung des ringförmigen c-Oligomers an Untereinheit a vorbei beschreiben, wobei die c-Monomere nacheinander protoniert und nach einer vollständigen Umdrehung wieder deprotoniert werden. Die Be- und Entladung mit Protonen erfolgt möglicherweise über zwei nichtlineare Halbkanäle in Untereinheit a, von denen der eine von der cytoplasmatischen Seite und der andere von der periplasmatischen Seite her zugänglich ist (Vik & Antonio, 1994; Junge et al., 1997).

# **1.2 Der protonentranslozierende Fo-Komplex**

Eine hochaufgelöste Kristallstruktur des kompletten  $F_0$ -Bereiches von *E. coli*, die Klarheit über den Aufbau, den Mechanismus der Protonentranslokation und die Wechselwirkungen zwischen den drei Untereinheiten a, b und c geben könnte, ist bisher noch nicht vorhanden. Dennoch gibt es zahlreiche biochemische und genetische Experimente, mit denen sich Teilbereiche des membranständigen Subkomplexes charakterisieren lassen. Weiterhin liegen NMR-Strukturdaten der Untereinheiten b und c vor, aus denen Modelle über die Anordnung der Untereinheiten in der Membran hervorgehen. Die bisher bekannten Strukturmerkmale der Untereinheiten a, b und c sollen im Folgenden erläutert werden

# 1.2.1 Untereinheit a

Die stark hydrophobe Untereinheit a ist mit einem Molekulargewicht von 30,3 kDa die größte Untereinheit des  $F_0$ ; strukturell ist sie bisher aber am wenigsten aufgeklärt. Dennoch konnte über Oberflächenmarkierung von eingeführten Cysteinen die Anzahl der transmembranen Helices und die Ausrichtung der Termini bestimmt werden (Valiyaveetil & Fillingame, 1998; Wada et al., 1999). Es wurden fünf membrandurchspannende Domänen identifiziert, wobei der N-Terminus der Untereinheit im Periplasma und der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert ist. Zahlreiche Mutagenesestudien zeigen die Bedeutung der Untereinheit a für die Protonentranslokation. In diesen Experimenten wurde der Rest aR210 als essentiell identifiziert. Dieser Rest ist in allen bisher bekannten Sequenzen hochkonserviert und jeder Austausch führte zum Funktionsverlust des Enzyms (Cain & Simoni, 1989; Eya et al., 1991). Der Rest aR210 bildet möglicherweise vorübergehend eine Salzbrücke mit dem Rest D61 in Untereinheit c aus (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996). Ein Kontakt zwischen dem c-Oligomer und der transmembranen Helix 4 der Untereinheit a, die den Rest R210 trägt, ist ebenfalls in Quervernetzungsexperimenten nachgewiesen worden (Fillingame et al., 1998). Die Anordnung der fünf Helices in der Membran sowie die Identifizierung der postulierten Halbkanäle für die Protonentranslokation bleibt aber weiterhin spekulativ. Mutagenesestudien geben allerdings Hinweise darauf, dass der Halbkanal zur periplasmatischen Seite von den Resten aH245 und aE219 begrenzt wird und an der cytoplasmatischen Seite des anderen Halbkanals der konservierte Rest aE196 lokalisiert ist (Vik et al., 1998).

# 1.2.2 Untereinheit b

Die Untereinheit b ist ein zum größten Teil  $\alpha$ -helicales Polypeptid von 17,3 kDa und über ein hydrophobes Segment am N-Terminus in der Membran verankert. Diese transmembrane Region interagiert mit den Untereinheiten a und c (Kumamoto & Simoni, 1986; Jones et al., 2000). Der Rest der Untereinheit b ist zum größten Teil hydrophil. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Untereinheit b als schmale Struktur etwa 110 Å aus der Membran herausragt und so eine Verbindung mit dem oberen Bereich des F<sub>1</sub>-Komplexes herstellt (Wilkens & Capaldi, 1998), wo sie Kontakte zu den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  ausbildet (Ogilvie et al., 1998; McLachlin et al., 2000). Die Untereinheit b liegt im EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex als Dimer vor, was durch Quervernetzungen nachgewiesen wurde. Diese zeigten keinen Effekt auf die ATPase Aktivität (Rodgers et al., 1997; Rodgers & Capaldi, 1998). Zudem führte die Expression des cytoplasmatischen Bereiches der Untereinheit b zur Bildung eines löslichen Dimers (Dunn, 1992).

Mittlerweile liegt eine NMR-Struktur der ersten 34 Aminosäurereste des N-Terminus von b in einem Chloroform/Methanol/Wasser Gemisch vor, das membranähnliche Bedingungen simulieren soll (Dmitriev et al., 1999a). Aus den Daten ergibt sich eine  $\alpha$ -helicale Struktur, die im Bereich der Reste 23-26 durch einen starren Knick unterbrochen ist, so dass sich ein Winkel von 20° ergibt (siehe Abbildung 1.2-1). Die Richtungsänderung, die durch den Knick hervorgerufen wird, könnte dazu dienen, den cytoplasmatischen Bereich in eine senkrechte Position zur Membran zu bringen, um so die Dimerisierung von zwei b-Untereinheiten zu erleichtern (Dmitriev et al., 1999a).



# Abbildung 1.2-1: NMR-Struktur des N-terminalen Bereichs der Untereinheit b in Chloroform/Methanol/Wasser (4:4:1)

Dargestellt ist die  $\alpha$ -helicale Struktur der membranständigen N-terminalen Aminosäurereste. Ein Knick im Bereich der Reste 23-26 ruft eine Richtungsänderung der  $\alpha$ -Helix hervor. PDB-Eintrag 1B9U, grafische Darstellung mit RASMOL (Sayle & Milner-White, 1995).

Untereinheit b ist essentiell für die Stabilisierung der Verbindung des  $F_0$ - mit dem  $F_1$ -Komplex. Im Modell einer "elastischen" ATPase (Cherepanov et al., 1999; Junge, 1999) wird der Untereinheit b aber auch eine hohe Flexibilität zugeschrieben. Durch elastische Verformung könnte sie während der Katalyse vorübergehend Energie aufnehmen, die durch die Erzeugung eines Drehmoments aufgrund der Rotationsbewegungen innerhalb des Komplexes hervorgerufen wird.

# 1.2.3 Untereinheit c

Die membranintegrale Untereinheit c ist mit 8,3 kDa die kleinste Untereinheit der ATPase und wird wegen ihrer stark hydrophoben Eigenschaft auch als Proteolipid bezeichnet. Die NMR-Struktur des c-Monomers in einem membransimulierenden Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (Girvin et al., 1998) zeigt eine Haarnadelform aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die über eine hydrophile Schlaufe miteinander verbunden sind. Über diese Schlaufe werden Kontakte mit den beiden

 $F_1$ -Untereinheiten  $\varepsilon$  und  $\gamma$  gebildet (Watts et al., 1995; Hermolin et al., 1999). Die beiden Helices verlaufen von der Schlaufe ausgehend parallel, sind aber in Richtung der Termini in Winkeln von 15° und 30° gegeneinander leicht verdreht (siehe Abbildung 1.2-2). Eine Erhöhung des pH auf 8 ruft eine Konformationsänderung hervor. Eine NMR Analyse (Rastogi & Girvin, 1999) zeigt die C-terminale Helix um 140° um die eigene Achse gedreht (siehe Abbildung 1.2-2). Diese Konformation entspricht dem deprotonierten Zustand des für die Protonentranslokation essentiellen Restes cD61. Dagegen stellt die zuerst beschriebene Struktur den protonierten Zustand des cD61 bei pH 5 dar.



# Abbildung 1.2-2: NMR-Strukturen der c-Monomere in Chloroform/Methanol/Wasser (4:4:1) bei pH 5 und pH 8

Dargestellt ist die Haarnadelstruktur der Untereinheit c, in der zwei transmembrane  $\alpha$ -Helices über eine polare Schlaufe miteinander verbunden sind. Der für die Protonentranslokation essentielle Rest cD61 ist als Kalottenmodell hervorgehoben. Zu beachten ist die Konformationsänderung der C-terminalen Helix bei pH 8 und die dadurch geänderte Ausrichtung des cD61. PDB-Eintrag 1A91 (pH 5) und 1C99 (pH 8).

Der konservierte Rest cD61, dem in vielen Modellen eine zentrale Rolle bei der Protonentranslokation zugerechnet wird (Rastogi & Girvin, 1999; Fillingame et al., 2000a), befindet sich in der Mitte der C-terminalen Helix in einer Art Hohlraum und ist umgeben von sperrigen und hydrophoben Resten. Die pH-abhängige Konformationsänderung lässt vermuten, dass während der Protonentranslokation die C-terminale Helix rotiert und so der Rest cD61 möglicherweise Zugang zu den hypothetischen Protonenhalbkanälen in Untereinheit a bekommt. Substitutionsversuche haben gezeigt, dass das Aspartat von Position 61 auf die gegenüberliegende Position 24 der N-terminalen Helix übertragen werden kann, wobei die Aktivität erhalten bleibt (Zhang & Fillingame, 1994). Die Struktur der Mutante cA24D/D61N wurde ebenfalls in einem Lösungsmittelgemisch durch NMR bestimmt, um die Orientierung des Aspartat in Position 24 zu überprüfen (Dmitriev et al., 2002). Die NMR-Struktur dieser Mutante bei pH 5 ist der Wildtypstruktur bei pH 8 sehr ähnlich, wobei die C-terminale Helix der Mutante um 150° abgewinkelt ist. Die N-terminale Helix ist so gedreht, dass die essentielle Carboxylgruppe des cD24 zur selben Seite des Moleküls orientiert ist wie die des cD61 im Wildtyp Monomer.

C-Monomere der Natrium-translozierenden ATPase aus Propiogenium modestum sind mittels NMR in SDS-Micellen (Matthey et al., 1999) und auch in dem gleichen Lösungsmittelgemisch analysiert worden, das für die E. coli Strukturen verwendet wurde (Matthey et al., 2002). Jedoch führte keine der Bedingungen zu einer stabilen Tertiärstruktur, und auch die Sekundärstrukturen wiesen Unterschiede auf. Die in SDS-Micellen analysierte Struktur zeigte vier kurze  $\alpha$ -Helices, von denen die mittleren beiden einer Lokalisation im Cytoplasma zugerechnet wurden. Im Lösungsmittelgemisch wurden dagegen nur zwei  $\alpha$ -helicale Segmente identifiziert, die aber im Unterschied zum E. coli Monomer keine stabile Haarnadelform ausbildeten. Nach der früheren NMR-Struktur wurde ein Modell entwickelt, das die Na<sup>+</sup>-bindenden Reste nahe der Membranoberfläche zeigt, SO dass die Bindungsstellen von der cytoplasmatischen Seite frei zugänglich sind (Dimroth, 2000). Dies stellt einen entscheidenden Unterschied zur Untereinheit c von E. coli dar, denn hier ist der protonentranslozierende Rest zu beiden Seiten der Membran abgeschirmt.

Obwohl eine hochaufgelöste Struktur über die Anordnung der c-Monomere in der Membran bislang fehlt, konnten aus den NMR-Strukturen verschiedene Modelle des c-Oligomers abgeleitet werden. Alle Modelle basieren auf einer ringähnlichen Anordnung des Proteolipids, die bereits in elektronenmikroskopischen und AFM-Aufnahmen identifiziert werden konnte (Birkenhäger et al., 1995; Singh et al., 1996; Takeyasu et al., 1996). Die Anzahl der c-Monomere im Proteolipidring wird für *E. coli* kontrovers diskutiert und scheint in verschiedenen Organismen nicht identisch zu sein. Eine AFM-Analyse von c-Oligomeren aus Chloroplasten zeigt einen Ring von 14 Monomeren (Seelert et al., 2000). Die Natrium-translozierende ATPase aus *Ilyobacter tartaricus* weist einen Ring aus 11 Monomeren auf, was ebenfalls über AFM und Cryo-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnte (Stahlberg et al., 2001). Eine niedrig aufgelöste Röntgenstruktur des mitochondrialen F<sub>1</sub>c-Komplexes aus Hefe zeigt ein c-Oligomer aus 10 Monomeren (Stock et al., 1999). Im Fall von *E. coli* wurde aufgrund von Markierungsstudien zunächst ein Ring aus 9 bis 12 c-Monomeren postuliert (Foster & Fillingame, 1982; von Meyenburg et al., 1982). Studien mit genetisch fusionierten c-Monomeren deuten auf eine Stöchiometrie von 12 Kopien hin (Jones & Fillingame, 1998). In aktuelleren Fusionsexperimenten wurde die Stöchiometrie bevorzugt mit 10 Monomeren angegeben, wobei sich allerdings auch Komplexe aus 8, 9, 11 und 12 Monomeren identifizieren ließen (Jiang et al., 2001). Eine solche Flexibilität in der Zusammensetzung des Proteolipidringes wird auch bei einer Änderung der Wachstumsbedingungen der Bakterien beobachtet (Schemidt et al., 1998).

# 1.2.4 Modelle des Proteolipidringes

Ein von Groth und Walker vorgeschlagenes Modell (Groth & Walker, 1997) ist auf der Grundlage einer früheren NMR Teilstruktur des c-Monomers (Girvin & Fillingame, 1995) entwickelt worden. Im Modell setzt sich der Proteolipidring aus 12 c-Monomeren zusammen, wobei die N-terminalen Helices nach außen zur Lipidschicht hin ausgerichtet sind (siehe Abbildung 1.2-3). Der innere Ring wird durch die C-terminalen Helices gebildet, die über starke hydrophobe Kontakte interagieren. Der innere Durchmesser des Ringes beträgt im unteren Bereich 32,6 Å und wird nach oben hin schmaler mit 27,9 Å. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Hohlraum entweder mit Phospholipiden oder durch einen Teil der  $\gamma$ -Untereinheit ausgefüllt wird, damit die semipermeablen Eigenschaften der inneren *E. coli* Membran aufrecht erhalten werden können.

Der für die Protonentranslokation wichtige Rest cD61 ist im inneren Ring lokalisiert, jedoch liegt die Carboxylgruppe in einer Tasche, die eine Zugänglichkeit von der Lipidphase aus ermöglicht ohne komplett exponiert zu sein. Dieses Modell steht zum großen Teil in Einklang mit verschiedenen experimentell ermittelten Daten, wie zum Beispiel die Markierungsexperimente mit dem lipophilen, photoreaktiven Agens TID, das Aufschluss über die Zugänglichkeit einzelner Reste gibt (Hoppe & Sebald, 1984). Eine Stöchiometrie von 12 Kopien wurde für dieses Modell ausgehend von Hinweisen über die Zusammensetzung des Chloroplasten Proteolipids gewählt (Fromme et al., 1987). Eine mögliche Anzahl von 10 Kopien pro Ring würde sich mit dem Modell jedoch auch in Einklang bringen lassen, wobei die vorausgesagten Kontakte zwischen benachbarten Monomeren dabei erhalten blieben.



#### Abbildung 1.2-3: Modell des c-Oligomers nach Groth und Walker (1997)

Das Modell basiert auf der NMR-Teilstruktur des c-Monomers (Girvin & Fillingame, 1995). Das Peptidrückgrat ist, vom  $F_1$ -Bereich aus gesehen, in Aufsicht dargestellt. Die N-terminalen Helices (grün) der 12 c-Monomere sind an der Peripherie des Ringes angeordnet, während die C-terminalen Helices (blau) ins Innere des Ringes orientiert sind. Das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom des für die Protonentranslokation essentiellen Restes cD61 ist rot markiert.

Ein weiteres Modell des Proteolipidringes wurde von Dmitriev, Jones und Fillingame vorgestellt (Dmitriev et al., 1999b). Als Grundlage für die Modellierung des Oligomers diente die vollständige NMR-Struktur des c-Monomers (Girvin et al., 1998). Weiterhin wurden Daten über Molekülabstände, die in Cystein-Quervernetzungsexperimenten ermittelt wurden, in die Berechnungen des Modells einbezogen (Jones et al., 1998). Auch für dieses Modell wurde eine bevorzugte Stöchiometrie von 12 Monomeren angenommen, die sich aus Experimenten mit genetisch fusionierten, funktionellen c-Dimeren und -Trimeren ableiten ließ (Jones & Fillingame, 1998). Im Unterschied zum Modell von Groth und Walker sind hier allerdings die C-terminalen Helices nach außen gerichtet, während die N-terminalen Helices sehr dicht gepackt im Inneren des Ringes angeordnet sind (siehe Abbildung 1.2-4). Der Zylinder hat einen äußeren Durchmesser von 55 bis 60 Å und bildet einen inneren Hohlraum von minimal 11 bis 12 Å. Die Orientierung der C-Termini

nach außen begründen die Autoren mit den Quervernetzungen, die über Cysteine in der C-terminalen Helix mit Untereinheit a erzielt wurden (Jiang & Fillingame, 1998) und mit der Annahme, dass Untereinheit a peripher zum Proteolipidring angeordnet ist, wie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen hervorgeht (Birkenhäger et al., 1995; Singh et al., 1996). In diesem Modell ist die Seitenkette des cD61 jeweils im Zentrum von vier transmembranen Helices zweier benachbarter c-Monomere lokalisiert. In dieser Position ist es abgeschirmt von der umgebenden Lipidschicht und damit auch von den möglichen Protonenhalbkanälen in Untereinheit a. Die Autoren gehen davon aus, dass während der Protonentranslokation eine Drehbewegung die C-terminale Helix in Kontakt zum essentiellen Rest aR210 bringt (Fillingame et al., 2000b).



Abbildung 1.2-4: Modell des c-Oligomers nach Dmitriev, Jones und Fillingame (1999) Das Modell basiert auf der vollständigen NMR-Struktur des c-Monomers (Girvin et al., 1998). Dargestellt ist das Peptidrückgrat in Aufsicht von der F₁-Seite aus. Die N-terminalen Helices (grün) der 12 c-Monomere sind im Ringinneren angeordnet, während die C-terminalen Helices (blau) das Ringäußere bilden. Der essentielle Rest cD61 ist jeweils im Zentrum von zwei benachbarten c-Monomeren lokalisiert. Zum besseren Überblick sind die Seitenketten der cD61 Reste als Kugel-Stab-Modell rot dargestellt. PDB-Eintrag 1J7F.

Ein drittes Modell für den Aufbau des c-Oligomers, das die strukturellen Änderungen des c-Monomers im deprotonierten Zustand berücksichtigt, wurde von Rastogi und Girvin vorgeschlagen (Rastogi & Girvin, 1999). Dieses Modell wurde auf der Grundlage der NMR-Strukturen der c-Monomere bei pH 5 und pH 8 berechnet und mit den experimentellen Daten aus Cystein Quervernetzungen kombiniert (Jones et al., 1998), die auch für das Modell von Dmitriev, Jones und Fillingame herangezogen wurden. Wie in den beiden oben beschriebenen Modellen wurde auch hier eine Stöchiometrie von 12 Kopien angenommen, allerdings mit einem Monomer im deprotonierten Zustand und den übrigen 11 im protonierten Zustand. In diesem Modell wurde ebenfalls eine Orientierung der C-terminalen Helices nach außen favorisiert, woraus sich eine Ringstruktur mit einem äußeren Durchmesser von 62 Å und einem inneren Durchmesser von 25 Å ergibt. Die C-terminalen Helices sind in diesem Modell weniger dicht gepackt als die N-terminalen Helices und erlauben so einen Zugang des abgeschirmten protonierten cD61 von der äußeren Seite des Ringes her. Das deprotonierte Monomer bildet mit der N-terminalen Helix dieselben intermolekularen Kontakte aus wie die protonierte Form, während die C-terminale Helix aufgrund ihrer gedrehten Form jedoch mit anderen Resten interagiert.



#### Abbildung 1.2-5: Modell des c-Oligomers nach Rastogi und Girvin (1999)

Für dieses Modell wurden 11 NMR-Strukturen des c-Monomers bei pH 5 und eine NMR-Struktur bei pH 8 herangezogen (Rastogi & Girvin, 1999), die dem protonierten bzw. deprotonierten Zustand des cD61 (Seitenkette rot dargestellt) entsprechen. Die N-terminalen Helices (grün) der c-Monomere bilden das Innere und die C-terminalen Helices (blau) das Äußere des Ringes. Untereinheit a, dargestellt durch vier Helices (gelb), ist peripher am Proteolipidring angeordnet. Die für die Protonentranslokation essentielle Seitenkette des aR210 ist als Kugel-Stab-Modell gezeigt. Zu beachten ist die geänderte Konformation des deprotonierten Restes cD61 und dessen Ausrichtung zum Rest aR210. PDB-Eintrag 1C17.

Nachdem die aktuelle NMR-Struktur des c-Monomers bei pH 8 eine deutliche Konformationsänderung im Vergleich zur Struktur bei pH 5 gezeigt hatte, war es von besonderem Interesse, daraus ein Modell zu entwickeln, das Aufschluss über die Vorgänge während der Protonentranslokation geben kann. Zu diesem Zweck wurde der modellierte Proteolipidring von Rastogi und Girvin mit einem Modell der Untereinheit a kombiniert. Da bisher noch keine NMR- oder Röntgen-Strukturdaten der Untereinheit a vorliegen, wurden auf der Grundlage der transmembranen Helixtopologie von Untereinheit a zunächst mehrere Modelle berechnet, die anschließend zur weiteren Eingrenzung einer möglichen Anordnung mit verschiedenen biochemischen Daten verglichen wurden (Yamada et al., 1996; Jäger et al., 1998; Valiyaveetil & Fillingame, 1998; Wada et al., 1999). Für ein ac<sub>12</sub>-Modell wurden weitere Daten über Kontaktstellen zwischen Untereinheit a und c hinzugezogen (Jiang & Fillingame, 1998). Der daraus resultierende theoretische ac<sub>12</sub>-Komplex (siehe Abbildung 1.2-5) zeigt ein Bündel aus vier Helices der Untereinheit a, das an der Peripherie des Proteolipidringes lokalisiert ist. Der essentielle Rest aR210 ist zwischen dem protonierten und dem deprotonierten Rest cD61 angeordnet, also innerhalb der postulierten Protonentranslokationsstelle.

# 1.2.5 Mechanismus der Protonentranslokation

Der genaue Mechanismus der Protonentranslokation und der Kopplung mit den katalytischen Vorgängen im F<sub>1</sub>-Bereich ist immer noch spekulativ. Eine Rotation der Untereinheiten  $\gamma$  und  $\varepsilon$  relativ zum Stator  $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$  konnte jedoch über die Verknüpfung mit einem Actinfilament direkt sichtbar gemacht werden (Noji et al., 1997; Kato-Yamada et al., 1998). Ebenso konnte eine Rotation des c-Ringes direkt nachgewiesen werden (Sambongi et al., 1999; Pänke et al., 2000). Allerdings wurden diese Experimente mit solubilisierten F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexen durchgeführt, wobei das Detergenz möglicherweise die strukturelle Integrität des Enzyms beeinflusst (Noji & Yoshida, 2001). Die Solubilisierung des F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes scheint außerdem eine Entkopplung von ATP-Hydrolyse und Protonentranslokation hervorzurufen. DCCD, ein Inhibitor der Protonentranslokation, hat keinen Einfluss auf die Rotation des Proteolipidringes und auch die ATP-Hydrolyse der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe bleibt ungehemmt (Tsunoda et al., 2000). In vielen Modellen zur Rotation wird angenommen, dass sich Untereinheit c an der fixierten Untereinheit a vorbeibewegt. Diese Theorie wird durch aktuelle Experimente belegt, in denen zum ersten Mal die Rotation in membranständigen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexen nachgewiesen wurde (Nishio et al., 2002). Unter der Annahme, dass sich im Experiment Rotor und Stator austauschen lassen, wurde der Proteolipidring fixiert und eine relative Drehung der Untereinheit a am Proteolipidring vorbei über ein Actinfilament sichtbar gemacht.

An der Protonentranslokation durch den F<sub>0</sub>-Bereich sind die Reste cD61 und aR210 beteiligt, wie in dem Modell von Rastogi und Girvin (siehe Abbildung 1.2-5) hervorgehoben ist. Liegt ein Protonengradient über der Membran vor, kann der Rest cD61 über einen hypothetischen Halbkanal in Untereinheit a von der periplasmatischen Seite ein Proton aufnehmen. Diese Protonierung führt wiederum zu einer Drehung der C-terminalen Helix des c-Monomers. Aufgrund dieser Konformationsänderung und sterischer Interaktionen mit der Untereinheit a wird nach dem Modell von Rastogi und Girvin (1999) das gesamte c-Oligomer weitergeschoben, so dass der Rest aR210 die nächste Position zwischen zwei c-Monomeren erreicht. Das nächste protonierte Monomer kann anschließend über einen weiteren Halbkanal in Untereinheit a ein Proton an die cytoplasmatische Seite abgeben. Während der Translokation eines Protons würde sich nach diesem Modell das c<sub>12</sub>-Oligomer zusammen mit den Untereinheiten  $\gamma$  und  $\varepsilon$  über eine Interaktion mit Untereinheit c (Watts et al., 1995; Hermolin et al., 1999) um 30° drehen. Vier solcher Schritte würden zur 120° Drehung führen, die für ye bereits beobachtet wurde (Duncan et al., 1995; Sabbert et al., 1996) und die zu den für die Katalyse ausschlaggebenden Konformationsänderungen im F1 führt. In anderen Modellen werden dagegen stärker elektrostatische Wechselwirkungen bei den Rotationsprozessen betont (Junge et al., 1997; Elston et al., 1998; Dimroth et al., 1999).

# **1.3 Der katalytische F<sub>1</sub>-Komplex**

Im Gegensatz zu den niedrigaufgelösten Strukturdaten des F<sub>0</sub>-Bereiches ergibt sich aus Kristalldaten der F<sub>1</sub>-Region verschiedener Organismen ein fast vollständiges Bild über den Gesamtaufbau der Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Da von dem *E. coli* F<sub>1</sub>-Komplex Strukturdaten von nur geringer Auflösung vorliegen, wird im Folgenden der Aufbau zunächst anhand der Struktur des mitochondrialen F<sub>1</sub>-Komplexes beschrieben.

# **1.3.1** Das $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer

Die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  nehmen mit einem Molekulargewicht von je 55,3 kDa und 50,3 kDa den größten Teil des F<sub>1</sub>-Komplexes ein. Ihre alternierende Anordnung

wurde mit der Kristallstruktur der ATPase in einem Hexamer aus Rinderherzmitochondrien bei 2,8 Å aufgelöst (Abrahams et al., 1994). Beide Untereinheiten weisen eine ähnliche Struktur, bestehend aus drei Teilbereichen, auf. Die N-terminale Domäne ist von der Membran am weitesten entfernt und hauptsächlich aus β-Faltblatt Strukturen aufgebaut. Darauf folgt die zentrale nukleotidbindende Domäne aus alternierenden  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt Strukturen sowie ein Bereich aus  $\alpha$ -helicalen Strukturen am C-Terminus. Jeweils eine  $\alpha$ - und eine β-Untereinheit bilden zusammen eine Einheit, die an der Kontaktfläche ein katalytisches Zentrum trägt. Der größte Teil dieser katalytischen Bindungsstelle liegt auf der Seite der  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheiten weisen ebenfalls Nukleotidbindungsstellen auf, die jedoch nicht katalvtisch sind. Damit sind im F<sub>1</sub>-Komplex insgesamt 6 Nukleotidbindungsstellen lokalisiert. Die Kristallstruktur der mitochondrialen ATPase zeigt die ß-Untereinheiten in unterschiedlichen Konformationen und mit unterschiedlicher Nukleotidbesetzung. Zwei  $\beta$ -Untereinheiten, die mit MgADP (Bezeichnung:  $\beta_{DP}$ ) bzw. mit dem nicht hydrolysierbaren ATP Analogon MgAMP-PNP ( $\beta_{TP}$ ) beladen sind, weisen eine geschlossene Konformation auf. Dagegen zeigt die nichtbeladene  $\beta$  Untereinheit ( $\beta_E$ ) eine offene Konformation, in der die C-terminale Domäne und die untere Hälfte der Nukleotidbindungstasche nach unten geklappt sind. Die drei  $\alpha$  Untereinheiten liegen dagegen in einheitlicher Konformation vor und sind mit MgAMP-PNP beladen. Eine unbeladene β-Untereinheit in offener Konformation zeigt sich auch in der Struktur des DCCD inhibierten mitochondrialen Komplexes (Gibbons et al., 2000) (siehe Abbildung 1.3-1).

Eine weitere Konformation, die möglicherweise einen katalytischen Übergangszustand darstellt, wurde in einem mit Aluminiumfluorid behandelten Komplex der mitochondrialen ATPase beobachtet (Menz et al., 2001). Dieser Komplex enthielt in den Nukleotidbindungsstellen  $\beta_{DP}$ und  $\beta_{TP}$ MgADP-Fluoroaluminat, wobei beide Nukleotidbindungsstellen in geschlossener Konformation vorlagen. Die dritte katalytische Untereinheit  $\beta_E$  war in diesem Komplex nicht leer, sondern mit MgADP und Sulfat beladen. Diese Untereinheit nimmt dabei eine "halb geschlossene" Konformation ein und wird als BADP+Pi bezeichnet. Dieser F<sub>1</sub>-Komplex könnte dem Zustand nach der ATP-Hydrolyse und vor der Produktfreisetzung entsprechen.



Abbildung 1.3-1: Kristallstruktur des DCCD inhibierten F<sub>1</sub>-Komplexes aus Rinderherzmitochondrien (Gibbons et al., 2000)

Dargestellt ist das  $\alpha_3\beta_3$  Hexamer in Aufsicht. Untereinheit  $\gamma$  befindet sich im Zentrum des Hexagons. Zu erkennen sind die nicht-katalytischen Bindungstaschen der  $\alpha$ -Untereinheiten, die mit Nukleotiden beladen sind (rot dargestellt), und die katalytischen Bindungstaschen, die zum größten Teil in den  $\beta$ -Untereinheiten lokalisiert sind. Zu beachten ist, dass eine der katalytischen Bindungstaschen unbeladen ist, wodurch die Untereinheit eine andere Konformation einnimmt ( $\beta_E$ ). PDB-Eintrag 1E79.

Die Kristallstruktur eines  $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ -Komplexes aus *E. coli* mit einer relativ niedrigen Auflösung von 4,4 Å deutet ebenfalls auf eine asymmetrische Anordnung der katalytischen Bindungsstellen hin. Die gebundenen Nukleotide konnten allerdings nicht definiert werden (Hausrath et al., 1999).

Eine symmetrische Anordnung der katalytischen Untereinheiten wurde im  $\alpha_3\beta_3$ -Komplex des thermophilen Bakteriums *Bacillus* PS3 identifiziert (Shirakihara et al., 1997). In der Kristallstruktur zeigen sich alle Nukleotidbindungsstellen unbesetzt und entsprechen der  $\beta_E$ -Konformation der mitochondrialen Struktur. Auch in der Kristallstruktur des chloroplastidären F<sub>1</sub>-Komplexes (Groth & Pohl, 2001), der mit einer Auflösung von 3,2 Å bestimmt wurde, scheinen die Bindungstaschen keine Nukleotide zu enthalten. Im Gegensatz zur Kristallstruktur des thermophilen F<sub>1</sub>-Komplexes nehmen hier jedoch alle Untereinheiten eine geschlossene Konformation ein. Diese beiden Kristallstrukturen sind ein Hinweis auf die hohe Flexibilität in Bezug auf die Konformationen des F<sub>1</sub>-Komplexes. Möglicherweise ist

das Magnesium-Ion der entscheidende Faktor zur Erreichung der asymmetrischen Struktur, denn die oben beschriebenen Kristallisationen wurden ohne Magnesium durchgeführt (Senior et al., 2002).

### **1.3.2** Untereinheiten $\gamma$ und $\epsilon$

Untereinheit  $\gamma$  (31,4 kDa) konnte bereits zu einem großen Teil in der Kristallstruktur des mitochondrialen F<sub>1</sub>-Komplexes im Zentrum des  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers identifiziert werden (Abrahams et al., 1994). Im DCCD inhibierten mitochondrialen Komplex gelang jedoch die vollständige Auflösung der Struktur bei 2,4 Å (Gibbons et al., 2000). Zur gleichen Zeit wurde die zentrale Domäne der Untereinheit  $\gamma$  im  $\gamma\epsilon$ -Komplex aus *E. coli* mit einer Auflösung von 2,1 Å bestimmt (Rodgers & Wilce, 2000). Die  $\gamma$  Untereinheit gehört zum Rotor der ATPase und bildet mit Untereinheit  $\epsilon$ den zentralen Stiel zwischen membranständiger F<sub>0</sub>-Region und dem  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer (siehe Abbildung 1.3-2).



# Abbildung 1.3-2: Untereinheiten $\gamma$ und $\varepsilon$ in der Kristallstruktur des DCCD inhibierten F<sub>1</sub>-Komplexes aus Rinderherzmitochondrien (Gibbons et al., 2000)

Dargestellt ist ein Teilbereich der Kristallstruktur im Querschnitt. Die  $\alpha$ -Helices der Untereinheit  $\gamma$  (blau) ragen ins Zentrum des  $\alpha_3\beta_3$  Hexamers hinein. Untereinheit  $\varepsilon$  (rot) befindet sich im unteren Bereich des F<sub>1</sub>-Komplexes und stellt zusammen mit  $\gamma$  die Verbindung zum F<sub>0</sub>-Komplex her. Die Bezeichnung  $\varepsilon$  entspricht der Nomenklatur in E. coli (in der mitochondrialen ATPase als  $\delta$  bezeichnet). PDB-Eintrag 1E79.

Die N- und C-terminalen Bereiche der Untereinheit  $\gamma$  bestehen aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die leicht umeinander gewunden sind und deren Termini in das Hexamer hineinragen. Es wird angenommen, dass diese asymmetrischen  $\alpha$ -helicalen Bereiche für die unterschiedlichen Nukleotidaffinitäten der katalytischen Bindungstaschen von Bedeutung sind. Der mittlere Bereich erstreckt sich unterhalb des Hexamers und bildet ein Bündel aus  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices. Untereinheit  $\gamma$ weist zu einem gewissen Grad eine interne Flexibilität auf und kann damit als elastisches Element bei der Kopplung zwischen der Rotation des Proteolipidringes und den Konformationsänderungen der katalytischen Bindungsstellen fungieren (Menz et al., 2001).

Untereinheit  $\varepsilon$  ist mit einem Molekulargewicht von 15 kDa die kleinste der  $F_1$ -Untereinheiten in *E. coli*. Sie ist zwar essentiell für die Bindung des  $F_1$ - an den membranständigen F<sub>0</sub>-Komplex, wirkt jedoch auf die ATP-Hydrolyse im isolierten F<sub>1</sub>-Komplex hemmend (Weber et al., 1999). Mittlerweile sind mehrere Kristallstrukturen der E-Untereinheit veröffentlicht worden. In der schon erwähnten DCCD inhibierten F1-Struktur der mitochondrialen ATPase war die komplette ε-Untereinheit zu erkennen (Gibbons et al., 2000) (siehe Abbildung 1.3-2). Weiterhin wurde eine Kristallstruktur bei 2,3 Å von einer aus E. coli isolierten Untereinheit ɛ (Uhlin et al., 1997) und die oben erwähnte ye-Struktur (Rodgers & Wilce, 2000) beschrieben. Die Untereinheit setzt sich aus zwei Domänen zusammen: ein "β-Sandwich" bildet den N-terminalen Bereich, während sich am C-Terminus zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices befinden. Die Strukturen der isolierten Untereinheit  $\varepsilon$  aus E. coli und der entsprechenden mitochondrialen Untereinheit weisen eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Faltung auf. Jedoch nimmt  $\varepsilon$  in der  $\gamma\varepsilon$ -Kristallstruktur eine abweichende Form ein. Hier bilden die  $\alpha$ -Helices keine enge Haarnadelstruktur aus, sondern sie sind nahezu rechtwinklig zueinander angeordnet, umwinden dabei einen Teil von  $\gamma$  und interagieren mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten im intakten Komplex. Diese Strukturabweichung ist ein Indiz für eine gewisse Bewegungsfreiheit von  $\varepsilon$  im nativen Komplex. Es wird angenommen, dass die beiden Domänen sich unabhängig voneinander während der katalytischen Vorgänge bewegen (Schulenberg et al., 1997). Die Konformationsänderung der Untereinheit spielt eine Rolle bei der selektiven Hemmung der ATP-Hydrolysereaktion und es wird angenommen, dass ɛ

für eine Regulation der Rotationsbewegung und damit die Richtung der Katalysereaktion verantwortlich ist (Tsunoda et al., 2001b).

# **1.3.3 Untereinheit** $\delta$

Untereinheit  $\delta$  (19,3 kDa) ist an der Bildung des zweiten peripheren Stiels beteiligt, der für die Stabilisierung des Enzyms während der Rotationsbewegung von Bedeutung ist (Rodgers et al., 1997). Sie ist an der Untereinheit  $\alpha$  lokalisiert und interagiert mit den Untereinheiten b des membranständigen F<sub>O</sub>-Komplexes.

Von dieser Untereinheit liegen bisher keine kristallographischen Daten vor, denn sie wird zum Teil zur Verbesserung der Symmetrie des F<sub>1</sub>-Bereiches und damit zur Erleichterung der Kristallisation abgelöst (Hausrath et al., 1999; Groth & Pohl, 2001). Allerdings konnte die N-terminale Domäne der Untereinheit  $\delta$ , die ein Bündel aus sechs aneinander gelagerten  $\alpha$ -Helices bildet, mittles NMR bestimmt werden (Wilkens et al., 1997). Die Auflösung des C-terminalen Bereiches ist jedoch von großer Bedeutung, da gerade hier die Reste lokalisiert sind, die mit den Untereinheiten b und  $\alpha$  interagieren, was in Quervernetzungsexperimenten gezeigt wurde (Ogilvie et al., 1997; McLachlin & Dunn, 2000).

### 1.3.4 Katalytische Reaktionsmechanismen

Der von Boyer vorgeschlagene "binding change" Mechanismus beinhaltet, dass die drei katalytischen Bindungsstellen einen Zyklus mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für Substrate und Produkte durchlaufen (Boyer, 1989; Boyer, binden Hypothese 1993). Nach der ursprünglichen während der ATP-Synthesereaktion zuerst ADP und Pi an eine Bindungsstelle, daraufhin wird ATP synthetisiert und im dritten Schritt freigesetzt. Dabei sind gleichzeitig zwei Bindungsstellen beladen und eine ist frei, so wie in der Kristallstruktur der ATPase aus Rinderherzmitochondrien belegt wurde (Abrahams et al., 1994). Dieser Mechanismus wird nach der Anzahl der beladenen Bindungsstellen auch als "Bisite" Katalyse bezeichnet. Mittlerweile wird jedoch auf der Grundlage aktuellerer Daten eine "Trisite" Katalyse favorisiert (Ren & Allison, 2000; Weber & Senior, 2000; Senior et al., 2002). Im "Trisite" Mechanismus sind alle drei Bindungsstellen belegt, wie auch die Kristallstruktur der mit Aluminiumfluorid inhibierten ATPase zeigt (Menz et al., 2001), und arbeiten zusammen. Es wird angenommen, dass für die Synthese- und Hydrolysereaktion mindestens fünf verschiedene Konformationszustände mit unterschiedlicher Affinität erforderlich sind (Senior et al., 2002). Ob dabei eine Bindungsstelle oder zwei Bindungsstellen gleichzeitig katalytisch aktiv sind, ist bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden. Die Phosphatbindung und ATP Freisetzung sind energiegebunden, d.h. abhängig von Rotationsvorgängen.

Die Konformationsänderungen der katalytischen Bindungsstellen sind mit der Rotation der Untereinheit  $\gamma$  gekoppelt. Die Rotation von  $\gamma$  in Relation zu den katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten wurde am isolierten F<sub>1</sub>-Subkomplex mehrfach experimentell nachgewiesen (Duncan et al., 1995; Sabbert et al., 1996; Noji et al., 1997). Über Quervernetzungsversuche wurde eine Rotation von  $\gamma$  im membrangebundenen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex während der ATP-Hydrolyse- und der Synthesereaktion belegt (Zhou et al., 1996; Zhou et al., 1997). Die Rotation von  $\gamma$ läuft in 120° Schritten ab, die von Pausen unterbrochen werden (Yasuda et al., 1998). Diese 120° Schritte konnten weiter aufgelöst werden (Yasuda et al., 2001). Dabei wird dem 30° Teilschritt die Freisetzung der Hydrolyseprodukte und dem 90° Teilschritt die ATP Bindung zugerechnet, während die Hydrolysereaktion im stationären Intervall abläuft.

Experimente mit einer gleichzeitigen Quervernetzung der Untereinheiten c- $\varepsilon$  und  $\varepsilon$ - $\gamma$ , die keinen Aktivitätsverlust der ATPase bewirken, deuten an, dass die Rotationen dieser Untereinheiten kombiniert sind (Tsunoda et al., 2001a). Die Rotation der Untereinheit  $\gamma$  ist also mit der Rotation des Proteolipidringes gekoppelt, d.h. die katalytische Reaktion des F<sub>1</sub>-Komplexes resultiert in einer Protonentranslokation des F<sub>0</sub>-Komplexes und umgekehrt. Eine direkte Quervernetzung von c mit  $\gamma$  bewirkt jedoch auch die Entkopplung der ATP-Hydrolyse von der Protonentranslokation, was darauf hindeutet, dass die Untereinheiten während der Rotation möglicherweise ebenfalls Konformationsänderungen durchlaufen (Schulenberg et al., 1999).

# 1.4 Zielsetzung

Über den F<sub>1</sub>-Komplex der ATPase liegen zahlreiche Strukturdaten von hoher Auflösung vor, die Aufschluss über die Wechselwirkungen der Untereinheiten und über die katalytischen Vorgänge geben. Dagegen stehen bisher von dem membranständigen  $F_0$ -Bereich nur begrenzt Strukturinformationen zur Verfügung, aus denen sich kein detailliertes Bild über den Gesamtaufbau ableiten lässt. In der vorliegenden Arbeit wurden Strukturuntersuchungen an der  $F_0F_1$ -ATPase aus *E. coli* durchgeführt.

Zur strukturellen Charakterisierung des membranständigen Bereiches der ATPase wurden zunächst Mutagenesestudien am Proteolipid durchgeführt. Dadurch sollten intra- und intermolekulare Kontaktstellen der Untereinheit c identifiziert werden, aus denen unter Berücksichtigung verschiedener Strukturmodelle des multimeren Komplexes der c-Untereinheit der molekulare Aufbau des Proteolipidringes hervorgehen sollte. Ein weiteres Ziel zur Aufklärung der Struktur der *E. coli* ATPase bestand in der Reinigung eines vollständigen und intakten ATPase Komplexes zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung eines Teilbereiches der F<sub>1</sub>-Region. Auf der Grundlage von kristallographischen Strukturdaten der chloroplastidären ATPase sollte durch gezielte Modifikationen im EF<sub>1</sub>-Bereich eine Bindungstasche für den phytopathogenen Inhibitor Tentoxin geschaffen werden, der auf die native *E. coli* ATPase nicht hemmend wirkt.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Molekularbiologische Methoden

Die in diesem Teil beschriebenen Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) entnommen. Alle verwendeten Lösungen wurden entweder autoklaviert (20 min, 121°C) oder sterilfiltriert (Rotrand Filter, 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland).

# 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue verwendet. Die Expression der Wildtyp- und modifizierten ATPase erfolgte in dem ATPase defizienten Stamm DK8.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi	(Bullock et al., 1987)
	relA1 lac	
	F' [ $proAB^+$ lacI <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15 Tn10( $tet^r$ )]	
DK8	1100\(uncB-uncC) ilv::Tn10	(Klionsky et al., 1984)

Folgende Plasmide wurden für Klonierungen und ATPase Aktivitätsmessungen eingesetzt:

**pBR322:** Ein *E. coli* Klonierungsvektor (Sutcliffe, 1979), der für den Einbau des *E. coli* ATPase Operons (*unc* Operon) verwendet wurde. Der Vektor diente als Kontrolle für Aktivitätsmessungen, bei denen die Zellen keine ATPase exprimieren. Größe: 4,4 kb.

**pBWU13**: Bei diesem Vektor handelt es sich um ein pBR322 Derivat, in das über die *Hind* III und *Nde* I Schnittstellen das *unc* Operon einkloniert ist (Moriyama et al., 1991). Der Vektor diente als Wildtyp für die Aktivitätsmessungen und war die Grundlage für alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen im  $F_0$ - und  $F_1$ -Bereich der ATPase. Größe: 10,5 kb.

**pGTG:** Dieser Vektor wurde für Subklonierungen im  $F_0$ -Bereich eingesetzt. Der Vektor entspricht dem Plasmid pMW172 (Way et al., 1990), in dessen Polylinker Region die Sequenzen für die Restriktionsenzyme *Pfl*M I und *Ppu*M I einkloniert wurden. Größe: 2,6 kb.

pGTGuncacb: Dieser Vektor geht aus pGTG hervor. In die Schnittstellen *Pfl*M I und *Ppu*M I wurde das entsprechende Fragment aus dem Plasmid pBWU13 einkloniert. Der Vektor enthält somit die Sequenz für Untereinheit c der *E. coli* ATPase, flankiert von Fragmenten der Untereinheiten a und b (Groth et al., 1998). Größe: 3,8 kb.

**pSK11:** Dieser Vektor geht aus pACWU1.2 hervor und enthält ebenfalls alle Strukturgene der *E. coli* ATPase. Am N-Terminus der Untereinheit  $\beta$  ist ein RGS Motiv, gefolgt von 6 Histidinen, eingefügt. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Lill (Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen, Vrije Universiteit Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt und in dieser Arbeit für die metallchromatographische Reinigung der ATPase eingesetzt. Größe: 9,2 kb.

# 2.1.2 Nährmedien zur Anzucht von E. coli

Zur Anzucht von *E. coli* für Klonierungsarbeiten wurde LB Medium verwendet. Da die in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide eine Ampicillinresistenz tragen, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zur Selektion 100 µg/ml Ampicillin zugefügt. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte für 12 bis 16 h bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 Upm. Agarplatten wurden ebenfalls für 12 bis 16 h bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die Anzucht von transformierten DK8 Zellen zur Aktivitätsmessung erfolgte in 2YT Medium. Für Wachstumsversuche mit Succinat als Kohlenstoffquelle und für die Isolierung des ATPase Komplexes (mit Glycerin als Kohlenstoffquelle) wurden die DK8 Zellen in Minimalmedium (Tanaka et al., 1967) angezogen.

Die Nährmedien wurden, soweit nicht anders angegeben, zur Sterilisation 20 min bei 121 °C autoklaviert.

LB (Luria Bertani) Medium:

10 % (w/v)	Pepton
5 % (w/v)	Hefeextrakt
5 % (w/v)	NaCl
in H <sub>2</sub> O bidest.,	mit NaOH pH 7,0 einstellen

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem LB Medium 1,5 % (w/v) Agar zugefügt.

2YT Medium:

16 % (w/v)	Pepton
10 % (w/v)	Hefeextrakt
5 % (w/v)	NaCl
in H <sub>2</sub> O bidest.,	mit NaOH pH 7,0 einstellen

Minimalmedium (Tanaka et al., 1967):

 34 mM  $KH_2PO_4$  

 64 mM  $K_2HPO_4$  

 0,3 mM  $MgSO_4$ 
 $1 \mu M$   $CaCl_2$ 
 $1 \mu M$   $ZnCl_2$  

 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$  

 in  $H_2O$  bidest.

Die Lösung wurde autoklaviert und vor dem Gebrauch mit folgenden sterilfiltrierten Zusätzen komplementiert:

1 μM	FeSO <sub>4</sub>
2 mg/l	Thiamin
50 mg/l	Isoleucin, Valin, Asparagin (Stammlsg. 25 mg/ml in 1 M NaOH)
50 mg/l	Thymin
0,5 % (v/v)	Succinat (Stammlsg. 20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7 mit KOH)
oder:	
0,5 % (v/v)	Glycerin

# 2.1.3 Herstellung Transformations-kompetenter E. coli Zellen

#### **Rubidiumchlorid Methode**

Zellen der *E. coli* Stämme XL1-Blue und DK8 wurden zur Aufnahme von DNA durch Behandlung mit Rubidiumchlorid vorbereitet (Hanahan, 1983). Dazu wurden 5 ml LB Medium mit 12,5  $\mu$ g/ml Tetracyclin versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml LB/Tetracyclin Medium inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend auf Eis 15 min abgekühlt und bei 4.000 g<sub>max</sub> für 10 min bei 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 30 ml RFI Puffer resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Sedimentation der Zellen mit 4.000 g<sub>max</sub> wurde das Pellet in 8 ml RFII Puffer aufgenommen und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

# **RFI** Puffer

100 mM	RbCl <sub>2</sub>
50 mM	$MnCl_2$
30 mM	KAcetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
in H <sub>2</sub> O bidest.	

### **RFII** Puffer

10 mM	MOPS/NaOH pH 6,8
10 mM	RbCl <sub>2</sub>
30 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 % (v/v)	Glycerin
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Die Puffer wurden frisch angesetzt, sterilfiltriert und auf Eis vorgekühlt.

### Elektroporation

Eine Voraussetzung für die Elektroporation von *E. coli* besteht darin, dass die Zellen möglichst frei von Salzen sind und alle Medienreste gut entfernt werden. Mit einer XL1-Blue Einzelkolonie wurde eine 5 ml LB Vorkultur, versetzt mit 12,5  $\mu$ g/ml Tetracyclin, angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Davon wurden 2,5 ml in 500 ml LB Medium (+ 12,5  $\mu$ g/ml Tetracyclin) überführt und bis

zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,7 angezogen. Die Zellen wurden auf Eis 15 min abgekühlt und bei 4.000 g<sub>max</sub> und 4 °C für 10 min sedimentiert. Das Medium wurde vollständig dekantiert und die Zellen in insgesamt 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und nochmals mit 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen, um alle Medienreste zu entfernen. Sollten die Zellen direkt für die Elektroporation eingesetzt werden, wurde das Pellet nach einer weiteren Zentrifugation in einem der Zellmenge entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Für eine längere Aufbewahrung der Zellen wurden diese zunächst in 40 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin aufgenommen und nach erneuter Sedimentation und Abschätzung des Zellvolumens in etwa dem gleichen Volumen 10 %igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten für mehrere Wochen bei -70 °C gelagert werden.

# 2.1.4 Transformation von E. coli

### Hitzeschock

Die nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Aliquots von 20 bis 50 µl kompetenter Zellen wurden mit 50 bis 500 ng Plasmid DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Zur Regeneration wurde zu den Ansätzen 300 µl LB Medium gegeben und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die zur Selektion 100 µg/ml Ampicillin enthielten.

#### Elektroporation

Diese Methode (Dower et al., 1988) wurde vor allem für das Einbringen von Ligationsansätzen in die Zellen angewandt, da durch die Elektroporation eine höhere Transformationsrate erzielt werden kann als bei der Rubidiumchlorid/Hitzeschock Methode. Hierzu wurde je ein 50  $\mu$ l Aliquot der vorbereiteten Bakteriensuspension (siehe 2.1.3) auf Eis aufgetaut und mit maximal 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes gemischt, um die Salzkonzentration gering zu halten. Bei Bedarf wurde der Ligationsansatz gefällt und das DNA Pellet in H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette mit 2 mm Elektrodenabstand gegeben. Das Anlegen des elektrischen Feldes erfolgte am "*E. coli* Pulser" (BioRad, München, Deutschland) bei einer Spannung von 2,5 kV. Nach der Elektroporation wurden die

Zellen sofort mit 500 µl LB oder SOC Medium versetzt und für 30 bis 60 min bei 37 °C geschüttelt. Der Ansatz wurde auf zwei LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion) verteilt und ausgestrichen.

### SOC Medium

0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
2 % (w/v)	Trypton
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
20 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	Glucose
in H <sub>2</sub> O bidest.	

# 2.1.5 Isolierung von Plasmid DNA

Für die Präparation von reiner Plasmid DNA, wie sie vor allem für Sequenzanalysen benötigt wird, wurde das QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das nach dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie funktioniert. Dazu wurden Bakterien aus 3 ml Flüssigkultur nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern aufgearbeitet. Die DNA wurde mit H<sub>2</sub>O bidest. von der Membran eluiert und bei -20 °C gelagert.

Als Alternative zur Überprüfung einer größeren Menge Klone wurde die DNA mit alkalischer Lyse isoliert (Birnboim & Doly, 1979). Dazu wurden 1,5 ml Bakterien aus einer Flüssigkultur bei 3.000 g<sub>max</sub> pelletiert und mit 100 µl GTE Puffer und 2 µl RNAse Lösung (5 mg/ml) durch Vortexen resuspendiert. Zur alkalischen Lyse der Bakterien wurde anschließend 200 µl Lysepuffer zugegeben und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Durch die Zugabe von 150 µl eiskaltem Kaliumacetat-Puffer und einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine gefällt und durch eine Zentrifugation bei 12.000 g<sub>max</sub> für 10 min pelletiert. Der DNA enthaltende Überstand wurde zur Fällung mit dem zweifachen Volumen an 100 % Ethanol versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA 10 min bei 12.000 g<sub>max</sub> pelletiert. Das DNA Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wurde das DNA Pellet 10 min luftgetrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. GTE Puffer:

25 mM	Tris/HCl pH 8,0
50 mM	Glucose
10 mM	EDTA
in H <sub>2</sub> O bidest.	

# Lysepuffer:

200 mM	NaOH
1 % (w/v)	SDS
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Kaliumacetat Puffer:

3 M Kaliumacetat, pH 4,8 in H<sub>2</sub>O bidest.

# 2.1.6 DNA Fällung mit Ethanol

Die ethanolische Fällung von Plasmid DNA dient zur Konzentrierung und stellt eine Möglichkeit zur Entfernung störender Puffersubstanzen dar.

Zu einem Volumen DNA Lösung wird  $^{1}/_{10}$  Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 2,5 Volumen eiskaltes 100 %iges Ethanol gegeben. Bei hohen DNA Konzentrationen präzipitiert die DNA sehr schnell und es reicht eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur aus. Bei Konzentrationen unter 250 ng/µl wurde die Fällung bei -20 °C für 30 min bis 24 h durchgeführt. Das DNA Präzipitat wurde bei 12.000 g<sub>max</sub> und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Nach dem Lufttrocknen des Pellets für 10 min wurde die DNA in H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen.

# 2.1.7 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die isolierte Plasmid DNA verdünnt und in einer Micro-Quarzküvette bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  ist ein Maß für die Kontamination mit Proteinen: ein Wert von 1,8 bis 2,0 deutet auf eine hohe Reinheit der Nukleinsäuren hin.

# 2.1.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die hier verwendeten Restriktionsendonukleasen mit den entsprechenden Reaktionspuffern wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland) bezogen. Für qualitative Restriktionsanalysen wurden ca. 2  $\mu$ g Plasmid DNA in einem Volumen von 20  $\mu$ l eingesetzt und 60 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Reaktionsbedingungen für die einzelnen Enzyme wurden dem Herstellerkatalog entnommen. Für einen quantitativen Restriktionsansatz wurde 10 bis 20  $\mu$ g DNA eingesetzt und 2 bis 6 Stunden inkubiert.

qualitativer Restriktionsansatz:

2 μl Plasmid DNA (1 μg/μl)
2 μl Reaktionspuffer (10x konz.)
2μl BSA (1 mg/ml, wenn erforderlich)
2 U Restriktionsendonuclease
ad 20 μl mit H<sub>2</sub>O bidest.

Eine Spaltung mit zwei verschiedenen Enzymen konnte in demselben Ansatz durchgeführt werden, wenn die optimalen Pufferbedingungen für die Enzyme vergleichbar waren. Bei unterschiedlichen Bedingungen wurde nach der Spaltung mit dem einen Enzym eine ethanolische DNA Fällung vorgenommen, um so einen Pufferaustausch zu ermöglichen (siehe 2.1.6).

### 2.1.9 Auftrennung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse eines Restriktionsansatzes und für die präparative Auftrennung von DNA Fragmenten wurden, je nach erforderlichem Trennbereich, 0,8 bis 2 %ige Agarosegele eingesetzt. Die Agarose wurde in TBE Puffer gelöst und mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt, das in die DNA interkaliert und mit UV-Licht detektiert werden kann. Die Proben wurden mit  $^{1}/_{10}$  Volumen Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker diente ein 1 kb DNA Standard (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland). Die Elektrophorese erfolgte bei 50 mA für 1 bis 2 h.

TBE Puffer:

100 mM	Tris
100 mM	Borsäure
2,5 mM	EDTA
in H <sub>2</sub> O bidest.	

DNA-Probenpuffer:

 $\begin{array}{ll} 50 \ \% \ (v/v) & Glycerin \\ 0,1 \ \% \ (w/v) & Bromphenolblau \\ in \ H_2O \ bidest. \end{array}$ 

Zur Gewinnung der aufgetrennten DNA Fragmente aus den Agarosegelen wurden die Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und über QIAquick Gel Extraction Säulchen (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Die DNA wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris/HCl pH8,5 eluiert.

# 2.1.10 Alkalische Phosphatase Behandlung

Zur Vermeidung einer Religation von geschnittenen Vektoren in einem Ligationsansatz wurden die Phosphatgruppen am 5' Ende mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland) entfernt. Dazu wurde ein Ansatz mit 10 µg geschnittenem Vektor und 5 U alkalischer Phosphatase (CIP) in dem mitgelieferten Puffer gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die CIP über Gelelektrophorese oder über QIAquick Gel Extraction Säulchen (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll zur PCR-Produkt Reinigung aus dem DNA Ansatz entfernt.

# 2.1.11 Ligation

Die Ligation von DNA Fragmenten mit linearisierter Vektor DNA erfolgte in einem molaren Verhältnis von ungefähr 5:1 (bis 10:1) unter Verwendung der T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland) und dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 bis 30 µl durchgeführt. Für eine schnelle Ligation von überhängenden Enden wurden 200 U Ligase eingesetzt und der Ansatz bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Alternativ wurden 40 U Ligase pro Ansatz verwendet und die Ligation bei 16 °C 6 bis 16 h inkubiert. Zu jeder Ligation wurden Kontrollen mit linearisierter Vektor DNA ohne
DNA-Fragment durchgeführt, um die Menge an religiertem Vektor zu überprüfen. Jeder Ligationsansatz wurde in unterschiedlichen Volumina über Hitzeschock oder Elektroporation in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (2.1.4).

### 2.1.12 Tryptophan-Substitutionsmutagenese

Die Orientierung der c-Monomere im Proteolipidring sollte durch einzelne Substitutionen von Aminosäuren am N-Terminus der c-Monomere durch Tryptophane untersucht werden. Der Austausch wurde durch zwei hintereinander geschaltete Polymerasekettenreaktionen erreicht. Dabei wurde im ersten Schritt ein ca. 500 Basenpaar großes DNA Fragment amplifiziert, das am 3' Ende des codogenen Stranges den Basenaustausch trug. Im zweiten Schritt wurde dieses Fragment als Megaprimer eingesetzt, so dass ein Fragment amplifiziert wurde, das im mittleren Bereich die Mutation aufwies und durch die Restriktionsschnittstellen *Pfl*M I und *Ppu*M I flankiert wurde.

 Tabelle 2.1-1: Mutagenese-Oligonukleotide für die Substitution der Aminosäuren in

 Position 12 bis 24 der Untereinheit c durch Tryptophan:

Bezeichnung	Sequenz
cA12Wfor	<sup>5</sup> ' - CTGCTGTACATG <b>TGG</b> GCCGCTGTGATGATG - <sup>3</sup> '
cA13Wfor	<sup>5'</sup> - GCTGTACATGGCT <b>TGG</b> GCTGTGATGATGGG - <sup>3'</sup>
cA14Wfor	<sup>5'</sup> - TACATGGCTGCC <b>TGG</b> GTGATGATGGGTCTG - <sup>3'</sup>
cV15Wfor	<sup>5'</sup> - CATGGCTGCCGCT <b>TGG</b> ATGATGGGTCTGGCG - <sup>3'</sup>
cM16Wfor	<sup>5'</sup> - GGCTGCCGCTGTG <b>TGG</b> ATGGGTCTGGC - <sup>3'</sup>
cM17Wfor	<sup>5'</sup> - GCCGCTGTGATG <b>TGG</b> GGGTCTGGCGGCAATCGG - <sup>3'</sup>
cG18Wfor	<sup>5'</sup> - GCTGTGATGATG <b>TGG</b> CTGGCGGCAATCGG - <sup>3'</sup>
cL19Wfor	<sup>5'</sup> - GCTGTGATGATGGGT <b>TGG</b> GCGGCAATCGG - <sup>3'</sup>
cA20Wfor	<sup>5'</sup> - GTGATGATGGGTCTG <b>TGG</b> GCAATCGGTGCT - <sup>3'</sup>
cA21Wfor	<sup>5'</sup> - ATGATGGGTCTGGCG <b>TGG</b> ATCGGTGCTGCG- <sup>3'</sup>
cI22Wfor	<sup>5'</sup> - GATGGGTCTGGCGGCA <b>TGG</b> GGTGCTGCGAT- <sup>3'</sup>
cG23Wfor	<sup>5</sup> - GGTCTGGCGGCAATC <b>TGG</b> GCTGCGATCGGT- <sup>3</sup>
cA24Wfor	<sup>5</sup> ' - CTGGCGGCAATCGGT <b>TGG</b> GCGATCGGTATC- <sup>3</sup> '
T7for	<sup>5'</sup> - AGGGAGACCACAACGGTTT - <sup>3'</sup>
T7rev	<sup>5'</sup> - GGATATAGTTCCTCCTTTCA - <sup>3'</sup>

Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 2.1-1) wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Basentripletts, die für die Aminosäuren 12 bis 24 der c Untereinheit kodieren, wurden jeweils durch ein TGG Basentriplett ersetzt. Die Bezeichnung leitet sich ab aus Untereinheit c, gefolgt von der nativen Aminosäure, der Positionsnummer und der neu eingesetzten Aminosäure Tryptophan. Die T7 Oligonukleotide binden an die Bereiche in pGTGuncacb, die die ATPase Sequenz flankieren.

### Polymerasekettenreaktion (PCR):

Als Matrize für die zu amplifizierenden Fragmente wurde der Vektor pGTGuncacb eingesetzt. Dieser Vektor ist mit einer Größe von ca. 3,8 kb wesentlich kleiner als der Vektor pBWU13 (ca. 10,5 kb) und eignet sich besser für die Anlagerung der Oligonukleotide im Sequenzbereich der Untereinheit c. Als Polymerase wurde die temperaturstabile Pfu Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) eingesetzt. Sie besitzt durch ihre 3'-5' Exonucleaseaktivität eine Korrektureigenschaft. Die PCR Reaktionen wurden in einem Gene Cycler der Firma BioRad (München, Deutschland) durchgeführt.

PCR Ansatz:

Polymerase Puffer (10X)	5 µl
dNTP-Mix (je 1,25 mM)	8 µl
Matrize pGTGuncacb (200 ng/µl)	0,5 µl
T7 rev (1 μM)	5 µl
cXYWfor (1 µM)	5 µl
Pfu Polymerase (3 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl

### PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung	93 °C	1 min	
Anlagerung der Primer	55 °C	2 min	20 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	93 °C	1 min	
Anlagerung der Primer	55 °C	2 min	1 Zyklus
Elongation	72 °C	7 min	

Der PCR Ansatz wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und das Produkt mit der Größe von 500 bp mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Elution erfolgte in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest. Dieses Fragment wurde anschließend in einer zweiten PCR als Megaprimer eingesetzt.

Der zweite PCR Ansatz erfolgte wie oben beschrieben, allerdings mit dem T7for Oligonukleotid und 30  $\mu$ l des Megaprimers als gegenläufiges Oligonukleotid. In dieser PCR wurde ein 1,4 kb großes DNA Fragment amplifiziert, das ebenfalls über Agarosegelelektrophorese gereinigt wurde. Das PCR Produkt mit der Tryptophan Mutation wurde zunächst über die *Pfl*M I und *Ppu*M I Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGTG einkloniert. In diesem Vektor konnte das Fragment mit der Substitution vervielfältigt und in größeren Mengen isoliert werden. Anschließend erfolgte die Insertion des 1,2 kb großen *Pfl*M I - *Ppu*M I Fragmentes in den entsprechend geschnittenen Vektor pBWU13.

Die Tryptophanmutationen wurden anschließend durch DNA Sequenzierung überprüft (Seqlab, Göttingen, Deutschland).

### 2.1.13 Mutationen im Bereich der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit

Durch den gezielten Austausch von Aminosäuren in den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sollte in der tentoxinresistenten *E. coli* ATPase eine Sensitivität für den phytopathogenen Inhibitor erzielt werden. Die Substitutionen wurden, wie in 2.1.12 beschrieben, durch zwei aufeinander folgende PCR Schritte vorgenommen. Die PCR Ansätze und das PCR Programm wurden, wie unter 2.1.12 beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt: Als Matrize für die PCR Reaktionen wurde der Vektor pBWU13 eingesetzt und für die Mutagenese wurden die in Tabelle 2.1-2 aufgeführten Oligonukleotide verwendet (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland).

Bezeichnung	Sequenz
aQ49Arev	<sup>5'</sup> - ATTTCACCCGCCATACAATC <sup>3'</sup>
aL64Arev	<sup>5′</sup> - TCGAGGTT <b>CGC</b> TGCGATAG <sup>3′</sup>
aL95A/E96Qrev	<sup>5′</sup> - ACCGGAAC <b>TTGCGC</b> GATACGG <sup>3′</sup>
aI273Mfor	<sup>5′</sup> - TACCGTCAG <b>ATG</b> TCCCTGCT <sup>3′</sup>
βG58S/S59A/S60Tfor	<sup>5′</sup> - TCGCAATG <b>AGTGCCACC</b> GACGGT <sup>3′</sup>
α3200for	<sup>5</sup> '- TCTTAAGGGGACTGGAGC - <sup>3'</sup>
α4400rev	<sup>5'</sup> - TACGGATACCACCGGACAG - <sup>3'</sup>
β6300rev	<sup>5'</sup> - CGATAACGTTGGAGTCGGTCA - <sup>3'</sup>
γ5216for	<sup>5′</sup> - CGGCAATGTTGTTGCCCA - <sup>3′</sup>

Tabelle 2.1-2: Mutagenese-Oligonukleotide für Modifikationen im EF<sub>1</sub>-Komplex:

Für die Mutationen Q49A, L64A und L95A/E96Q wurde in der ersten PCR a3200 for und in der zweiten PCR a4400 rev als gegenläufiges Oligonukleotid verwendet. Für die Mutation I273M wurde in der ersten PCR  $\alpha$ 4400rev und in der zweiten PCR  $\alpha$ 3200for eingesetzt. Im Fall der Mutation  $\beta$  G58S/S59A/S60T wurde in der ersten PCR ß6300rev und in der zweiten PCR y5216for als gegenläufiges Oligonukleotid eingesetzt. Die PCR Fragmente mit den Mutationen in  $\alpha$  wurden nach ihrer Reinigung mit den Restriktionsendonukleasen Sph I und Pml I geschnitten und in den entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBWU13 ligiert. Das Fragment, das die Mutation in β trug, wurde über die Schnittstellen Rsr II und Sac I in den entsprechend vorbereiteten Vektor pBWU13 einkloniert. Für eine Kombination mehrerer Substitutionen in Untereinheit  $\alpha$  wurde der Vektor pBWU13 einem Einzelaustausch als Matrize zusammen mit einem anderen mit Mutageneseoligonukleotid in der PCR eingesetzt. Substitutionen in beiden Untereinheiten wurden erzielt, indem das PCR Fragment mit der β-Mutation über die Restriktionsschnittstellen Rsr II und Sac I in die entsprechend geschnittenen pBWU13 Vektoren einkloniert wurde, die bereits α-Mutationen enthielten. Die Aminosäure-Substitutionen wurden anschließend durch DNA Sequenzierung verifiziert (SeqLab, Göttingen, Deutschland).

### 2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.1 Isolierung invertierter Membranvesikel

Membranvesikel wurden sowohl für ATPase Aktivitätsmessungen als auch für den immunologischen Nachweis der Untereinheit c im Westernblot verwendet.

Der ATPase defiziente Stamm DK8 wurde mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Mit einer einzelnen Kolonie wurden je 500 ml 2YT Medium angeimpft, das 100 µg/ml Ampicillin und 0,5 % (w/v) Glucose enthielt. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler bei 180 Upm und 37 °C für ca. 9 h, bis eine OD<sub>600</sub> von 1,4 bis 1,6 erreicht war. Die Zellen wurden bei 6.000 g<sub>max</sub> und 4 °C für 10 min sedimentiert. Das Medium wurde vollständig dekantiert und die Zellen in kaltem TMG Puffer resuspendiert, so dass sich eine Dichte von 0,3 g Zellen/ml Puffer ergab. Anschließend wurden die Zellen mit einem Branson Sonifier Typ 250 aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen mit einer Mikrospitze für 6 min auf Stufe 2 im 50 % Modus in einem Eiswasserbad beschallt. Die Zelltrümmer wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 30.000 gmax und 4 °C sedimentiert. Um die Membranvesikel aus dem Überstand zu isolieren, wurde eine Ultrazentrifugation des Überstandes bei 278.000 gmax und 4 °C für 75 min durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Membranvesikel in 400 µl TMG Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Membranvesikel wurden ein- bis zweimal mit einer 500 µl Hamilton Spritze aufgezogen, um eine homogene Suspension zu erreichen. Nicht resuspendierte Aggregate wurden anschließend in einer 5 minütigen Zentrifugation bei 10.000 g<sub>max</sub> abgetrennt.

Die Membranvesikel wurden bis zu ihrer Verwendung auf Eis aufbewahrt.

TMG Puffer:

50 mM	Tricin/NaOH pH 8,0
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 % (v/v)	Glycerin
in H <sub>2</sub> O bidest.	

### 2.2.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Membranvesikel-Supensionen wurde der "Bicinchoninic Acid Assay" der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet. Die Testlösungen wurden nach Herstellerangaben gemischt und mit entsprechend verdünnten Membranproben versetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte 20 min bei 37 °C. Der violette Farbkomplex, der durch die Reaktion der Bicinchonininsäure mit dem Kupfer-komplexierten Protein gebildet wird, wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer BSA Eichreihe von 5 bis 30 µg/ml.

Der Proteingehalt Detergenzhaltiger Ansätze wurde mit dem "BioRad Protein Assay" (BioRad, München, Deutschland) bestimmt. Dieser Test beruht auf der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine. Aliquots der zu bestimmenden Proben wurden mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 800  $\mu$ l aufgefüllt und nach Zugabe von 200  $\mu$ l Testlösung mindestens 5 min bei RT inkubiert. Die Messung der Proben und der Eichreihe mit Konzentrationen von 2 bis 12  $\mu$ g/ml erfolgte bei 595 nm.

### 2.2.3 ATPase Aktivitätsmessungen

Der Einfluss von Mutationen auf den Aufbau und die Funktion der ATPase wurde durch Aktivitätsmessungen untersucht. Die Aktivitäten der Mutanten wurden dabei immer in Relation zur Aktivität des Wildtyps (pBWU13) gesetzt. Als Kontrolle für Membranvesikel ohne ATPase Aktivität wurden DK8 Zellen mit dem Vektor pBR322 transformiert.

### 2.2.3.1 Wachstum auf Succinat-/Minimalmedium

Eine einfache Überprüfung der Tryptophanmutanten auf eine aktive ATPase wurde mit Hilfe eines Minimalmediums (Tanaka et al., 1967) mit Succinat als Kohlenstoffquelle durchgeführt (siehe 2.1.2). Dazu wurde der ATPase defiziente Stamm DK8 mit den Plasmiden pBR322, pBWU13 und den modifizierten pBWU13 Plasmiden mittels Hitzeschock transformiert (siehe 2.1.4). Nach einer 60 minütigen Inkubation der Zellen in LB Medium bei 37 °C wurden die Zellen bei 1.500 g<sub>max</sub> für 2 min sedimentiert. Das LB Medium wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 10 mM Tris/HCl pH 8 vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Succinat/Minimalmediumplatten ausgestrichen und bei 37 °C für 2 bis 3 Tage inkubiert.

### 2.2.3.2 Nachweis der Protonentranslokation

Der Nachweis der Protonentranslokation erfolgt an Membranvesikeln über die Messung der Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes ACMA in einem Fluorimeter nach Strotmann (Strotmann et al., 1990). Der unprotonierte Farbstoff kann die Vesikelmembran passieren und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Reaktionsmedium und dem Vesikelinneren ein. Während der ATP Hydrolyse werden Protonen über den F<sub>0</sub>-Komplex ins Vesikelinnere gepumpt und die Farbstoffmoleküle im Vesikelinneren werden protoniert. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht und es diffundieren weitere unprotonierte Farbstoffmoleküle ins Vesikelinnere, wobei dem Reaktionsmedium auf diese Weise ACMA Moleküle Die entzogen werden. daraus resultierende Fluoreszenzlöschung im Reaktionsmedium steht in direkter Abhängigkeit zum Protonengradienten, der durch die Hydrolyseaktivität und die gerichtete Protonentranslokation der ATPase aufgebaut wird.

Die Fluoreszenz wurde durch Licht mit einer Wellenlänge von 410 nm angeregt und über einen Interferenzfilter (495 nm) zu einer Photodiode geleitet. Die Messungen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml Reaktionsmedium mit 100 µg Membranvesikeln/ml bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Nachdem das Grundsignal des Reaktionsansatzes aufgezeichnet worden war, wurde 0,25 µM ACMA zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet. Nach dem Erreichen der maximalen Fluoreszenzabnahme wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µM Nigericin entkoppelt und der Protonengradient aufgehoben. So konnte die unspezifische Fluoreszenzlöschung, die durch Wechselwirkung von ACMA Molekülen mit ATP hervorgerufen wurde, bestimmt werden. Eine präparationsbedingte erhöhte Membranpermeabilität, die den Aufbau des Protonengradienten beeinflussen könnte, wurde durch Messungen mit 0,3 mM NADH durchgeführt. Für die Messungen mit Inhibitor wurden die Membranvesikel mit 50 µM Tentoxin versetzt und 30 min auf Eis vorinkubiert. Dem Reaktionsmedium wurde ebenfalls die entsprechende Menge Tentoxin zugefügt.

Reaktionsmedium:

20 mM	Tricin/NaOH pH 8,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
150 mM	KCl
in H <sub>2</sub> O bidest.	

### 2.2.3.3 ATP-Hydrolysemessungen

Die ATP Hydrolyse wurde an Membranvesikeln, bzw. am solubilisierten ATPase Komplex gemessen. Das Reaktionsmedium entsprach dem der ACMA-Messungen und wurde ebenfalls auf 25 °C temperiert und mit 0,3 mg/ml Membranvesikeln (zusätzlich 1  $\mu$ M Nigericin), bzw. mit 50  $\mu$ g/ml solubilisierter ATPase versetzt. Nach 20 s wurde die Hydrolysereaktion durch Zugabe von 2 mM ATP gestartet. In Intervallen von viermal 15 s wurde dem Reaktionsansatz je ein Aliquot von 150  $\mu$ l entnommen und die Hydrolysereaktion durch Zugabe von 150  $\mu$ l 1 M TCA-Lösung abgestoppt. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 15.000 g<sub>max</sub> und 4 °C sedimentiert. Die Menge an freigesetztem anorganischem Phosphat im Überstand wurde photometrisch bestimmt (Taussky & Shorr, 1953). Dazu wurde der Überstand mit 150  $\mu$ l Farbreagenz versetzt und 1 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und der gebildete Phosphomolybdatkomplex bei 740 nm kolorimetrisch bestimmt. Als Referenz diente eine Eichreihe von 0,1 bis 0,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Farbreagenz zur Phosphatbestimmung:

5 % (w/v) FeSO<sub>4</sub> 1,6 % (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> in 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Für die Messungen mit Tentoxin wurden die Membranvesikel mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen 30 min auf Eis vorinkubiert. Das Reaktionsmedium wurde ebenfalls mit der entsprechenden Konzentration an Tentoxin versetzt. Bei den  $\alpha/\beta$ -Mutanten mit verzögerter Hydrolyse wurde das erste Aliquot erst 45 s nach ATP Zugabe entnommen, so dass die Phosphatfreisetzung im linearen Bereich gemessen werden konnte. Im Fall der K<sub>M</sub>-Wert Bestimmung wurde das Substrat ATP im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 4 mM eingesetzt. Die K<sub>M</sub>-Wert Bestimmung mit Inhibitor erfolgte mit einer Tentoxinkonzentration, die dem doppelten K<sub>I</sub> für die jeweilige Mutante entsprach.

### 2.2.3.4 ATP Synthesemessungen

Die Messung der Syntheseaktivität wurde ebenfalls an invertierten Membranvesikeln durchgeführt. Die Bestimmung des gebildeten ATP erfolgte mit Hilfe eines Biolumineszenz Tests, der die ATP-abhängige Oxidation von Luciferin durch das Enzym Luciferase zugrunde liegt. Mit diesem Nachweis lassen sich auch sehr geringe ATP-Konzentrationen nachweisen.

Das Reaktionsmedium wurde auf 25 °C temperiert und mit 140 µg/ml Membranvesikeln versetzt. Nach 20 s wurden die Vesikel durch Zugabe von 0,3 mM NADH energetisiert und so die Synthesereaktion gestartet. Anschließend wurden fünf Proben von je 100  $\mu$ l in Intervallen von 15 s entnommen, mit 600  $\mu$ l Stopp-Puffer versetzt und in ein Eisbad überführt. Zur Neutralisation wurden die Proben mit 300 µl 1 M KOH versetzt und bis zur ATP Bestimmung bei -20 °C aufbewahrt. Als Kontrolle wurde jeweils eine Messung mit nicht-energetisierten Membranvesikeln durchgeführt. Das Reaktionsmedium enthielt Diadenylyl-Pentaphosphat, das die Aktivität der Adenylat-Kinase hemmt, um eine Konzentrationsveränderung des ADP durch dieses Enzym auszuschließen.

Reaktionsmedium Synthese:

20 mM	Tricin/NaOH pH 8,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
150 mM	KCl
40 µM	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -Di(adenosin-5'-) pentaphosphat
5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
250 μΜ	ADP
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Stopp-Puffer:

50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH pH 7,4
79 mM	NaCl
2,5 % (v/v)	Perchlorsäure
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Die Bestimmung des ATP Gehaltes der Proben wurde mit Hilfe des ATP Bioluminescence Assay Kits CLS II der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) in einem Luminometer (LKB Wallac, Typ 1250) durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Luciferase-Meßpuffer mit 50 µl Luciferase-Lösung versetzt und das Grundsignal mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet. Anschließend wurden 10 μl der ATP-Syntheseproben zugesetzt und der Schreiberausschlag registriert. Als Referenz wurden zu jeder Messung zweimal 5 µl einer 2 µM ATP-Lösung zugegeben.

Luciferase-Meßpuffer:

100 mM	Tris/Acetat pH 7,7
2 mM	EDTA

Luciferase-Lösung:

lyophilisierte Luciferase nach Herstellerangaben mit 10 ml H<sub>2</sub>O bidest. versetzt

Für die Messungen mit Inhibitor wurden die Membranvesikel 30 min auf Eis mit 50 µM Tentoxin vorinkubiert. Das Reaktionsmedium wurde ebenfalls mit 50 µM Tentoxin versetzt.

#### 2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichen Gelen (Laemmli, 1970). Die SDS-Polyacrylamidgele bestanden jeweils aus einem 15 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel.

1
Trenngel 15 %

Tabelle 2.2-1: Zusammensetzung der Gele:

	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
Trenn-/Sammelgelpuffer	32 ml	6 ml
Acrylamidlösung	40 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	7,7 ml	18 ml
TEMED	0,04 ml	0,03 ml
APS	0,25 ml	0,2 ml

Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
0,4 % (w/v)	SDS
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O bidest.

Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland):

 $\begin{array}{ll} 30 \ \% \ (\text{w/v}) & \text{Acrylamid} \\ 0,8 \ \% \ (\text{w/v}) & \text{Bisacrylamid} \\ \text{in } H_2 O \ \text{bidest.} \end{array}$ 

APS:

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H<sub>2</sub>O bidest.

Invertierte Membranvesikel, bzw. die Fraktionen mit der solubilisierten ATPase, wurden mit Probenpuffer versetzt und direkt in die Geltaschen pipettiert. Auf das Kochen der Proben zur Denaturierung wurde in diesem Fall verzichtet, da es das Laufverhalten des Proteolipids im Gel verändert und den immunologischen Nachweis negativ beeinflusst. Zur elektrophoretischen Untersuchung von Proteinkristallen wurden diese in Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 30 mA und 200 V für 14 h. Zur Identifizierung der Molekularmassen der Proteinuntereinheiten wurde der 10 kDa Standard der Firma Gibco BRL Life Technologies (Eggerstein, Deutschland) eingesetzt.

Probenpuffer:

230 mM	Tris/HCl pH 6,8
2 % (w/v)	SDS
36 % (v/v)	Glycerin
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
50 mM	DTT

Elektrodenpuffer:

 0,025 M Tris

 0,192 M Glycin

 0,1 % (w/v) SDS

 in H<sub>2</sub>O bidest.

### 2.2.5 Silberfärbung von Proteingelen

Die hier angewandte Methode der Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 1988) eignet sich besonders gut für den Nachweis von Proteinen in geringer Konzentration, denn die Nachweisgrenze liegt bei 100 pg Protein pro Bande. Mit dieser Methode ließen sich also auch Proteinkontaminationen in gereinigten ATPase Fraktionen nachweisen, die für Kristallisationsansätze von Nachteil sind.

Das Gel wurde dazu nach der Elektrophorese eine Stunde im Fixierer inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation mit Thiosulfat wurde das Gel dreimal 10 min gründlich mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und anschließend 30 min in der Silberlösung inkubiert. Die Silberlösung wurde dekantiert und das Gel kurz gewässert, bevor die Entwicklerlösung zugegeben wurde. Je nach Bandenintensität wurde die Reaktion nach 5 bis 20 min mit Zitronensäure abgestoppt. Nach weiteren 30 min wurde das Gel gewässert und zur Dokumentation gescannt.

Fixierer:

30 % (v/v)	Ethanol, technisch
10 % (v/v)	Essigsäure, technisch
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Inkubator:

30 % (v/v)	Ethanol, technisch
0,5 % (w/v)	Natriumacetat
0,2 % (w/v)	$Na_2S_2O_3$
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Silberlösung:

0,1 % (w/v)	AgNO <sub>3</sub>
0,07 % (v/v)	Formaldehyd
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Entwickler:

Stopplösung:

2,3 M Zitronensäure in H<sub>2</sub>O bidest.

### 2.2.6 Westernblot Analyse

Die Untereinheit c des F<sub>0</sub>-Komplexes wurde mittels Westernblot Analyse (Towbin et al., 1979) immunologisch nachgewiesen. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel wurde eine PVDF Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland) verwendet, die sich vor allem für kleine und hydrophobe Proteine eignet.

Die PVDF Membran und 6 Blatt Gel-Blotting Papier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) wurden auf Größe des Gels zugeschnitten. Die PVDF Membran wurde mit Ethanol benetzt und anschließend zusammen mit 3 Blatt Papier und dem SDS-Gel in Anodenpuffer equilibriert. Anschließend wurde nacheinander das Papier, die PVDF Membran und das Gel luftblasenfrei auf die Anode des Semidry Blot Apparates (Multiphor II, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) gestapelt. Drei weitere Lagen Papier, die zuvor in Kathodenpuffer equilibriert worden waren, wurden dem Aufbau zugefügt und mit der Kathode der Apparatur bedeckt. Für den Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Membran wurde für eine Stunde eine Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran angelegt.

Kathodenpuffer:

20 mM	Tris/HCl pH 9,0
40 mM	ε-Aminocapronsäure
20 % (v/v)	Ethanol, technisch
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Anodenpuffer:

75 mMTris/HCl pH 7,420 % (v/v)Ethanol, technischin H2O bidest.

Zum Nachweis des Proteintransfers wurde die PVDF Membran anschließend für 5 min bei Raumtemperatur in Ponceau-Lösung inkubiert. Zur Entfernung der Hintergrundfärbung wurde die Membran in H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und die Banden des Proteinstandards markiert. Im Anschluss wurde die Membran durch eine Inkubation in TBS entfärbt.

Ponceau-Lösung:

 $\begin{array}{ll} 0,2 \ \% \ (w/v) & \mbox{Ponceau S} \\ 3 \ \% \ (w/v) & \mbox{TCA} \\ \mbox{in $H_2O$ bidest.} \end{array}$ 

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 60 min bei RT oder über Nacht im Kühlraum in der Blocklösung inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen. Zum spezifischen Nachweis der Untereinheit c wurde die Membran für 1 h mit dem Primärantikörper inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Nach der darauf folgenden Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min mit TBS-T und zweimal 5 min in TBS gewaschen.

Die Detektion der Untereinheit c wurde mit Hilfe des BM Chemilumineszenz Blotting Substrats (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PVDF Membran wurde eine Minute mit dem Reagenz inkubiert. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Kodak X-OMAT Film für 1 bis 10 min exponiert. Der Film wurde anschließend 1 min entwickelt (Agfa G150 Entwickler) und nach kurzem Wässern 1 min fixiert (Agfa G334 Röntgen Schnellfixierbad).

TBS (Tris buffered saline):

 $\begin{array}{ll} 50 \text{ mM} & \text{Tris/HCl pH 7,0} \\ 0,9 \% (w/v) & \text{NaCl} \\ \text{in H}_2\text{O bidest.} \end{array}$ 

TBS-T:

0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS

Blocklösung:

1 % (w/v)	Casein
20 mM	NaOH
in TBS	

### Primärantikörper

polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die ATPase Untereinheit c; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Arechaga, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England 1:5.000 verdünnt in TBS, versetzt mit 1 % BSA (Fraction V) und 0,02 % (w/v)

NaN<sub>3</sub>

### Sekundärantikörper

Meerrettich Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) 1:15.000 verdünnt in TBS

### 2.2.7 Reinigung der ATPase über Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung des nativen ATPase Komplexes für die Kristallisation wurden Membranvesikel einer fraktionierten Solubilisierung unterzogen. Im Anschluss wurde der ATPase Komplex durch eine isopyknische Zentrifugation im Glycerin-Dichtegradienten aufgetrennt.

Der ATPase defiziente Stamm DK8 wurde mit dem Plasmid pBWU13 transformiert und in Minimalmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (siehe 2.1.2) angezogen, um eine Überproduktion der ATPase zu erzielen. Dazu wurden 4 1 Minimalmedium mit einer 20 ml LB-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 Upm auf einem Schüttler für ca. 36 h bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 2,0 inkubiert. Die Zellen wurden bei 6.000 g<sub>max</sub> 10 min bei 4 °C sedimentiert, bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70 °C gelagert.

Zur Isolierung der Membranvesikel wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut und in 35 ml TMG Puffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte wie unter 2.2.1

beschrieben. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Membranvesikel in insgesamt 4 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen.

Resuspendierungspuffer:

20 mM	TES/NaOH pH 7,0
0,8 % (v/v)	MonothioGlycerin
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	ADP
in H <sub>2</sub> O bidest.	

In einer fraktionierten Solubilisierung wurden anschließend durch Zugabe von 0,8 % Octyl-β-D-glucopyranosid (w/v)zunächst Oberflächenproteine von den Membranvesikeln abgelöst. Dazu wurden die Membranvesikel 2 min bei 37 °C inkubiert, 4 min geschüttelt, erneut 1 min bei 37 °C inkubiert und 1 min geschüttelt. Die abgelösten Proteine wurden durch eine 60 minütige Ultrazentrifugation bei 330.000 g<sub>max</sub> und 4 °C von den Membranvesikeln getrennt. Die Vesikel wurden anschließend erneut in 4 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen, mit 2 % (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid versetzt und wie vorher beschrieben inkubiert. In einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt wurden die solubilisierten F<sub>O</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe von den Membranpartikeln abgetrennt. Der Überstand wurde auf 6 Glyceringradienten von je 35 ml verteilt, deren einzelne Stufen Konzentrationen von 10, 14, 18, 22 und 25 % Glycerin aufwiesen. Die Glycerinstufen wurden (v/v)in 1 % Resuspendierungspuffer angesetzt und enthielten zusätzlich (w/v)Octyl-β-D-glucopyranosid. Nach einer 20 stündigen Zentrifugation bei 100.000 g<sub>max</sub> und 4 °C wurden die Gradienten in 1 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE untersucht (siehe 2.2.4).

### 2.2.8 Reinigung der ATPase über Metallchelatchromatographie

Eine weitere Reinigung des ATPase Komplexes erfolgte über einen 6fachen Histidin-Tag am N-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit. Für die Anzucht wurden DK8 Zellen mit dem Plasmid pSK11 transformiert, wie unter 2.2.7 beschrieben kultiviert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Zellpellet wurde bei 37 °C aufgetaut, in TMG Puffer (1,5 ml/g Zellen) aufgenommen und daraus invertierte Membranvesikel isoliert (siehe 2.2.1). Nach der Ultrazentrifugation wurden die Membranvesikel in 4 ml Isolationsmedium aufgenommen.

Komplexe erfolgte (wie in 2.2.7) mit Die Solubilisierung der ATPase 1,5 % Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid durch Zugabe oder von (w/v)n-Dodecyl-B-D-maltosid unter Rühren mit anschließender 30 minütiger Inkubation bei 4 °C. Die solubilisierten Proteine wurden von der Membranfraktion durch eine Ultrazentrifugation von 60 min bei 278.000 gmax und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend für die Reinigung der ATPase Komplexe mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) eingesetzt. Hierzu wurde das TALON Metal Affinity Resin der Firma Clontech (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Nach einer Equilibrierung des TALON Materials mit dem 10fachen Volumen an Isolationsmedium wurden die solubilisierten Proteine 20 min auf einem Taumelschüttler mit dem Säulenmaterial inkubiert. Nach dem Absetzen des Materials in einer Säule wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit dem 20fachen Säulenvolumen an Waschpuffer entfernt. Die Elution der spezifisch gebundenen ATPase Komplexe erfolgte in 10 ml Stufen mit 20, 40, 60, 80, 100 und 150 mM Imidazol in Elutionspuffer. Je 50  $\mu$ l der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden anschließend zur Analyse auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.2.4). Das Imidazol wurde anschließend durch einen Regenerationspuffer von der Säule entfernt. Nach dem Waschen des Materials mit 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O bidest. wurde das TALON in 20 % (v/v) Ethanol bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Isolationsmedium:

20 mM	TES/NaOH pH7,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
150 mM	KCl
0,5 % (w/v)	ε-Aminocapronsäure
10 % (v/v)	Glycerin
0,002 % (w/v)	PMSF
in H <sub>2</sub> O bidest.	

Waschpuffer:

0,04 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid in Isolationsmedium

Elutionspuffer:

0,04 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid 20 - 150 mM Imidazol in Isolationsmedium

Regenerationspuffer:

20 mM	MES/HCl pH 5,0
100 mM	NaCl
in H <sub>2</sub> O bidest.	

### 2.2.9 Gelfiltrationschromatographie

An die Reinigung über IMAC wurde eine Gelfiltration angeschlossen. Als Material wurde Sephacryl S-300-HR (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit einem Trennbereich von 10 bis 1.500 kDa verwendet. Das Material wurde in einer Säule von 30 cm Länge und 1 cm Durchmesser an das Pharmacia HiLoad System (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) angeschlossen und mit einer Flußrate von 0,2 ml/min mit dem 3fachen Säulenvolumen an Gelfiltrationspuffer equilibriert. Zur Überprüfung der Qualität der Säule wurde Dextranblau (2.000 kDa) in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt. Nach der Analyse der Elutionsfraktionen (siehe 2.2.8) über SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit den geringsten Verunreinigungen gesammelt. Eine Konzentrierung bis auf ca. 500 µl Proteinlösung erfolgte mit Fugisep Maxi Ultrafiltrationseinsätzen (Intersep, Witten, Deutschland) über eine Polyethersulfonmembran mit einer molekularen Ausschlussgröße von 100 kDa. Die Proteinlösung wurde anschließend auf die Sephacryl Säule aufgetragen und mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min aufgetrennt. Die Elution der Proteine von der Säule wurde mit Hilfe einer UV-Lampe bei 280 nm detektiert. Mit einem Fraktionssammler wurden Aliquots von 500 μl gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Gelfiltrationspuffer:

20 mM	TES/NaOH pH 7,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
150 mM	KCl
10 % (v/v)	Glycerin
0,04 % (w/v)	n-Dodecyl-β-D-maltosid
0,5 % (w/v)	ε-Aminocapronsäure
0,002 % (w/v)	PMSF
0,02 % (w/v)	NaN <sub>3</sub>

### 2.2.10 Kristallisationsansätze

Die Kristallisationsexperimente wurden mit  $EF_0F_1$ -Komplexen durchgeführt, die zuvor über den Hexahistidin-Tag an Untereinheit  $\beta$  isoliert und durch die Gelfiltration weiter gereinigt worden waren. Die Fraktionen, die den vollständigen, homogenen ATPase Komplex enthielten, wurden gesammelt und mit einem Fugisep Maxi Ultrafiltrationseinsatz (Intersep, Witten, Deutschland) eingeengt. Die konzentrierte Proteinlösung wurde dreimal mit Kristallisationspuffer gewaschen und die Proteinkonzentration auf ca. 10 mg/ml eingestellt.

Kristallisationspuffer:

20 mM	TES/NaOH pH 7,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 % (v/v)	Glycerin
0,5 % (w/v)	ε-Aminocapronsäure
0,002 % (w/v)	PMSF
0,02 % (w/v)	NaN <sub>3</sub>
0,1 % (w/v)	n-Dodecyl-β-D-maltosid

Zur Stabilisierung des Proteins wurde die Lösung 30 min mit 2 mM AMP-PNP und 0,08 mM ADP auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 12.000  $g_{max}$  abzentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Für die Kristallisationsansätze wurde das Microbatch Verfahren angewandt (d'Arcy et al., 1996). Dabei wurde je 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Screening Puffer verschiedener Hampton Research Kristallisations Kits (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 10 °C. Um die ATPase

Komplexe zusätzlich zu stabilisieren, wurden verschiedene Inhibitoren der ATPase als Additive eingesetzt.

Hampton Research Kristallisations Kits (Hampton Research, Laguna Niguel, USA):

Crystal Screen 2 Crystal Screen 2 Crystal Screen Lite Crystal Screen Cryo MembFac Natrix PEG/Ion Screen Grid Screen Ammonium Sulfate Grid Screen MPD Grid Screen PEG 6000 Quik Screen

Additive (Endkonzentration im Ansatz):

50 µM	DCCD
0,01 % (w/v)	Efrapeptin
100 µM	Dequaliniumchlorid
20 µM	Aurovertin
50 µM	Quinacrine Mustard
0,15 mM ScCl <sub>3</sub>	/ 5 mM NaF/ 1,25 mM MgSO <sub>4</sub> / 0,5 mM ADP

Die Überprüfung der Kristalle erfolgte mit einem Farbstoff (Izit Crystal Dye, Hampton Research, Laguna Niguel, USA), der in die Lösungsmittelkanäle von Proteinkristallen eindringen kann und diese blau färbt, wogegen Salzkristalle ungefärbt bleiben. Für eine Analyse über SDS-PAGE wurden die Kristalle den Ansätzen entnommen und dreimal im entsprechenden Hampton Screening Puffer gewaschen, um Proteinreste zu entfernen. Anschließend wurden die Kristalle in Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.2.4).

### 3 Ergebnisse

## 3.1 Indirekte Strukturanalyse: Mutagenesestudien am Proteolipid

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen können dazu dienen sowohl die Funktion als auch die Struktur der ATPase zu charakterisieren. Dazu werden durch Mutagenesen gezielte Veränderungen an der ATPase vorgenommen. Veränderte biochemische Eigenschaften der Mutanten können Aufschlüsse über die räumliche Anordnung von Untereinheiten im ATPase Komplex geben, wie z.B. die Ausrichtung der c-Monomere im Proteolipidring.

### 3.1.1 Prinzip der Tryptophan-Substitutionsmutagenese

Durch den gezielten Austausch von Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Untereinheit c durch Tryptophan sollten Kontaktstellen benachbarter c-Monomere identifiziert werden. Tryptophan ist eine relativ voluminöse und leicht hydrophobe Aminosäure, deren Einbau in die c-Monomere des Proteolipidringes toleriert werden sollte, wenn der Rest nach außen zur Lipidphase ausgerichtet ist. In diesem Fall bewirkt die Mutation keine räumlichen Konflikte mit benachbarten c-Monomeren, wie es im Modell in Abbildung 3.1-1 A gezeigt ist, und sollte daher keinen Einfluss auf die Aktivität der Mutante haben.



#### Abbildung 3.1-1: Prinzip der Tryptophanmutagenese

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem Modell des Proteolipidrings in Aufsicht mit je drei c-Monomeren: N- und C-terminale  $\alpha$ -Helices sind jeweils durch eine hydrophile Schlaufe verbunden, das eingefügte Tryptophan ist hervorgehoben. **A**: Die Tryptophane rufen an dieser Position keine sterischen Konflikte hervor, die Mutante ist funktionell. **B**: Die Tryptophane rufen intermolekulare sterische Konflikte hervor, die Mutante ist nicht oder nur eingeschränkt funktionell.

Befindet sich das Tryptophan in einer Position der N-terminalen  $\alpha$ -Helix, die zum benachbarten c-Monomer ausgerichtet ist, kommt es zu einer räumlichen Behinderung innerhalb des Proteolipidringes, die sich auf die Funktionalität der Mutante auswirken sollte (Abbildung 3.1-1 B). Eine eingeschränkte oder fehlende Aktivität ist auch zu erwarten, wenn das Tryptophan zur C-terminalen Helix desselben Monomers ausgerichtet ist und es so zu intramolekularen Störungen kommt. Auf diese Weise sollte die Aktivität der Mutanten Hinweise auf die Zugänglichkeit der ausgewählten Positionen und mögliche inter- oder intramolekulare Kontaktstellen geben.

Mit Hilfe der NMR-Struktur des c-Monomers (Girvin et al., 1998) können die Positionen des Aminosäureaustausches verdeutlicht werden. In Abbildung 3.1-2 ist die Haarnadelstruktur des c-Monomers dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerung des N-terminalen Bereichs zeigt das  $C_{\alpha}$ -Rückgrat mit den Positionen, in denen die Aminosäurereste gegen Tryptophan ausgetauscht wurden.



#### Abbildung 3.1-2: Positionen der Tryptophansubstitution im c-Monomer

*NMR-Struktur* des c-Monomers (PDB-Eintrag 1A91). Die Ausschnittsvergrößerung des *N-terminalen* Bereiches zeigt die C $\alpha$ - Atome, an denen die Reste durch Tryptophan ersetzt wurden. Die Beschriftung gibt die native Aminosäure und deren Positionsnummer an.

Die nativen Aminosäurereste nehmen in allen Fällen ein kleineres Volumen ein als das eingefügte Tryptophan mit 227,8 Å<sup>3</sup> (Zamyatin, 1972). Glycin (Position 18 und 23) sowie Alanin (Position 12, 13, 14, 20, 21 und 24) haben ein relativ kleines Oberflächenvolumen von 60,1 Å<sup>3</sup>, bzw. 88,6 Å<sup>3</sup>. Valin in Position 15 hat ein

Volumen von 140 Å<sup>3</sup> und auch die Reste Methionin in Position 16 und 17 (162,9 Å<sup>3</sup>), Leucin in Position 19 (166,7 Å<sup>3</sup>) und Isoleucin in Position 22 (166,7 Å<sup>3</sup>) weisen ein geringeres Seitenkettenvolumen als Tryptophan auf. Es ist demnach zu erwarten, dass der Einbau des Tryptophan an inter- und intramolekularen Kontaktstellen Auswirkungen auf die Anordnung der c-Monomere im Proteolipidring hat.

Die Aminosäuresubstitution durch Tryptophan wurde jeweils an nur einer Position pro Mutante vorgenommen. In zwei aufeinander folgenden PCR Schritten wurde ein 1,2 kb Fragment mit dem entsprechenden Basenaustausch amplifiziert, das in den Vektor pBWU13 eingeführt wurde. Die Expression von pBWU13 im ATPase defizienten Stamm DK8 führt zu einer zehnfach höheren Aktivität im Vergleich zu einem Stamm, der nur die chromosomale ATPase exprimiert (Moriyama et al., 1991). Daher eignet sich dieses System besonders zum Nachweis von Änderungen in der ATPase Aktivität durch eingeführte Mutationen.

### 3.1.2 Immunologischer Nachweis der Untereinheit c

Der Austausch von Aminosäureresten durch den großen, leicht hydrophoben Tryptophanrest kann sich bereits auf die Faltung der c-Monomere, deren Zielsteuerung zur Membran oder die Assemblierung des Proteolipidringes auswirken (Groth et al., 1998). Eine fehlende ATPase Aktivität ließe sich dann nicht ausschließlich auf eine Veränderung der molekularen Kontakte im Proteolipidring zurückführen. Daher wurde zunächst die Expression der Untereinheit c und deren Einbau in die Membran immunologisch nachgewiesen.

Membranvesikel vom Wildtyp pBWU13, vom Kontrollplasmid pBR322, das keine ATPase exprimiert, und von den Tryptophan-Substitutionsmutanten wurden zu gleichen Proteinmengen in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF Membran übertragen und mit einem Antikörper gegen die Untereinheit c analysiert (siehe 2.2.6). Der Westernblot in Abbildung 3.1-3 zeigt für alle Vesikel ein schwaches Signal, das einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa zuzuordnen ist, wobei es sich um eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers handelt. Ein viel deutlicheres, spezifisches Signal ist für den Wildtyp (Bahn 1 und 17) und die Mutanten (Bahn 3 bis 15) zu beobachten, das dem c-Monomer mit einem apparenten Molekulargewicht von 6,5 kDa entspricht, während die Kontrollvesikel in Bahn 2 und 16 kein Signal

aufweisen. Die Signale lassen außerdem darauf schließen, dass die c-Monomere der Mutanten in etwa der gleichen Menge exprimiert werden wie die des Wildtyps. Die Westernblot Analyse zeigt weiterhin, dass in allen Mutanten der Einbau des Tryptophans keinen Einfluss auf die Stabilität der c-Monomere und deren korrekten Einbau in die Membran hat. Demnach sind alle Effekte, die in den nachfolgenden ATPase Aktivitätsmessungen zu beobachten sind, auf eine Beeinflussung der Anordnung der c-Monomere im Ring zurückzuführen.





Westernblot Analyse der Membranvesikel von Wildtyp, Kontrolle und Tryptophanmutanten. Der immunologische Nachweis wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen die Untereinheit c der E. coli ATPase durchgeführt. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes erfolgte anhand des Molekulargewichtmarkers (links). Bahn 1 und 17: Wildtyp; Bahn 2 und 16: ATPase defiziente Kontrolle; Bahn 3: cA12W; Bahn 4: cA13W; Bahn 5: cA14W; Bahn 6: cV15W; Bahn 7: cM16W; Bahn 8: cM17W; Bahn 9: cG18W; Bahn 10: cL19W; Bahn 11: cA20W; Bahn 12: cA21W; Bahn 13: cl22W; Bahn 14: cG23W; Bahn 15: cA24W.

### 3.1.3 Wachstum der Tryptophanmutanten auf Minimalmedium

Das Wachstum der Tryptophanmutanten auf Minimalmedium mit Succinat als Kohlenstoffquelle dient als vorläufiger Test der Mutanten auf eine funktionierende oxidative Phosphorylierung mit intakter ATPase. Dazu wurde das Kontrollplasmid pBR322, der Wildtyp pBWU13 und die entsprechenden pBWU13 Derivate mit den Tryptophanmutationen in den ATPase defizienten Stamm DK8 transformiert und für zwei bis drei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium-Platten inkubiert (siehe 2.2.3.1). Die ATPase defiziente Kontrolle zeigte erwartungsgemäß kein Kolonienwachstum, da aus der Kohlenstoffquelle Succinat aufgrund der fehlenden ATPase keine Energie gewonnen werden kann. Das Wachstum des Wildtyps und der Mutanten ist in Tabelle 3.1-1 aufgeführt. Ein mit dem Wildtyp vergleichbares Kolonienwachstum war für die Mutanten cA12W, cA14W, cV15W, cM16W, cM17W, cL19W und

cI22W zu beobachten, wobei nach weiteren drei Tagen Inkubation die Kolonien der Mutanten cA12W und cA14W deutlich kleiner blieben als die übrigen Kolonien. Die Mutanten cA13W, cG18W, cA20W, cA21W, cG23W und cA24W wiesen dagegen kein Wachstum auf. Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Mutanten die Protonentranslokation durch den F<sub>0</sub>-Bereich, die eine Voraussetzung für die ATP-Synthese darstellt, durch eine strukturelle Störung des Proteolipidringes blockiert ist.

Mutante	WT	cA12W	cA13W	cA14W	cV15W	cM16W	cM17W
Wachstum	+	±	-	±	+	+	+
Mutane	cG18W	cL19W	cA20W	cA21W	cI22W	cG23W	cA24W

**Tabelle 3.1-1: Wachstum der Tryptophanmutanten auf Succinat/Minimalmedium** Nach 2 bis 3 Tagen wurde das Wachstum der Mutanten kontrolliert und mit dem Wildtyp, bzw. mit der Kontrolle ohne ATPase (kein Wachstum, nicht aufgeführt) verglichen. "+" bedeutet Wachstum; "-" bedeutet kein Wachstum auf Succinat/Minimalmedium; "±" steht für verlangsamtes Wachstum nach weiteren drei Tagen Inkubation.

### 3.1.4 Auswirkung der Tryptophanmutationen auf die Protonentranslokation

Methode Überprüfung Eine sehr sensitive zur der Auswirkung des Tryptophaneinbaus auf die Assemblierung des Proteolipidringes und damit die Funktionalität des gesamten membrandurchspannenden Fo-Bereiches stellt die Messung der Protonentranslokation dar. Der durch ATP-Hydrolyse aufgebaute Protonengradient wurde an invertierten Membranvesikeln (siehe 2.2.1) über die Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes ACMA quantifiziert (siehe 2.2.3.2). In Abbildung 3.1-4 sind ausgewählte ACMA-Quench Kurvenverläufe dargestellt: Der ACMA-Quench des Wildtyps (A) - von der Grundfluoreszenz bis zum Endsignal nach Zugabe des Entkopplers Nigericin - wird dabei als Bezugsgröße verwendet. Die Mutante cA13W (B) zeigt keinen Quench, wie auch die pBR322 Vesikel, die keine ATPase enthalten und bei jeder Messung als Kontrolle eingesetzt werden (nicht abgebildet). Mutante cV15W (C) ist ein Beispiel für eine funktionelle Mutante, bei der der Protonengradient fast im gleichen Maße wie beim Wildtyp aufgebaut wird. Dagegen zeigt die Mutante cM17W (D) eine eingeschränkte Protonentranslokation.



#### Abbildung 3.1-4: ATP induzierte Protonentranslokation

Ausgewählte ACMA-Quench Kurvenverläufe von Wildtyp (**A**), cA13W (**B**), cV15W (**C**) und cM17W (**D**). Nach Aufzeichnung des Grundsignals und Zugabe des Farbstoffes ACMA wird die Protonentranslokation mit ATP gestartet und bis zur Einstellung des Gleichgewichtes aufgezeichnet. Die Messung wird durch Zugabe des Entkopplers Nigericin (Nig.) beendet, wobei die Differenz zur Grundlinie die maximale Fluoreszenz darstellt und als Bezugsgröße dient.

Um auszuschließen. dass eine präparationsbedingte, unspezifische Protonenpermeabilität der Membranvesikel der Protonentranslokation entgegenwirkt, wurde in Vergleichsmessungen ein respiratorischer Protonengradient mit NADH aufgebaut. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich aber für keine der Tryptophanmutanten eine signifikante Abnahme des NADH induzierten Protonengradienten (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass ein Verringerung des ATP **ACMA-Quenches** induzierten auf eine Veränderung des protonentranslozierenden F<sub>O</sub>-Komplexes zurückzuführen ist. Alle Messungen wurden an mindestens drei unterschiedlichen Membranvesikelpräparationen durchgeführt und sind in Abbildung 3.1-5 zusammengefasst. Zum Vergleich wurde die Fluoreszenzlöschung des Wildtyps als 100 % definiert und die Kurven der Mutanten in Relation dazu gesetzt. Die Tryptophansubstitutionen in den Positionen 15, 19 und 22 rufen nur geringe Effekte in Bezug auf die Protonentranslokation hervor. Diese Mutanten zeigen mit 90 %, 83 % und 90 % einen ähnlichen Protonengradienten wie der Wildtyp. Für die Mutanten cM16W und cM17W wurden mit 71 % und 51 % reduzierte Aktivitäten detektiert. Eine stark eingeschränkte Protonentranslokation, die nur geringfügig über dem gemessenen Hintergrund der Kontrolle liegt, wurde für die Mutanten cA12W und cA14W nachgewiesen. An den Membranen der Mutanten cA13W, cG18W, cA20W, cA21W, cG23W und cA24W wurden keine Protonengradienten aufgebaut, was darauf hindeutet, dass das

Tryptophan in diesen Positionen eine wesentliche Störung im Aufbau und somit der Funktion des Proteolipidringes hervorruft.



# Abbildung 3.1-5: Protonentranslokation der Tryptophanmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Zusammenfassung der Messungen zur ATP induzierten Protonentranslokation. Gemessen wurde die Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes ACMA: die Fluoreszenzlöschung der Tryptophanmutanten wurde in Relation zur Fluoreszenzlöschung des Wildtyps (WT) gesetzt. Die Fluoreszenzlöschung steht in direkter Korrelation mit dem durch den F<sub>0</sub>-Komplex aufgebauten Protonengradienten.

### 3.1.5 Auswirkung der Tryptophanmutationen auf die ATP-Hydrolyse

Die Tryptophanmutationen im c-Monomer können sich nicht nur auf die Anordnung und Funktionalität der Untereinheiten im F<sub>O</sub>-Bereich sondern auch die Wechselwirkung des  $F_0$ - mit dem  $F_1$ -Komplex auswirken. So kann eine Veränderung des Proteolipidringes möglicherweise die Assemblierung der F<sub>1</sub>-Untereinheiten an den F<sub>0</sub>-Komplex beeinflussen und zu einer Veränderung der ATP-Hydrolyseaktivität des F<sub>1</sub>-Komplexes führen. Die ATP-Hydrolyse wurde über die Freisetzung von anorganischem Phosphat bestimmt (siehe 2.2.3.3). Die Messungen wurden mit mindestens drei verschiedenen Membranvesikelpräparationen (siehe 2.2.1) durchgeführt und die Hydrolyseraten der Tryptophanmutanten in Relation zur Rate des Wildtyps gesetzt. Als Kontrolle diente das Plasmid pBR322. Die Rate des freigesetzten Phosphats in diesen ATPase freien Vesikeln wurde als Grundwert von den Hydrolyseraten der übrigen Vesikel subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1-6 zusammengefasst.



**Abbildung 3.1-6: ATP-Hydrolyse der Tryptophanmutanten im Vergleich zum Wildtyp** Die ATP-Hydrolyseraten wurden an Membranvesikeln über die Freisetzung von anorganischem Phosphat gemessen. Die Aktivität des Wildtyps (WT) lag bei  $0,30 \pm 0,05 \mu$ mol Phosphat/(mg\*min).

Für die Mutanten cL19W und cI22W wurden Hydrolyseraten von 96 % und 95 % gemessen, die dem Wildtyp entsprechen. Reduzierte Hydrolyseaktivitäten von 76 %, 53 % und 48 % lagen bei den Mutanten cV15W, cM16W und cM17W vor. Die Substitution der Alaninreste in Position 12, 14 und 21 durch Tryptophan bewirkte einen deutlichen Rückgang der Hydrolyserate auf 14, 12 und 10 % im Vergleich zum Wildtyp. Für die Mutanten cA13W, cG18W, cA20W, cG23W und cA24W wurden Aktivitäten von unter 10 % gemessen. Dabei handelt es sich jedoch vermutlich um eine unspezifische Hintergrundaktivität des Messsystems.

### 3.1.6 Übertragung der Ergebnisse auf die Struktur des c-Monomers

Ausgehend von den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen lassen sich die Auswirkungen der Tryptophanmutationen in drei Klassen zusammenfassen:

Tryptophan in Position:	ATPase Aktivität:
15, 19 und 22	keine oder nur geringe Einschränkung
16 und 17	reduziert aktiv
12, 13, 14, 18, 20, 21, 23 und 24	stark eingeschränkt oder inaktiv

Für eine bessere Einordnung der Ergebnisse in den strukturellen Aufbau des Proteolipids wurden diese drei Bereiche in den NMR-Strukturen des c-Monomers bei pH 5 (Girvin et al., 1998) und pH 8 (Rastogi & Girvin, 1999) farblich markiert dargestellt (siehe Abbildung 3.1-7 und Abbildung 3.1-8). Mit dem Programm Swiss-PDB-Viewer (Guex & Peitsch, 1996) wurden in den NMR-Strukturen des c-Monomers an den entsprechenden Positionen die nativen Aminosäuren durch Tryptophanreste ersetzt, wobei jeweils das sterisch günstigste Rotamer gewählt wurde. Daraus ergeben sich im Kontext mit den Aktivitätsmessungen Anhaltspunkte, an welchen Positionen inter- oder intramolekulare Kontakte die beobachteten Funktionsstörungen hervorrufen.

Abbildung 3.1-7 A zeigt eine Übersicht über kritische Positionen (rot dargestellt) im protonierten c-Monomer. An diesen Positionen rufen die eingebauten Tryptophane wesentliche Funktionsstörungen hervor. Der blau dargestellte Bereich entspricht der Position 16 (Position 17 wird verdeckt), an der ein Tryptophaneinbau nur einen mäßigen Effekt bewirkt. Der grün markierte Bereich zeigt die Stellen, an denen Tryptophane die Funktion nicht beeinflussen. Dieser Bereich liegt genau entgegengesetzt zu der C-terminalen Helix und scheint eine hohe Zugänglichkeit zu haben, was auch in der Darstellung in Abbildung 3.1-7 B gut zu erkennen ist. Für diesen Bereich lassen sich Konflikte durch intramolekularen Kontakt ausschließen. In Abbildung 3.1-7 C sind die Mutationen dargestellt, aus denen eine verminderte Aktivität resultiert. In beiden Positionen drehen sich die Tryptophane von der gegenüberliegenden und scheinen ebenfalls keinen Helix weg somit intramolekularen Konflikt zu bewirken. Die rot dargestellten Tryptophane in Abbildung 3.1-7 D bis F, die zum Funktionsverlust führen, grenzen entweder an die C-terminale Helix an oder sind in entgegengesetzten Positionen angeordnet, aus denen sich evtl. Kontakte zu benachbarten Untereinheiten ergeben. Die Wahrscheinlichkeit eines sterischen Konfliktes innerhalb des c-Monomers kann mit Hilfe des Programmes Swiss-PDB-Viewer bestimmt werden. Dabei geben positive Werte sterische Konflikte des Rotamers mit anderen Seitenketten oder dem Peptidrückgrat an, negative Werte sind ein Indiz dafür, dass keine strukturellen Störungen vorliegen. Bei einer Überprüfung dieser Werte für das c-Monomer ergaben sich positive Werte nur für die Positionen 13, 20 und 24, womit diese Positionen für intramolekulare Konflikte in Frage kommen.



## Abbildung 3.1-7: Mögliche Rotamere der eingefügten Tryptophanreste im c-Monomer bei pH 5

Die Darstellungen basieren auf den NMR-Strukturdaten des c-Monomers bei pH 5 (PDB-Eintrag 1A91). A: Haarnadelstruktur des c-Monomers. Markiert sind die Positionen, in denen das Tryptophan keinen Effekt (grün), einen mäßigen Effekt (blau) oder einen starken Effekt (rot) hervorruft. B bis F: Ausschnitt aus dem Mutationsbereich in Aufsicht. Die farbigen Markierungen entsprechen den Zuordnungen in A, der Bereich der gegenüberliegenden C-terminalen Helix ist grau dargestellt. Die Mutationen wurden mit dem Programm Swiss-PDB-Viewer (Guex & Peitsch, 1996) simuliert. Für eine bessere Übersicht sind in dieser Darstellung zwei bis drei Mutationen gleichzeitig angezeigt.



## Abbildung 3.1-8: Mögliche Rotamere der eingefügten Tryptophanreste im c-Monomer bei pH 8

**A**: NMR-Struktur des c-Monomers bei pH 8 (PDB-Eintrag 1C99) mit Markierung der Positionen, an denen die eingefügten Tryptophanreste einen starken Effekt (rot), eine mäßigen Effekt (blau) oder keinen Effekt (grün) bewirken. **B** bis **F**: Ausschnitt aus dem Mutationsbereich in Aufsicht. Die farbliche Zuordnung der Reste entspricht der Darstellung in A, die gegenüberliegende C-terminale Helix ist grau dargestellt. Die Mutationen wurden mit dem Programm Swiss-PDB-Viewer simuliert.

In Abbildung 3.1-8 A ist die Konformationsänderung der deprotonierten Form des c-Monomers in Bezug auf die C-terminale Helix zu erkennen. Durch die stärker abgewinkelte Form wird der Abstand der C-terminalen Helix zu dem Mutationsbereich der N-terminalen Helix deutlich größer. Die Ausrichtung der Tryptophanreste, die keine Auswirkung auf die Funktionalität haben (Abbildung 3.1-8 B), ist auch hier der C-terminalen Helix entgegengesetzt. Die Tryptophanreste in den Positionen 16 und 17 (Abbildung 3.1-8 C) sind zu beiden Seiten weggedreht, scheinen aber einen größeren Abstand zur C-terminalen Helix zu haben als in der protonierten Struktur. In Abbildung 3.1-8 D bis F sind die Positionen dargestellt, in denen die Tryptophanreste einen Funktionsverlust hervorrufen. In den Positionen 14, 18 und 21 sind die Reste ebenfalls entgegengesetzt zur gegenüberliegenden Helix ausgerichtet und kommen eher für kritische Kontakte mit benachbarten Untereinheiten in Frage. Eine Bestimmung der möglichen intramolekularen sterischen Konflikte mit dem Programm Swiss-PDB-Viewer zeigte nur für den Rest A24W positive Werte. In der deprotonierten Form ergibt sich für alle übrigen Tryptophanreste für die Anordnung im Monomer ein sterischer Vorteil, insbesondere für die Reste A13W und A20W, die in der protonierten Form wahrscheinlich strukturelle Störungen innerhalb des Monomers hervorrufen.

### 3.2 Direkte Strukturanalyse: Kristallisation des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>

Der Vorteil der Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen liegt darin, dass sich aus den Daten ein dreidimensionales Bild des Proteins berechnen lässt. Bei ausreichend hoher Auflösung ließe sich dann für die *E. coli* ATPase die genaue Anzahl der c-Monomere bestimmen und deren Orientierung im Proteolipidring detektieren. Voraussetzungen für die Kristallisation von Proteinen ist eine hohe Reinheit der Präparation, deren Homogenität und Monodispersität.

### 3.2.1 Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> über Dichtegradientenzentrifugation

Die Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes erfolgte mit dem Plasmid pBWU13 im ATPase defizienten Stamm DK8 in Anlehnung an das Protokoll von Moriyama et al. (1991). Für eine kontrollierte Überproduktion der ATPase wurden die Zellen in Minimalmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle angezogen. Die EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe wurden invertierten Membranvesikeln aus mit Octyl-B-D-glucopyranosid (Octylglucosid) solubilisiert und in einem Glycerin-Dichtegradienten aufgetrennt (siehe 2.2.7).

Das silbergefärbte Gel in Abbildung 3.2-1 zeigt die Verteilung der solubilisierten Proteine im Gradienten. Ausgehend von dem aufgetragenen Molekulargewichtsmarker lassen sich Banden den Untereinheiten des  $F_0F_1$ -Komplexes zuordnen.



#### Abbildung 3.2-1: SDS-PAGE der Glycerin-Gradientenfraktionen

Dargestellt ist ein silbergefärbtes 15 %iges SDS-Gel, auf das je 50 µl der gesammelten Fraktionen aufgetragen wurde. Der Glyceringradient wurde in 1 ml Fraktionen von der höchsten Stufe ausgehend gesammelt, die entsprechenden Fraktionen sind über den Bahnen angegeben. Die Fraktionen 12 bis 18 liegen etwa im Bereich der 18 % Glycerinstufe, die Fraktionen 19 bis 25 entsprechen der 14 % Glycerinstufe und die Fraktionen 26 bis 34 entsprechen der 10 % Glycerinstufe. Die Zuordnung der Banden erfolgte mit Hilfe des 10 kDa Molekulargewichtsmarkers.

Im Bereich der Fraktionen 18 bis 24, die etwa der 14 % igen Glycerinstufe entsprechen, sind alle Untereinheiten des F<sub>0</sub>- und des F<sub>1</sub>-Bereiches zu sehen. Die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  (55 kDa, bzw. 50 kDa) werden in diesem 15 % igen Gel nicht deutlich getrennt und erscheinen als eine Bande. Weiterhin lassen sich die Untereinheiten  $\gamma$  (31 kDa),  $\delta$  (19 kDa) und b (17 kDa) identifizieren. Untereinheit a (30 kDa) weist aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften ein anderes Laufverhalten im Gel auf als der entsprechende Molekulargewichtsmarker und ist als Bande zwischen 20 und 30 kDa zu erkennen. Unterhalb der Bande, die der Untereinheit  $\epsilon$  (15 kDa) entspricht, ist eine weitere Bande zu sehen, bei der es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt handelt. Die Untereinheit c weist das geringste Molekulargewicht auf (8,3 kDa) und ist ebenfalls als sehr deutliche Bande im unteren Bereich des Gels zu erkennen. Obwohl mit diesem Verfahren alle Untereinheiten des ATPase Komplexes isoliert werden können, ist die Reinheit für Kristallisationsexperimente nicht ausreichend. So sind im Bereich von 60 kDa, 80 kDa und 100 kDa zusätzliche Banden zu erkennen, bei denen es sich möglicherweise um Aggregate von Untereinheiten wie z.B.  $\alpha$  und  $\gamma$  handeln kann. Auch unterhalb der Untereinheiten  $\gamma$  und a sind schwache Banden zu erkennen, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln könnte. Weiterhin ist im Bereich von 10 kDa eine wesentliche Verunreinigung zu sehen, die zwar stärker in die Fraktionen geringerer Dichte verschoben ist, aber auch in den EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> enthaltenden Fraktionen als schwache Doppelbande zu erkennen ist.

Für diese Reinigung wurden ca. 4 g Zellen verarbeitet. Nach der Solubilisierung wurden 4,6 mg Protein auf die Gradienten geladen. Die Proteinausbeute an gereinigtem  $EF_0F_1$ -Komplex aus den gesammelten Fraktionen 19 bis 23 lag bei 2,8 mg Protein.

### 3.2.2 Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> über Metallchelatchromatographie

Für die Reinigung des  $EF_0F_1$ -Komplexes über immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) wurde das Plasmid pSK11 im Stamm DK8 eingesetzt. Es kodiert für einen ATPase Komplex, der am N-Terminus der β-Untereinheit sechs Histidine trägt. Die Solubilisierung wurde wie in 3.2.1 über Glycerin-Dichtegradienten mit Octylglucosid vorgenommen (siehe 2.2.7). Die Reinigung erfolgte mit TALON (Clontech, Heidelberg, Deutschland). Die solubilisierten Proteine wurden für 20 min mit dem TALON Material inkubiert, um eine Bindung der  $EF_0F_1$ -Komplexe über den Histidin-Tag zu ermöglichen (siehe 2.2.8). Das Entfernen der unspezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit 10 mM Imidazol im Waschpuffer, spezifisch gebundene Komplexe wurden mit 150 mM Imidazol eluiert. Aliquots der Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen wurden in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und silbergefärbt.

Das Gel in Abbildung 3.2-2 zeigt in Bahn 1 die solubilisierten Proteine mit der  $\alpha/\beta$ -Doppelbande zwischen 50 kDa und 60 kDa. In den ersten beiden Waschfraktionen (Bahn 2 und 3) ist ein großer Anteil nichtgebundener unspezifischer Proteine zu erkennen, ab Bahn 4 lassen sich jedoch einige Banden den ATPase Untereinheiten zuordnen, und zwar die Untereinheiten  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$ , a,  $\varepsilon$  und c. In allen Elutionsfraktionen (Bahn 13 bis 17) ist die  $\alpha/\beta$ -Doppelbande zu sehen. In den

ersten beiden Elutionsfraktionen sind zusätzlich schwache Banden zu erkennen, die den anderen  $EF_0F_1$ -Untereinheiten zugeordnet werden können; allerdings sind auch viele Abbauprodukte zu sehen. Da schon in den Waschfraktionen ein großer Anteil an  $EF_0F_1$ -Komplexen auftritt, die entweder nicht an das Affinitätsmaterial gebunden haben oder die schon durch den Waschpuffer abgelöst wurden, ist die Proteinmenge in den Elutionsfraktionen sehr gering. Die Proteinausbeute in den Elutionsfraktionen lag bei 0,3 mg ausgehend von 5,7 mg solubilisierten Proteinen aus 4 g Zellmaterial und ist damit geringer als bei der Reinigung über den Glycerin-Dichtegradienten.



Abbildung 3.2-2: Reinigung Octylglucosid-solubilisierter EF<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe über TALON pSK11/DK8 Membranvesikel wurden mit Octylglucosid solubilisiert und mit Hilfe des Metallaffinitätmaterials TALON gereinigt. Je 50 µl der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und silbergefärbt. Bahn 1: solubilisierte Proteine (5 µl); Bahn 2-12: Waschfraktionen mit 10 mM Imidazol; Bahn 13-17: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol. Die Zuordnung der Banden erfolgte mit Hilfe des 10 kDa Molekulargewichtsmarkers.

Um die Proteinausbeute und den Reinheitsgrad der  $EF_0F_1$ -Präparation zu verbessern, wurde das Detergenz n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (Dodecylmaltosid) eingesetzt. Dazu wurden Proteine aus Membranvesikeln aus pSK11/DK8 mit 1,5 % (w/v) Dodecylmaltosid solubilisiert und zur Bindung des ATPase Komplexes mit TALON inkubiert (siehe 2.2.8). Das Entfernen nichtgebundener Proteine erfolgte mit 5 mM Imidazol im Waschpuffer (gesammelt in je 5 ml Fraktionen) und die Elution wurde mit 150 mM Imidazol durchgeführt (gesammelt in 1 ml Fraktionen). Zur Analyse wurden die Fraktionen auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen, das silbergefärbt wurde.



## Abbildung 3.2-3: Reinigung Dodecylmaltosid-solubilisierter EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe über TALON

pSK11/DK8 Membranvesikel wurden mit Dodecylmaltosid solubilisiert und über TALON gereinigt. Je 50 μl der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und silbergefärbt. Bahn 1: 10 kDa Molekulargewichtsmarker; Bahn 3: Säulendurchlauf nichtgebundener Proteine (5 μl aufgetragen); Bahn 4 bis 18: Waschfraktionen mit 5 mM Imidazol; Bahn 19 bis 29: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol.

In Abbildung 3.2-3 ist das Elutionsprofil der TALON Säule dargestellt. In Bahn 3 sieht man den Durchlauf an solubilisierten Proteinen, die nach der Inkubation nicht an die Säule gebunden haben. Darin sind Untereinheiten des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes zu erkennen, vor allem die deutliche Doppelbande von  $\alpha/\beta$  zwischen 50 kDa und 60 kDa und die Bande unterhalb von 10 kDa, die dem c-Monomer entspricht. Das lässt darauf schließen, dass entweder die Bindungskapazität des Materials ausgeschöpft war, oder dass die Inkubationszeit für eine vollständige Bindung aller  $EF_0F_1$ -Komplexe nicht ausreichend war. Die Waschfraktionen in Bahn 4 bis 18 zeigen, dass zunächst unspezifische Proteine von der Säule gewaschen wurden, wobei aber auch Banden zu erkennen sind, welche dem F<sub>O</sub>-Komplex zugeordnet werden können. Neben den Untereinheiten a, b und c sind die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zu detektieren und auch Untereinheit  $\delta$  lässt sich als schwache Bande erkennen. Zudem ist zu beachten, dass in den späteren Waschfraktionen (Bahn 11 bis 18) nur geringe Verunreinigungen auftreten, und dass hier hauptsächlich in geringer Konzentration die Banden des  $F_{\Omega}$ -Komplexes vorhanden sind. In den Elutionsfraktionen ist eine spezifische Elution des  $EF_0F_1$ -Gesamtkomplexes zu sehen; dabei konzentriert sich der eluierte Komplex auf nur etwa 4 Fraktionen, die kaum Verunreinigungen durch Abbauprodukte oder unspezifische Banden enthalten.
Die Proteinausbeute der gesammelten Elutionsfraktionen lag bei 2 mg aus 20 mg Rohproteinextrakt und 2 g Zellen. Die Solubilisierung mit Dodecylmaltosid liefert somit eine bessere Ausbeute an solubilisierten Proteinen im Vergleich zu der Reinigung mit Octylglucosid. Das Silbergel in Abbildung 3.2-3 zeigt zwar alle Untereinheiten des  $EF_0F_1$ -Komplexes, da es sich jedoch um ein denaturierendes Gel handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Fraktionen auch Teilkomplexe des  $EF_0F_1$  vorhanden sind. Die Möglichkeit, dass die Eluate nicht homogen sind, wird durch die Tatsache belegt, dass sich offenbar schon während der Waschschritte Untereinheiten des  $F_0$  abgelöst haben.

## 3.2.3 Gelfiltrationschromatographie des gereinigten EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes

Mittels einer Gelfiltrationschromatographie wurde die Homogenität des mit Dodecylmaltosid solubilisierten und über IMAC gereinigten  $EF_0F_1$ -Komplexes überprüft. In einer mit Sephacryl S-300-HR (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gepackten Säule mit einem Fraktionierungsbereich von 10 kDa bis 1.500 kDa sollten  $EF_0F_1$ -Gesamtkomplexe von Aggregaten, abgelösten Teilkomplexen oder einzelnen Untereinheiten abgetrennt werden. Die Eluate wurden zunächst mittels Ultrafiltrationsmembranen mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa konzentriert und mit Hilfe einer FPLC über das Säulenmaterial gegeben (siehe 2.2.9). Die Fraktionen wurden zu je 400 µl bei einer Flußrate von 200 µl/min gesammelt und anschließend über SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

Das SDS-Gel in Abbildung 3.2-4 A zeigt eine deutliche Verschiebung der Untereinheiten des  $F_{O}$ - (Bahn 7 bis 13) und des  $F_1$ -Komplexes (Bahn 20 bis 26). Nur in sehr wenigen Fraktionen (Bahn 17 bis 19) lassen sich alle Untereinheiten des  $EF_OF_1$ -Komplexes erkennen. Die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  eluieren zusammen mit einem hohen Anteil der  $F_O$ -Untereinheiten a, b und c zuerst von der Säule. Sie lassen sich im Elutionsprofil (Abbildung 3.2-4 B) dem Hauptpeak zuordnen. In den späteren Fraktionen eluieren hauptsächlich die  $F_1$ -Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zusammen mit  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$ , was im Elutionsprofil dem zweiten, kleineren Peak entspricht. Bei einem Zerfall der ATPase in  $F_O$ - und  $F_1$ -Subkomplexe sollten die  $F_1$ -Subkomplexe zuerst von der Gelfiltrationssäule eluieren, da sie mit 380 kDa ein größeres Molekulargewicht aufweisen als die  $F_O$ -Subkomplexe (150 kDa). Die Tatsache, dass jedoch in den ersten Elutionsfraktionen hauptsächlich  $F_O$ -Untereinheiten detektiert werden, spricht dafür, dass sich Aggregate gebildet haben, die somit ein höheres Molekulargewicht aufweisen als der F<sub>1</sub>-Komplex.





Dargestellt ist ein silbergefärbtes 15 %iges SDS-Gel der Gelfiltrationsfraktionen (**A**) mit dem dazugehörigen Elutionsprofil (**B**). **A**: Das Gel zeigt die Fraktionen 12 bis 36 (je 30 µl aufgetragen) und den 10 kDa Molekulargewichtsmarker (M). **B**: Elutionsprofil der Fraktionen 12 bis 36; Schreibervorschub: 1 mm/min.

Aus den Ergebnissen der Gelfiltration lässt sich schließen, dass der gereinigte  $EF_0F_1$ -Komplex nicht in homogener und monodisperser Form vorliegt und damit für die Verwendung zur Kristallisation nicht geeignet ist.

## 3.2.4 Optimierung der Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>

Eine Verbesserung der Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes wurde durch die Änderung der Wasch-Elutionsbedingungen und während der Metallchelat-Affinitätschromatographie erreicht. Zum einen wurde dem Waschpuffer kein Imidazol zugefügt, wodurch die frühzeitige Ablösung und Elution des F<sub>0</sub>-Teilkomplexes verhindert werden konnte. Weiterhin wurde durch einen 150 Stufengradienten 20 bis mМ Imidazol von getestet, welche Imidazolkonzentration ausreichend ist, um den gebundenen Komplex vollständig von den Kobalt-Ionen des Säulenmaterials zu verdrängen. Da Kobalt eine relativ geringe Bindungsaffinität aufweist, ist eine vollständige Elution der EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe schon unter milden Bedingungen von 30 mM Imidazol bei geringem Hintergrund an unspezifisch gebundenen Proteinen möglich. Die Homogenität des Eluats wurde erneut durch eine Gelfiltrationschromatographie überprüft. Es wurden Fraktionen von je 400 µl bei einer Flußrate von 200 µl/min gesammelt.

Das Elutionsprofil der Gelfiltration in Abbildung 3.2-5 zeigt einen einzigen Peak, der auf dem SDS-Gel als homogener, monodisperser Komplex aus allen identifiziert werden kann. EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Untereinheiten Die Untereinheiten des F<sub>1</sub>-Komplexes lassen sich in denselben Fraktionen detektieren wie auch die Untereinheiten des F<sub>0</sub>-Komplexes, wobei die höchste Konzentration in den Fraktionen 24 bis 31 (Bahn 11 bis 18) vorliegt. Dabei zeigen sich kaum die Verunreinigungen, obwohl Nachweisgrenze der angewandten Silberfärbemethode (siehe 2.2.5) bei 100 pg Protein pro Bande liegt. Man kann also ausschließen, dass neben dem gereinigten EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex noch Kontaminationen durch Fremdproteine oder Abbauprodukte des ATPase Komplexes vorliegen. Damit ist diese Präparation des ATPase Komplexes zur Verwendung für Kristallisationsansätze geeignet.





Dargestellt ist das silbergefärbte 15 %ige SDS-Gel der Gelfiltration (**A**) und das Elutionsprofil (**B**) des mit Dodecylmaltosid solubilisierten und über IMAC gereinigten  $EF_0F_1$  nach Änderung der Elutionsbedingungen. **A**: Das Gel zeigt den 10 kDa Molekulargewichtsmarker (M), daneben den konzentrierten  $EF_0F_1$  (Ausgangsmaterial für die Gelfiltration) und die Elutionsfraktionen 16-37 (je 30 µl aufgetragen). **B**: Elutionsprofil der Fraktionen 16 bis 37, Schreibervorschub: 1 mm/min.

Die Proteinausbeute nach dieser optimierten Solubilisierungs- und Reinigungsmethode lag nach der Gelfiltration und erneutem Aufkonzentrieren bei 5 mg bis 7 mg Protein pro 20 g bis 25 g Zellen. Nachdem der Einfluss hoher Imidazolkonzentrationen auf die Stabilität des  $EF_0F_1$ -Komplexes nachgewiesen war, wurde die Gelfiltrationschromatographie nicht nur zur Analyse und zur Abtrennung von Kontaminationen eingesetzt sondern auch als Möglichkeit um das Imidazol, mit dem der Komplex von der TALON Säule eluiert wurde, zu entfernen.

#### 3.2.5 Überprüfung der Aktivität des gereinigten EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes

Für die Kristallisation eines nativen ATPase Komplexes ist es wichtig, dass durch die Fusion mit dem Histidin-Tag oder durch die Reinigungsbedingungen die Struktur und die Funktion des Enzyms nicht gravierend beeinflusst wird. Daher wurde zunächst die Protonentranslokation und die Hydrolyse der pSK11/DK8 Membranvesikel getestet (siehe 2.2.3.2 und 2.2.3.3). Für eine Überprüfung der Aktivität des solubilisierten und gereinigten pSK11/EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes bietet sich die Methode der ATP-Hydrolysemessung an. Wie in Tabelle 3.2-1 aufgelistet, konnte für die pSK11 Membranvesikel sowohl ATP-Hydrolyse als auch Protonentranslokation nachgewiesen werden. Die Protonentranslokation der pSK11 Membranvesikel lag bei 74 % absolutem ACMA-Quench und die Hydrolyserate bei 0,189 μmol Phosphat/(mg Protein\*min). Als Anhaltspunkt für ein ähnliches, aber nicht identisches Vektorsystem können die Werte der pBWU13 Membranvesikel herangezogen werden. Die Protonentranslokation liegt mit einem absoluten ACMA-Quench von 86 % nur geringfügig über dem Wert der pSK11 Membranvesikel.

	pSK11/DK8: Membranvesikel	pSK11: gereinigter Komplex
Protonentranslokation: abs. ACMA-Quench	74 % ± 6,6 %	-
Hydrolyse: Pi [µmol/mg*min]	$0,189 \pm 0,01$	$0,236 \pm 0,049$

#### Tabelle 3.2-1: Überprüfung der Aktivität des ATPase Komplexes aus pSK11/DK8

Die Protonentranslokation (absoluter ACMA-Quench) und ATP-Hydrolyse von pSK11/DK8 Membranvesikeln wurden gemessen. Die ATP-Hydrolyse wurde außerdem am gereinigten  $pSK11/EF_0F_1$ -Komplex gemessen. Die Messungen wurden an drei verschiedenen Membranpräparationen durchgeführt.

Die Hydrolyserate der pBWU13 Vesikel liegt mit  $0,330 \pm 0,045 \mu mol$ Phospat/mg Protein\*min 43 % über der Hydrolyserate von pSK11. Eine besonders hohe Aktivitätsrate des pBWU13/DK8 Systems wurde bereits von Moriyama et al. (1991) beschrieben. Die Hydrolyse des gereinigten ATPase Komplexes aus pSK11 bezieht sich mit 0,236 µmol Phosphat/mg\*min direkt auf die EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Proteinmenge, im Gegensatz zu den Hydrolyseraten der Vesikel, bei denen sich die Proteinmenge auf die Membranvesikel bezieht, die auch andere Proteine enthalten. Die Hydrolyserate des gereinigten Komplexes sollte also höher liegen als die der Membranvesikel. Die nur wenig gesteigerte Hydrolyserate deutet allerdings auch darauf hin, dass sich keine F<sub>1</sub>-Teilkomplexe abgelöst haben, die ungekoppelt eine wesentlich höhere Aktivität aufweisen. Die gemessenen Aktivitäten zeigen, dass das Expressionssystem pSK11/DK8, die Solubilisierung mit Dodecylmaltosid und die Reinigungsmethode über IMAC für die Verwendung der ATPase Komplexe zur Kristallisation geeignet ist.

#### 3.2.6 Kristallisationsansätze mit gereinigtem EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>

Nach der optimierten Reinigung der EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexe wie in 3.2.4 beschrieben, wurden die ausgewählten Fraktionen über Ultrafiltrationsmembranen konzentriert und die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Als Kristallisationsmethode wurde das Microbatch Verfahren eingesetzt, dass zu den Dampfdiffusionsmethoden gehört (siehe 2.2.10). Dazu wurde in Mikrotiterplatten 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Screening-Puffer gemischt und mit Mineralöl überschichtet, was eine sehr langsame und schonende Konzentrierung des Protein/Präzipitans-Gemisches zur Folge hat. Eine weitere Voraussetzung für die Kristallisation besteht darin, dass der Proteinkomplex über einen möglichst langen Zeitraum bis zur Kristallisation stabil bleiben muss. Daher wurden für den Kristallisationspuffer, in dem der EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex aufgenommen wurde, folgende Zusätze ausgewählt: Natriumazid gegen mikrobielle Kontaminationen des Ansatzes, Glycerin zur Stabilisierung des Proteins, sowie PMSF und ɛ-Aminocapronsäure als Proteaseinhibitoren. Im Fall der ATPase wirkt außerdem MgCl<sub>2</sub> stabilisierend. Weiterhin wurde zur Beladung der katalytischen Bindungstaschen des F<sub>1</sub>-Komplexes 40 µM ADP und 1 mM des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PNP zugesetzt. Mit diesen Zusätzen soll der unterschiedlichen Bindungsaffinität der drei katalytischen Bindungstaschen entsprochen werden (Abrahams et al., 1994).

Zur Überprüfung verschiedener Präzipitantien und Pufferbedingungen für eine Kristallisation des  $EF_0F_1$ -Komplexes wurden 11 verschiedene Screening-Kits der Firma Hampton Research (Laguna Niguel, USA) verwendet, die insgesamt 438 verschiedene Pufferzusammensetzungen ergaben (2.2.10). Für die Inkubation der

Ansätze wurde eine Temperatur von 10 °C gewählt, da der isolierte EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex bei höheren Temperaturen zerfällt.

Die erste Beobachtung, die beim Mischen der Proteinlösung mit den Screening-Puffern gemacht wurde, war die sofortige Bildung eines Präzipitats mit PEG-haltigen Puffern. Die Ansätze klärten sich nach einigen Tagen zwar wieder etwas, es blieb aber ein hoher Anteil an Präzipitat zurück. Nach mehreren Wochen Inkubationszeit waren in einigen der übrigen Ansätze sehr kleine würfel- oder plattenförmige Kristalle von ca. 20 bis 50 µm Kantenlänge zu beobachten, die sich zum Teil an der Oberfläche des Ansatz-Tropfens befanden. Die Screening-Puffer, in denen sich die Kristalle gebildet hatten, enthielten abgesehen von zwei Ausnahmen Phosphat und waren zum größten Teil im sauren Bereich gepuffert. Diese Puffer sind in Tabelle 3.2-2 aufgeführt.

Pufferzusammensetzung				
Nr. 1: 0,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0				
Nr. 2: 0,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6				
Nr. 3: 1,0 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0				
Nr. 4: 1,0 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6				
Nr. 5: 1,4 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0				
Nr. 6: 1,4 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6				
Nr. 7: 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0				
Nr. 8: 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6				
Nr. 9: 0,8 M Natrium/Kalium Phosphat, 0,1 M Na Hepes pH 7,5				
Nr. 10: 0,5 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Na Citrat pH 5,6				
Nr. 11: 1 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Na Citrat pH 5,6				
Nr. 12: 1 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Tris HCl pH 8,5				
Nr. 13: 2 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Tris HCl pH 8,5				
Nr. 14: 1 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Na Acetat pH 4,6, 0,1 M Lithiumsulfat				
Nr. 15: 4% MPD, 0,1 M Na Citrat pH 5,6, 0,1 M Magnesiumchlorid				
Nr. 16: 30% Jeffamin M-600, 0,1 M MES pH 6,5, 0,05 M Cäsiumchlorid				

#### Tabelle 3.2-2: Kristall-Screening Puffer

In den aufgelisteten Screening Puffern waren sehr kleine würfel- oder plattenförmige Kristalle von ca. 20 bis 50 µm Kantenlänge zu beobachten.

Die Kristalle ließen sich mit dem Farbstoff Izit der Firma Hampton Research nicht eindeutig als Proteinkristalle identifizieren, da aufgrund der geringen Größe nicht genau festgelegt werden konnte, ob der Farbstoff in die Kristalle eingedrungen war oder sich nur darunter befand. Für eine Analyse über SDS-PAGE waren die Kristalle ungeeignet, da sie sich nur mit der umgebenden Proteinlösung aus den Ansätzen entfernen ließen. Auf einem silbergefärbten SDS-Gel ließe sich dann nicht festlegen, ob die Banden auf den Kristall oder die Proteinlösung zurückzuführen wären. Einige größere Kristalle, die sich in anderen Puffern gebildet hatten, wurden über SDS-PAGE analysiert, aber als Salzkristalle identifiziert.

Aufgrund der geringen Größe war eine Charakterisierung der Kristalle nach diesen ersten Screening Experimenten nicht möglich. Eine Änderung der Kristallisationsbedingungen war erforderlich.

#### 3.2.7 Kristallisationsansätze von EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> komplexiert mit Inhibitoren

Im nächsten Schritt wurden den Kristallisationsansätzen Inhibitoren der ATPase zugesetzt, um eine Stabilisierung der Komplexe und eine Verbesserung der Kristallisation zu erreichen. Für jeden Inhibitor wurden Ansätze mit allen 438 Screening-Puffern durchgeführt. Als Inhibitoren wurden DCCD, Aurovertin B, Efrapeptin, Quinacrine Mustard und Dequalinium verwendet. ScCl<sub>3</sub> und NaF wurden zur Erzeugung eines katalytischen Übergangszustands eingesetzt. Die bereits im vorigen Kapitel beschriebenen, sehr kleinen würfelförmigen Kristalle wurden nach einigen Wochen Inkubation auch mit den Inhibitoren DCCD, Scandiumfluorid und Quinacrine Mustard beobachtet. Bei der Verwendung von DCCD als Additiv wurden mit allen in Tabelle 3.2-2 beschriebenen Puffern Kristalle beobachtet, mit Ausnahme von Puffer Nr. 16 mit 30 % Jeffamin M-600. Der Zusatz von Scandiumfluorid ergab Kristalle mit allen dort aufgeführten Puffern mit Ausnahme der Puffer 1 bis 8, die Natrium/Kalium Phosphat enthielten. Quinacrine Mustard als Additiv führte zur Bildung von Kristallen mit den Natrium/Kalium Phopshat Puffern Nr. 1 bis 8 und den Ammoniumphosphat Puffern Nr. 11 und 13. Weiterhin wurde beobachtet, dass keiner der hier eingesetzten Inhibitoren zu einer Kristallbildung mit zusätzlich zu den in Tabelle 3.2-2 aufgelisteten Puffern führte. Mit den Inhibitoren Efrapeptin, Aurovertin B und Dequalinium bildeten sich in keinem der Puffer Kristalle aus. Die Größe der Kristalle konnte durch den Zusatz der Inhibitoren nicht wesentlich verbessert werden. Es gelang allerdings etwas größere Kristalle aus DCCD-Ansätzen

mit den Puffern Nr. 7 und 8 zu entnehmen, die jeweils 1,8 M Natrium/Kaliumphosphat pH 5 und pH 5,6 enthielten, und mittels SDS-PAGE zu überprüfen.

Zur Analyse wurden die Kristalle dem Ansatz mit einer Kunststofföse entnommen und dreimal im entsprechenden Puffer gewaschen, um Reste von Proteinlösung zu entfernen. Als Kontrolle wurde die Öse nochmals in die Proteinlösung getaucht und genau wie die Kristalle in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen (siehe 2.2.4). In Abbildung 3.2-6 ist das entsprechende silbergefärbte 15 %ige SDS-Gel dargestellt. Als Molekulargewichtskontrolle dient neben dem 10 kDa Molekulargewichtsmarker (Bahn 1) ein Aliquot einer frisch gereinigten  $EF_0F_1$ -Fraktion (Bahn 2) zur besseren Zuordnung der Kristallbanden.



Abbildung 3.2-6: Analyse der Kristalle der DCCD inhibierten EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> Ansätze

Dargestellt sind zwei Ausschnitte eines silbergefärbten 15 %igen SDS-Gels, die zum besseren Überblick zusammengefasst wurden. Bahn 1: 10 kDa Molekulargewichtsmarker; Bahn 2: solubilisierter und gereinigter  $EF_0F_1$ -Komplex; Bahn 3: Kristalle aus dem DCCD-Ansatz mit 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0; Bahn 4: Kontrolllösung zu Bahn 3 aus demselben Ansatz; Bahn 5: Kristalle aus dem DCCD-Ansatz mit 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6; Bahn 6: Kontrolllösung zu Bahn 5 aus demselben Ansatz.

Die Kristalle aus dem Ansatz mit 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0 in Bahn 3 zeigen eine deutliche Bande, die auf Höhe der Untereinheit b läuft. In der Kontrolle zu diesem Ansatz (Bahn 4) sind mehrere Banden zu erkennen, die sich teilweise den  $EF_0F_1$ -Untereinheiten zuordnen lassen, wie z.B.:  $\alpha/\beta$ , a und c. Auf Höhe der Untereinheit b ist ebenfalls eine Bande zu erkennen, aber sehr viel schwächer als im Vergleich zu den aufgetragenen Kristallen. Die Kristalle aus dem Ansatz mit 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6 zeigen ein ähnliches Bandenmuster: in Bahn 5 ist eine deutliche Bande auf Höhe Untereinheit b zu erkennen, während in der Kontrolle nur sehr schwache Signale auf Höhe von  $\alpha$  und  $\beta$  zu erkennen sind. Aufgrund der geringen Größe der Kristalle sind die Banden im Gel auch nach langer Silberfärbung nicht sehr ausgeprägt. Allerdings spricht der Vergleich mit den Kontrollen jedoch dafür, dass es sich hier um eine für die Kristalle spezifische Bande handelt.

Weiterhin wurden in einem Ansatz, der versuchsweise bei 20 °C gelagert wurde, nach einer kürzeren Inkubationszeit ebenfalls kleine würfel- und plattenförmige Kristalle in 1,0 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0 und 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,0 beobachtet. Nach der Analyse auf einem SDS-Gel zeigten diese Kristalle ebenfalls deutliche Banden in Höhe der Untereinheit b, die in der Kontrolle nicht detektiert wurden. Die hohe Inkubationstemperatur würde in diesem Fall dafür sprechen, dass der EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex zerfallen ist und evtl. eine Kristallisation von Untereinheit b begünstigt wurde.

In den mittels SDS-PAGE getesteten Kristallen waren in vier Fällen deutliche Banden zu sehen, die der Untereinheit b zugeordnet werden können, während dieses Signal in den dazugehörigen Kontrollen sehr viel schwächer oder gar nicht vorhanden war. Eine Bestätigung, dass es sich tatsächlich um Kristalle der Untereinheit b handelt, bleibt jedoch offen, da sich diese Kristalle nicht in größerer Form reproduzieren ließen. Die sehr kleinen Kristalle der anderen Ansätze ließen sich weder für eine Westernblot Analyse noch für eine Überprüfung des Streuungsmusters im Röntgenstrahl verwenden. Einige wenige größere Kristalle (ca. 200 µm Kantenlänge), die nicht dem Muster der oben beschriebenen Kristalle entsprachen und sich in anderen Puffern gebildet hatten, zeigten im Röntgenstrahl keine Streuung.

Im Folgenden sind Fotos von einigen ausgewählten Kristallen in verschiedenen Puffern zu sehen (siehe Abbildung 3.2-7).



#### Abbildung 3.2-7: Kristalle aus den EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Kristallisationsansätzen

A: Würfelförmiger Kristall. Puffer: 1,8 M Natrium/Kalium Phosphat pH 5,6.
B: Relativ großer plattenförmiger Kristall an der Pufferoberfläche. Puffer: 1,8 M Natrium/Kaliumphosphat pH 5,0

**C**: Plattenförmige Kristalle am Boden des Kristallisationsbehälters. Puffer: 4 % MPD, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6, 0,1 M Magnesiumchlorid.

**D**: Würfel- und plattenförmige Kristalle. Puffer: 1 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6.

*E*: Hexagonale Kristalle mit unregelmäßigen Kanten. Puffer: 2 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Tris HCl pH 8,5.

*F*: Würfelförmige Kristalle an der Pufferoberfläche. Puffer: 1 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Na Acetat pH 4,6, 0,1 M Lithiumsulfat.

#### 3.3 Modifikation der EF<sub>1</sub>-Struktur

Durch gezielte Modifikationen des F<sub>1</sub>-Bereiches der *E. coli* ATPase lässt sich die Struktur so verändern, dass die Bindung des phytopathogenen Inhibitors Tentoxin ermöglicht wird. Diese gerichtete Veränderung der Eigenschaft des  $EF_0F_1$ -Komplexes wurde auf der Basis der Kristallstruktur von CF<sub>1</sub>/Tentoxin (Groth, 2002) und eines *E. coli* Homologiemodelles (Engelbrecht & Junge, 1997) vorgenommen.

#### 3.3.1 Sequenzvergleich tentoxinresistenter und -sensitiver Spezies

Tentoxin ist ein cyclisches Tetrapeptid aus verschiedenen Alternaria Spezies, das auf die ATPasen einiger Organismen hemmend wirkt. Die chloroplastidäre ATPase aus Spinat, sowie einige Nicotiana und Lactuca Spezies und die ATPase aus dem Cyanobakterium Synechococcus sp. PCC6301 (Synonym Anacystis nidulans) werden durch Tentoxin gehemmt. Dagegen zeigt Tentoxin auf die ATPase aus E. coli und dem thermophilen Bacillus PS3, sowie auf die chloroplastidäre ATPase aus Chlamydomonas reinhardtii und auf mitochondriale ATPasen keine Wirkung. Aus der Kristallstruktur des CF<sub>1</sub>-Komplexes aus Spinat komplexiert mit Tentoxin (Groth, 2002) geht hervor, welche Aminosäurereste über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Kontakte mit dem Inhibitor in Wechselwirkung stehen. Die Aminosäuresequenzen dieser für die Tentoxinbindung essentiellen Bereiche wurden mit den entsprechenden Sequenzen von E. coli, Chlamydomonas und Synechococcus verglichen. In Abbildung 3.3-1 A ist der N-terminale Sequenzbereich der  $\alpha$ -Untereinheiten dargestellt. In der Sequenz aus Spinacia oleracea sind die Aminosäuren hervorgehoben, mit denen das Tentoxinmolekül hydrophobe Kontakte ausbildet: I63, L65, V75, Y237, L238 und M274. Diese Reste sind bis auf M274 sowohl im sensitiven Synechococcus als auch in den resistenten ATPasen von Chlamydomonas und E. coli konserviert und bieten sich damit nicht für Modifikationen zur Erzielung einer Tentoxinsensitivität im E. coli Enzym an. Der Rest M274 entspricht jedoch in der E. coli Sequenz dem hydrophoberen I273 und wurde für einen Austausch festgelegt (grau unterlegt).

Die Kristallstruktur des  $CF_1$  (Groth & Pohl, 2001) lieferte bereits Hinweise auf die Bedeutung des Restes A96 für die Tentoxinbindung. In resistenten Spezies wird das Alanin durch Reste mit größerem Seitenkettenvolumen eingenommen (Groth & Pohl, 2001). Auch in *E. coli* ist an dieser Position ein Leucinrest lokalisiert der mit 166,7 Å<sup>3</sup> ein größeres Volumen als Alanin (88,6 Å<sup>3</sup>) aufweist.

**A**: 1 MATIRADEIS KIIRERIEGY NREVKVVNTG TVLQVGDGIA RIHGLDEVMA GELVEFEEGT Spinac 1 MAMRTPEELS NLIKDLIEQY TPEVKMVDFG IVFQVGDGIA RIYGLEKAMS GELLEFEDGT Chlamy Synech 1 MVSIRPDEIS SIIRQQIEQY SQDVKVENVG TVLQVGDGIA RIYGLQQVMS GELVEFEDGT 1 .MQLNSTEIS ELIKQRIAQF NVVSEAHNEG TIVSVSDGVI RIHGLADCMQ GEMISLPGNR Ecoli Spinac 61 IGTALNLESN NVGVULMGDG LMIQEGSSVK ATGRIAQIPV SEAYLGRVIN ALAKPIDGRG 61 LGIALNLEAN NVGAVLLGDG LKITEGSRVR CTGKIAEIPV GEAYLGRVVD GLPRPVDGKG Chlamy Synech 61 TGIALNLEED NVGAVLMGEG RNIQEGSTVK ATGKIAQIPV GDALVGRVVS PLGAPLDGKG 60 YAIALNLERD SVGAVVMGPY ADLAEGMKVK CTGRI**LE**VPV GRGLLGRVVN TLGAPIDGKG Ecoli Spinac 121 EITASESRLI ESPAPGIMSR RSVYEPLQTG LIAIDAMIPV GRGQRELIIG DRQTGKTAVA Chlamy 121 AVQTKDSRAI ESPAPGIVAR RSVYEPLATG LVAVDAMIPV GRGQRELIIG DRQTGKTAIA Synech 121 EIAATENRLI ESPAPGIIAR RSVHEPMQTG ITAIDAMIPI GRGQRELIIG DRQTGKTAIA Ecoli 120 PLDHDGFSAV EAIAPGVIER QSVDQPVQTG YKAVDSMIPI GRGQRELIIG DRQTGKTALA Spinac 181 TDTILNQQGQ NVICVYVAIG QKASSVAQVV TNFQERGAME YTIVVAETAD SPATLQ Chlamy 181 VDTILNQKGK GVICVYVAIG QKASSVAQVL NTLKERGALD YTIIVMANAN EPATLQYLAP Synech 181 IDTILNOKGE DVICVYVAIG OKASSVANII EVLRERGALD YTVVVAANAS EPATLOYLAP Ecoli 180 IDAIINQRDS GIKCIYVAIG QKASTISNVV RKLEEHGALA NTIVVVATAS ESAALQYLAR Spinac 241 YTGAALAEYF MYRERHTLII YDDLSKQAQA YRQ<mark>Y</mark>SLLLRR PPGREAYPGD VFYLHSRLLE Chlamy 241 YTGATLAEYF MYTGRPTLTI YDDLSKQAQA YREMSLLLRR PPGREAYPGD VFYLHSRLLE Synech 241 YAGAAIAEYF MYKGKATLVI YDDLTKQAQA YRQMSLLLRR PPGREAYPGD VFYLHSRLLE Ecoli 240 MPVALMGEYF RDRGEDALII YDDLSKQAVA YRQISLLLRR PPGREAFPGD VFYLHSRLLE **B**: 1 MRINPTTSDP GVSTLEKKNL GRIAQIIGPV LNVAFPPGKM PNIYNALIVK GRDTAGQPMN Spinac Chlamv 1 MPWGILIPLT MSDSIETKNM GRIVQIIGPV LDIVFAKGQV PNIYNALTIR AKNSAGTEMA Synech 1 ..... MVTTTEKTNI GYIRQVIGPV VDVEFPAGKL PQIYNALVIK GKNEAGQDLS 1 ..... MAT GKIVQVIGAV VDVEFPQDAV PRVYDALEVQ NGNER..... Ecoli Spinac 61 VTCEVQQLLG NNRVRAVAMS ATDGLTRGME VIDTGAPLSV PVGGPTLGRI FNVLGEPVDN Chlamy 61 VTCEVQQLLG DNCVRAVSMN PTEGLMRGME VVDTGKPLSV PVGKVTLGRI FNVLGEPVDN Synech 51 VTCEVQQLLG DRKVRAVSMS TTDGLVRGLE VIDTGAPISV PVGEATLGRI FNVLGEPVDE Ecoli 39 LVLEVQQQLG GGIVRTIAM**G SS**DGLRRGLD VKDLEHPIEV PVGKATLGRI MNVLGEPVDM

#### Abbildung 3.3-1: Sequenzvergleich tentoxinsensitiver und -resistenter Spezies

**A**: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz der ATPase Untereinheit  $\alpha$  aus Spinacia oleracea (Chloroplast), Chlamydomonas reinhardtii (Chloroplast), Synechococcus sp. PCC 6301 und E. coli im Vergleich. **B**: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz der ATPase Untereinheit  $\beta$  aus oben genannten Spezies. Schwarz unterlegt sind die für die Tentoxinbindung in Spinat essentiellen Aminosäurereste. Grau unterlegt sind die Aminosäurereste, die in E. coli anschließend modifiziert wurden.

Auffällig ist hier, dass die sensitive Spinat ATPase und das sensitive Synechococcus Enzym in Position 96 und 97 konservierte Aminosäuren aufweisen (Alanin und Glutamin), während in den resistenten Enzymen andere Kombinationen vorliegen (A96 und E97 in Chlamydomonas, L95 und E96 in E. coli). Daher wurden beide Aminosäurereste in E. coli für eine Substitution festgelegt. Bei der Betrachtung der CF<sub>1</sub>/TTX-Kristallstruktur fiel ein weiterer Rest in der Nähe der Tentoxinbindungsstelle auf, der im resistenten E. coli Enzym durch einen größeren Rest eingenommen wird. Der Rest A50 entspricht in E. coli dem Rest Q49 (143,8 Å<sup>3</sup>) und wurde ebenfalls für einen Austausch ausgewählt. Zusammengefasst ergeben sich daraus folgende Modifikationen für die *E. coli*  $\alpha$ -Untereinheit:  $\alpha$ Q49A,  $\alpha$ L95A/E96Q und  $\alpha$ I273M.

Abbildung 3.3-1 B zeigt die N-terminale Sequenz der ATPase β-Untereinheiten. Die CF<sub>1</sub>/TTX-Kristallstruktur aus Spinat zeigt, dass BD83 mit Tentoxin eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Dieser Rest ist konserviert im sensitiven Synechococcus Enzym, während in der resistenten ATPase aus Chlamydomonas ein Glutamat vorliegt. In E. coli liegt an der entsprechenden Position 61 allerdings ebenfalls ein Aspartat vor. Für eine Modifikation wurden die angrenzenden Reste G58, S59 und S60 ausgewählt, da es Hinweise darauf gibt, dass sich zwischen den Resten S59 und D61 in E. coli eine Wasserstoffbrücke ausbildet, die eine Bindung des Tentoxin an das D61 verhindert (Groth et al., 2002). In Untereinheit  $\beta$  ergeben sich folglich die Mutationen βG58S/S59A/S60T für das E. coli Enzym.

# 3.3.2 Aktivität der EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten $\alpha$ Q49A, $\alpha$ L95A/E96Q, $\alpha$ I273M und $\beta$ G58S/S59A/S60T

Die nach dem Sequenzvergleich ausgewählten Modifikationen wurden, wie in 2.1.13 beschrieben, im Vektor pBWU13 vorgenommen. Die Expression der Mutanten aQ49A, aL95A/E96Q, aI273M und BG58S/S59A/S60T erfolgte im ATPase defizienten Stamm DK8. Um die Aktivität der Mutanten zu überprüfen, wurden Membranvesikel isoliert und ATP-Hydrolyse Messungen durchgeführt (siehe 2.2.3.3). Die Grundaktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zeigen, dass die Aminosäuresubstitutionen die katalytischen Eigenschaften nicht wesentlich verändert haben: die Hydrolyserate der β-Mutante liegt bei 95 % im Vergleich zum Wildtyp, der eine absolute Hydrolyserate von  $0.350 \pm 0.03 \mu mol P_i/mg^*min zeigt.$ Die  $\alpha$ -Mutanten weisen Raten von 77 %, 74 % und 76 % im Vergleich zu pBWU13 auf. Im nächsten Schritt wurde die Tentoxinsensitivität überprüft. Dazu wurden die Membranvesikel 30 min mit Tentoxin in Konzentrationen von 5, 10, 20 und 50 µM auf Eis vorinkubiert und mit entsprechender Tentoxinkonzentration im Reaktionsmedium gemessen. Die Messungen wurden mit mindestens drei verschiedenen Membranvesikel-Präparationen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die in Abbildung 3.3-2 dargestellte Auftragung der Hydrolyseraten gegen die Tentoxinkonzentration zeigt bei keiner Mutante einen deutlichen Effekt des

Inhibitors. In Abbildung 3.3-2 A sieht man für die Mutante  $\beta$ G58S/S59A/S60T eine leichte Abnahme der Hydrolyserate um ca. 10 % bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M TTX. Für die Mutante  $\alpha$ Q49A lässt sich keine Sensitivität gegenüber Tentoxin erkennen. In Abbildung 3.3-2 B zeigt die Mutante  $\alpha$ L95A/E96Q ebenfalls nur eine leichte Abnahme der Aktivität um 8 % bei 50  $\mu$ M Tentoxin. Mit der Modifikation  $\alpha$ I273M ist ebenfalls keine Tentoxinsensitivität erzeugt worden. Die Schwankungen, die zu beobachten sind, entsprechen im Fall der  $\alpha$ -Mutanten den Schwankungen des Wildtyps und sind damit nicht auf eine erzeugte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor zurückzuführen.



Abbildung 3.3-2: ATP-Hydrolyse der Mutanten  $\alpha$ Q49A,  $\alpha$ L95A/E96Q,  $\alpha$ l273M und  $\beta$ G58S/S59A/S60T im Vergleich zum Wildtyp

Die ATP-Hydrolyseaktivität der Mutanten bei steigender Tentoxinkonzentration wurde in Relation zur Aktivität des Wildtyps (pBWU13) bei 0  $\mu$ M TTX gesetzt. **A**: ATP-Hydrolyseaktivität des Wildtyps [O],  $\beta$ G58S/S59A/S60T [D] und  $\alpha$ Q49A [ $\Delta$ ]. **B**: ATP-Hydrolyseaktivität des Wildtyps [O],  $\alpha$ L95A/E96Q [**1**] und  $\alpha$ I273M [**1**].

Um ausschließen zu können, dass der ausbleibende Effekt des Inhibitors von der Qualität der verwendeten Tentoxinprobe abhängt, wurde ein Kontrollversuch mit gereinigtem CF<sub>1</sub> durchgeführt. Die Hydrolyse-Grundaktivität des CF<sub>1</sub> betrug  $1,09 \pm 0,028 \mu mol P_i/mg^*min$  und wurde bereits durch 0,5  $\mu$ M Tentoxin auf eine Aktivität von nur 10 % reduziert. Bei einer Tentoxinkonzentration von 1  $\mu$ M konnte eine 95 %ige Hemmung der ATP-Hydrolyse nachgewiesen werden. Daraus lässt sich für die *E. coli* Mutanten ableiten, dass die vorgenommenen Modifikationen nicht ausreichen, um eine Tentoxinbindung zu ermöglichen.

## 3.3.3 Überlagerung der CF<sub>1</sub>/TTX -Struktur mit einem *E. coli* Homologiemodell

Da aus dem Sequenzvergleich nicht abgeleitet werden konnte, welche Reste des EF<sub>1</sub>-Komplexes für die Erzeugung einer Tentoxinbindungsstelle ausgetauscht werden müssen, wurde die räumliche Ausrichtung der Aminosäurereste untersucht. Für einen Vergleich der Struktur des EF<sub>1</sub>-Komplexes mit der Kristallstruktur des  $CF_1$ -Komplexes (Groth, 2002) im Bereich der Tentoxin Bindestelle wurde ein EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Homologiemodell herangezogen (Engelbrecht & Junge, 1997). Dieses Modell wurde aus der E. coli Sequenz erstellt, die in die Kristallstruktur des mitochondrialen F<sub>1</sub>-Bereiches (Abrahams et al., 1994) durch Homologie-Modelling eingepasst wurde. Bei einer Überlagerung des Homologiemodells mit der CF<sub>1</sub>/TTX-Struktur waren im Bereich der Tentoxinbindungsstelle Unterschiede in der Ausrichtung einiger Reste zu erkennen. Besonders auffallend war der konservierte Rest αL64 der E. coli Struktur, der in den Bereich des Tentoxin hineinragt und in Kontakt mit dem aromatischen Ringsystem des Inhibitormoleküls kommt. Diese unterschiedliche Ausrichtung der beiden Leucinreste ist in Abbildung 3.3-3 dargestellt. Der Leucinrest des EF<sub>1</sub> (blau dargestellt) grenzt im Modell viel dichter an das Inhibitormolekül (rot dargestellt) an als der Leucinrest des CF<sub>1</sub> (grün). Eine Tentoxinbindung im EF<sub>1</sub>-Subkomplex könnte also durch die Ausrichtung der Leucinseitenkette (166,7 Å<sup>3</sup>) behindert werden. Daher wurde dieser Rest, der im CF<sub>1</sub>-Subkomplex dem Rest L65 entspricht, durch Alanin mit einem Volumen von nur 88,6 Å<sup>3</sup> ersetzt (Mutation  $\alpha$ L64A).



#### Abbildung 3.3-3: Überlagerung der CF<sub>1</sub>/TTX-Struktur mit einem *E. coli* Homologiemodell

Die Kristallstruktur des CF<sub>1</sub>-Komplexes (dunkelgrau) komplexiert mit Tentoxin (rot, PDB-Eintrag 1KMH) wurde mit der Struktur des E. coli Homologiemodelles (hellgrau) überlagert. Hervorgehoben ist das konservierte Leucin (CF<sub>1</sub> L65 grün; EF<sub>1</sub> L64 blau), das in der E. coli Struktur weiter in den Bindungsbereich des Tentoxinmoleküls hineinragt als in der CF<sub>1</sub> Struktur.

#### 3.3.4 Effekt des Austauschs αL64A

Mit der Mutante aL64A wurde überprüft, ob das Leucin an Position 64 tatsächlich mit dem Inhibitor in Wechselwirkung tritt und eine Bindung verhindert. Nach der kleineren sollte Substitution mit dem Alanin ein Effekt in der ATP-Hydrolyseaktivität nach Inkubation mit Tentoxin zu messen sein. Die ATP-Hydrolyse wurde wie in 2.2.3.3 beschrieben mit steigenden Tentoxinkonzentrationen gemessen. In der Auftragung in Abbildung 3.3-4 ist ein deutlicher Effekt des Tentoxin auf die Hydrolyserate der Mutante zu sehen. Die Hemmung durch Tentoxin ist konzentrationsabhängig und beginnt bei etwa 4 µM mit einer leichten Abnahme der Aktivität und erreicht bei 35 bis 50 µM TTX eine Hemmung von 30 %.





Die ATP-Hydrolyse wurde an Membranvesikeln von  $\alpha$ L64A [ $\blacktriangle$ ] mit steigender Tentoxinkonzentration gemessen. Die Grundaktivität ohne Tentoxin wurde als 100 % festgelegt und die Aktivitäten mit Tentoxin in Relation dazu gesetzt. Die Aktivität des Wildtyps [O] ohne Tentoxin wurde ebenfalls als 100 % festgelegt und die Werte mit Tentoxin in Relation dazu gesetzt.

Mit dem Austausch des L64 durch ein Alanin wurde also eine erste strukturelle Voraussetzung für die Bindung des Inhibitormoleküls geschaffen. Allerdings reicht dieser Austausch nicht aus, um denselben Effekt zu erzielen, der mit dem  $CF_1$ -Subkomplex gemessen wurde.

#### **3.3.5** Kombination der Mutationen der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit

Da mit dem Austausch  $\alpha$ L64A keine komplette Hemmung mit Tentoxin erzielt werden konnte, ist es naheliegend, dass noch andere strukturelle Eigenschaften des EF<sub>1</sub>-Komplexes zur Tentoxinresistenz beitragen. Ein weiterer Ansatz bestand darin Substitutionen zu kombinieren, so dass mehrere voluminöse Aminosäurereste gleichzeitig ausgetauscht wurden, um so einen Raum für eine Bindungstasche zu erzeugen. Eine Kombination der Substitutionen  $\alpha$ Q49A und  $\alpha$ L95A/E96Q ergab eine Mutante mit einer leichten Sensitivität gegenüber Tentoxin. Diese Mutation wurde anschließend mit  $\alpha$ L64A und in einem zweiten Schritt zusätzlich mit der Substitution  $\alpha$ I273M kombiniert, so dass zwei Mutanten mit der Kombination  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M konstruiert wurden. Die Messungen in Abhängigkeit der Tentoxinkonzentration sind in Abbildung 3.3-5 dargestellt.



Abbildung 3.3-5: ATP-Hydrolyseaktivität der Mutanten mit kombinierten Modifikationen in der EF<sub>1</sub>  $\alpha$ -Untereinheit

Die ATP-Hydrolyse Messungen wurden an Mutanten mit folgenden Substitutionen durchgeführt:  $\alpha$ Q49A/L95A/E96Q [ $\triangle$ ],  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q [ $\triangle$ ] und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M [ $\blacktriangle$ ]. Zum Vergleich ist der Wildtyp dargestellt<sup>[O]</sup>. Bei der Auftragung wurden die Hydrolyseraten der Mutanten und des Wildtyps bei 0  $\mu$ M TTX jeweils auf 100 % festgelegt und die Raten mit Tentoxin in Relation dazu berechnet.

Die in Abbildung 3.3-5 gezeigten ATP-Hydrolyseraten der kombinierten  $\alpha$ -Mutanten zeigen eine konzentrationsabhängige Tentoxinsensitivität, die im Fall der Mutante  $\alpha$ Q49A/L95A/E96Q mit einer 15 %igen Hemmung bei 50  $\mu$ M TTX nicht so stark ausgeprägt ist. Die  $\alpha$ -Mutanten mit den zusätzlichen Substitutionen L64A und

1273M weisen bei 50 μM TTX eine deutlich stärker reduzierte ATP-Hydrolyserate mit einer Aktivität von 22 % bzw. 24 % auf. Allerdings sieht man im Bereich von 3 μM bis 20 μM TTX einen Unterschied in der Hemmung der beiden α-Mutanten. Die Mutante Q49A/L64A/L95A/E96Q wird in diesem Konzentrationsbereich weniger stark gehemmt als die Mutante Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M. So wird z.B. bei 5 μM TTX eine Hemmung von 15 % in der Mutante mit den vier Aminosäuresubstitutionen gemessen, während bei der Mutante mit den fünf Substitutionen bereits eine Hemmung von 41 % zu verzeichnen ist. Die Einschränkung der ATP-Hydrolyserate ist möglicherweise auf eine Verzögerung der Substratumsetzung in den katalytischen Bindungstaschen oder eine Verzögerung der Produktfreisetzung zurückzuführen, die durch die Inhibitorbindung am F<sub>1</sub>-Komplex hervorgerufen wird.

Da mit den Substitutionen in der Untereinheit  $\beta$  bereits ein leichter Effekt zu sehen war (siehe Abbildung 3.3-2), wurden diese Mutationen ebenfalls mit Austauschen in der  $\alpha$ -Untereinheit kombiniert. Die Kombination  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T wurden ebenfalls auf eine konzentrationsabhängige Tentoxinsensitivität überprüft.





Die ATP-Hydrolyse Messungen wurden an Mutanten mit folgenden Substitutionen durchgeführt:  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T [ $\square$ ] und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T [ $\blacksquare$ ]. Zum Vergleich ist der Wildtyp dargestellt[ $\bigcirc$ ]. Bei der Auftragung wurden die ATP-Hydrolyseraten der Mutanten und des Wildtyps bei 0  $\mu$ M TTX jeweils auf 100 % festgelegt und die Raten mit Tentoxin in Relation dazu berechnet.

Abbildung 3.3-6 zeigt, dass der Effekt des Austausches  $\alpha$ L64A durch die Kombination mit den  $\beta$ -Modifikationen noch weiter gesteigert werden konnte. Die Mutante  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T zeigte bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M TTX nur noch eine Aktivität von 42 %, während durch den Einzelaustausch von  $\alpha$  L64A eine Aktivität von 71 % gemessen wurde (vgl. Abbildung 3.3-4). Bei einer Kombination aller Aminosäuresubstitutionen in der Mutante  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T war eine Reduktion der Aktivität bei 50  $\mu$ M TTX auf nur etwa 2 % zu messen. Damit konnte erstmals eine fast komplette Inhibierung der ATP-Hydrolyseaktivität des *E. coli* Enzyms beobachtet werden.

## 3.3.6 Reaktivierung der ATP-Hydrolyse bei hohen Tentoxinkonzentrationen

Am CF<sub>1</sub> wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Aktivität durch eine Bindung des Tentoxin an eine zweite (Santolini et al., 1999) oder dritte Bindungsstelle (Mochimaru & Sakurai, 1997) mit niedriger Affinität aufgehoben wird und eine Stimulierung der Aktivität gemessen werden kann. Zur Überprüfung, ob auch diese Eigenschaft auf die sensitiven *E. coli*-Mutanten übertragen wurde, wurden für vier ausgewählte Mutanten ATP-Hydrolysemessungen mit einer Tentoxinkonzentration von 1 mM durchgeführt und mit der ATP-Hydrolyserate bei 50  $\mu$ M TTX verglichen. Die Ergebnisse dieser Messungen zur Reaktivierung sind in Tabelle 3.3-1 dargestellt.

Mutante	ATP-Hydrolyserate [%] + 50 μM TTX	ATP-Hydrolyserate [%] + 1 mM TTX
aL64A	$68 \pm 3$	$84 \pm 4$
αL64A/βG58S/S59A/S60T	$41 \pm 3$	$55 \pm 2$
αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M	$24 \pm 2$	$39 \pm 2$
αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ βG58S/S59A/S60T	1 ± 1,6	$23 \pm 2$

**Tabelle 3.3-1: Reaktivierung der ATP-Hydrolyseaktivität bei hoher TTX-Konzentration** Die ATP-Hydrolyserate der vier Mutanten bei 0  $\mu$ M TTX wurde auf 100 % gesetzt und die Werte mit 50  $\mu$ M TTX (maximale Hemmung) und 1 mM TTX (Reaktivierung) in Relation dazu berechnet. Für alle Mutanten ist nach Inkubation mit 1 mM Tentoxin eine leichte, aber deutliche Reaktivierung zu erkennen. Die Aktivität der Mutanten konnte durch eine Erhöhung der Tentoxinkonzentration um 15 % bis 22 % stimuliert werden.

#### 3.3.7 Bestimmung der K<sub>I</sub>-Werte

Zur weiteren Charakterisierung der Mutationen wurden aus den oben gezeigten ATP-Hydrolyseraten (siehe 3.3.4 und 3.3.5) die Tentoxinkonzentrationen bestimmt, mit denen in den sensitiven Mutanten eine halbmaximale Hemmung erzielt werden kann. Die enzymkinetischen Werte wurden unter Einbeziehung der Standardabweichungen der einzelnen Messungen mit dem Programm GraFit (Leatherbarrow, 1990) bestimmt und sind in Tabelle 3.3-2 dargestellt.

Mutante	<b>Κ</b> <sub>1</sub> : <b>ΤΤΧ</b> [μ <b>Μ</b> ]	
aL64A	23,3 ± 5,7	
αQ49A/L64A/L95A/E96Q	$23,4 \pm 3,2$	
αL64A/βG58S/S59A/S60T	$12,4 \pm 0,7$	
αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M	8,5 ± 1,1	
αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/	$5,4 \pm 0,2$	
βG58S/S59A/S60T		

Tabelle 3.3-2: K<sub>I</sub>-Werte der tentoxinsensitiven E. coli-Mutanten

Der K<sub>I</sub>-Wert für die Einzelmutante  $\alpha$ L64A entspricht mit 23  $\mu$ M Tentoxin dem Wert der Mehrfachmutante  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q, die jedoch insgesamt eine stärkere Hemmung bei 50  $\mu$ M Tentoxin aufweist als die Einzelmutante. Mit Ausnahme dieser Mutante lässt sich aus den Werten ableiten, dass sich der K<sub>I</sub> in den Bereich niedrigerer Tentoxinkonzentrationen verschiebt, je mehr Aminosäuren substituiert worden sind. So wird für die Mutante, in der alle Substitutionen kombiniert sind, schon mit einer Tentoxinkonzentration von nur 5,4  $\mu$ M bereits eine halbmaximale Hemmung erreicht.

#### 3.3.8 Einfluss von Tentoxin auf die K<sub>M</sub>- und v<sub>max</sub>-Werte

Durch die Messung der  $K_{M}$ - und  $v_{max}$  Werte mit und ohne Tentoxin kann man einen Hinweis auf den Mechanismus der Inhibierung erhalten. Dazu wurden an vier ausgewählten Mutanten die ATP-Hydrolysemessungen bei sechs verschiedenen ATP Konzentrationen ohne und mit Inhibitor durchgeführt. Die Konzentration des Tentoxin entsprach dabei dem zweifachen K<sub>I</sub>-Wert der jeweiligen Mutante (Segel, 1993). Die Werte der ATP-Hydrolysemessungen sind in Abbildung 3.3-7 dargestellt. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten K<sub>M</sub> und v<sub>max</sub> erfolgte mit dem Programm GraFit.



**Abbildung 3.3-7:** K<sub>M</sub>- und v<sub>max</sub>-Wert Bestimmung ohne und mit Tentoxin Die ATP-Hydrolysemessungen wurden mit verschiedenen ATP-Konzentrationen im Reaktionsmedium ohne Tentoxin (offene Symbole) und mit Tentoxin (ausgefüllte Symbole) durchgeführt, wobei die TTX-Konzentration dem zweifachen K<sub>I</sub> der jeweiligen Mutante entsprach. **A**:  $\alpha$ L64A; **B**:  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T; **C**:  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M; **D**:  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T.

An den Kurvenverläufen der Meßreihen ohne Tentoxin (offene Symbole) im Vergleich zu den Meßreihen mit Tentoxin (ausgefüllte Symbole) wird nochmals deutlich, dass der Effekt von Tentoxin um so größer wird, je mehr Modifikationen am EF<sub>1</sub>-Komplex vorgenommen wurden. In der Reihenfolge der Abbildung 3.3-7 A bis D. die den αL64A,  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T, Mutanten αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M und aQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ entsprechen, βG58S/S59A/S60T nimmt der Abstand der Kurven im Sättigungsbereich kontinuierlich zu. Die aus den Kurven ermittelten kinetischen Konstanten sind in Tabelle 3.3-3 aufgeführt.

Mutante	K <sub>M</sub> : ATP [μM] -TTX	K <sub>M</sub> : ATP [μM] +TTX	v <sub>max</sub> : Phosphat [µmol/mg*min] -TTX	v <sub>max</sub> : Phosphat [µmol/mg*min] +TTX
А	$283 \pm 54$	$326\pm72$	0,199 ± 0,011	0,153 ± 0,010
В	$248\pm57$	$315 \pm 26$	0,180 ± 0,013	$0,109 \pm 0,003$
С	$238\pm18$	$244\pm54$	$0,256 \pm 0,006$	$0,118 \pm 0,007$
D	$232 \pm 52$	$257\pm50$	0,206 ± 0,011	$0,077 \pm 0,004$

**Tabelle 3.3-3:** K<sub>M</sub>- und v<sub>max</sub>-Werte der Tentoxinsensitiven EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten**A**: $\alpha L 64A$ ;**B**: $\alpha L 64A/\beta G 58S/S 59A/S 60T$ ;**C**: $\alpha Q 49A/L 64A/L 95A/E 96Q/1273M$ ;**D**: $\alpha Q 49A/L 64A/L 95A/E 96Q/1273M/\beta G 58S/S 59A/S 60T$ .

Bei einem Vergleich der K<sub>M</sub>-Werte ohne Inhibitor fällt zunächst auf, dass sie für alle Mutanten etwa in demselben Bereich liegen (232 bis 283 µM ATP). In diesem Bereich liegt auch der K<sub>M</sub>-Wert des Wildtyps mit 273  $\pm$  39  $\mu$ M ATP. Bei einer Zugabe von Tentoxin in der Konzentration des zweifachen KI scheinen die K<sub>M</sub>-Werte leicht erhöht. Bezieht man allerdings die Standardabweichungen der einzelnen Messungen mit ein, so liegen die Werte etwa in demselben Bereich wie die K<sub>M</sub>-Werte ohne Inhibitor. Die Änderung der v<sub>max</sub>-Werte entspricht den Erwartungen: die Hydrolyserate nimmt in Anwesenheit des Inhibitors in demselben Maß ab, wie Messungen schon in den oben beschriebenen mit unterschiedlichen Tentoxinkonzentrationen gezeigt wurde (siehe Abbildung 3.3-4 bis Abbildung 3.3-6).

#### 3.3.9 Einfluss der Substitutionen auf die ATP-Synthese

Nachdem der Effekt von Tentoxin auf die ATP-Hydrolyse nachgewiesen worden war, sollte überprüft werden, ob der Inhibitor ebenfalls einen Einfluss auf die ATP-Synthese hat. Die Synthesereaktion wurde an Membranvesikeln der sensitiven Mutanten durchgeführt und der ATP Gehalt mittels eines Biolumineszenz Tests ermittelt, dem die ATP-abhängige Oxidation von Luciferin durch das Enzym Luciferase zugrunde liegt (siehe 2.2.3.4).

Die zeitabhängige ATP-Synthese der tentoxinsensitiven Mutanten  $\alpha$ L64A,  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T,  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T sind in dieser Reihenfolge in Abbildung 3.3-8 A bis D dargestellt.





Die ATP-Syntheserate wurde diskontinuierlich an NADH energetisierten Membranvesikeln gemessen. Die Messungen wurden ohne Inhibitor (offene Symbole) und mit 50  $\mu$ M Tentoxin (ausgefüllte Symbole) durchgeführt. **A**:  $\alpha$ L64A; **B**:  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T; **C**:  $\alpha$ Q49A/L664A/I95A/E96Q/I273M; **D**:  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T.

Die Raten der ATP-Synthese aus mindestens drei verschiedenen Membranvesikelpräparationen wurden ohne Inhibitor (offene Symbole) und mit einer Tentoxinkonzentration von 50 µM gemessen (ausgefüllte Symbole). Die Syntheseraten ohne Tentoxin wurden jeweils als 100 % festgelegt und die Raten mit Tentoxin in Relation dazu gesetzt. Als Kontrolle wurde die Syntheserate des Wildtyps bestimmt. Im Ansatz ohne Tentoxin wies der Wildtyp eine Rate von 80 nmol ATP/mg\*min auf, die durch den Zusatz von 50 µM Tentoxin nicht signifikant verändert wurde und bei 78 nmol ATP/mg\*min lag. Die Synthese-Aktivität der Mutante  $\alpha$ L64A wurde mit Tentoxin auf 70 ± 7 % reduziert. Bei der Mutante aL64A/BG58S/S59A/S60T war eine Abnahme der ATP-Syntheserate auf  $49 \pm 5$  % in Gegenwart von Tentoxin zu messen. Eine weitere Steigerung des Hemmeffektes war bei der Mutante mit den Substitutionen αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M zu beobachten. Hier betrug die Syntheserate nur noch 44 ± 4 % der Grundaktivität. Die Mutante, in der die Kombination aller Aminosäuresubstitutionen in  $\alpha$  und  $\beta$  vorliegt, zeigte eine Aktivität von  $32 \pm 5$  % im Vergleich zur Aktivität ohne Tentoxin. Die relative Hemmung der ATP-Synthese der Mutanten aL64A und aL64A/BG58S/S59A/S60T entspricht in etwa den Effekten, die auch für die ATP-Hydrolyse gemessen wurden, wogegen die ATP-Synthese der Mutanten aQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M und aQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ βG58S/S59A/S60T eine weniger stark ausgeprägte Hemmung aufweist. Allerdings lassen auch diese Messungen einen ähnlich abgestuften Effekt des Inhibitors erkennen, wie er bei den ATP-Hydrolysen beobachtet wurde: je mehr Modifikationen im EF<sub>1</sub>-Komplex gleichzeitig vorliegen, desto stärker ist die Inhibierung.

#### 3.3.10 Einfluss der Modifikationen auf die Protonentranslokation

Da die Protonentranslokation durch die ATP-Hydrolyse angetrieben wird, sollte sich eine Inhibierung des Hydrolysemechanismus ebenfalls auf den Transport von Protonen durch den membranständigen  $F_0$ -Bereich auswirken. Der Einfluss von Tentoxin auf die Protonentranslokation wurde an Membranvesikeln über die Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes ACMA ermittelt (siehe 2.2.3.2). Zunächst wurden die ACMA-Quench Kurven der sensitiven Mutanten ohne Inhibitor aufgezeichnet. Anschließend wurde die Protonentranslokation in Reaktionsmedium mit 50  $\mu$ M Tentoxin nach einer 30 minütigen Vorinkubation der Vesikel mit entsprechender Inhibitorkonzentration gemessen. Die Messungen wurden mit drei verschiedenen Membranvesikelpräparationen durchgeführt. Als Beispiel sind jeweils zwei typische ACMA-Quench Kurven in Abbildung 3.3-9 dargestellt.

Im Vorfeld jeder Messung konnte eine präparationsbedingte unspezifische Protonenpermeabilität der Membranvesikel durch den Aufbau eines Protonengradienten mit NADH ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde in Kontrollversuchen nachgewiesen, dass Tentoxin keinen Einfluss auf diesen respiratorischen Protonengradienten hat. Der ATP induzierte absolute ACMA-Quench ohne Inhibitor lag bei allen Mutanten mit ca. 80 % nur knapp unter dem absoluten Wert des Wildtyps (85 %, nicht dargestellt).



**Abbildung 3.3-9: Einfluss von Tentoxin auf die Protonentranslokation** Dargestellt sind ATP induzierte ACMA-Quench Kurven der Mutanten  $\alpha$ L64A  $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T (**B**),  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/1273M (**C**)

 $\alpha$ L64A/ $\beta$ G58S/S59A/S60T (**B**),  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M (**C**) und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T (**D**) ohne Tentoxin (-TTX) und mit 50  $\mu$ M Tentoxin (+TTX). Die Zugabe von ATP und des Entkopplers Nigericin ist durch Pfeile markiert.

Die Zugabe von Tentoxin reduzierte den ACMA-Quench der Mutante aL64A auf  $84 \pm 4$  % im Vergleich zur Grundaktivität ohne Inhibitor (Abbildung 3.3-9, A). Die Protonentranslokation der Mutante aL64A/βG58S/S59A/S60T ist mit Tentoxin auf  $78 \pm 7$  % gesenkt (B). Eine weitere leichte Steigerung des Effektes durch Tentoxin war bei den Mutanten αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M (C) und  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T (D) zu beobachten. Die Protonentranslokationen sind hier auf  $67 \pm 2$  %, bzw,  $64 \pm 3$  % im Vergleich zur Grundaktivität ohne Inhibitor reduziert. Die Hemmung der Protonentranslokation zeigt sich mit diesem Messsystem nicht so ausgeprägt wie die Hemmung der ATP-Synthese und -Hydrolyse. Allerdings zeigen die ACMA-Quench Kurven eine

(**A**),

Verzögerung des Beginns der Protonentranslokation. In Abbildung 3.3-9 C und D ist dieser Effekt vor allem für die Messung mit Tentoxin zu erkennen. Nach ATP Zugabe nimmt die Fluoreszenz aufgrund der Wechselwirkung mit den Farbstoffmolekülen sofort um ca. 15 % ab; die auf die Protonentranslokation zurückzuführende Fluoreszenzlöschung setzt dann aber erst mit einer Verzögerung ein. Diese Verzögerung ist für die Mutanten αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M und αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/βG58S/S59A/S60T auch schon in den ACMA-Quench Kurven in Abwesenheit von Tentoxin zu sehen, dort ist der Effekt allerdings nicht so ausgeprägt. Da für die beiden Mutanten aL64A und aL64A/BG58S/S59A/S60T der Einsatz der Protonentranslokation mit Tentoxin in geringerem Maße zeitverzögert ist, scheint auch hier ein Zusammenhang mit der Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren vorzuliegen. Je mehr Modifikationen im EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> vorgenommen wurden, desto stärker zeigt sich der Effekt des Inhibitors auf die ATPase Aktivität.

## 4 Diskussion

Die ATP-Synthase ist ein komplexes Enzym, das als einzigartiger Motor funktioniert. Über eine Kopplung von zwei Rotationssystemen wird elektrochemische in mechanische und wiederum in chemische Energie umgewandelt. Auf der Grundlage von zahlreichen chemischen, biochemischen und genetischen Ansätzen konnten Modelle über Aufbau und Wirkungsweise der ATP-Synthase entwickelt werden. Ein großer Fortschritt wurde jedoch 1994 mit der Kristallstruktur des mitochondrialen F<sub>1</sub>-Bereiches erzielt (Abrahams et al., 1994). In der dreidimensionalen Struktur wurden drei unterschiedlich beladene katalytische Bindungsstellen sichtbar, wodurch der von Boyer vorgeschlagene "binding change" Mechanismus belegt werden konnte (Boyer, 1989; Boyer, 1993). Hieraus wird die Notwendigkeit einer hochaufgelösten Struktur des kompletten ATPase Komplexes für das Verständnis seiner Wirkungsweise deutlich.

#### 4.1 Indirekte Strukturuntersuchungen am c-Oligomer

Die hier beschriebenen Strukturuntersuchungen an der *E. coli* ATPase sollten zunächst auf das Proteolipid-Oligomer fokussiert werden. Ausgehend von der NMR-Struktur eines c-Monomers wurden verschiedene Modelle über die ringförmige Anordnung eines Oligomers aus 12 Monomeren vorgeschlagen (Groth & Walker, 1997; Dmitriev et al., 1999b; Rastogi & Girvin, 1999). Groth und Walker favorisieren in ihrem Modell, das auf der Grundlage einer unvollständingen NMR-Struktur des c-Monomers beruht (Girvin & Fillingame, 1995), eine Orientierung der N-terminalen Helices der Monomere nach außen. Dagegen schlagen die anderen Autoren für ihre Modelle, die aus der kompletten NMR-Struktur des c-Monomers berechnet wurden (Girvin et al., 1998), eine entgegengesetzte Ausrichtung vor (siehe 1.2.4). Auch die Stöchiometrie der c-Monomere im Ring bleibt spekulativ und wurde für *E. coli* mit 9 bis 12 angegeben (Foster & Fillingame, 1982; Jones & Fillingame, 1998; Jiang et al., 2001).

Bisher wurden zur Untersuchung molekularer Kontaktstellen hauptsächlich Cystein-Substitutionsmutagenesen und Quervernetzungsversuche angewandt (Jiang & Fillingame, 1998; Jones et al., 1998). Untersuchungen zu Proteininteraktionen mit Hilfe von Cystein-Substitutionen können aber problematisch sein, da lokaler pH und Hydrophobizität in der direkten Umgebung der eingefügten Cysteine die Reaktivität gegenüber Cystein-spezifischen Reagenzien und die Ausbildung von Disulfidbrücken negativ beeinträchtigen können (Creighton, 1984). So kann zum Beispiel eine fehlende Quervernetzung zwischen zwei Cysteinen damit interpretiert werden, dass es zwischen den beiden Positionen keinen Kontakt gibt. Aber tatsächlich kann das Ergebnis auch auf die eingeschränkte Reaktivität der Cysteine zurückzuführen sein. Außerdem kann unter den Pufferbedingungen, die für die Quervernetzungsversuche notwendig sind, die ursprüngliche Konformation des Proteins destabilisiert werden. Die Quervernetzungen über Cysteine geben also nicht unbedingt ein Bild der Ausrichtung der Reste im nativen Protein wieder.

Eine Alternative stellt die Tryptophan-Substitutionsmutagenese dar, die bereits zur Identifizierung molekularer Kontaktstellen im C-terminalen Bereich des c-Monomers durchgeführt wurde (Groth et al., 1998). Tryptophan wird wegen seiner Größe und des leicht hydrophoben Charakters als Substituent im transmembranen Bereich von Proteinen eingesetzt (Sharp et al., 1995). Aufgrund der fluiden Eigenschaft der Lipidphase sollte die Indolseitenkette des Tryptophans in Positionen toleriert werden, die zur Membran hin ausgerichtet sind. Eine Ausrichtung zu benachbarten Untereinheiten oder einer gegenüberliegenden Helix sollte dagegen zu einem sterischen Konflikt führen, der in einer messbaren Änderung der Enzymfunktion resultiert. Die Tryptophan-Substitutionsmutagenese besitzt im Vergleich zu Quervernetzungsexperimenten über Cysteine also den Vorteil, dass keine speziellen Versuchsbedingungen notwendig sind und die Reaktivität des Restes nicht ausschlaggebend Das Muster die ist. der Funktionsänderungen, die Tryptophanmutanten aufweisen, kann die inter- und intramolekularen Kontaktstellen des c-Monomers widerspiegeln. Mit diesen experimentellen Daten lässt sich anschließend die Gültigkeit eines theoretischen Modells überprüfen.

Bevor die Funktionalität der Tryptophanmutanten allerdings im Hinblick auf molekulare Kontakte interpretiert werden kann, sollte vorher ausgeschlossen werden, dass Reste ersetzt werden, die essentiell für die Funktionalität des Proteins sind. Für die Tryptophansubstitutionen im c-Monomer wurden 12 aufeinander folgende Positionen im transmembranen Bereich der N-terminalen Helix ausgewählt. Der für die Protonentranslokation wichtige Rest cD61 befindet sich in der gegenüberliegenden Helix. Die Substitutionen in der N-terminalen Helix sollten sich also nur in Bezug auf sterische Konflikte auswirken und nicht in Bezug auf das Fehlen eines essentiellen Restes.

## 4.1.1 Einfluss der Tryptophansubstitutionen auf die Aktivität der ATPase

Im Vorfeld der Aktivitätsmessungen wurde zunächst die Integrität der c-Monomere der Membran immunologisch überprüft (siehe 3.1.2.). in In den Membranvesikelfraktionen aller Mutanten wurde Untereinheit c in monomerer Form nachgewiesen. Die Signale der Mutanten entsprachen in Intensität und Molekulargewicht den Signalen des Wildtyps, woraus sich schließen lässt, dass der Einbau des Tryptophan keinen Einfluss auf das Expressionsniveau, die Proteinfaltung der Monomere und deren Zielsteuerung zur Membran hat. Demnach können alle Aktivitätsminderungen der Mutanten auf sterische Konflikte im Proteolipidring zurückgeführt werden.

Die Überprüfung der Assemblierung der c-Monomere zu einem funktionellen Ring erfolgte mit Hilfe von Wachstumsversuchen auf Minimalmedium, Messungen der Protonentranslokation und der ATP-Hydrolyse (siehe 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5). Die Messung der Protonentranslokationsrate ist der sensitivste Nachweis von sterischen Konflikten im Proteolipidring, da dieser Aktivität mehrere komplexe Prozesse zugrunde liegen, wie die Beladung der c-Monomere mit Protonen, die anschließende Rotation des Proteolipidringes und die Abgabe der Protonen an die andere Seite der Membran. Sollte einer dieser Einzelschritte durch eine strukturelle Veränderung des c-Oligomers beeinträchtigt sein, resultiert das in einer Änderung der gesamten Protonentranslokationsrate. Die ATP-Hydrolyse ist die treibende Kraft für die Protonentranslokation, was durch Interaktionen der Untereinheiten  $\gamma$  und  $\varepsilon$  des F<sub>1</sub>-Komplexes mit dem Proteolipidring gewährleistet wird. Eine strukturelle Veränderung des c-Oligomers könnte also auch die Assoziation des F<sub>1</sub>-Komplexes an den membranständigen F<sub>O</sub>-Bereich und deren Wechselwirkungen miteinander beeinflussen. Aus diesem Grund wurden ebenfalls die ATP-Hydrolyseraten überprüft.

Alle Aktivitätsmessungen zeigten ein übereinstimmendes Muster, über das sich die Mutanten in drei Klassen einteilen lassen (siehe 3.1.6).



## Abbildung 4.1-1: Überblick über die Auswirkung der Tryptophan-Mutationen in der N-terminalen Helix des c-Monomers

Dargestellt ist die Haarnadelstruktur des c-Monomers (pH5) mit dem Bereich der Tryptophansubstitutionen in der N-terminalen Helix. Die Positionen, in denen das Tryptophan keinen Einfluss hat, sind grün markiert, Positionen mit mäßiger Einschränkung sind blau markiert und die Positionen, in denen eine Substitution durch Tryptophan zum Funktionsverlust führt, sind rot markiert. In der Ausschnittsvergrößerung sind die nativen Aminosäuren mit Positionsnummern gezeigt.

In drei der ausgewählten Positionen, cV15W, cL19W und cI22W, wirken sich die Substitutionen durch Tryptophan nur minimal auf die Aktivität aus. Das Wachstum auf Succinat/Minimalmedium entsprach dem Wachstum des Wildtyps und deutete bereits auf ein funktionierendes System zur Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung hin. Die Protonentranslokationsrate der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp nur um 10 bis 17 % reduziert. Die ATP-Hydrolyserate zeigte eine Einschränkung von nur 5 % für die Positionen 19 und 22 und eine etwas stärkere Reduktion von 24 % für die Mutante cV15W. Eine Darstellung über die mögliche Ausrichtung dieser Positionen in der protonierten und deprotonierten Form des c-Monomers mit Hilfe des Programmes Swiss-PDB-Viewer (Guex & Peitsch, 1996) zeigt die Tryptophane in einer der C-terminalen Helix genau entgegengesetzten Position (siehe Abbildung 3.1-7 B und Abbildung 3.1-8 B). Demnach stellen diese Positionen zum einen keine intramolekularen Kontaktstellen dar, zum anderen zeigt die hohe Aktivität der Mutanten, dass das Tryptophan in diesen Positionen auch die Assemblierung des Proteolipidringes und die Funktion nicht wesentlich beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass die Positionen 15, 19 und 22 keine Kontakte zu benachbarten c-Monomeren ausbilden.

Der Effekt der Tryptophan Substitution in den Positionen cM16W und cM17W hat nur eine mäßige Auswirkung, die für das Wachstum der Mutanten auf Minimalmedium nicht ausschlaggebend war. Eine Reduktion der ATPase Aktivität konnte über die Protonentranslokation und die ATP-Hydrolyserate nachgewiesen werden. Die Rate der Protonentranslokation war um 29 % (cM16W) und 49 % (cM17W) reduziert, während die ATP-Hydrolyserate um 47 % (cM16W) und 52 % (cM17W) eingeschränkt war. In der Darstellung der Substitutionen im c-Monomer (siehe Abbildung 3.1-7 C und Abbildung 3.1-8 C) nehmen die Tryptophane eine Position ein, in der sie zu beiden Seiten von den Helices weggedreht sind. Dabei ist der Abstand der Reste von der gegenüberliegenden Helix in der deprotonierten Form des c-Monomers größer als in der protonierten Form. Demnach ist eine sterische Störung mit benachbarten Untereinheiten eine mögliche Erklärung für die eingeschränkte Funktion.

Eine starke Einschränkung der Aktivität ist für die Mutanten cA12W, cA13W, cA14W, cG18W, cA20W, cA21W, cG23W und cA24W sowohl in der Protonentranslokation als auch in der ATP-Hydrolyse zu verzeichnen. Eine Protonentranslokation war mit 7 und 5 % nur für die Mutanten mit dem Austausch in Position 12 und 14 nachweisbar. Dagegen wurde mit bis zu 14 % eine geringe ATP-Hydrolyse für alle Mutanten nachgewiesen, was aber in Anbetracht der Standardabweichungen als Hintergrundaktivität des Messsystems interpretiert werden kann. Die Wachstumsversuche stimmen mit den gemessenen Daten ebenfalls überein, mit Ausnahme der Mutanten 12 und 14, die zunächst Wachstum zeigten, das aber nach drei Tagen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war. Dies deutet darauf hin, dass die Wachstumsversuche zwar als erster Hinweis auf die ATPase Aktivität dienen können, dass aber die Aktivitätsmessungen ein deutlich sensitiveres System darstellen. Eine Überprüfung der Ausrichtung der Tryptophane in den NMR-Strukturen (Abbildung 3.1-7 und Abbildung 3.1-8 D-F) weist die Positionen 14, 18 und 21 als mögliche Kontaktstellen zu den benachbarten c-Monomeren aus, da diese sich in entgegengesetzter Richtung zur gegenüberliegenden Helix ausrichten und der Funktionsverlust also nicht durch intramolekulare Kontakte erklärt werden kann. Die Berechnung der günstigsten Rotamere durch den Swiss-PDB-Viewer liefert Werte, über die sich Aussagen zu möglichen sterischen Konflikten treffen lassen. Positive Werte, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für sterische Störungen anzeigen, ergaben sich dabei im Fall des protonierten c-Monomers für die Tryptophane in den Positionen 13, 20 und 24. Damit ist in diesen Positionen der Aktivitätsverlust möglicherweise durch einen intramolekularen sterischen Konflikt zu erklären, während der Aktivitätsverlust der anderen Mutanten eher auf Störungen

mit benachbarten Monomeren oder Untereinheiten zurückzuführen ist. Die deprotonierte Form des c-Monomers weist eine Konformationsänderung auf, die zu einem größerem Abstand der C-terminalen Helix zum Mutationsbereich führt. Die Wahrscheinlichkeit für intramolekulare Störungen ist in dieser Form nach der Bestimmung mit dem Swiss-PDB-Viewer für Tryptophanreste in allen Positionen geringer. Lediglich die Simulation des Austausches in Position 24 lieferte positive Werte. Damit wäre der Funktionsverlust durch den Austausch cA24W im deprotonierten Zustand des Monomers auf einen kritischen intramolekularen Kontakt zurückzuführen.

## 4.1.2 Einfluss von Seitenkettenvolumen, Hydrophobizität und Konformation auf die Aktivität der Tryptophanmutanten

Betrachtet man die Änderung des Seitenkettenvolumens der nativen Aminosäuren im Vergleich zu dem eingefügten Tryptophan (siehe 3.1.1), so ist ein Zusammenhang mit der Auswirkung auf die Aktivität erkennbar. Die Positionen, in denen starke Effekte gemessen wurde, wiesen im nativen Monomer ausschließlich Aminosäurereste mit sehr kleinem Volumen wie Glycin und Alanin auf. Die Positionen, in denen das sperrige Tryptophan toleriert wird, werden im Wildtyp Monomer von Aminosäuren mit ebenfalls relativ großem Volumen eingenommen: Valin, Methionin, Leucin und Isoleucin. Dieser Zusammenhang zeigt, dass hier das Volumen des Tryptophans der ausschlaggebende Faktor ist und nicht die Hydrophobizität. Denn der Unterschied in der Hydrophobizität (Kyte & Doolittle, 1982) der nativen Reste im Vergleich zum Tryptophan ist für die Mutanten cI22W, cV15W und cL19W am größten. Diese zeigen jedoch den geringsten Effekt. Die geringste Änderung der Hydrophobizität ist nach Kyte und Doolittle für die Mutanten zu erwarten, die Alanin oder Glycin als native Aminosäure aufweisen. Allerdings zeigt sich gerade für diese Mutanten der stärkste Effekt.

Für den Aminosäurerest cA24W ergibt sich zusätzlich noch die Besonderheit, dass dieser Rest durch eine pH-abhängige Konformationsänderung des c-Monomers (Rastogi & Girvin, 1999) im deprotonierten Zustand in Richtung des essentiellen Restes cD61 ausgerichtet wird (siehe Abbildung 4.1-2). Der geringste Abstand zwischen dem Aspartat 61 und dem Indolring des Tryptophan im protonierten Monomer liegt bei ca. 5 Å und ist in der deprotonierten Form auf nur 1,6 Å verringert. Die beiden Reste befinden sich in einer Ebene und es wurde bereits nachgewiesen, dass die protonentranslozierende Eigenschaft des Aspartat auf die Position 24 übertragen werden kann (Zhang & Fillingame, 1994). Wenn das native Alanin in Position 24 durch das sperrige Tryptophan ersetzt wird, liegt es nahe, dass dadurch der essentielle Rest cD61 im deprotonierten Zustand stark beeinträchtigt wird, was durch den kompletten Aktivitätsverlust belegt wird.





Ausschnitt aus dem modifizierten Bereich des c-Monomers in Aufsicht mit N-terminaler Helix (dunkelgrau) und C-terminaler Helix (hellgrau). Das eingefügte Tryptophan in Position 24 ist rot dargestellt, der für die Protonentranslokation essentielle Rest cD61 ist blau dargestellt. **A**: In der protonierten Form des c-Monomers (PDB-Eintrag 1A91) weisen die Reste cA24W und cD61 einen größeren Abstand auf als in (**B**) der deprotonierten Form des c-Monomers (PDB-Eintrag 1C99). Die Konformationsänderung ist auf eine Drehung der C-terminalen Helix zurückzuführen.

## 4.1.3 Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit molekularen Strukturmodellen des c-Oligomers

In einer Zusammenarbeit mit L.R. Forrest und M.S.P. Sansom (Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Biochemistry, University of Oxford, UK) wurden sechs Modelle für den Proteolipidring entwickelt. Über Moleküldynamik-Berechungen wurden Oligomere aus 9, 10 und 12 Monomeren modelliert, in denen entweder die N-terminale Helix ("N-außen") oder die C-terminale Helix ("C-außen") an der Peripherie des Ringes orientiert ist (siehe Abbildung 4.1-3). Für die "N-außen"-Modelle wurde als Grundlage das Modell von Groth und Walker eingesetzt (Groth & Walker, 1997). Die Proteolipidringe mit einer Orientierung der C-terminalen Helix nach außen wurden ausgehend von den "N-außen"-Modellen unter der Annahme eines symmetrischen Verhaltens modelliert.



Abbildung 4.1-3: Modelle des Proteolipidringes (nach L. Forrest, pers. Mitteilung) Dargestellt sind 6 Modelle zum Aufbau des Proteolipidringes. Es wurden Stöchiometrien von

9, 10 und 12 Monomeren in zwei verschiedenen Orientierungen angenommen. **A-C**: Die N-terminalen Helices der Monomere sind nach außen orientiert. **D-F**: die C-terminalen Helices der c-Monomere sind nach außen orientiert. Zur besseren Orientierung ist die Carboxylgruppe des essentiellen Restes cD61 hervorgehoben. Die Darstellung der Modelle erfolgte mit dem Programm Molscript (Kraulis, 1991).

In diesen Modellen wurde nacheinander der Austausch der Reste in Position 12 bis 24 durch Tryptophan simuliert und die sterischen Störungen ermittelt, die sich für die jeweiligen Rotamere ergaben (Schnick et al., 2000). Auf diese Weise wurden die Positionen ermittelt, in denen die Tryptophanreste die Assemblierung des Proteolipidringes und damit die ATPase Aktivität beeinflussen. Die theoretischen Werte wurden mit den experimentellen Daten verglichen und das Modell mit den meisten Übereinstimmungen ermittelt.

In den beiden Proteolipidmodellen, die sich aus 9 Monomeren zusammensetzen (siehe Abbildung 4.1-3 A + D), ergaben sich einige Unterschiede zwischen der theoretischen Vorhersage und den experimentellen Daten. So wird für Position 14, 18, 21 und 23 im Modell keine Funktionsstörung vorhergesagt, die aber im Experiment eindeutig zu messen war. Dagegen decken sich die gemessenen Aktivitäten zum größten Teil mit dem "N-außen"-Modell aus 10 Monomeren (Abbildung 4.1-3 B). Für die Mutationen cG18W und cA21W zeigt das Modell allerdings keine sterischen Konflikte an, die tatsächlich jedoch gemessen wurden. Das kann ein Hinweis auf einen eher funktionellen als räumlichen Konflikt sein, der z.B. durch eine Beeinträchtigung der Interaktion mit Untereinheit a während der Drehung des Proteolipidringes hervorgerufen wird. Die periphere Ausrichtung von Position 18 und damit eine mögliche Ausrichtung zur peripher angeordneten Untereinheit a ist bereits in der Darstellung der Tryptophan Mutation im c-Monomer erkennbar (siehe 3.1.6). Für den Rest cA21W zeigt das Modell eine mögliche Interaktion mit dem essentiellen cD61 an, wodurch die Protonierung/Deprotonierung während der Protonentranslokation durch das sperrige Tryptophan beeinträchtigt sein könnte. Für das "C-außen"-Modell aus 10 Monomeren (Abbildung 4.1-3 E) ergeben sich einige Widersprüche zu den experimentell ermittelten Daten. Nach diesem Modell sind funktionelle Mutanten mit Tryptophanen in Position 20 und 23, und strukturelle Konflikte in Positionen 15 und 17 zu erwarten, was den tatsächlichen Aktivitäten dieser Mutanten widerspricht. Für die Position 18 wird in diesem Modell allerdings eine strukturelle Störung vorhergesagt, was wiederum in Einklang mit den gemessenen Werten steht. In den dodecameren Modellen beider Orientierungen (Abbildung 4.1-3 C + F) stimmen die experimentellen Daten nicht mit den Vorhersagen für die Positionen 12, 18 und 21 überein. Für die Positionen 17 und 23 ergeben sich Unterschiede in der "N-außen"-Orientierung im Vergleich zum "C-außen"-Modell: die Vorhersagen stimmen im "N-außen"-Modell mit den während die Aktivitäten überein, Ergebnisse für das "C-außen"-Modell widersprüchlich sind.

Ein weiteres Indiz für eine "N-außen"-Orientierung ergibt sich aus Berechnungen der zugänglichen Oberfläche der Seitenketten für alle sechs Modelle. Die Reste Valin (Position 15), Methionin (Positionen 16 und 17), Leucin (Position 19) und Isoleucin (Position 22), die den funktionellen Mutanten entsprechen, haben in den

"N-außen"-Modellen eine wesentlich höhere Oberflächenzugänglichkeit als in den "C-außen"-Modellen (Schnick et al., 2000).

Mit den experimentell ermittelten Daten lässt sich die Gültigkeit eines theoretischen Modelles eingrenzen. Die hier beschriebenen Tryptophansubstitutionen sind nicht in Einklang mit den Modellen, die eine "C-außen"-Orientierung aufweisen. Dagegen stimmt das "N-außen"-Modell aus 12 Monomeren in einigen Bereichen mit den experimentellen Messungen überein. Die besten Übereinstimmungen ergeben sich allerdings für das "N-außen"-Modell aus 10 Monomeren. Diese Anordnung kann also mit einiger Wahrscheinlichkeit als Modell für den Proteolipidring angenommen werden.

Hinweise auf eine mögliche Orientierung der N-terminalen Helix nach außen wurden bereits durch Tryptophansubstitutionen im C-terminalen Bereich der c-Monomere erhalten (Groth et al., 1998). Dabei wurden in den 12 aufeinander folgenden Positionen cD61 bis cL72 die nativen Aminosäuren durch Tryptophane ersetzt. Dieser Mutationsbereich liegt dem Bereich der hier vorgenommenen Aminosäuresubstitutionen genau gegenüber, so dass sich die beiden Versuchsreihen ergänzen.

#### 4.1.4 Verifikation des "N-außen"-Modells: Vergleich mit Literaturdaten

Das hier favorisierte Modell mit einer Orientierung der N-terminalen Helices der c-Monomere nach außen wird durch weitere, in der Literatur beschriebene, Markierungsexperimente unterstützt. Mit der hydrophoben Substanz TID wurden Reste identifiziert, die im nativen F<sub>0</sub>-Komplex und der solubilisierten Untereinheit c exponiert sind (Hoppe & Sebald, 1984). Schon für das Modell von Groth und Walker konnte gezeigt werden, dass 90 % der mit TID markierten Reste auch im Modell zugänglich sind, wogegen eine "C-außen"-Orientierung (Jones et al., 1998) eher nicht mit den Markierungsexperimenten in Einklang zu bringen ist (Groth, 2000). Die Ergebnisse aus den Markierungsexperimenten wurden ebenfalls auf die hier beschriebenen sechs Proteolipidmodelle (siehe Abbildung 4.1-3) übertragen. In den "N-außen"-Modellen sind dabei die markierten Reste an der Oberfläche des Zylinders orientiert und von der Lipidphase aus zugänglich. Damit entsprechen die "N-außen"-Modelle dem für eine lipophile Substanz erwarteten Markierungsmuster. In der "C-außen"-Orientierung dagegen sind die markierten Reste im Inneren
lokalisiert. Es wäre zwar möglich, dass TID ins Innere des Zylinders diffundieren könnte, allerdings wäre dann zumindest auch eine Markierung von einigen Resten an der Peripherie zu erwarten (Groth, 2000).

Weiterhin scheinen Immunmarkierungsversuche ebenfalls die "N-außen"-Modelle zu unterstützen. Es wurden verschiedene Peptidantikörper eingesetzt, die gegen die Schlaufenregion und den oberen Bereich der N-terminalen Helix gerichtet sind (Birkenhäger et al., 1999). Eine Bindung der monoklonalen Antikörper an den Bereich L31 bis Q42 der Untereinheit c wurde sowohl in Abwesenheit des F<sub>1</sub>-Bereiches als auch für den  $F_0F_1$ -Gesamtkomplex nachgewiesen. Eine gleichzeitige Bindung der Antikörper und des F<sub>1</sub>-Bereiches an den F<sub>0</sub>-Bereich lässt sich nur mit einer peripheren Orientierung der N-terminalen Helix erklären (Altendorf et al., 2000). Bei einer "C-außen"-Orientierung würde es dagegen zu sterischen Konflikten kommen.

Im Gegensatz dazu lassen Quervernetzungsversuche über Cysteine auf eine periphere Anordnung der C-terminalen Helix schließen (Jiang & Fillingame, 1998; Jones et al., 1998). Nach diesen Experimenten scheinen zunächst die Quervernetzungen von cA62C, cM65C, cG69C, cL72C und cY73C mit der peripher angeordneten Untereinheit a ein deutlicher Hinweis auf eine "C-außen"-Orientierung des c-Oligomers zu sein. Tatsächlich lassen sich diese Quervernetzungen auch mit einer "N-außen"-Orientierung erklären, da die meisten dieser Reste in eine Lücke zwischen benachbarten c-Monomeren zeigen und von außen zugänglich sind (Groth, 2000). Die Möglichkeit eines Kontaktes dieser Reste mit Untereinheit a liegt außerdem nahe, wenn man die pH-abhängige Konformationsänderung der C-terminalen Helix berücksichtigt (Rastogi & Girvin, 1999). Dadurch erhält das c-Monomer während der katalytischen Vorgänge eine gewisse Flexibilität.

Für den Mechanismus der Protonentranslokation wird eine Interaktion des Restes cD61 mit dem Rest R210 in Untereinheit a postuliert (Vik & Antonio, 1994; Elston et al., 1998). In den hier beschriebenen "C-außen"-Modellen ist die Carboxylgruppe des cD61 zur Peripherie hin exponiert. Aber auch in den "N-außen"-Modellen ist die Carboxylgruppe in ausreichendem Maße zugänglich. So kann ein vorübergehender Kontakt zwischen den Resten cD61 mit aR210 während der Protonentranslokation mit beiden Orientierungen erklärt werden. Im Gegensatz dazu ist der Rest cD61 im "C-außen"-Modell von Dmitriev, Jones und Fillingame (Dmitriev et al., 1999b) in

einer sehr kompakten Struktur von benachbarten c-Monomeren, die eine funktionelle Einheit bilden, von der Peripherie abgeschirmt. Eine Interaktion dieses Restes mit der Untereinheit a würde nach diesem Modell eine Umorientierung des Helixbündels erfordern. Eine solche Drehbewegung des Helixbündels während der Katalyse steht allerdings im Widerspruch zu Quervernetzungsexperimenten an der C-terminalen Helix (Jones et al., 1998). Quervernetzungen von cI66C, cV74C, cM75C und V78C sollten benachbarte C-terminale Helices zusammenhalten und eine Drehbewegung verhindern. Dennoch wurde für diese Mutanten Wachstum auf Minimalmedium nachgewiesen, das mit dem Wildtyp vergleichbar war. Das cD61 scheint also mit diesen Quervernetzungen auch ohne eine Drehung der Helix zugänglich zu sein (Groth, 2000).

Das Modell von Rastogi und Girvin stellt eine weniger kompakte Struktur aus 12 Monomeren in einer "C-außen"-Orientierung dar (Rastogi & Girvin, 1999). Im Gegensatz zu dem entsprechenden Dodecamer, das in dieser Arbeit beschrieben wurde, wurde das Modell von Rastogi und Girvin mit 11 protonierten und einer deprotonierten Struktur des c-Monomers, die mit einem Modell der Untereinheit a in Kontakt steht, konstruiert. Auf der Grundlage dieses Modells wurde ein Mechanismus zur Protonentranslokation vorgeschlagen, der zum cD61 zwei Zugangskanäle durch Untereinheit a oder an der Schnittstelle von Untereinheit a und c beschreibt (siehe 1.2.5). Die allgemeine Gültigkeit dieses postulierten Mechanismus der Protonentranslokation bleibt jedoch fraglich, wenn man in Betracht zieht, dass die polaren Reste, die den periplasmatischen Zugangskanal bilden, unter den ATPasen nicht konserviert sind (Schnick et al., 2000). Zudem scheint eine Protonentranslokation an der Schnittstelle zwischen a und c unter dem Gesichtspunkt einer Rotation des Proteolipidringes an Untereinheit a vorbei problematisch. Werden in dieses Modell - entsprechend den in dieser Arbeit durchgeführten Substitutionsmutagenesen - Tryptophane eingesetzt, so ergeben sich Abweichungen zwischen den Vorhersagen sterischer Konflikte und den tatsächlich gemessenen Aktivitäten. Auf der Grundlage des Modells wären für die Mutationen cM16W, cM17W und cL19W Funktionsverluste durch strukturelle Störungen zu erwarten, während die Mutante cA21W funktionell sein sollte (Schnick et al., 2000).

Im Vergleich mit den Literaturdaten kann die Gültigkeit des vorgeschlagenen Modells aus 10 Monomeren mit einer Orientierung der N-terminalen Helices nach außen gerechtfertigt werden. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass alle Modelle auf NMR-Strukturen beruhen, die aus einem c-Monomer in einem Gemisch von organischen Lösungsmitteln hervorgehen. Daher ist nicht klar, ob die vorliegenden NMR Daten dem nativen Zustand entsprechen oder nicht. Allerdings konnte eine in Chloroform/Methanol gereinigte Untereinheit c mit den Untereinheiten a und b zu einem funktionellen, protonentranslozierenden Komplex rekonstituiert werden (Dmitriev et al., 1995). Dies bestätigt die Annahme, dass die Lösungsmittelstruktur tatsächlich der Struktur im Oligomer entspricht. Außerdem wurde gezeigt, dass sich solubilisierte c-Monomere auch in Abwesenheit anderer Untereinheiten zu einer ringförmigen Struktur zusammenlagern (Arechaga et al., 2002). Die Eigenschaft Ringstrukturen zu bilden ist also eventuell schon in der Sekundär- oder Tertiärstruktur der c-Monomere festgelegt. Dies spricht ebenfalls dafür, dass ein Modell, welches hauptsächlich auf den Strukturdaten der c-Monomere beruht und die Daten der anderen F<sub>O</sub>-Untereinheiten nur indirekt mit einbezieht, dem nativen Komplex entsprechen kann.

## 4.1.5 Kristallstrukturen des c-Oligomers aus Hefe und *Ilyobacter tartaricus*

Durch die indirekte Strukturanalyse lassen sich Modelle erstellen, die eine hohe Übereinstimmung mit biochemischen und genetischen Daten aufweisen. Dennoch kann nur durch eine hochaufgelöste Kristallstruktur die Stöchiometrie der c-Monomere und die Ausrichtung der Helices eindeutig identifiziert werden. Da für *E. coli* bis jetzt noch keine Kristalldaten des F<sub>O</sub>-Bereiches zur Verfügung stehen, werden in der Literatur immer wieder Vergleiche mit der Kristallstruktur eines Teilkomplexes der mitochondrialen ATPase aus Saccharomyces cerevisiae angeführt (Stock et al., 1999). Die Kristalle zeigen in einer Auflösung von 3,9 Å einen Ring aus 10 c-Monomeren. Auch hier weisen die c-Monomere eine Haarnadelstruktur auf, in der zwei  $\alpha$ -Helices über eine Schlaufe verbunden sind. Da die Seitenkettendichte nicht interpretiert werden konnte, war eine zweifelsfreie Bestimmung der Ausrichtung der Monomere im Ring nicht möglich. Dennoch schlagen die Autoren über Vergleiche von Quervernetzungen der polaren Schlaufe mit Untereinheit ɛ (Hermolin et al., 1999) und den unterschiedlichen Helixlängen eine mögliche Orientierung der N-terminalen Helices nach innen und der C-terminalen Helices nach außen vor. Ein Knick in den äußeren Strukturen wird ebenfalls als Indiz für eine "C-außen"-Orientierung angesehen. Diese Anordnung entspricht zwar in der Stöchiometrie dem in dieser Arbeit favorisierten Modell, jedoch in entgegengesetzter Ausrichtung. Allerdings ergeben sich auch weitere allgemeine Unterschiede zwischen der Hefe- und der *E. coli* Struktur. Trotz einer ähnlichen Form der c-Monomere lässt sich die *E. coli* Struktur nicht perfekt mit der Elektronendichte der Hefestruktur überlagern (Stock et al., 1999). Das könnte auf die sehr geringe Sequenzübereinstimmung der beiden Spezies von nur 23 % zurückzuführen sein. Die Kristallstruktur der mitochondrialen ATPase dieses eukaryotischen Organismus kann als Modell für einen möglichen Aufbau des Proteolipidringes dienen, muss aber nicht zwangsläufig dem in der Plasmamembran lokalisierten Proteolipidring der bakteriellen ATPase entsprechen. Ebenso lassen sich die Ergebnisse der Tryptophansubstitutionen und der Markierungsversuche mit TID und Antikörpern, die an ATPase Komplexen aus *E. coli* durchgeführt wurden, mit dem Modell des Proteolipids aus Hefe nicht in Einklang bringen.

Vor kurzem wurde ein weiteres Modell eines Proteolipidringes aus 11 Monomeren postuliert: das c-Oligomer der Na<sup>+</sup>-translozierenden ATPase aus Ilyobacter tartaricus (Vonck al., 2002). Zweidimensionale Kristalle et wurden elektronenmikroskopisch analysiert und aus den Daten eine 3-D Projektion mit einer Auflösung von 4 Å berechnet, die einen inneren und einen äußeren Ring aus je 11 Helices zeigen. Die Methode reicht jedoch nicht für eine Auflösung der Seitenketten aus und die Struktur zeigt nur die <sub>a</sub>C-Atome. Aus der Tatsache, dass die inneren Helices sehr eng gepackt sind, schließen die Autoren, dass an den Kontaktstellen Glycine vorliegen. Aus dieser Annahme leiten sie weiterhin ab, dass die N-terminalen Helices nach innen zeigen, da diese einen Bereich aufweisen, der insgesamt 9 Alanine und 8 Glycine enthält. Auch dieses Modell zeigt eine gegensätzliche Ausrichtung der Monomere im Vergleich zum "N-außen"-Modell, das in dieser Arbeit vorgeschlagen wurde. Allerdings ist zu beachten, dass die NMR-Struktur des c-Monomers aus E. coli von der modellierten Struktur der Monomere aus I. tartaricus signifikant abweicht (Vonck et al., 2002). Zudem sind die Sequenzen der beiden Organismen nur zu 19 % identisch, woraus sich Strukturunterschiede ergeben können. Auch im Vergleich zu diesem Modell, das auf kristallographischen Daten beruht, kann eine Orientierung der N-terminalen Helices der c-Monomere nach außen im EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.1.6 Stöchiometrie des c-Oligomers

Es wird weitgehend angenommen, dass die Anzahl der c-Monomere im  $F_0F_1$ -Komplex mit dem Verhältnis von translozierten Protonen pro gebildetem ATP Molekül korrelliert (Arechaga & Jones, 2001). Die Anzahl von Protonen, die pro ATP transloziert werden, wurde mit 3 oder 4 in unterschiedlichen Systemen beschrieben (Ferguson & Sorgato, 1982; van Walraven et al., 1996). Für die Synthese eines ATP Moleküls ist eine Teilrotation von  $\gamma$  um 120° notwendig. Da die Rotation von  $\gamma$  mit der des c-Oligomers gekoppelt ist, könnte die Anzahl translozierter Protonen pro gebildetem ATP mit der Anzahl der c-Monomere in Zusammenhang gebracht werden. Die erforderliche Rotation von  $\gamma$  um 120° kann erreicht werden, wenn 9 Monomere vorhanden sind und je 3 Protonen pro ATP transloziert werden oder wenn 12 Monomere den Ring bilden und dabei je 4 Protonen transloziert werden.

Mittlerweile liegen jedoch Strukturdaten vor, die in verschiedenen Organismen Ringe aus 10 (Stock et al., 1999), 11 (Stahlberg et al., 2001) oder 14 Monomeren (Seelert et al., 2000) zeigen. Die Quervernetzungsversuche im E. coli Proteolipid wurden mittlerweile ebenfalls mit einer bevorzugten Stöchiometrie von 10 Monomeren interpretiert (Jiang et al., 2001) und auch die Tryptophansubstitutionen, die in dieser Arbeit vorgenommen wurden, unterstützen ein Proteolipidmodell aus 10 Monomeren. Damit steht die dreifache Symmetrie des F<sub>1</sub>-Komplexes nicht mit der Symmetrie des Proteolipidringes in Einklang. Aus einem Proteolipidring von 10 Monomeren lässt sich ableiten, dass das Verhältnis von Protonen zu ATP möglicherweise nicht ganzzahlig ist und der Wert zwischen 3 und 4 liegt (Stock et al., 1999). Eine gekoppelte Rotation von  $\gamma$  und c ließe sich dann mit einer gewissen Elastizität der Untereinheit  $\gamma$  erklären, so dass die 10 Teilschritte des Proteolipidringes pro Umdrehung von Untereinheit  $\gamma$  in 3 Teilschritte umgewandelt werden können. Diese Elastizität wurde bereits als Merkmal der ATPase in zwei Modellen beschrieben (Cherepanov et al., 1999; Pänke & Rumberg, 1999). Es wurde auch gezeigt, dass die Anzahl der c-Monomere in der E. coli ATPase von der Kohlenstoffquelle abhängt (Schemidt et al., 1998). Wachstum auf Glucose führt zu einer höheren Anzahl an c-Monomeren als Wachstum auf Succinat. In einem kleineren Ring würde das Übersetzungsverhältnis (Protonen zu ATP) reduziert und dem geringeren Membranpotential angepasst (Stock et al., 1999).

Die Literaturdaten zeigen, dass eine Stöchiometrie von 10 Monomeren, wie sie für das "N-außen"-Modell vorgeschlagen wurde, durchaus mit dem Rotationsmodell und der 3-Schritt Drehung von  $\gamma$  in Einklang gebracht werden kann. Es wird aber auch deutlich, dass auch andere Stöchiometrien in Frage kommen. So kann auch das Modell aus 12 Monomeren, das ebenfalls Übereinstimmungen mit den Tryptophansubstitutionen zeigt, nicht ausgeschlossen werden.

# 4.2 Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes und Kristallisationsexperimente

Wie schon in der Einleitung beschrieben, liegen zahlreiche hochaufgelöste Strukturdaten des F<sub>1</sub>-Komplexes aus verschiedenen Organismen vor, aus denen sich ein fast vollständiges Bild für den hydrophilen Bereich ergibt. Die vollständige Auflösung der Struktur des membranständigen F<sub>0</sub>-Bereiches bleibt weiterhin offen. Daher lag der Schwerpunkt in der Reinigung eines vollständigen und homogenen  $EF_0F_1$ -Komplexes für die Kristallisation, um vor allem einen Einblick in den Aufbau des F<sub>0</sub>-Komplexes zu erhalten.

## 4.2.1 Reinigung eines homogenen, intakten ATPase Komplexes

Für eine erste Reinigung wurde der Vektor pBWU13 eingesetzt, der eine unmodifizierte ATPase exprimiert. Die Solubilisierung der Proteine wurde mit dem Detergenz Octylglucosid vorgenommen und die Reinigung erfolgte anschließend über einen Glycerindichtegradienten (siehe 3.2.1). Mit diesem Verfahren konnte ein Komplex isoliert werden, der alle ATPase Untereinheiten aufwies (siehe Abbildung 3.2-1). Allerdings war die Reinheit der Fraktionen für den Einsatz zur Kristallisation nicht ausreichend, denn es wurden auch unspezifische Produkte detektiert, bei denen es sich um Abbauprodukte oder Aggregate des ATPase Komplexes oder um andere Proteine handelt.

Alternativ zum nativen ATPase Komplex wurde für die Reinigung eine modifizierte ATPase mit einem sechsfachen Histidin-Tag am N-Terminus der Untereinheit  $\beta$ eingesetzt. Für die Reinigung über immobilisierte Metallchelat Affinitätschromatographie wurde das Material TALON (Clontech, Heidelberg, Deutschland) ausgewählt. Der Vorteil dieses Materials liegt in der relativ geringen Bindungsaffinität des Kobalts, wobei der Hintergrund an unspezifisch gebundenen Proteinen gering bleibt und eine Elution des histidinfusionierten Proteins unter milden Bedingungen möglich ist.

Ein Vergleich der Reinigungen nach Solubilisierung mit den Detergenzien Octylglucosid und Dodecylmaltosid zeigte einen deutlichen Vorteil des Dodecylmaltosid (siehe 3.2.2). Im Vergleich zu Octylglucosid konnte die Ausbeute der solubilisierten Proteine mit Dodecylmaltosid um das Vierfache gesteigert werden. Die höhere Proteinausbeute kann auf die Solubilisierung in einem Schritt zurückgeführt werden, wodurch ein größerer Anteil unspezifischer Proteine solubilisiert wurde als in der fraktionierten Solubilisierung mit Octylglucosid. Dennoch konnte aus den Dodecylmaltosid solubilisierten Proteinen der EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex mit allen Untereinheiten in konzentrierter Form und ohne Kontamination durch Abbauprodukte oder andere Proteine gereinigt werden (siehe Abbildung 3.2-3). Eine Solubilisierung mit Octylglucosid dagegen scheint die Bindungseigenschaften der Histidine an das Säulenmaterial zu beeinflussen, denn ein großer Teil der ATPase Untereinheiten wurde bereits in den Waschfraktionen nachgewiesen (siehe Abbildung 3.2-2). Die Elutionsfraktionen enthielten folglich nur sehr geringe Mengen des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes mit einem hohen Hintergrund an unspezifischen Banden. In der Reinigung mit Dodecylmaltosid wurden in den Waschfraktionen hauptsächlich die Untereinheiten des F<sub>O</sub> identifiziert. Dies weist bereits auf eine Ablösung des  $F_0$ -Bereiches vom Gesamtkomplex und auf eine Inhomogenität der Elutionsfraktionen hin. Ein Zerfall des ATPase Komplexes in Found F<sub>1</sub>-Subkomplexe in den Eluaten konnte über eine Gelfiltrationschromatographie nachgewiesen werden (siehe 3.2.3). Diese Ablösung ist auf die hohe Imidazolkonzentration von 150 mM im Elutionspuffer zurückzuführen und wird möglicherweise schon in den Waschfraktionen durch den Zusatz von Imidazol bewirkt. Aufgrund der geringen Bindungsaffinität des Kobalts war es möglich, die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer auf 30 mM zu reduzieren, und einen  $EF_0F_1$ -Komplex in homogener und monodisperser Form zu reinigen, was durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie nachgewiesen wurde (siehe 3.2.4). Auf einen Zusatz von Imidazol im Waschpuffer zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde verzichtet. Da Imidazol offensichtlich die Stabilität des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes beeinflusst, wurde auch bei der präparativen Aufarbeitung direkt im Anschluss an die IMAC eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, um das Imidazol und eventuell vorliegende Teilkomplexe zu entfernen. Nach dieser

optimierten Methode ließen sich  $EF_0F_1$ -Komplexe in ausreichender Menge von ca. 5 mg pro Präparation für die Verwendung in Kristallisationsexperimenten isolieren.

Die Messungen zur ATP-Hydrolyse zeigen, dass der gereinigte  $EF_0F_1$ -Komplex noch funktionell ist (siehe 3.2.5). Das bedeutet, dass zum einen die Solubilisierung mit Dodecylmaltosid und die Reinigung keine signifikanten strukturellen Veränderungen des Komplexes hervorgerufen haben, und dass auch der Histidin-Tag an der  $\beta$ -Untereinheit die katalytische Eigenschaft des F<sub>1</sub>-Komplexes nicht beeinflusst. Demnach ist davon auszugehen, dass eine Kristallstruktur dieses  $EF_0F_1$ -Komplexes weitgehend die native Struktur der *E. coli* ATPase wiedergeben könnte.

## 4.2.2 Kristallisationsexperimente

Die für eine Kristallisation erforderliche Reinheit und Homogenität des  $EF_0F_1$ -Komplexes wurde zwar durch die Reinigungsmethode gewährleistet, dennoch konnten keine Kristalle erhalten werden, die zu einer Strukturauflösung geführt hätten.

Es wurden zwar in vielen Ansätzen kleine würfel- oder plattenförmige Kristalle beobachtet, diese waren allerdings mit 20 bis 50 µm Kantenlänge zu klein für Untersuchungen im Röntgenstrahl (siehe Abbildung 3.2-7). Die Gemeinsamkeit der Screening-Puffer, in denen diese Kristalle beobachtet wurden, lag in der Puffersubstanz Phosphat mit zum größten Teil saurem pH (siehe Tabelle 3.2-2). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich um Salzkristalle handelt, die aus einer Komplexierung des Phosphats mit divalenten Kationen wie Magnesium entstehen können (Quik Screen User Guide HR2-221, Hampton Research, Laguna Niguel, USA). Allerdings wurden in Kontrollexperimenten, die nur die Screening Puffer und den Kristallisationspuffer der ATPase Komplexe enthielten, keine derartigen Kristalle beobachtet.

Um eine Stabilisierung der ATPase Komplexe zu erreichen und dadurch verbesserte Kristallisationsbedingungen zu schaffen, wurden verschiedene Inhibitoren der ATPase eingesetzt, die zum Teil auch erfolgreich für die Kristallisation der mitochondrialen ATPase aus Rinderherzmitochondrien eingesetzt wurden. Die Kristallstruktur des mitochondrialen F<sub>1</sub>-Komplexes mit Efrapeptin zeigt die Bindung des Inhibitors in der Mitte des F<sub>1</sub> (Abrahams et al., 1996). Aurovertin inhibiert die

oxidative Phosphorylierung durch Bindung an die β-Untereinheit. Die Kristallstruktur des F1 komplexiert mit Aurovertin wurde ebenfalls aufgeklärt (van Raaij et al., 1996). DCCD hemmt die Protonentranslokation des  $F_0$ -Komplexes durch eine kovalente Reaktion eines einzelnen Inhibitormoleküls mit dem essentiellen Rest cD61 (Hoppe & Sebald, 1984; Hermolin & Fillingame, 1989). Außerdem wurde eine DCCD-Modifikation des Glutamatrestes 199 in Untereinheit ß kristallographisch nachgewiesen (Gibbons et al., 2000). Quinacrine Mustard ist ein irreversibler Inhibitor des F<sub>1</sub>, der an die  $_{394}$ DELSEED<sub>400</sub> Sequenz der Untereinheit  $\beta$ bindet (Bullough et al., 1989b). Bei Dequalinium handelt es sich um ein amphiphiles Kation, dessen hemmende Wirkung am F<sub>1</sub>-Komplex aus Rinderherzmitochondrien nachgewiesen wurde (Bullough et al., 1989a). Ein katalytischer Übergangszustand des F<sub>1</sub>-Komplexes sollte durch die Bindung von MgADP und Scandiumfluorid an die katalytischen Bindungsstellen erzeugt werden. Dieser Komplex führt zu einer fast vollständigen Hemmung der Hydrolyseaktivität (Nadanaciva et al., 2000).

Durch den Einsatz von Aurovertin, Dequalinium und Efrapeptin konnte keine Kristallbildung induziert werden. Mit den Inhibitoren DCCD, Quinacrine Mustard und Scandiumfluorid wurden Kristalle in den phosphathaltigen Puffern mit saurem pH beobachtet. Allerdings konnte keine deutliche Verbesserung der Kristallgröße erzielt werden und die Form der Kristalle entsprach weitgehend den vorher beschriebenen Kristallen. Nur in vereinzelten Ansätzen mit DCCD bildeten sich etwas größere Kristalle aus, die im SDS-Gel eine Bande auf Höhe der Untereinheit b zeigten (Abbildung 3.2-6). Für einen eindeutigen Nachweis, dass sich in diesen Ansätzen Kristalle der Untereinheit b gebildet haben, reicht die Analyse über SDS-PAGE jedoch nicht aus. Es wäre möglich, dass unter den sauren Pufferbedingungen der ATPase Komplex zerfällt und sich Kristalle aus einzelnen Untereinheiten ausbilden. Für einen Zerfall des Komplexes spricht auch, dass Kristalle, die sich in einem Versuchsansatz bei 20°C gebildet hatten, auf dem SDS-Gel ebenfalls eine Bande in Höhe der Untereinheit b zeigten. Diese vereinzelten größeren platten- und würfelförmigen Kristalle ließen sich allerdings nicht reproduzieren und die vorhandenen kleineren Kristalle waren für weitere Untersuchungen ungeeignet. Ohne ein Röntgen-Streuungsmuster lässt sich nicht klären, ob es sich hierbei tatsächlich um Proteinkristalle handelt.

## 4.2.3 Weitere Überlegungen zur Kristallisation des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes

Die Kristallisation von Membranproteinen ist generell problematisch, da diese Proteine einen amphipatischen Charakter haben. Der kritische Faktor für die Erzeugung dreidimensionalen von Kristallen, die sich für eine Röntgenstrukturanalyse eignen, ist die Solubilisierung der Proteine mit Detergenzien. Diese Detergenzien sollten die Eigenschaften der Lipidphase simulieren, die die hydrophoben Teilbereiche des Proteins umgibt, und eine Aggregation der Proteine verhindern. Das hier verwendete Detergenz Dodecylmaltosid wurde bereits erfolgreich zur Solubilisierung und Kristallisation des mitochondrialen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes aus Saccharomyces cerevisiae eingesetzt (Stock et al., 1999). Die Kristallisation wurde im Microbatch Verfahren durchgeführt und die Kristalle bildeten sich bei 4°C in Gegenwart von ADP und AMP-PNP mit dem Präzipitans PEG 6000 aus. Daraus resultierte ein Komplex aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ und c ( $\delta$  entspricht Untereinheit  $\epsilon$  in *E. coli*). Für die Kristallisation des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes wurden ähnliche Bedingungen gewählt. Mit den PEG haltigen Screening Puffern wurde jedoch eine sofortige Präzipitation des Proteins beobachtet und es bildeten sich keine Kristalle in diesen Puffern. Demnach lassen sich die Kristallisationsbedingungen des mitochondrialen Komplexes nicht auf den EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex übertragen.

Die bisher beschriebenen Kristallstrukturen der ATPase aus *E. coli* wurden entweder aus isolierten Untereinheiten (Uhlin et al., 1997; Rodgers & Wilce, 2000) oder aus dem abgelösten EF<sub>1</sub>-Komplex erhalten (Hausrath et al., 1999), an dem zur Verbesserung der Symmetrie zusätzlich die  $\delta$ -Untereinheit entfernt wurde. Daraus geht bereits hervor, dass eine Kristallisation des vollständigen EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes auf direktem Wege schwierig ist. Auch der kristallisierte Hefekomplex weist keinen vollständigen F<sub>0</sub>-Bereich auf, denn die Untereinheiten a und b fehlen. Die Hefestruktur zeigt jedoch, dass es prinzipiell möglich ist, den hydrophilen und hydrophoben Bereich in einem Komplex zu kristallisieren.

Die Tatsache, dass trotz der hohen Reinheit und Homogenität der Proteinlösung keine  $EF_0F_1$ -Kristalle gewachsen sind, ist möglicherweise auf die Asymmetrie des Komplexes zurückzuführen, die durch die Untereinheiten a, b und  $\delta$  hervorgerufen werden. Es wäre auch möglich, dass der Histidin-Tag an Untereinheit  $\beta$  eine Kristallisation des  $EF_0F_1$ -Komplexes verhindert hat. Möglichkeiten für eine Verbesserung der Kristallisation des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes bestehen in der Ablösung von Untereinheiten zur Steigerung der Symmetrie. Es könnte auch versucht werden, einen isolierten F<sub>O</sub>-Subkomplex zu kristallisieren, der zum größten Teil hydrophobe Eigenschaften aufweist und für den sich leichter Kristallisationsbedingungen finden ließen. Weiterhin passende könnten Fv-Fragmente von Antikörpern zur Cokristallisation eingesetzt werden, wie für den Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex aus Hefe beschrieben wurde (Hunte et al., 2000). Ein weiterer Ansatz besteht in der Entfernung des Histidin-Tags nach der Reinigung des EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplexes. Eine Abspaltung des Histidin-Tags lässt sich durch den Einbau einer Thrombin Schnittstelle erreichen. Diese Methode wurde zur Kristallisation der Cytochrom P450 Reduktase eingesetzt (Zhao et al., 1996). Allerdings beeinflusst ein Histidin-Tag nicht generell die Kristallisation, denn es sind bereits mehrere Proteine mit Histidin-Tag kristallisiert worden, wie z.B. Annexin 24 aus Capsicum annuum (Hofmann et al., 2000) und die Kinase-2/MAP Kinase (Zhang et al., 1993).

## 4.3 Gezielte Modifikationen des EF<sub>1</sub>-Komplexes zur Tentoxinbindung

In diesem Teil der Arbeit wurden basierend auf kristallographischen Strukturdaten der chloroplastidären ATPase (Groth, 2002) und einem *E. coli* Homologiemodell (Engelbrecht & Junge, 1997) gezielte Modifikationen am EF<sub>1</sub>-Komplex vorgenommen, um die Bindung des phytopathogenen Inhibitors Tentoxin an der tentoxinresistenten *E. coli* ATPase zu ermöglichen.

### 4.3.1 Grundlagen für die Modifikationen des EF<sub>1</sub>-Komplexes

Die wichtigste Grundlage für die Modifikationen des EF<sub>1</sub> war die Auflösung der Kristallstruktur des chloroplastidären F<sub>1</sub>-Bereiches aus Spinat, komplexiert mit dem phytopathogenen Inhibitor Tentoxin (Groth, 2002). Schon in der Kristallstruktur des chloroplastidären  $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$  Komplexes aus Spinat mit einer Auflösung von 3,2 Å wurde eine potentielle Tentoxinbindungsstelle beschrieben (Groth & Pohl, 2001). In der aktuellen Struktur gelang jedoch die exakte Identifizierung der Bindungstasche des Inhibitors. Das cyclische Tetrapeptid Tentoxin ist an der Schnittstelle der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert, wobei der größte Teil der Bindungstasche von der  $\alpha$ -Untereinheit gebildet wird (siehe Abbildung 4.3-1).

Der Inhibitor interagiert über hydrophobe Kontakte mit den Resten  $\alpha$ I63,  $\alpha$ L65,  $\alpha$ V75,  $\alpha$ Y237,  $\alpha$ L238 und  $\alpha$ M274 und bildet mit dem Rest  $\beta$ D83 eine Wasserstoffbrückenbindung aus.



**Abbildung 4.3-1: Kristallstruktur des CF**<sub>1</sub> **komplexiert mit Tentoxin (Groth, 2002)** In der Kristallstruktur ist die Bindung des Inhibitors Tentoxin (rot) an der Kontaktfläche zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zu sehen. Die Bindungstasche befindet sich zum größten Teil auf der Seite der  $\alpha$ -Untereinheit. PDB-Eintrag 1KMH.

Nach der kristallographischen Identifizierung der Reste, die mit dem Inhibitor in Wechselwirkung stehen, wurde im Hinblick auf diese Reste ein Vergleich der Sequenzen tentoxinsensitiver und -resistenter Organismen durchgeführt (siehe 3.3.1). Der Sequenzvergleich von Spinacia oleracea (sensitiv), Synecchococcus sp. PCC6301 (sensitiv), Chlamydomonas rheinhardtii (resistent) und E. coli (resistent) zeigt für einige der kritischen Reste Übereinstimmungen. Die Reste aI63, aL65,  $\alpha$ V75,  $\alpha$ Y237 und  $\alpha$ L238 sind in allen Sequenzen konserviert (CF<sub>1</sub> Numerierung) und kamen daher nicht für eine Modifikation in E. coli in Frage. Für eine hydrophobere Isoleucin eingenommen wird. Aus der Kristallstruktur ließ sich zudem eine Bedeutung des Restes  $\alpha A96$  für die Tentoxinbindung ableiten: in einigen resistenten Spezies werden diese Positionen durch sperrige hydrophobe oder basische Reste eingenommen (Groth, 2002). Der Sequenzvergleich zeigt, dass an dieser Position in *E. coli* der wesentlich größere Rest Leucin (166,7 Å<sup>3</sup>) lokalisiert ist. Ein ebensolcher Unterschied im Volumen wurde auch für den Rest  $\alpha A50$  ermittelt, an dessen Stelle in *E. coli* ein Glutaminrest (143,8 Å<sup>3</sup>) lokalisiert ist. Diese Positionen

wurden daher für einen Austausch durch die entsprechenden kleineren Alaninreste (88,6 Å<sup>3</sup>), wie sie in der CF<sub>1</sub>-Struktur vorliegen, ausgewählt.

Die Bedeutung des Restes \beta D83 für die Tentoxinbindung wurde sowohl in der Kristallstruktur als auch in Mutagenesestudien deutlich. Ein Austausch durch Leucin, Alanin oder Glutamat im sensitiven Organismus ruft eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor hervor (Tucker et al., 2000). In Chlamydomonas liegt anstelle des Restes βD83 ein Glutamatrest vor und es wurde gezeigt, dass allein der Austausch dieses Restes durch Aspartat ausreicht, um eine Tentoxinsensitivität zu bewirken (Hu et al., 1997). Für E. coli kommt diese Modifikation zur Erzielung einer Sensitivität nicht in Frage, da in der entsprechenden Position bereits ein Aspartat vorhanden ist. Dieses Aspartat ist ebenfalls in der resistenten thermophilen F<sub>1</sub>-ATPase aus Bacillus PS3 konserviert. Eine Überlagerung der CF<sub>1</sub>-Struktur mit der TF<sub>1</sub>-Struktur (Shirakihara et al., 1997) lieferte den Hinweis, dass die Resistenz des TF<sub>1</sub>-Komplexes möglicherweise auf eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen dem entsprechenden Aspartat und der Seitenkette des benachbarten (n-2)-Restes, einem zurückzuführen ist (Groth et al., 2002). Damit wäre die Serin. Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Aspartat und dem Inhibitormolekül nicht mehr möglich. Im CF<sub>1</sub>-Komplex liegt an dieser Position ein Alanin vor, das keine Wasserstoffbrücke eingehen kann. Die E. coli Sequenz weist in der (n-2)-Position ein Serin auf, also ist es möglich, dass eine intramolekulare Bindung eine Wechselwirkung des Aspartats mit dem Inhibitormolekül verhindert. Die dem Aspartat benachbarten Reste G/S/S wurden daher durch die Reste S/A/T, entsprechend der CF<sub>1</sub>-Sequenz, substituiert.

Die zahlreichen Konservierungen kritischer Reste in den Sequenzen resistenter und sensitiver Spezies sind ein Hinweis darauf, dass weitere strukturelle Eigenschaften für eine Resistenz oder Sensitivität ausschlaggebend sein müssen, die sich aus der Sekundär- oder Tertiärstruktur ergeben. Für eine genaue Eingrenzung struktureller Unterschiede der Tentoxinbindungstasche im CF<sub>1</sub>-Komplex und des entsprechenden Bereiches im EF<sub>1</sub>-Komplex wären kristallographische Strukturdaten von hoher Auflösung erforderlich, die aber aus den vorher diskutierten Gründen nicht zur Verfügung stehen. Eine Überlagerung der Strukturen war jedoch durch die Verwendung eines *E. coli* Homologiemodells möglich (Engelbrecht & Junge, 1997). Das Modell basiert auf der *E. coli* Aminosäuresequenz, die in die Kristallstruktur des

mitochondrialen F<sub>1</sub>-Komplexes (Abrahams et al., 1994) eingepasst wurde, und könnte der nativen Struktur des EF<sub>1</sub>-Komplexes entsprechen. Es ist jedoch nicht möglich, die erforderlichen Substitutionen ausschließlich auf der Grundlage dieses Modells festzulegen, da in der *E. coli* Sequenz im Vergleich zur CF<sub>1</sub>-Sequenz eine Folge von 5 Aminosäuren fehlt (siehe Abbildung 3.3-1). Diese Reste befinden sich im N-terminalen Bereich der  $\beta$ -Untereinheit, der an die Tentoxinbindungsstelle angrenzt. Dennoch konnte durch die Überlagerung der CF<sub>1</sub>-Struktur mit dem *E. coli* Modell ein Rest identifiziert werden, der in einem möglichen sterischen Konflikt mit dem aromatischen Ringsystem des Tentoxinmoleküls steht (siehe 3.3.3). Dieser Rest entspricht  $\alpha$ L65 im CF<sub>1</sub>-Komplex und konnte durch den Vergleich der Primärsequenzen nicht als kritisch für *E. coli* identifiziert werden, da er konserviert ist. Dieser Rest zeigt im Homologiemodell eine deutlich andere Ausrichtung als in der CF<sub>1</sub>-Struktur. Um den sterischen Konflikt zu beheben, wurde das relativ große Leucin durch das kleinere Alanin ausgetauscht.

Auf der Grundlage dieser Strukturinformationen konnten gezielt Modifikationen im  $EF_1$ -Komplex vorgenommen werden, wobei die Aminosäuren entweder durch die nativen Reste des CF<sub>1</sub>-Komplexes oder durch kleinere Reste ersetzt wurden. In Untereinheit  $\alpha$  wurden die Mutationen Q49A, L64A, L95A/E96Q und I273M vorgenommen und in Untereinheit  $\beta$  die Substitution G58S/S59A/S60T durchgeführt (*E. coli* Numerierung).

## 4.3.2 Tentoxinsensitivität nach Austausch einzelner Aminosäurereste

Der Effekt von Tentoxin auf die EF<sub>1</sub>-Mutanten wurde anhand der ATP-Hydrolyseaktivität überprüft (Abbildung 3.3-2, Abbildung 3.3-4). Entgegen den Erwartungen zeigte die Substitution ßG58S/S59A/S60T nur eine leichte Aktivitätseinschränkung von etwa 10 % bei 50 µM Tentoxin. Das steht im Gegensatz zu dem Effekt, der im thermophilen F<sub>1</sub>-Komplex durch einen entsprechenden Austausch erzielt werden konnte. Im TF<sub>1</sub>-Komplex wurde durch die Substitution βS66A (E. coli: S59A) eine Bindung des Inhibitors erreicht, die in einer 70 %igen Hemmung der Hydrolyseaktivität resultierte (Groth et al., 2002). Die Hemmung des TF<sub>1</sub>-Komplexes durch diesen Austausch belegt die Vermutung, dass die Wasserstoffbrückenbindung des Aspartat zum Inhibitormolekül für eine stabile Bindung essentiell ist, und dass die Ausbildung einer intramolekularen

Wasserstoffbrücke mit benachbarten Resten, wie z.B. dem Serin, diese Bindung verhindern kann. Daraus lässt sich auch die Tentoxinsensitivität der *Chlamydomonas* Mutante erklären (Hu et al., 1997): an Position (n-2) ist ein Prolin vorhanden, das keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann, daher reicht die Substitution durch das Aspartat aus, um die Resistenz gegenüber Tentoxin aufzuheben. Die geringe Aktivitätseinschränkung, die an der *E. coli* Mutante  $\beta$ G58S/S59A/S60T in Gegenwart von Tentoxin gemessen wurde, ist ein Hinweis darauf, dass die Unterbrechung der vermuteten intramolekularen Wasserstoffbrücke zu einer Tentoxinbindung beitragen kann, dass aber auf jeden Fall noch andere strukturelle Voraussetzungen, wie die Entfernung sperriger Reste in Untereinheit  $\alpha$ , für die Erzeugung einer Bindungstasche notwendig sind. Für weitere strukturelle Erfordernisse spricht auch die unveränderte Tentoxinresistenz einer *E. coli* Mutante, die mit der  $\beta$ -Untereinheit aus Spinat komplementiert wurde (Chen et al., 1995).

Eine Überprüfung des Effektes von Tentoxin auf die Aktivität der Mutanten  $\alpha$ Q49A,  $\alpha$ L95A/E96Q und I273M zeigte, dass durch diese Substitutionen keine Bindung des Inhibitors ermöglicht wurde (siehe Abbildung 3.3-2). Nur die Substitution  $\alpha$ L64A zeigte einen klaren Effekt in Bezug auf die Sensitivität gegenüber Tentoxin. Durch diesen Einzelaustausch konnte ein eindeutiger Rückgang der ATP-Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit der Tentoxinkonzentration gemessen werden. Die ATP-Hydrolyseaktivität wurde bei 50  $\mu$ M Tentoxin um 30 % gehemmt (siehe Abbildung 3.3-4).



#### Abbildung 4.3-2: Substitution αL64A im EF<sub>1</sub>-Komplex

Ausschnitt aus der EF<sub>1</sub>-Struktur des E. coli Homologiemodells, überlagert mit der CF<sub>1</sub>/TTX-Struktur (nur Tentoxin eingeblendet). Die Darstellung zeigt die Ausrichtung des nativen Restes  $\alpha$ L64 zur möglichen Tentoxinbindungsstelle. Der sterische Konflikt mit dem Tentoxinmolekül wird durch den Austausch mit Alanin deutlich reduziert. Im Hintergrund ist der Rest  $\beta$ D61 hervorgehoben, der wahrscheinlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Inhibitor eingeht. Die Abbildung 4.3-2 zeigt im Homologiemodell den möglichen sterischen Konflikt des Restes  $\alpha$ L64 mit dem Tentoxinmolekül, der durch eine Substitution durch Alanin aufgehoben werden kann. Nach dem Modell wird der Abstand zum Inhibitormolekül von 1,7 Å auf 3,8 Å erhöht und damit mehr Raum für eine Bindung geschaffen. Da der erzielte Effekt mit einer 30 %igen Hemmung aber nicht so stark ist wie für den modifizierten TF<sub>1</sub>-Komplex (Groth et al., 2002) oder für den CF<sub>1</sub>-Komplex aus Spinat gemessen wurde (Mochimaru & Sakurai, 1997; Santolini et al., 1998), ist davon auszugehen, dass weitere Reste in Untereinheit  $\alpha$  eine Bindung des Tentoxinmoleküls erschweren.

## 4.3.3 Steigerung der Tentoxinsensitivität durch kombinierte Substitutionen

Der hemmende Effekt von Tentoxin auf den EF<sub>1</sub>-Komplex konnte schrittweise durch die Kombination der Substitutionen gesteigert werden. Durch die Kombination der Mutationen  $\alpha$ Q49A und  $\alpha$ L95A/E96Q, die vorher keinen Effekt mit Tentoxin gezeigt hatten, wurde eine leichte Hemmung von bis zu 15 % erzielt (siehe Abbildung 3.3-5). Die zusätzliche Substitution  $\alpha$ L64A führte zu einem deutlich gesteigerten Effekt, der in einer Hemmung von 78 % bei 50  $\mu$ M TTX resultierte und damit etwa der maximalen Hemmung des modifizierten TF<sub>1</sub>-Komplexes entspricht (Groth et al., 2002). Durch einen zusätzlichen Austausch von  $\alpha$ I273M wurde keine weitere Steigerung der Inhibierung gemessen: hier wurde die Aktivität mit 50  $\mu$ M TTX um 76 % gehemmt. Daraus lässt sich zunächst ableiten, dass die Substitution der sperrigen Reste ( $\alpha$ Q49 und  $\alpha$ L95) einen größeren Effekt auf die Aktivität bewirkt hat als die Änderung der Substitutionen zeigt auch, dass der Rest  $\alpha$ L64 im Vergleich zu den anderen ausgewählten Resten eine besondere Bedeutung für die Bindung des Inhibitors hat.

Die Bedeutung der Mutationen in der Untereinheit  $\beta$  für die Tentoxinbindung wurde in einem gesteigerten Effekt in Kombination mit den  $\alpha$ -Substitutionen nachgewiesen. Schon durch die Kombination  $\beta$ G58S/S59A/S60T mit dem Austausch  $\alpha$ L64A wurde eine Inhibierung der ATP-Hydrolyseaktivität von 58 % erreicht. Eine Kombination aller Substitutionen in den Untereinheiten  $\alpha$  mit der Substitution  $\beta$ G58S/S59A/S60T führte jedoch zu einer nahezu kompletten Hemmung der ATP-Hydrolyseaktivität von etwa 98 % (siehe Abbildung 3.3-6 und Abbildung 4.3-3). Daraus geht hervor, dass die Effekte sich addieren und dass zur Bindung des Inhibitors zum einen eine Bindungstasche in Untereinheit  $\alpha$  durch die Entfernung sperriger Reste geschaffen wird. Zum anderen wird die Bedeutung der Mutation in Untereinheit  $\beta$  für eine komplette Inhibierung der ATP-Hydrolyseaktivität deutlich. Die eindeutige Steigerung des Effektes durch die Mutation  $\beta$ S59A spricht für die Vermutung, dass auch hier die Unterbrechung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zu einer stabilen Bindung des Tentoxinmoleküls an das Aspartat führt.



**Abbildung 4.3-3: Substitutionen in der** *E. coli*  $\alpha$ **- und**  $\beta$ **-Untereinheit** Ausschnitt aus dem Bereich der Tentoxinbindungstasche im E. coli Homologiemodell überlagert mit der CF1/TTX-Struktur (nur Tentoxin eingeblendet). **A**: native Aminosäuren, die teilweise im sterischen Konflikt mit TTX stehen könnten. **B**: Substitutionen der kritischen Reste, die zu einer fast kompletten Hemmung der ATP-Hydrolyseaktivität führen.

## 4.3.4 Charakterisierung der tentoxinsensitiven EF<sub>1</sub>-Mutanten

## 4.3.4.1 Einfluss der Substitutionen auf die K<sub>I</sub>-Werte

Zur weiteren Charakterisierung wurden einige ausgewählte Mutanten für eine Bestimmung der K<sub>I</sub>-Werte eingesetzt (siehe Tabelle 3.3-2). Auffällig ist, dass sich die Mutante  $\alpha$ L64A und die Mehrfachmutante  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q nicht im K<sub>I</sub>-Wert unterscheiden, denn die halbmaximale Hemmung wird in beiden Fällen bei einer Konzentration von 23 µM TTX erreicht. Daraus lässt sich wiederum ableiten, dass die Aufhebung der vermuteten sterischen Konflikte in den Positionen 49 und 95 keine so große Bedeutung hat wie der sterische Konflikt in Position 64. Offensichtlich wird die Zugänglichkeit für den Inhibitor durch die zusätzlichen Substitutionen im Vergleich zum Einzelaustausch  $\alpha$ L64A nicht weiter erleichtert. Im Gegensatz dazu kann durch die Kombination der Mutationen in der  $\beta$ -Untereinheit mit dem Einzelaustausch  $\alpha$ L64A eine strukturelle Voraussetzung geschaffen werden, die eine stabilere Bindung des Tentoxin bewirkt: der K<sub>I</sub> ist im Fall der Mutante aL64A/BG58S/S59A/S60T auf 12,4 µM TTX reduziert. Daraus lässt sich die Bedeutung der Wechselwirkung des Tentoxin mit dem βD61 ableiten, die erst durch die Aufhebung der intramolekularen Wasserstoffbrücke durch die Mutation ßS59A ermöglicht wird. Allerdings kann der Nachteil, der sich für die Inhibitorbindung aus der intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen ßS59 und ßD61 ergibt, durch eine Kombination aller Substitutionen in Untereinheit  $\alpha$  kompensiert werden. Denn mit der Mutante aQ49A/L64A/L95A/E96/I273M konnte eine weitere Verringerung des K<sub>I</sub> erzielt werden. denn hier ist für eine halbmaximale Hemmung eine Konzentration von 8,5 µM TTX erforderlich. Daraus geht hervor, dass vor allem die Substitution I273M für die günstigeren Bindungsvoraussetzungen verantwortlich ist. Der Austausch des hydrophoben Isoleucin durch Methionin verbessert deutlich die Bindung des Inhibitors im Vergleich zur Mutante  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q (K<sub>I</sub>: 23 µM). Möglicherweise ist auch eine geänderte Ausrichtung der Seitenkette des Methionin, wie in Abbildung 4.3-3 zu sehen ist, der Grund dafür. Erst durch den Austausch hydrophober und sperriger Reste in Untereinheit  $\alpha$  in Kombination mit der Unterbrechung der intramolekularen Wasserstoffbrücke in Untereinheit ß können die strukturellen Voraussetzungen für eine Bindungstasche noch weiter gesteigert werden: eine halbmaximale Hemmung wird bei der Mutante  $\alpha$ Q49A/L64A/L95A/E96Q/I273M/ $\beta$ G58S/S59A/S60T schon bei 5,4  $\mu$ M TTX erreicht. Die K<sub>I</sub>-Werte der E. coli Mutanten sind deutlich höher als der K<sub>I</sub>-Wert für den CF<sub>1</sub>-Komplex, der bei 10 nM TTX liegt (Santolini et al., 1999). Die native Bindungstasche im CF<sub>1</sub>-Komplex scheint demnach noch leichter zugänglich zu sein als die erzeugte Bindungstasche im EF<sub>1</sub>-Komplex. Für den TF<sub>1</sub>-Komplex, der in Untereinheit β den Serin-Alanin Austausch trägt, ist eine Konzentration von 5 bis 10 µM TTX für eine halbmaximale Hemmung notwendig, was den E. coli Mutanten entspricht. Im TF<sub>1</sub>-Komplex konnte jedoch schon durch einen einzelnen Austausch eine Bindung des Inhibitors erreicht werden, woraus zu schließen ist, dass in der nativen Untereinheit α bessere strukturelle Voraussetzungen für eine Tentoxinbindung gegeben sind als im EF<sub>1</sub>-Komplex.

## 4.3.4.2 Einfluss des Tentoxin auf $K_{M}$ - und $v_{max}$ -Werte der Mutanten

Aus kinetischen Studien (Steele et al., 1978) und den Strukturdaten des  $CF_1/TTX$ -Komplexes (Groth, 2002) geht hervor, dass Tentoxin als allosterischer Inhibitor der chloroplastidären ATPase wirkt. In der Literatur wird der Mechanismus

entweder als unkompetitiv (Steele et al., 1976) oder als nicht kompetitiv (Dahse et al., 1994) beschrieben. Für eine Charakterisierung der hier vorliegenden Inhibierung wurden für vier der sensitiven Mutanten die kinetischen Konstanten K<sub>M</sub> und v<sub>max</sub> bestimmt (siehe Tabelle 3.3-3). Die  $v_{max}$ -Werte der Mutanten  $\alpha$ L64A, αL64A/βG58S/S59A/S60T, αQ49A/L64A/L95A/E96Q/I273M und der Mutante mit der Kombination aller Substitutionen zeigen wie erwartet eine Abnahme in Gegenwart von Tentoxin (2xK<sub>I</sub>). Die v<sub>max</sub>-Werte mit und ohne Tentoxin weisen dabei dasselbe Verhältnis auf, wie sich auch schon aus den Messungen in Abhängigkeit der Tentoxinkonzentration ergeben hat (siehe Abbildung 3.3-4 bis Abbildung 3.3-6). Eine Abnahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ist sowohl für die unkompetitive als auch für die nicht kompetitive Hemmung charakteristisch. Der vorliegende Mechanismus ist daher aus den K<sub>M</sub>-Werten abzuleiten. Die Michaelis-Menten Konstante K<sub>M</sub> liegt für alle Mutanten im Bereich von 230 bis 280 µM ATP und wird durch die Zugabe von Tentoxin nicht signifikant verändert (240 bis 320 µM ATP). Während für eine unkompetitive Hemmung eine Verringerung der K<sub>M</sub>-Werte zu erwarten ist, stimmen diese Messungen eher mit dem nicht kompetitiven Mechanismus überein, bei dem sich die K<sub>M</sub>-Werte nicht verändern. Dieser Mechanismus zeichnet sich dadurch aus, dass eine Bindung des Tentoxin auch an einen ATPase Komplex möglich ist, dessen katalytische Bindungsstellen nicht mit Nukleotiden beladen sind. Im unkompetitiven Mechanismus dagegen, wäre eine Bindung nur an den Enzym-Substrat-Komplex möglich (Schnick et al., 2002).

#### 4.3.4.3 ATP-Synthese und Protonentranslokation

Der Einfluss von Tentoxin wurde in den vorherigen Versuchen ausschließlich über die ATP-Hydrolyseaktivität charakterisiert. Eine Hemmung ist jedoch auch in der ATP-Syntheserate zu messen (siehe Abbildung 3.3-8). Die Effekte, die in den ATP-Syntheseraten zu beobachten waren, zeigten dieselbe Abstufung wie auch die ATP-Hydrolyseaktivitäten. Die Einzelmutante  $\alpha$ L64A wurde bei 50  $\mu$ M TTX zu 30 % gehemmt, eine Kombination mit den Substitutionen in  $\beta$  resultierte in einer 51 %igen Hemmung. Diese Aktivitätseinschränkungen wurden auch in den entsprechenden ATP-Hydrolyse Messungen beobachtet. Für die Mutante, die die Kombination aller  $\alpha$ -Substitutionen trägt, wurde eine Inhibierung von 56 % gemessen und die Mutante, die die kompletten Substitutionen in  $\alpha$  und  $\beta$  aufweist, zeigte eine 68 %ige Hemmung. Der Effekt des Tentoxin in Bezug auf die ATP-Hydrolyse ist demnach für diese beiden Mutanten stärker ausgeprägt als in Bezug auf die ATP-Synthese, obwohl die Tendenz ähnlich ist. Die Tatsache, dass auch für die Komplettmutante noch eine ATP-Synthese detektiert werden konnte, ist möglicherweise auf das Versuchssystem zurückzuführen, mit dem sich noch sehr geringe ATP-Konzentrationen nachweisen lassen. Am  $CF_0F_1$ -Komplex konnte mit Tentoxin eine ATP-Synthese Hemmung erzielt werden, die der Hemmung der ATP-Hydrolyse entspricht (Pinet et al., 1996). Der Unterschied in der Inhibierung der ATP-Synthese und -Hydrolyse, der bei den *E. coli* Mutanten beobachtet wurde, kann damit zusammenhängen, dass die Bindungstasche für den Inhibitor nicht so perfekt ist, wie im nativen  $CF_1$ -Komplex. Möglicherweise ist die Auswirkung des Inhibitors auf die umgekehrte Katalyserichtung durch eine unterschiedliche Beeinflussung der Konformation geändert oder es ist für die komplette Hemmung der ATP-Synthese eine höhere Tentoxinkonzentration erforderlich.

Die ATP-Hydrolyse getriebene Protonentranslokation durch den membranständigen F<sub>0</sub>-Bereich zeigte ebenfalls eine tentoxinabhängige Einschränkung, die aus der reduzierten ATP-Hydrolyseaktivität resultiert (siehe Abbildung 3.3-9). Der Effekt von Tentoxin zeigte sich allerdings nur mäßig im Ausmaß der Abnahme der ACMA-Fluoreszenz: der ACMA-Quench wurde durch die Substitution aL64A um 16 % und in Kombination mit den β-Substitutionen um 22 % gesenkt. Die kombinierten α-Substitutionen und die Komplettmutante bewirkten eine Reduktion der Protonentranslokation um 33 % und 36 %. Allerdings war der Beginn der Protonentranslokation und die Geschwindigkeit der Reaktion in den kombinierten Mutanten verzögert. Diese Verlangsamung nimmt mit der Anzahl der Substitutionen zu und ist in der Komplettmutante am deutlichsten zu sehen. Damit spiegelt sich in dem Mechanismus der Protonentranslokation der Effekt des Tentoxin auf die ATP-Hydrolyse wider. Offensichtlich reicht jedoch für eine Detektion der Protonentranslokation mit dem sensitiven System der Fluoreszenzmessung eine Restaktivität der ATP-Hydrolyse aus, wie sie die inhibierte  $\alpha/\beta$ -Gesamtmutante mit 2 % aufweist. Für eine weitere Charakterisierung der Verlangsamung der Protonentranslokation, besonders im Fall der aL64A Mutante, sind jedoch andere Versuchssysteme mit einer höheren Auflösung der Vorgänge erforderlich.

#### 4.3.4.4 Reaktivierung der ATP-Hydrolyse

Eine weitere Überprüfung der Eigenschaften des sensitiven *E. coli* F<sub>1</sub>-Komplexes im Vergleich zum CF<sub>1</sub>-Komplex liegt in der Messung einer Reaktivierung der eingeschränkten ATP-Hydrolyseaktivität bei hohen Inhibitor-Konzentrationen. Im CF<sub>1</sub>-Komplex bewirkt die hochaffine Bindung (0,01  $\mu$ M TTX) eines Inhibitormoleküls eine Hemmung, während die Bindung eines zweiten (Santolini et al., 1999) oder dritten (Mochimaru & Sakurai, 1997) Tentoxinmoleküls mit niedriger Affinität (10 µM TTX) zu einer Reaktivierung führt. Auch im modifizierten, Tentoxinsensitiven TF<sub>1</sub>-Komplex konnte eine leichte Reaktivierung der ATP-Hydrolyse von etwa 25 % bei 1 mM Tentoxin erzielt werden (Groth et al., 2002). Für die vier ausgewählten E. coli Mutanten konnte ebenfalls mit 1 mM Tentoxin eine Erhöhung der ATP-Hydrolyserate um 15 bis 22 % im Vergleich zur Hemmung bei 50  $\mu$ M Tentoxin festgestellt werden (siehe Tabelle 3.3-1). Es bleibt offen, ob in E. coli eine weitere Steigerung der Reaktivierung durch noch höhere Tentoxinkonzentrationen erreicht werden kann, da die Löslichkeit des Inhibitors auf 3.5 mM limitiert ist und bereits bei einer Konzentration über 1 mM der monomere Zustand des Moleküls nicht sicher ist (Santolini et al., 1999). Für den isolierten CF<sub>1</sub>-Komplex wurden Reaktivierungen von 200 bis 300 % gemessen (Steele et al., 1978; Dahse et al., 1994), allerdings entspricht die Reaktivierung des membrangebundenen CF<sub>1</sub>-Komplexes (Sigalat et al., 1995) den in E. coli gemessenen Werten. Im Gegensatz zur inhibitorischen Bindungsstelle des Tentoxin (Groth, 2002) ist die reaktivierende Bindungsstelle noch nicht lokalisiert worden. Allerdings zeigt die ATP-Hydrolyse Reaktivierung der EF<sub>1</sub>-Substitutionsmutanten, dass der hemmende und reaktivierende Effekt mit denselben Substitutionen erzielt werden kann. Daher könnte die niedrig affine Bindungsstelle auf einem anderen  $\alpha/\beta$ -Paar, aber in demselben Bereich wie die hochaffine Bindungsstelle liegen.

#### 4.3.5 Rückschlüsse auf die strukturellen Zusammenhänge

Die gezielte Erzeugung einer Tentoxinbindungstasche im resistenten *E. coli* ATPase Komplex zeigt, dass es möglich ist, Strukturdaten anderer Organismen auf das bakterielle Enzym zu übertragen. Hier wurde die dreidimensionale Struktur der Chloroplasten ATPase und der mitochondrialen ATPase, die die Grundlage für das *E. coli* Homologiemodell war, mit der *E. coli* Aminosäuresequenz verknüpft. Aus diesen Daten ließen sich in *E. coli* die für eine Tentoxinbindung kritischen Reste identifizieren. Vor allem der Rest  $\alpha$ L64A konnte dabei nur durch die Überlagerung der Strukturen identifiziert werden. Daraus geht hervor, dass das Homologiemodell in diesem Teilbereich mit einiger Wahrscheinlichkeit der nativen Struktur des *E. coli* F<sub>1</sub>-Komplexes entspricht.

Die Ergebnisse der Substitutionsmutagenese geben einen Einblick in die strukturellen Voraussetzungen, die für eine Tentoxinbindung erforderlich sind. Der molekulare Mechanismus der Inhibierung von ATP-Hydrolyse und -Synthese bleibt aber weiterhin spekulativ. Auffällig ist die räumliche Trennung der Tentoxinbindungstasche von den katalytischen Zentren. Es wird angenommen, dass Tentoxin die Konformationsänderungen im F<sub>1</sub>-Bereich beeinflusst, die für eine katalytische Umsetzung essentiell sind. So könnten sich kleinere Änderungen in der Struktur, die durch die Tentoxinbindung im N-terminalen Bereich des  $\alpha/\beta$ -Paares hervorgerufen wird, über den Bereich der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten und auch der rotierenden Untereinheit  $\gamma$  fortsetzen und in der zentralen Region die Konformation der Nukleotidbindungstaschen beeinflussen. Aus der CF1/TTX Kristallstruktur geht hervor, dass der Inhibitor die katalytische  $\alpha/\beta$ -Schnittstelle in der geschlossenen Konformation festhält und damit den Wechsel in die offene Konformation verhindert (Groth, 2002).

Die Bedeutung kleinerer struktureller Änderungen im N-terminalen Bereich der  $\alpha$ und  $\beta$ -Untereinheiten in bezug auf die Katalyse wird bereits in der Aktivität der *E. coli* Mutanten ohne Tentoxin deutlich. Im Vergleich zum Wildtyp ist in den Mutanten mit den kombinierten Substitutionen die ATP-Hydrolyse Grundaktivität auf 50 bis 60 % reduziert. Die Auswirkung der Substitutionen zeigt sich auch in der Protonentranslokation der  $\alpha$ - und  $\alpha\beta$ -Kombinationsmutanten (Abbildung 3.3-9). Im ACMA-Quench ist hier auch ohne Tentoxin bereits eine leichte Verzögerung der Reaktion zu erkennen.

Zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen der Tentoxinhemmung an den sensitiven *E. coli* Mutanten können Einzelmolekülmessungen oder eine Kristallisation des EF<sub>1</sub>/TTX-Komplexes dienen.

## 5 Zusammenfassung

Die Untersuchung der Struktur der  $F_0F_1$ -ATPase ist von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Wirkungsweise des Enzyms auf molekularer Ebene. Die Struktur des hydrophilen  $F_1$ -Komplexes ist über Röntgenstrukturanalysen weitgehend aufgeklärt. Vom membranständigen  $F_0$ -Bereich fehlt jedoch bisher eine hochaufgelöste Struktur. In der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle Untersuchungen an der *E. coli* ATPase durchgeführt, da die bakterielle ATPase als Minimalmodell für ATPasen verschiedener Organismen angesehen werden kann.

Untersuchungen zum Aufbau des Proteolipid-Oligomers führten zur Identifizierung intra- und intermolekularer Kontaktstellen der c-Monomere. Dazu wurde eine Tryptophansubstitutionsmutagenese am N-terminalen Bereich der c-Monomere durchgeführt. Die Aktivitätseinschränkungen, die sich aus diesen Mutationen ergaben, wurden mit theoretischen Daten verschiedener Strukturmodelle des Proteolipidringes verglichen. Die besten Übereinstimmungen zeigte dabei ein Modell aus 10 c-Monomeren, deren N-terminale Helices nach außen orientiert sind.

Zur kristallographischen Untersuchung des  $F_0F_1$ -Gesamtkomplexes wurde ein Protokoll entwickelt, das die Isolierung eines homogenen, intakten ATPase Komplexes von hoher Reinheit ermöglicht. Die Kristallisationsexperimente lieferten sehr kleine Kristalle, die sich für eine Röntgenstrukturanalyse nicht eigneten. Auch nach Komplexierung der ATPase mit verschiedenen Inhibitoren liessen sich keine geeigneten Kristalle erzielen.

Weiterhin wurde durch gezielte Modifikationen am EF<sub>1</sub>-Komplex die Bindung des phytopathogenen Inhibitors Tentoxin ermöglicht. Die Grundlage dafür lieferte die Kristallstruktur der chloroplastidären ATPase, die mit einem E. coli Homologiemodell überlagert wurde. Auf diese Weise konnten kritische Reste in Untereinheit  $\alpha$  identifiziert werden, die durch sterische Konflikte die Bindung des Inhibitors an den EF<sub>1</sub>-Komplex verhindern. Weiterhin wurde die Bedeutung einer Wasserstoffbrücke eines Restes in der β-Untereinheit mit dem Tentoxinmolekül nachgewiesen, die durch die Wechselwirkung mit einem benachbarten Rest im nativen EF<sub>1</sub>-Komplex verhindert wird. Eine E. coli Mutante mit kombinierten Substitutionen in Untereinheit  $\alpha$  und  $\beta$  zeigte eine komplette Inhibierung der ATP-Hydrolyse durch Tentoxin.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994). Nature 370, 621-628.
- Abrahams, J.P., Buchanan, S.K., Van Raaij, M.J., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93, 9420-9424.
- Altendorf, K., Stalz, W., Greie, J. & Deckers-Hebestreit, G. (2000). J. Exp. Biol. 203 Pt 1, 19-28.
- Arechaga, I. & Jones, P.C. (2001). FEBS Lett. 494, 1-5.
- Arechaga, I., Butler, P.J. & Walker, J.E. (2002). FEBS Lett. 515, 189-193.
- Birkenhäger, R., Greie, J.C., Altendorf, K. & Deckers-Hebestreit, G. (1999). Eur. J. Biochem. 264, 385-396.
- Birkenhäger, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F. & Altendorf, K. (1995). Eur. J. Biochem. 230, 58-67.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Boyer, P.D. (1989). Faseb J. 3, 2164-2178.
- Boyer, P.D. (1993). Biochim. Biophys. Acta 1140, 215-250.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). BioTechniques 5, 376.
- Bullough, D.A., Ceccarelli, E.A., Roise, D. & Allison, W.S. (1989a). Biochim. Biophys. Acta 975, 377-383.
- Bullough, D.A., Ceccarelli, E.A., Verburg, J.G. & Allison, W.S. (1989b). J. Biol. Chem. 264, 9155-9163.
- Bulygin, V.V., Duncan, T.M. & Cross, R.L. (1998). J. Biol. Chem. 273, 31765-31769.
- Cain, B.D. & Simoni, R.D. (1989). J. Biol. Chem. 264, 3292-3300.
- Chen, Z., Spies, A., Hein, R., Zhou, X., Thomas, B.C., Richter, M.L. & Gegenheimer, P. (1995). J. Biol. Chem. 270, 17124-17132.
- Cherepanov, D.A., Mulkidjanian, A.Y. & Junge, W. (1999). FEBS Lett. 449, 1-6.
- Creighton, T.E. (1984). Methods Enzymol. 107, 305-329.
- **d'Arcy, A., Elmore, C., Stihle, M. & Johnston, J.E.** (1996). J. Cryst. Growth **168**, 175-180.
- Dahse, I., Pezennec, S., Girault, G., Berger, G., André, F. & Liebermann, B. (1994). J. Plant Physiol. 143, 615-620.
- Deckers-Hebestreit, G. & Altendorf, K. (1996). Annu. Rev. Microbiol. 50, 791-824.
- Dimroth, P. (2000). Biochim. Biophys. Acta 1458, 374-386.
- Dimroth, P., Wang, H., Gräbe, M. & Oster, G. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 4924-4929.
- Dmitriev, O., Jones, P.C., Jiang, W. & Fillingame, R.H. (1999a). J. Biol. Chem. 274, 15598-15604.
- **Dmitriev, O.Y., Altendorf, K. & Fillingame, R.H.** (1995). Eur. J. Biochem. **233**, 478-483.
- Dmitriev, O.Y., Jones, P.C. & Fillingame, R.H. (1999b). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7785-7790.
- Dmitriev, O.Y., Abildgaard, F., Markley, J.L. & Fillingame, R.H. (2002). Biochemistry 41, 5537-5547.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988). Nucl. Acids Res. 16, 6127-6145.

- Duncan, T.M., Bulygin, V.V., Zhou, Y., Hutcheon, M.L. & Cross, R.L. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10964-10968.
- Dunn, S.D. (1992). J. Biol. Chem. 267, 7630-7636.
- Elston, T., Wang, H. & Oster, G. (1998). Nature 391, 510-513.
- Engelbrecht, S. & Junge, W. (1997). FEBS Lett. 414, 485-491.
- Eya, S., Maeda, M. & Futai, M. (1991). Arch. Biochem. Biophys. 284, 71-77.
- Ferguson, S.J. & Sorgato, M.C. (1982). Annu. Rev. Biochem. 51, 185-217.
- Fillingame, R.H., Jiang, W. & Dmitriev, O.Y. (2000a). J. Exp. Biol. 203 Pt 1, 9-17.
- Fillingame, R.H., Jiang, W., Dmitriev, O.Y. & Jones, P.C. (2000b). Biochim. Biophys. Acta 1458, 387-403.
- Fillingame, R.H., Jones, P.C., Jiang, W., Valiyaveetil, F.I. & Dmitriev, O.Y. (1998). Biochim. Biophys. Acta 1365, 135-142.
- Foster, D.L. & Fillingame, R.H. (1982). J. Biol. Chem. 257, 2009-2015.
- Fromme, P., Boekema, E.J. & Gräber, P. (1987). Z. Naturforsch. 42c, 1239-1245.
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2000). Nat. Struct. Biol. 7, 1055-1061.
- Girvin, M.E. & Fillingame, R.H. (1995). Biochemistry 34, 1635-1645.
- Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L. & Fillingame, R.H. (1998). Biochemistry 37, 8817-8824.
- Gogol, E.P., Lücken, U. & Capaldi, R.A. (1987). FEBS Lett. 219, 274-278.
- Groth, G. (2000). Biochim. Biophys. Acta 1458, 417-427.
- Groth, G. (2002). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3464-3468.
- Groth, G. & Walker, J.E. (1997). FEBS Lett. 410, 117-123.
- Groth, G. & Pohl, E. (2001). J. Biol. Chem. 276, 1345-1352.
- Groth, G., Tilg, Y. & Schirwitz, K. (1998). J. Mol. Biol. 281, 49-59.
- Groth, G., Hisabori, T., Lill, H. & Bald, D. (2002). J. Biol. Chem. 277, 20117-20119.
- Guex, N. & Peitsch, M.C. (1996). Protein Data Bank Quart. Newsletter 77, 7.
- Hanahan, D. (1983). J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Hausrath, A.C., Grüber, G., Matthews, B.W. & Capaldi, R.A. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13697-13702.
- Hermolin, J. & Fillingame, R.H. (1989). J. Biol. Chem. 264, 3896-3903.
- Hermolin, J., Dmitriev, O.Y., Zhang, Y. & Fillingame, R.H. (1999). J. Biol. Chem. 274, 17011-17016.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988). Electrophoresis 9, 28-32.
- Hofmann, A., Proust, J., Dorowski, A., Schantz, R. & Huber, R. (2000). J. Biol. Chem. 275, 8072-8082.
- Hoppe, J. & Sebald, W. (1984). Biochim. Biophys. Acta 768, 1-27.
- Hu, D., Fiedler, H.R., Golan, T., Edelman, M., Strotmann, H., Shavit, N. & Leu, S. (1997). J. Biol. Chem. 272, 5457-5463.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T. & Michel, H. (2000). Structure Fold. Des. 8, 669-684.
- Jäger, H., Birkenhäger, R., Stalz, W.D., Altendorf, K. & Deckers-Hebestreit, G. (1998). Eur. J. Biochem. 251, 122-132.
- Jiang, W. & Fillingame, R.H. (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6607-6612.
- Jiang, W., Hermolin, J. & Fillingame, R.H. (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98, 4966-4971.
- Jones, P.C. & Fillingame, R.H. (1998). J. Biol. Chem. 273, 29701-29705.

- Jones, P.C., Jiang, W. & Fillingame, R.H. (1998). J. Biol. Chem. 273, 17178-17185.
- Jones, P.C., Hermolin, J., Jiang, W. & Fillingame, R.H. (2000). J. Biol. Chem. 275, 31340-31346.
- Junge, W. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4735-4737.
- Junge, W., Lill, H. & Engelbrecht, S. (1997). Trends Biochem. Sci. 22, 420-423.
- Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., Jr. & Yoshida, M. (1998). J. Biol. Chem. 273, 19375-19377.
- Klionsky, D.J., Brusilow, W.S. & Simoni, R.D. (1984). J. Bacteriol. 160, 1055-1060.
- Kraulis, P.J. (1991). J. Appl. Cryst. 24, 946-950.
- Kumamoto, C.A. & Simoni, R.D. (1986). J. Biol. Chem. 261, 10037-10042.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982). J. Mol. Biol. 157, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Nature 227, 680-685.
- Leatherbarrow, R.J. (1990). Trends Biochem. Sci. 15, 455-458.
- Lill, H., Burkovski, A., Altendorf, K., Junge, W. & Engelbrecht, S. (1993). Biochim. Biophys. Acta 1144, 278-284.
- Matthey, U., Braun, D. & Dimroth, P. (2002). Eur. J. Biochem. 269, 1942-1946.
- Matthey, U., Kaim, G., Braun, D., Wuthrich, K. & Dimroth, P. (1999). Eur. J. Biochem. 261, 459-467.
- McLachlin, D.T. & Dunn, S.D. (2000). Biochemistry 39, 3486-3490.
- McLachlin, D.T., Coveny, A.M., Clark, S.M. & Dunn, S.D. (2000). J. Biol. Chem. 275, 17571-17577.
- Menz, R.I., Walker, J.E. & Leslie, A.G. (2001). Cell 106, 331-341.
- Mochimaru, M. & Sakurai, H. (1997). FEBS Lett. 419, 23-26.
- Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M. & Futai, M. (1991). J. Biol. Chem. 266, 22141-22146.
- Nadanaciva, S., Weber, J. & Senior, A.E. (2000). Biochemistry 39, 9583-9590.
- Nishio, K., Iwamoto-Kihara, A., Yamamoto, A., Wada, Y. & Futai, M. (2002). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **30**, 30.
- Noji, H. & Yoshida, M. (2001). J. Biol. Chem. 276, 1665-1668.
- **Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K., Jr.** (1997). Nature **386**, 299-302.
- Ogilvie, I., Aggeler, R. & Capaldi, R.A. (1997). J. Biol. Chem. 272, 16652-16656.
- Ogilvie, I., Wilkens, S., Rodgers, A.J., Aggeler, R. & Capaldi, R.A. (1998). Acta Physiol. Scand. Suppl. 643, 169-175.
- Pänke, O. & Rumberg, B. (1999). Biochim. Biophys. Acta 1412, 118-128.
- Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W. & Engelbrecht, S. (2000). FEBS Lett. 472, 34-38.
- Pinet, E., Cavelier, F., Verducci, J., Girault, G., Dubart, L., Haraux, F., Sigalat, C. & André, F. (1996). Biochemistry 35, 12804-12811.
- Rastogi, V.K. & Girvin, M.E. (1999). Nature 402, 263-268.
- Ren, H. & Allison, W.S. (2000). Biochim. Biophys. Acta 1458, 221-233.
- Rodgers, A.J. & Capaldi, R.A. (1998). J. Biol. Chem. 273, 29406-29410.
- Rodgers, A.J. & Wilce, M.C. (2000). Nat. Struct. Biol. 7, 1051-1054.
- Rodgers, A.J., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M.B., Howitt, S.M. & Capaldi, R.A. (1997). J. Biol. Chem. 272, 31058-31064.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S. & Junge, W. (1996). Nature 381, 623-625.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S. & Junge, W. (1997). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4401-4405.

- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. & Futai, M. (1999). Science 286, 1722-1724.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning A laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santolini, J., Haraux, F., Sigalat, C., Munier, L. & André, F. (1998). J. Biol. Chem. 273, 3343-3350.
- Santolini, J., Haraux, F., Sigalat, C., Moal, G. & André, F. (1999). J. Biol. Chem. 274, 849-858.
- Sayle, R.A. & Milner-White, E.J. (1995). Trends Biochem. Sci. 20, 374.
- Schemidt, R.A., Qu, J., Williams, J.R. & Brusilow, W.S. (1998). J. Bacteriol. 180, 3205-3208.
- Schnick, C., Koertgen, N. & Groth, G. (2002). J. Biol. Chem. 277, 51003-51007.
- Schnick, C., Forrest, L.R., Sansom, M.S. & Groth, G. (2000). Biochim. Biophys. Acta 1459, 49-60.
- Schulenberg, B., Aggeler, R., Murray, J. & Capaldi, R.A. (1999). J. Biol. Chem. 274, 34233-34237.
- Schulenberg, B., Wellmer, F., Lill, H., Junge, W. & Engelbrecht, S. (1997). Eur. J. Biochem. 249, 134-141.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. & Müller, D.J. (2000). Nature 405, 418-419.
- Segel, I.H. (1993). Enzyme Kinetics. (Wiley Classics Library).
- Senior, A.E., Nadanaciva, S. & Weber, J. (2002). Biochim. Biophys. Acta 1553, 188-211.
- Sharp, L.L., Zhou, J. & Blair, D.F. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7946-7950.
- Shirakihara, Y., Leslie, A.G., Abrahams, J.P., Walker, J.E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y. & Yoshida, M. (1997). Structure 5, 825-836.
- Sigalat, C., Pitard, B. & Haraux, F. (1995). FEBS Lett. 368, 253-256.
- Singh, S., Turina, P., Bustamante, C.J., Keller, D.J. & Capaldi, R. (1996). FEBS Lett. 397, 30-34.
- Stahlberg, H., Müller, D.J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U. & Dimroth, P. (2001). EMBO Rep. 2, 229-233.
- Steele, J.A., Uchytil, T.F. & Durbin, R.D. (1978). Biochim. Biophys. Acta 504, 136-141.
- Steele, J.A., Uchytil, T.F., Durbin, R.D., Bhatnagar, P.K. & Rich, D.H. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2245-2248.
- Stock, D., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (1999). Science 286, 1700-1705.
- Strotmann, H., Thelen, R., Müller, W. & Baum, W. (1990). Eur. J. Biochem. 193, 879-886.
- Sutcliffe, J.G. (1979). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90.
- Takeyasu, K., Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Iwamoto-Kihara, A. & Futai, M. (1996). FEBS Lett. 392, 110-113.
- Tanaka, S., Lerner, S.A. & Lin, E.C. (1967). J. Bacteriol. 93, 642-648.
- Taussky, H.H. & Shorr, E. (1953). J. Biol. Chem. 202, 675-685.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
- Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M. & Capaldi, R.A. (2001a). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 898-902.

- Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M. & Capaldi, R.A. (2000). FEBS Lett. 470, 244-248.
- Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M. & Capaldi, R.A. (2001b). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 6560-6564.
- Tucker, W.C., Du, Z., Hein, R., Richter, M.L. & Gromet-Elhanan, Z. (2000). J. Biol. Chem. 275, 906-912.
- Uhlin, U., Cox, G.B. & Guss, J.M. (1997). Structure 5, 1219-1230.
- Valiyaveetil, F.I. & Fillingame, R.H. (1998). J. Biol. Chem. 273, 16241-16247.
- van Raaij, M.J., Abrahams, J.P., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6913-6917.
- van Walraven, H.S., Strotmann, H., Schwarz, O. & Rumberg, B. (1996). FEBS Lett. 379, 309-313.
- Vik, S.B. & Antonio, B.J. (1994). J. Biol. Chem. 269, 30364-30369.
- Vik, S.B., Patterson, A.R. & Antonio, B.J. (1998). J. Biol. Chem. 273, 16229-16234.
- von Meyenburg, K., Jorgensen, B.B., Nielsen, J., Hansen, F.G. & Michelsen, O. (1982). Tokai J. Exp. Clin. Med. 7, 23-31.
- Vonck, J., von Nidda, T.K., Meier, T., Matthey, U., Mills, D.J., Kühlbrandt, W. & Dimroth, P. (2002). J. Mol. Biol. 321, 307-316.
- Wada, T., Long, J.C., Zhang, D. & Vik, S.B. (1999). J. Biol. Chem. 274, 17353-17357.
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H. & Capaldi, R.A. (1995). FEBS Lett. 368, 235-238.
- Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M. & Weeds, A.G. (1990). EMBO J. 9, 4103-4109.
- Weber, J. & Senior, A.E. (2000). Biochim. Biophys. Acta 1458, 300-309.
- Weber, J., Dunn, S.D. & Senior, A.E. (1999). J. Biol. Chem. 274, 19124-19128.
- Wilkens, S. & Capaldi, R.A. (1998). Nature 393, 29.
- Wilkens, S., Dunn, S.D., Chandler, J., Dahlquist, F.W. & Capaldi, R.A. (1997). Nat. Struct. Biol. 4, 198-201.
- Wilkens, S., Zhou, J., Nakayama, R., Dunn, S.D. & Capaldi, R.A. (2000). J. Mol. Biol. 295, 387-391.
- Yamada, H., Moriyama, Y., Maeda, M. & Futai, M. (1996). FEBS Lett. 390, 34-38.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr. & Yoshida, M. (1998). Cell 93, 1117-1124.
- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K. & Itoh, H. (2001). Nature 410, 898-904.
- Zamyatin, A.A. (1972). Prog. Biophys. Mol. Biol. 24, 107-123.
- Zhang, F., Robbins, D.J., Cobb, M.H. & Goldsmith, E.J. (1993). J. Mol. Biol. 233, 550-552.
- Zhang, Y. & Fillingame, R.H. (1994). J. Biol. Chem. 269, 5473-5479.
- Zhao, Q., Smith, G., Modi, S., Paine, M., Wolf, R.C., Tew, D., Lian, L.Y., Primrose, W.U., Roberts, G.C. & Driessen, H.P. (1996). J. Struct. Biol. 116, 320-325.
- Zhou, Y., Duncan, T.M. & Cross, R.L. (1997). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10583-10587.
- Zhou, Y., Duncan, T.M., Bulygin, V.V., Hutcheon, M.L. & Cross, R.L. (1996). Biochim. Biophys. Acta 1275, 96-100.

## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Strotmann möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Biochemie der Pflanzen an dem herausfordernden Thema der ATPase Strukturuntersuchung arbeiten zu können.

Herrn Dr. Georg Groth möchte ich für die engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für viele Anregungen und immer neue Impulse zum Thema danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Holger Lill für die freundliche Überlassung des Plasmids zur Kristallisation der ATPase.

Bei Herrn Dr. Bruno Miroux bedanke ich mich für die Einführung in die automatische DNA-Sequenzierung und für seine Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes am CNRS in Paris.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie der Pflanzen für eine sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und für vielseitige Unterstützungen in allen Lebenslagen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner "Laborfamilie": Claudia, Erik, Jan, Nicole, Karolina, Thomas und Antje. Ich möchte Euch für eine sehr gute Zusammenarbeit und die vielen Aufmunterungen danken. Ich werde mich immer gerne an die gemeinsame Zeit in Düsseldorf erinnern.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die durch ihre Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem gilt mein Dank Peter, der nie aufgehört hat mich zu ermutigen und mir mit seinem Rat zur Seite zu stehen.