

Die Bedeutung der F_0F_1 Grenzfläche für Bau und Funktion der ATP-Synthase

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Karolina Zientek-Lang
aus Olesno

Düsseldorf
2003

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

Referent: Prof. Dr. Heinrich Strotmann

Koreferent: Prof. Dr. Hanns Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2004

Gewidmet meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
Abkürzungen und Symbole	3
1.0 Einleitung	5
1.1 Struktur der ATP-Synthase	5
1.2 Untereinheiten des F ₁ Teilkomplexes	7
1.2.1 Untereinheiten der katalytischen Region	7
1.2.2 Untereinheit γ	9
1.2.3 Untereinheit δ	10
1.2.4 Untereinheit ϵ	10
1.3 Untereinheiten des F ₀ Teilkomplexes	11
1.3.1 Untereinheit a (plastidäre Untereinheit IV)	11
1.3.2 Untereinheit b (plastidäre Untereinheit I und II)	12
1.3.3 Untereinheit c (plastidäre Untereinheit III)	12
1.4 Katalytischer Mechanismus	14
1.4.1 „Binding – change“ Mechanismus	14
1.4.2 Kopplungsmechanismus und Protonentranslokation	15
1.5 Stator-Rotor Hypothese	18
1.6 Zielsetzung	19
2.0 Material und Methoden	20
2.1 Biochemische Methoden	20
2.1.0 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	20
2.1.1 Isolation von Thylakoiden und Chlorophyllbestimmung	20
2.1.2 Präparation der F ₁ -freien Thylakoidmembranen	21
2.1.3 Rekonstitutionsverfahren	21
2.1.4 Isolation der Teilkomplexe	22
2.2 Methoden zur Identifizierung der Komplexe	23
2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.2.2 Silberfärbung von Proteinen	25
2.2.3 Quantitative Bestimmung von Proteinbanden	25
2.2.4 Western Blot	26
2.3 Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1 Nährmedien für die Anzucht der <i>E. coli</i> Zellen	28
2.3.2 Herstellung der kompetenten Zellen	29
2.3.3 Transformation der Zellen	29
2.3.4 Isolation der Plasmid DNA	29
2.3.5 Heterologe Überexpression der plastidären γ Untereinheit	30
2.3.6 Isolation der Inclusion Bodies	30
2.3.7 Isolation der Proteine aus Inclusion Bodies	31
3.0 Ergebnisteil	32
3.1 Rekonstitutionsverfahren und Isolation der Teilkomplexe	32
3.1.1 Rekonstitution	32
3.1.2 Optimierung der Mg ²⁺ Konzentration für die Rekonstitutionen	34
3.1.3 Kriterien der Identifizierung des rekonstituierten Komplexes	36
3.1.4 Bindungsspezifität an die F ₁ -freien Thylakoidmembranen	38

3.2	Wechselwirkungen zwischen dem CF ₀ Komplex und F ₁ Untereinheiten im zentralen Stielbereich	40
3.2.1	Bindung der TF ₁ -ε Untereinheit an die F ₁ -freien Thylakoidmembranen	40
3.2.2	Bindung der N-terminalen Domäne der ε Untereinheit an die F ₁ -freien Thylakoidmembranen	42
3.2.3	Rekonstitution des membrangebundenen CF ₀ mit γ und γε	44
3.2.4	Bindung des thermophilen α ₃ β ₃ γ Komplexes in Abwesenheit und Gegenwart der ε Untereinheit	46
3.3	Wechselwirkungen im peripheren Stielbereich der ATP-Synthase	47
3.3.1	Bindung der bakteriellen δ Untereinheit an F ₁ -freie Thylakoidmembranen	47
3.3.2	Affinität der bakteriellen δ Untereinheit zum plastidären CF ₀ Komplex	50
3.3.3	Wechselwirkung der δ Untereinheit mit dem F ₀ und den Untereinheiten α und β	52
3.4	Bindung von γ, δ und ε an F ₀	54
3.5	Rekonstitution des gesamten CF ₀ F ₁ Komplexes	56
4.0	Diskussion	58
4.1	Rekonstitutionssystem	58
4.2	Rolle von Mg ²⁺ -Ionen im Rekonstitutionsansatz	60
4.3	Untersuchungen zu Wechselwirkungen im zentralen Stiel	60
4.3.1	Wechselwirkung zwischen der ε Untereinheit und dem F ₀ Komplex	61
4.3.2	Interaktion zwischen der γ Untereinheit und dem F ₀ Komplex	64
4.3.3	Wechselwirkungen zwischen der γ und ε Untereinheit sowie dem CF ₀ Komplex	65
4.4	Interaktion zwischen den Untereinheiten im peripheren Stielbereich	70
4.4.1	Kontakt der δ Untereinheit zum F ₀ Komplex	71
4.4.2	Kontakt des zweiten Stiels mit den Untereinheiten des katalytischen Zentrums	73
4.4.3	Affinität der bakteriellen δ Untereinheit zum chloroplastidären F ₀ Komplex	74
5.0	Zusammenfassung	78
6.0	Literaturverzeichnis	80

Abkürzungen und Symbole

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
AgNO ₃	Silbernitrat
AMP-PNP	5`-Adenylyl-imidodiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CF ₁	F ₁ Subkomplex der chloroplastidären ATP-Synthase
CF ₀	F ₀ Subkomplex der chloroplastidären ATP-Synthase
Cl ⁻	Chlorid-Ion
D	Aspartat
DMSO	Dimethylsulfonamid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
µg	Mikrogramm
H	Histidin
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosid
kDa	kilo-Dalton
λ	Wellenlänge
l	Liter
µl	Mikroliter
M	Molar
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

mM	Millimolar
μM	Mikromolar
min	Minute
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumnitrit
NaSCN	Natriumthiocyanat (Natriumrhodanid)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
Octylglucosid	Octyl-β-D-glucopyranosid
PDB	Proteindatenbank (Protein Data Bank)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
s	Sekunde
R	Arginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Threonin
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamid
TF ₁	F ₁ Subkomplex der ATP-Synthase aus <i>Bacillus thermophilus</i>
TF ₀	F ₀ Subkomplex der ATP-Synthase aus <i>Bacillus thermophilus</i>
TRICIN	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehung pro Minute
V	Volt
w/v	Gewicht zu Volumen
x g	Erdanziehungskraft

1.0 Einleitung

Die ATP-Synthase stellt eines der bedeutsamsten Enzyme für den Energiestoffwechsel der Zelle dar. Man findet sie in den Plasmamembranen der Bakterien wie auch in den Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten. Die ATP-Synthase katalysiert die endergone Bildung einer Phosphorsäureanhydridbindung zwischen einem ADP Molekül mit einem anorganischen Phosphat und damit die Bildung von ATP. Als Antriebskraft dient die Energie eines Protonengradienten, der durch Elektronentransfer während der Photosynthese bzw. Atmung an den Membranen von Chloroplasten, Mitochondrien und Bakterien erzeugt wird. In *Propionigenium modestum* dagegen ist die Antriebsenergie ein Natriumionengradient. Bei niedrigem Gradienten und hohem Phosphorylierungspotential kann die ATP-Synthase als Ionen-translozierende ATP-Hydrolase arbeiten, also die umgekehrte Reaktion katalysieren.

Das Enzym verbindet demnach zwei Funktionen: einen vektoriellen Ionentransport und die skalare Synthese bzw. Hydrolyse von ATP. Der für den Transport verantwortliche Enzymbereich ist membranintegral, der katalytische Teil extrinsisch; die beiden Teile sind funktionell und strukturell durch bestimmte Untereinheiten miteinander gekoppelt.

1.1 Struktur der ATP-Synthase

ATPasen aus evolutionär weit entfernten Organismen zeigen trotz zum Teil großer Unterschiede in der Primärstruktur weitgehende Homologie auf der Ebene der Tertiär- und Quartärstruktur wie auch in der Funktion. Basierend auf Daten aus verschiedenen Organismen war es daher möglich, ein universelles Modell des Enzyms zu entwickeln. Auch die zahlreichen funktionsfähigen, chimären Komplexe stellen in Bezug auf die 3D-Struktur und Funktion einen Beweis für einen hohen Konservierungsgrad der ATP-Synthase dar. Das in diesem Kapitel beschriebene Modell der ATPase beruht auf Daten der bakteriellen und plastidären Enzyme, die auch Gegenstand der experimentellen Untersuchungen sind. Das Enzym aus Mitochondrien wird im weiteren nicht ausführlich behandelt.

Die ATP-Synthase ist aus acht (in Bakterien) bzw. neun (in Chloroplasten) Untereinheiten zusammengesetzt (Abb. 1.1.1.). Diese Untereinheiten formen zwei separate Teilkomplexe: den membranständigen F_0 und den peripheren, an die Membran gebundenen F_1 . Die beiden Subkomplexe werden über mono- bzw. divalente Kationen miteinander stabilisiert.

Elektronenmikroskopischen Aufnahmen des isolierten, plastidären Enzyms zeigen eine dreiteilige Organisation der ATP-Synthase (Böttcher 1990). Zwischen dem F_0 Komplex und der

F₁-Masse befinden sich zwei Stiele (Stalks), die beide Teile nicht nur strukturell sondern auch funktionell miteinander verbinden.

Der F₀ besteht in Bakterien aus drei Untereinheiten a, b und c mit einer Stöchiometrie von ab₂c₍₉₋₁₂₎. In Chloroplasten und Cyanobakterien ist der F₀ Komplex aus vier Untereinheiten zusammengesetzt: I(= b₁), II(= b₂), III₍₉₋₁₄₎(= c) und IV(= a). Charakteristisch für jede der Untereinheiten ist das Vorhandensein einer transmembranen, hydrophoben α-helikalen Domäne. Die 9-14 Kopien der Untereinheit III sind in Form eines Ringes assembliert. Die genaue Stöchiometrie konnte bis jetzt nicht bestimmt werden.

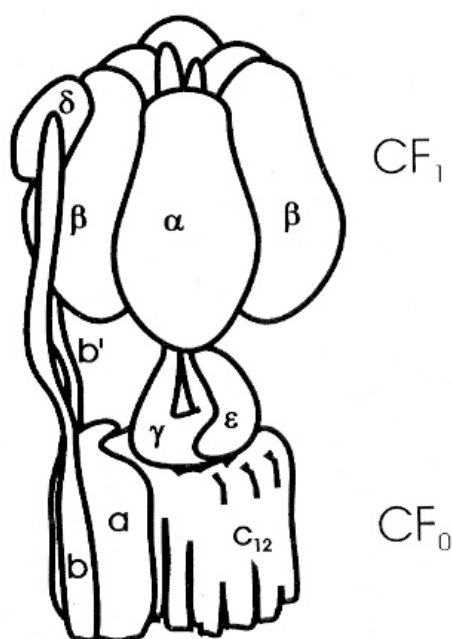


Abb. 1.1.1.: Schematische Darstellung der chloroplastidären CF₁CF₀ ATP-Synthase (nach Groth und Strotmann 1999).

Die katalytische Region des Enzyms bilden jeweils drei Kopien der α und der β Untereinheiten. Der protonen-translozierende F₀ Bereich setzt sich aus den Untereinheiten b, b', c₍₉₋₁₄₎ und a zusammen. Beide Subkomplexe verbindet der zentrale und der periphere Stiel, die von den Untereinheiten des Grenzbereiches γ, ε und δ gebildet werden.

Den für die katalytische Reaktion zuständigen F₁ Teilkomplex bilden fünf Untereinheiten, die entsprechend ihrer Größe mit den griechischen Buchstaben α, β, γ, δ und ε bezeichnet werden und eine Stöchiometrie von 3 : 3 : 1 : 1 : 1 haben. Die α und β Untereinheiten beinhalten die katalytischen Zentren und nicht-katalytische Bindungsstellen für ATP bzw. ADP.

Die drei α und β Untereinheiten sind alternierend angeordnet (Tiedge et al. 1983). Diese auch „Kopf“ genannte Hexagonstruktur stellt die Hauptmasse des Enzyms dar, ihre 3D-Struktur ist durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (Mitochondrien - Abrahams et al. 1994; Abrahams et al. 1996; Van Raaji et al. 1996; Orris et al. 1996; Braig et al. 2000; Gibbons et

al. 2000; *E. coli* – Hausrath et al. 1999; *Bacillus thermophilus* – Shirakihara et al. 1997; Chloroplasten - Groth 2001). Das Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ -Ringes wird von der N-terminalen und der C-terminalen Helix der γ Untereinheit ausgefüllt. Die beiden miteinander gewundenen Helices fungieren als Rotationsachse. Der mittlere Teil der γ sowie die ε Untereinheit bilden die Verbindung zum F_0 . Ein zweiter „peripherer“ Stiel besteht aus den F_0 -Untereinheiten I und II (bzw. b) soll über die δ Untereinheit mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon mit der Membran fixieren.

1.2 Untereinheiten des F_1 Teilkomplexes

1.2.1 Untereinheiten der katalytischen Region

Durch Röntgenanalyse von Kristallen des F_1 Subkomplexes aus Mitochondrien (Abrahams et al. 1994) wurde die Struktur des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons und des axialen Teils der γ Untereinheit aufgelöst. Nachfolgende Strukturanalysen aus anderen Organismen lieferten weitere Einzelheiten; aber der Grundbau scheint bei allen F-ATPasen relativ gleich zu sein.

Die beiden Untereinheiten α (55,4 kDa) und β (53,8 kDa) zeigen eine sehr ähnliche Struktur; es lassen sich drei Domänen unterscheiden: die N-terminale Domäne liegt am weitesten von der Membran entfernt und ist aus 6 β -Faltblättern aufgebaut. Im Mittelteil der Untereinheiten, der von α -Helices und β -Faltblättern gebildet wird, befinden sich die Nukleotidbindungstaschen. Die C-terminale Domäne besteht aus mehreren α -Helices (Abb. 1.2.1.1.).

An den Grenzflächen zwischen den α und β Untereinheiten befinden sich jeweils drei katalytische und drei nicht-katalytische Nukleotid-Bindungsstellen. Die ersten werden überwiegend von der β und die zweiten von der α Untereinheit gebildet.

Die von Abrahams (1994) aufgelöste Struktur des mitochondrialen F_1 Teilkomplexes präsentierte eine durch ein nicht-hydrolysierbares ATP – Analog, MgAMP-PNP, in einem bestimmten Ausschnitt des katalytischen Vorgangs fixierte Form des Enzyms. Die drei β Untereinheiten befanden sich in drei Konformationen entsprechend ihrer unterschiedlichen Substratbesetzung der katalytischen Zentren. Eine der Taschen enthielt MgADP, die zweite ein MgAMP-PNP und die dritte war ohne ein gebundenes Nukleotid. Die beladenen (mit MgADP bzw. MgAMP-PNP) β Untereinheiten lagen in einer geschlossenen (Abb. 1.2.1.1.), die nicht beladene dagegen in einer offenen Konformation vor. Im Gegensatz zu der geschlossenen zeigte sich in der offenen Konformation die C-terminale Domäne und der untere Teil der Nukleotidbindungstasche nach unten, zur Membran hin geklappt. Die nicht katalytischen

Stellen auf den drei α Untereinheiten waren mit MgAMP-PNP beladen und zeigten eine einheitliche Konformation.

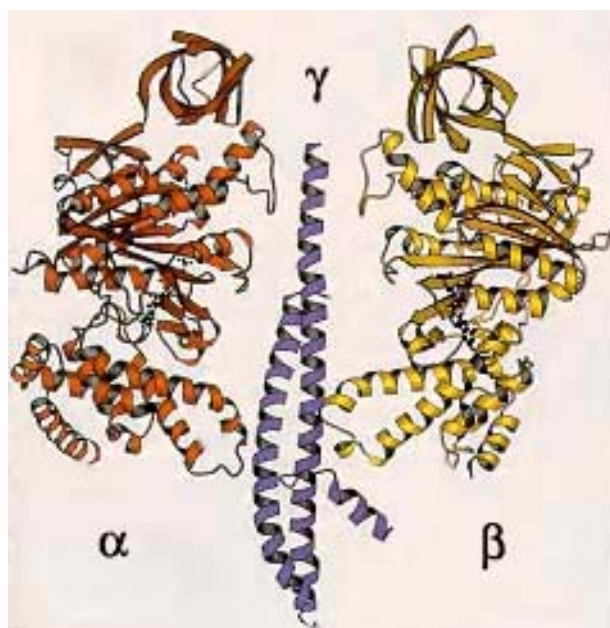


Abb. 1.2.1.1.: Röntgenstruktur der Untereinheiten α und β aus Rinderherz-Mitochondrien (nach Abrahams et al. 1994). Dargestellt ist die strukturelle Organisation des Teils des F_1 im Querschnitt mit je einer α (in rot) und einer β (in gelb) Untereinheit aus dem $\alpha_3\beta_3$ Hexagon. In der Mitte befinden sich die N- und C-terminalen Helices der γ Untereinheit. Zu erkennen ist die dreiteilige Struktur der α und β Untereinheiten (genaue Beschreibung im Text). Beide Untereinheiten liegen in einer geschlossenen Konformation vor.

Weitere mittlerweile publizierte Kristallstrukturen zeigen eine ähnliche asymmetrische Organisation der katalytischen Stellen (Mitochondrien - van Raaji et al. 1996; Orriss et al. 1996; Braig et al. 2000; *E. coli* – Hausrath et al. 1999). Andere dagegen wie der $\alpha_3\beta_3$ Teilkomplex aus *Bacillus thermophilus* (Shirakihara et al. 1997) und der $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ Teilkomplex aus Chloroplasten (Groth et al. 2001) waren symmetrisch. In diesen Fällen waren alle drei β Untereinheiten unbeladen und in einer einheitlichen Konformation. Die β Untereinheiten aus *Bacillus thermophilus* nahmen die offene Konformation ein, die aus Chloroplasten zeigten dagegen die geschlossene Konformation.

Für eine Teilreaktion des katalytischen Zyklus ist eine Interaktion zwischen den β Untereinheiten und der γ Untereinheit essentiell (Miyauchi et al. 1995; Nakamoto et al. 2000; Ren et al. 2000; Hara et al. 2000). Die sehr stark konservierte „DELSEED“ Sequenz (β Asp 380 - β Asp386) in den β Untereinheiten soll für den Kontakt mit der γ Untereinheit verantwortlich sein (Hara et al. 2000).

1.2.2 Untereinheit γ

Die γ Untereinheit (35,8 kDa) ist eine zentral gelegene Untereinheit, die sowohl dem Kopfbereich als auch dem Stielbereich angehört. An der Ausbildung des zentralen Stiels ist außerdem die ϵ Untereinheit beteiligt.

Der γ Untereinheit kommt eine wichtige Bedeutung bei der Kopplung der Protonentranslokation mit dem katalytischen Prozess zu (Menz et al. 2001). Bei der plastidären ATP-Synthase nimmt die γ Untereinheit außerdem an der Regulation der Aktivität des Enzyms teil (Strotmann et al. 1998; Hisabori et al. 2002).

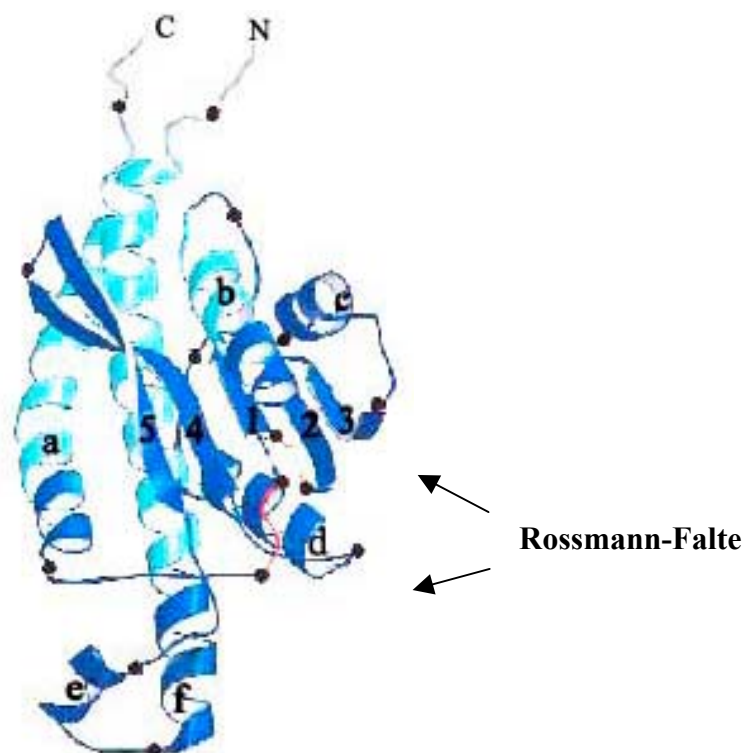


Abb. 1.2.2.1.: Röntgenstruktur des mittleren Bereiches der mitochondrialen γ Untereinheit (nach Gibbons et al. 2000). Die N- und C-terminalen Helices (Positionen 1 - 19 und 235 - 272) sind zur Übersichtlichkeit schematisch dargestellt. Die Buchstaben a bis f kennzeichnen die α -helikalen Strukturelemente (in türkis); β -Faltblätter (in blau) sind durchnummeriert (1 - 5).

Bei der ersten Röntgenstrukturanalyse des F_1 Subkomplexes aus Mitochondrien (Abrahams et al. 1994) konnte nur ein Teil der γ Untereinheit auf molekularer Ebene aufgelöst werden. Die verdrehten N- und die C-terminalen Domänen ragten als lange α -Helices in das Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons hinein.

Erst vor kurzem wurde unabhängig voneinander auch die Struktur des mittleren Bereiches der γ Untereinheit aus *E. coli* (Rodgers et al. 2000) und aus Rinderherzmitochondrien (Gibbons et al. 2000) aufgeklärt. Es zeigte sich in beiden Fällen eine ähnliche strukturelle Organisation. Die Struktur dieses Teilbereiches der γ Untereinheit aus Mitochondrien ist in der Abbildung 1.2.2.1. dargestellt. Er besteht aus fünf β -Faltblättern und sechs α -Helices. Die Faltblätter 1 bis 3 bilden mit zwei α -Helices (b und c in der Abbildung) eine Struktur, die man als „Rossmann-Falte“ bezeichnet. Diese ist durch eine Helix (in der Abbildung mit d gekennzeichnet) mit den Faltblättern 4 und 5 verbunden.

Der entsprechende Bereich aus *E. coli* besteht ebenso aus einem Bündel von 5 β -Faltblättern zwischen zwei α Helices, außerdem sind noch zwei weitere α - Helices und ein β -Faltblatt gefunden worden.

1.2.3 Untereinheit δ

Die Struktur der δ Untereinheit (20,4 kDa) konnte bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Die mit Hilfe einer multidimensionalen NMR-Spektroskopie aufgelöste Teilstruktur eines 105 Aminosäuren langen N-terminalen Fragmentes besteht aus einem Bündel von sechs aufeinanderliegenden α - Helices (Wilkens et al. 1997).

Die δ Untereinheit soll an der Bildung des zweiten, peripheren Stiels beteiligt sein, der den F_0 Komplex mit dem katalytischen Bereich verbindet. Dieser periphere Stiel soll hauptsächlich aus dem hydrophilen C-Terminus der zwei Kopien der b Untereinheit (bzw. Untereinheiten I und II) bestehen, hält das $\alpha_3\beta_3$ Hexagon während der Katalyse. Der Kontakt mit den α und β Untereinheiten soll über die δ Untereinheit vermittelt werden (Maggio et al. 1988; Archinard et al. 1986; Bragg et al. 1986; Joshi et al. 1990; Collinson et al. 1994; Belogradov et al. 1995). Diese Schlüsse wurden aus Bindungsversuchen gezogen.

1.2.4 Untereinheit ϵ

Die ϵ Untereinheit stellt mit 14,7 kDa die kleinste Untereinheit des F_1 Subkomplexes dar. Die mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgelöste Struktur der ϵ Untereinheit aus *E. coli* (Wilkens et al. 1995) zeigte einen Aufbau aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne ist aus 10 β -Faltblättern aufgebaut; die C-terminale aus vorwiegend zwei α - Helices. Weitere Strukturen der ϵ Untereinheit sind aus *E. coli* (Uhlin et al. 1997) und aus Mitochondrien (Gibbons et al. 2000) veröffentlicht worden. Sie stimmen mit der von Wilkens (1995) gefundenen Struktur

überein. Demgegenüber zeigte die von Rogers et al. (2000) beschriebene Struktur des $\gamma\epsilon$ Komplexes in der C-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit eine andere Konformation. Die beiden α Helices waren nicht haarnadelförmig gebogen sondern voneinander getrennt und umgaben die γ Untereinheit. Das Ergebnis suggeriert eine Bewegungsfreiheit der Helices, die auch durch Kreuzvernetzungsexperimente bestätigt wurde (Schulenberg et al. 1997).

Man nimmt an, dass die ϵ Untereinheit ihre Konformation und Position während des katalytischen Vorgangs ändert. Diese Änderungen sollen für die für die ϵ Untereinheit vorgeschlagene Funktion als Inhibitor der Enzymaktivität verantwortlich sein (Tsunoda et al. 2001).

1.3 Untereinheiten des F_0 Teilkomplexes

1.3.1 Untereinheit a (plastidäre Untereinheit IV)

Die stark hydrophobe Untereinheit a (Untereinheit a: 30 kDa; Untereinheit IV: 25,1 kDa) stellt das am wenigsten untersuchte Protein des membranintegrierten F_0 Teilkomplexes dar. Es werden Strukturmodelle mit sechs (Jäger et al. 1998; Yamada et al. 1996) bzw. fünf (Hatch et al. 1995; Valiyaveetil et al. 1998) transmembranen α -Helices diskutiert. Auch die Orientierung der C- und N-Termini in der Membran ist umstritten. Anhand einer Oberflächenmarkierung von eingeführten Cysteinen schließen Valiyaveetil et al. (1998), dass beim bakteriellen Enzym der N-Terminus dem Periplasma und der C-Terminus dem Cytoplasma zugewandt ist. Durch Mutagenesestudien konnte eine direkte Beteiligung der a Untereinheit an dem Protonentransport gezeigt werden. Mittels dieses Verfahrens sind die wichtigen, an dem Prozess beteiligten Aminosäuren aR210, aE219, aH245 identifiziert worden (Deckers-Hebestreit et al. 1996; Deckers-Hebestreit et al. 2000). Essentiell scheint das Arginin an der Position 210 zu sein. Jede Substitution dieser stark konservierten Aminosäure beeinträchtigte die Protonentranslokation (Vik et al. 2000).

Ein intermolekularer Kontakt der a Untereinheit mit der ebenfalls an dem Protonentransport beteiligten c Untereinheit wurde durch Mutagenesestudien (Howitt et al. 1992) und NMR-Spektroskopie (Filingame et al. 1998) nachgewiesen.

1.3.2 Untereinheit b (plastidäre Untereinheit I und II)

Die zweite am F_0 Teil beteiligte Untereinheit ist die Untereinheit b (Untereinheit b 17 kDa; Untereinheit I 20,9 kDa; Untereinheit II 16,4 kDa). Ihre Position ist am Rand des F_0 Teilkomplexes bestimmt worden (Hoppe et al. 1984). Die hydrophobe N-terminale Domäne, deren Struktur in einem Chloroform/Methanol/Wasser Gemisch mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgelöst wurde, verankert das Protein in der Membran (Dimitriev et al. 1999). Dieser Bereich ist als α -Helix ausgebildet, die durch einen Knick (Position 23 – 26) mit einem Winkel von 20° unterbrochen wird. Weitere Untersuchungen lassen vermuten (Hoppe et al. 1983), dass diese Biegung an der Membranoberfläche liegt. Es wird angenommen, dass der Knick dazu dient, den cytoplasmatischen Teil der b Untereinheit senkrecht relativ zur Membran zu positionieren und somit die Ausbildung des zweiten Stiels erleichtert.

Der polare, in das Cytoplasma ragende Teil ist ebenfalls als helikale Struktur mit einer Länge von 110\AA ausgebildet (Dunn et al. 2000). Die isolierte hydrophile Domäne aus dem Bakterium *E. coli* liegt in Lösung in dimerer Form (Dunn et al. 1992) vor. Resultate unterschiedlicher Experimente sprechen dafür, dass auch im F_0F_1 Komplex die b Untereinheit als Dimer vorkommt (Rodgers et al. 1997; Revington et al. 1999).

Die C-terminale Domäne (b 123 – 156) ist für die Bindung an die δ Untereinheit zuständig (McLachlin et al. 1998), was durch Kreuzvernetzungen nachgewiesen werden konnte (McLachlin et al. 2000; Beckers et al. 1992).

Im Gegensatz zu den a und c Untereinheiten des F_0 Komplexes ist für die b Untereinheit keine direkte Beteiligung an dem Protonentransport gefunden worden. Dennoch verlor nach Extraktion der b Untereinheit der F_0 Komplex die Fähigkeit zur Protonentranslokation (Schneider et al. 1985).

1.3.3 Untereinheit c (plastidäre Untereinheit III)

Die kleinste Untereinheit, die Untereinheit c (c Untereinheit 8,1 kDa; Untereinheit III 7,9 kDa) wird wegen ihres extrem hydrophoben Charakters auch Proteolipid genannt. Girvin et al. (1998) konnten die Struktur der Untereinheit c in einem Chloroform/Methanol/Wasser Gemisch mit Hilfe der NMR-Spektroskopie auflösen. Das c-Monomer besteht aus zwei antiparallelen, transmembranen α Helices (N- und C-terminale Domäne), die über eine hydrophile Schlaufe (loop) miteinander verbunden sind (Abb. 1.3.3.1.).

In der Membran bilden bis zu 14 c Untereinheiten eine Zylinder- oder Ring-ähnliche Struktur, wie mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte (Birkenhäu-

ger et al. 1995; Singh et al. 1996). Die Anzahl der Untereinheiten im c-Oligomer ist umstritten. Man vermutet, dass sie für jeden Organismus spezifisch ist. Für die ATP-Synthase aus Spinat-Chloroplasten ist ein Ring aus 12 (Fromme et al. 1987) und aus 14 c-Monomeren (Seelert et al. 2000) beschrieben worden. Für das Enzym aus *E. coli* wurde dagegen ein Proteolipidring aus 9 bis 12 c Untereinheiten postuliert (Jones, Filingame 1998). Eine Röntgenstrukturanalyse eines kristallisierten F₁-c Komplexes aus Hefe hat einen Ring aus 10 c-Monomeren zum Vorschein kommen lassen. Ebenso wie die Anzahl der c Untereinheiten ist die Orientierung der N- und C-terminalen Helices im Ring ungeklärt.

Es werden derzeit zwei Modelle diskutiert in denen, einmal die C-terminale Helix (Dimitriev et al. 1999) und einmal die N-terminale Helix (Groth et al. 1997; Schnick et al. 2000) an der Außenseite des Oligomers liegen soll.

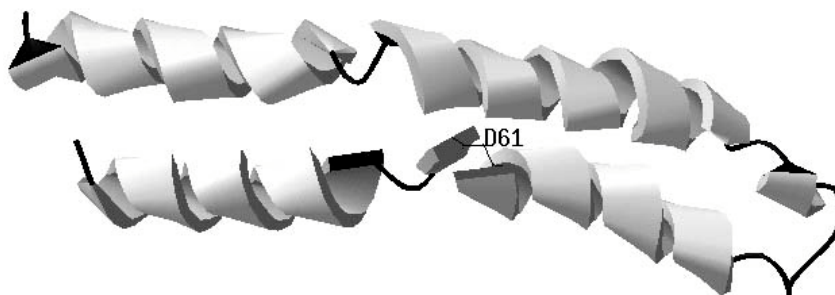


Abb. 1.3.3.1.: NMR-Struktur der c Untereinheit aus *E. coli*. Dargestellt sind zwei in Form einer Haarnadel-Struktur assoziierten α -Helices des c-Monomers, die über einen hydrophilen loop miteinander verbunden sind. Hervorgehoben ist der für die Protonentranslokation essentielle Aspartat-Rest cD61. Grafische Darstellung mit SWISS-Pdb-Viewer (Version 3.7).

Die c Untereinheit ist an der Protonentranslokation beteiligt (Deckers–Hebestreit et al. 2000). Eine essentielle Rolle spielt dabei eine konservierte saure Aminosäure in der Position 61 (cD61/cE61), die sich in der Mitte der C-terminalen Helix befindet und von hydrophoben Resten umgeben ist (Assanti–Porter et al. 1995; Filingame et al. 2000). Substitutionen in der Position 61 führten in allen Fällen zur vollständigen Hemmung des Protonenflusses. Durch gezielte Mutagenese war es jedoch möglich, die Asparaginsäure (cD61) aus der Position 61 in die äquivalente Position (cA24) der N-terminalen Helix zu übertragen, ohne dass dadurch die Protonendurchlässigkeit beeinträchtigt wurde (Miller et al. 1990).

Der hydrophile loop zwischen der N- und C-terminalen Domäne soll an der Energieübertragung zwischen dem F₀ und dem katalytischen Zentrum beteiligt sein (Zhang et al. 1995).

Dafür sprechen seine Position außerhalb der Membran in der strukturellen Nähe der ϵ und γ Untereinheiten und der hydrophile Charakter (Licher et al. 1998).

1.4 Katalytischer Mechanismus

1.4.1 „Binding – change“ Mechanismus

Gängige Funktionsmodelle der ATP-Synthase basieren auf dem von Boyer (1989) postulierten „binding – change“ Mechanismus. Dieser setzt die Beteiligung aller drei katalytischen Stellen voraus, die während des katalytischen Vorgangs zyklisch die Affinitäten zu den Substraten und dem Produkt ändern. Bei der ATP-Synthese soll folgender Zyklus durchlaufen werden: wenn eine katalytische Stelle die Substrate ADP und Pi bindet, synthetisiert die zweite ein ATP Molekül und die dritte setzt das Produkt ATP frei. Nach drei dieser Schritte befindet sich jeder der katalytischen Stellen wieder in der Anfangskonfiguration. Entsprechend ihrer Affinität zum Substrat werden die drei Konfigurationen als L (low), T (tight) und O (no affinity, open) bezeichnet. Das Wechseln der Affinität wird durch Änderung der Konformation der katalytischen Zentren realisiert.

Die beschriebene Struktur eines F_1 Subkomplexes aus Rinderherz-Mitochondrien (Abrahams et al. 1994), kann als Beleg für den „binding – change“ Mechanismus gewertet werden. Die drei katalytischen Zentren sind nicht nur unterschiedlich besetzt (ADP, AMP-PNP bzw. ohne gebundenes Nukleotid), sondern die drei β Untereinheiten zeigten unterschiedliche Konformationen.

Der von Boyer vorgeschlagene „binding – change“ Mechanismus lässt allerdings noch viele Fragen offen. Einer „bisisite“ Katalyse (Boyer 2000) wird ein „trisisite“ Mechanismus gegenüber gestellt (Menz et al. 2001; Ren et al. 2000). Bei der „bisisite“ Katalyse werden jeweils zwei gleichzeitig beladene Nukleotidbindungstaschen postuliert; bei der „trisisite“ Hypothese eine parallele Besetzung aller drei katalytischen Stellen durch Nukleotide vermutet. Man nimmt zudem an, dass die katalytische Reaktion nicht nur drei, sondern mindestens fünf unterschiedliche Konformationszustände erfordert (Weber, Senior 2000; Senior et al. 2002). Einen Beleg für diese Hypothese liefert die Kristallstruktur der durch Aluminiumfluorid inhibierten ATP-Synthase aus *E. coli* (Menz et al. 2001).

Einen Hinweis für die Beteiligung der γ Untereinheit an den zyklischen Konformationsänderungen im katalytischen Prozess lieferte schon die Strukturanalyse des F_1 Teilkomplexes aus Mitochondrien (Abrahams et al. 1994). Die drei unterschiedlichen Konformationen sollten

nach Ansicht der Autoren durch die Position der zentralen aus den beiden terminalen Helices der γ Untereinheit bestehenden Achse zu den drei β Untereinheiten induziert werden. Mittlerweile ist die Rotation der γ Untereinheit relativ zu den drei β Untereinheiten an isolierten F_1 Subkomplexen aus verschiedenen Organismen experimentell nachgewiesen worden.

Die Drehbewegung eines über Biotin-Streptavidin an die γ Untereinheit gebundenen mit Fluorochromen versehenen Actinfilamentes konnte während der Hydrolyse von ATP in isolierten $\alpha_3\beta_3\gamma$ aus *Bacillus thermophilus* fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden (Noji et al. 1997). Zu diesem Zweck wurde das isolierte $\alpha_3\beta_3$ Hexagon über in den N-Terminus der β Untereinheiten eingebaute Histidin-Reste auf eine Nickel-dotierte Glasplatte fixiert. Mit der gleichen Technik wurde die Rotation der γ Untereinheit in isoliertem F_1 von *E. coli* (Noji et al. 1999; Omote et al. 1999) und Chloroplasten (Hisabori et al. 1999) gezeigt. Die Rotation der γ Untereinheit wurde mit Hilfe von Kreuzvernetzungsexperimenten auch im membrangebundenen F_1F_0 Komplex während der Hydrolyse bzw. Synthese von ATP belegt (Zhou et al. 1996). Ebenso konnte die Rotation der ε Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* (Kato–Yamada et al. 1998) und des Proteolipidringes aus *E. coli* (Sambongi et al. 1999; Pänke et al. 2000; Fillin-game et al. 2002) während der ATP-Hydrolyse beobachtet werden. Die für alle drei Untereinheiten γ , ε und c vergleichbare Drehgeschwindigkeit und gleiche Drehrichtung deuten darauf hin, dass die drei Untereinheiten miteinander verknüpft sind, was auch durch Kreuzvernetzungsexperimente unterstützt wird. Bei einer gleichzeitigen Vernetzung der c - ε und ε - γ Untereinheiten wurde keine die Aktivität des Enzyms beeinträchtigende Wirkung beobachtet (Tsunoda et al. 2001). Eine enge Assoziation zwischen der γ Untereinheit und dem c -Ring wurde ebenso in der Struktur der ATPase aus Hefe beobachtet (Stock et al. 1999).

1.4.2 Kopplungsmechanismus und Protonentranslokation

Trotz intensiver Forschung ist der Mechanismus der Protonentranslokation und die Kopplung des Protonentransportes mit den Vorgängen in den katalytischen Zentren des Enzyms weitgehend unaufgeklärt.

Die Kopplungshypothese postuliert, dass die Hydrolyse bzw. Synthese von ATP durch die Rotation einer Achse bestehend aus den Untereinheiten γ , ε und dem Proteolipidzylinder relativ zum Stator $\alpha_3\beta_3\delta b_2 a$ mit dem Protonentransport gekoppelt ist (Weber et al. 2003). Mit dem Begriff Stator werden alle nicht rotierenden Untereinheiten der ATPase bezeichnet. Die Drehbewegung der γ Untereinheit im Inneren des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons und der damit verbundene, wechselnde Kontakt zu den drei β Untereinheiten soll für die Konformationsänderungen in

den Nukleotidbindungstaschen verantwortlich sein. Es wird derzeit angenommen, dass die Rotation der Achse durch eine Rotation des Proteolipidringes getrieben wird. Diese entsteht durch eine Wechselwirkung zwischen der a Untereinheit, c Untereinheiten und Protonen und ermöglicht die Protonentranslokation.

Die Verbindung des Proteolipidringes mit den Untereinheiten γ und ϵ ist unbekannt. Man nimmt an, dass der hydrophile loop, der die zwei Helices der c Untereinheit miteinander verbindet, dabei eine Rolle spielt. Diese Vermutung beruht auf der Tatsache, dass nur in dieser Region der c Untereinheit Kontaktstellen mit den ϵ und γ Untereinheiten identifiziert worden sind (Zhang et al. 1994; Zahng et al. 1995; Watts et al. 1995; Hermolin et al. 1999). Im weiteren gibt es Daten, die eine Konformationsänderung im polaren loop der c Untereinheit während der Protonentranslokation implizieren (Girvin et al. 1993; Assadi-Porter et al. 1995).

Die vermutete Kopplung der Rotation mit dem Protonentransport (Junge et al. 1997; Zhou et al. 1997) beruht auf der Wechselwirkung der F_0 Untereinheit a mit dem Proteolipidzylinder, die in der Protonentranslokation resultiert.

Die Rotation des Proteolipidringes relativ zur der a Untereinheit soll durch die Bindung von Protonen an der positiv und ihre Freisetzung an der negativ geladenen Membranseite erzeugt werden (Vik und Antonio 1994; Junge et al. 1997). Man nimmt dabei an, dass die Translokation der Protonen über eine Protonierung und Deprotonierung der Carboxyl-Gruppe der Asparaginsäure (cD61) bzw. Glutaminsäure (cE61) jeder c Untereinheit verläuft (siehe auch Kap. 1.3.3). Durch Mutagenesestudien ist auch die konservierte Position aR210 der a Untereinheit als essentiell für die Protonentranslokation identifiziert worden (Hartzog et al. 1993; Howitt et al. 1992; Hatch et al. 1995; Wang et al. 1994).

Es gibt mehrere Hypothesen, die den Vorgang der Protonentransport-gekoppelten Bewegung beschreiben. Das von Vik und Antonio (1994) für das Enzym aus *E. coli* beschriebene Modell postuliert starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem permanent positiv geladenen Arginin an der Position 210 der Untereinheit a und der deprotonierten Asparaginsäure in der Position 61 einer der c Untereinheiten im Proteolipidring. Protonierung auf der positiv geladenen Membranseite resultiert in der Dissoziation dieser Salzbrücke. Dabei wird eine Bewegung des Proteolipidringes erzeugt, so dass die nächste nicht-protonierte D61-Position im Ring mit dem Arginin der a Untereinheit interagieren kann.

Andere Modelle setzen eine Existenz von Kanälen für die Protonen voraus, die entweder durch die a Untereinheit gebildet werden (Junge et al. 1997; Rastogi et al. 1999; Dimroth et al. 2000) oder die durch eine enge Assoziation der transmembranen Helices der a und c Un-

tereinheit an der Grenzfläche zwischen diesen entstehen sollen (Weber et al. 1997; Galanis et al. 1989).

In dem Modell von Junge et al. (1997), das schematisch in der Abbildung 1.4.2.1. dargestellt ist, liegen in der Membran zwei versetzte Halbkanäle vor. Ein Halbkanal ist von der periplasmatischen, der andere von der cytoplasmatischen Seite für die Protonen zugänglich. Elf der zwölf den Proteolipidring bildenden c Untereinheiten besitzen in der Position 61 (cD61) eine Bindungsstelle für die Protonen, die über die Kanäle in der Untereinheit erreichbar ist. Die Drehung des Proteolipidringes relativ zu der Untereinheit a wird in diesem Modell nach dem von Vik und Antonio (1994) vorgeschlagenen Mechanismus ermöglicht.

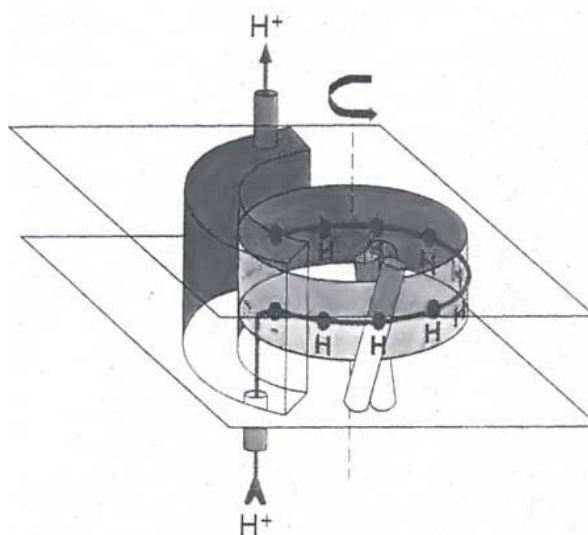


Abb. 1.4.2.1.: Modell der in einer Protonentranslokation resultierenden Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten a und c im F_0 Subkomplex (nach Junge 1997). Die Untereinheit a und der c-Ring sind schematisch dargestellt. Die Bindungsstellen für Protonen auf jeder Untereinheit c im Proteolipidring wurden gekennzeichnet. In Balkenform sind zwei Helices einer der c Untereinheiten im c-Ring dargestellt. Auf der Untereinheit a wurden zwei Halbkanäle markiert, die von der cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Seite für die Protonen zugänglich sind. Der Weg eines einzelnen Protons kann entlang des Pfeiles verfolgt werden. Der zweite verbogene Pfeil über dem Proteolipidring zeigt dessen Drehrichtung während der Synthese eines ATP-Moleküls.

Auch in dem Modell von Rastogi und Girvin (1999) erreichen die Protonen ihre in der Membran liegende Bindestelle (cD61) über Halbkanäle in der a Untereinheit. Jedoch gegenüber dem Modell von Junge et al. (1993), wo als Grundlage für die Rotation des Proteolipidringes die starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der a und c Untereinheit betont werden, stellen in diesem die sterischen Interaktionen zwischen den Untereinheiten a und c

und die Konformationsänderungen in der C-terminalen Domäne der c Untereinheit eine Basis für die Rotation dar.

1.5 Stator–Rotor Hypothese

Die Rotationshypothese postuliert die Übertragung der Rotation des Proteolipidringes auf die Untereinheiten γ und ϵ . Die rotierenden Untereinheiten werden als Rotor bezeichnet. Die Drehbewegung der γ Untereinheit im Inneren des $\alpha_3\beta_3$ Köpfchens spielt die entscheidende Rolle für den katalytischen Vorgang. Durch den aus der Rotation resultierenden, wechselnden Kontakt der γ Untereinheit zu den drei β Untereinheiten werden Konformationsänderungen an den katalytischen Stellen hervorgerufen.

Die Rotationshypothese stellt einige Anforderungen an die Struktur des Enzyms. Die Rotation der γ Untereinheit würde ohne eine Fixierung des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons nicht zum Erfolg führen. Es wird daher geschlußfolgert, dass eine Struktur existieren muß, die das Mitdrehen des $\alpha_3\beta_3$ Subkomplexes verhindert. Diese Funktion wird dem zweiten, „peripheren“ Stiel zugewiesen (Lill et al. 1996; Sorgen et al. 1999; Weber et al. 2003). Das Vorhandensein des zweiten Stiels wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in den ATP-Synthasen aus Chloroplasten (Böttcher et al. 1998), *E. coli* (Wilkens et al. 1998) und Mitochondrien (Karrasch et al. 1999) nachgewiesen. Der Stiel wird von zwei Untereinheiten, δ und b, gebildet und durchspannt den gesamten Raum von dem $\alpha_3\beta_3$ Hexagon bis zu der in der Membran liegenden Untereinheit a (Sawada et al. 1997; Rodgers et al. 1998; Dunn et al. 2000). Die Rolle des zweiten Stiels als Stator-Teil wird durch Kreuzvernetzungsexperimente unterstützt. Eine Vernetzung zwischen der α und δ Untereinheit in der ATP-Synthase aus *E. coli* zeigte keine negativen Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms (Oglivie et al. 1997).

Zielsetzung

Das Ziel der Untersuchungen in dieser Dissertation ist eine genaue Erforschung des Interaktionsbereiches zwischen dem F_0 und F_1 . Da zur Zeit die Struktur dieser Region nicht aufgelöst wurde, basieren die existierenden Modelle auf Daten aus Kreuzvernetzungsexperimenten, elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Röntgenstrukturanalysen von isolierten Fragmenten dieses Bereiches. Nach allen Modellen kommen in der F_0F_1 Grenzregion drei F_1 Untereinheiten, γ , δ und ϵ , vor. Diese sollen zwei Strukturen bilden, die man als zentralen (γ und ϵ Untereinheiten) und peripheren Stiel bezeichnet. Der periphere Stiel besteht aus den Untereinheiten δ des F_1 und b des F_0 . Den beiden Strukturen werden unterschiedliche Rollen zugewiesen. Der zentrale Stiel soll dem Rotor, der periphere dem Stator angehören. Beide Strukturen haben demgemäß wichtige Funktion innerhalb der ATP-Synthase. Daher ist das Wissen über die strukturelle und funktionelle Organisation des Grenzbereiches für das Verstehen des Enzyms von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit soll versucht werden, auf den F_0 mit isolierten F_1 Untereinheiten den F_1F_0 Komplex zu rekonstituieren. Dabei soll insbesondere die Bedeutung der oben genannten kleinen F_1 Untereinheiten untersucht werden. Aus praktischen Erwägungen wird als F_0 Baustein die vom F_1 befreite Thylakoidmembran von Spinat-Chloroplasten verwendet. Die F_1 Bausteine sind größtenteils bakterielle Untereinheiten aus *Bacillus thermophilus*. Sie bieten gegenüber den F_1 Untereinheiten aus Chloroplasten verschiedene Vorteile: 1.) sie zeigen eine höhere Stabilität; 2.) für die isolierten Untereinheiten wurde die Assemblierung unter geeigneten Bedingungen zu einer funktionsfähigen F_1 -ATPase gezeigt (Yosida et al. 1975); 3.) es existieren Klone für die einzelnen Untereinheiten (Matsui et al. 1995; Kato-Yamada et al. 1997; Hisabori et al. 1997; Hara et al. 2001) und etablierte Expressionssysteme (Hisabori et al. 1997; Amano et al. 1994).

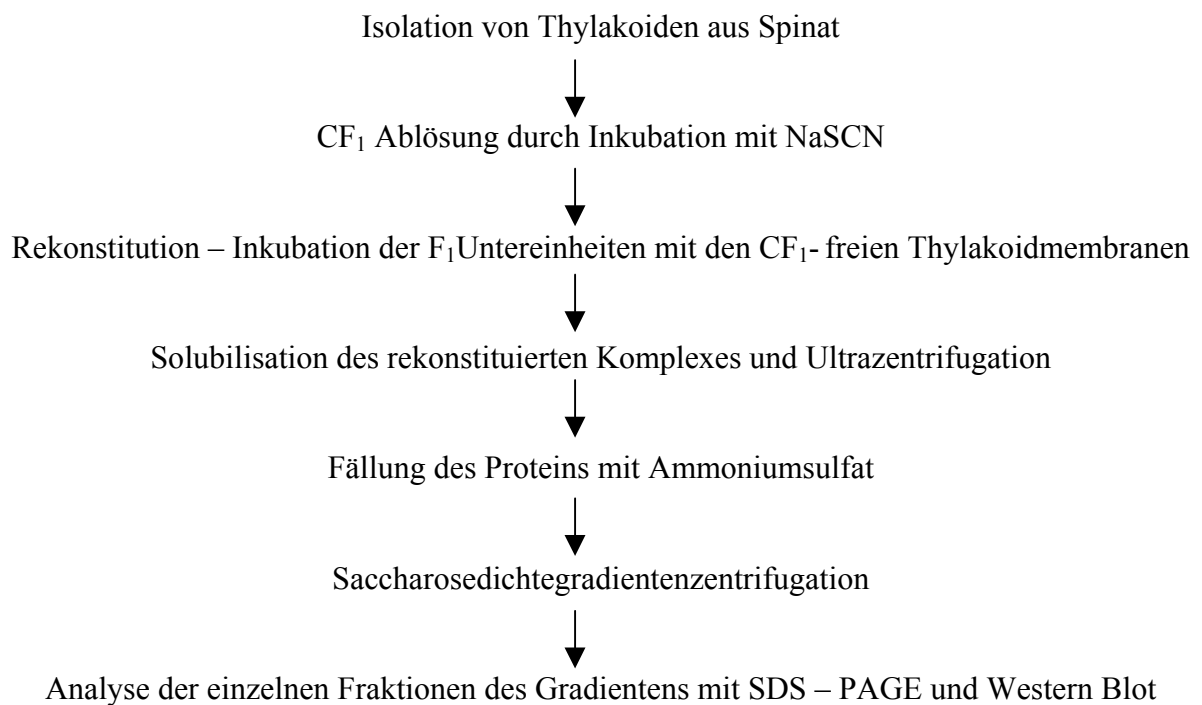
Aus den geplanten Rekonstitutionen mit F_1 -freien Thylakoiden werden chimäre F_0F_1 Komplexe resultieren. Es wurde vielfach gezeigt, dass trotz der bemerkenswerten Unterschiede auf der Ebene der primären Proteinstruktur chimäre ATP-Synthasen vollständig funktionsfähig sind. Die durchgeführten Rekonstitutionsexperimente sollen daher weitere Informationen über die Austauschbarkeit von Untereinheiten zwischen dem bakteriellen und plastidären F_0F_1 Komplex liefern.

Durch schrittweises Vorgehen beginnend mit der Bindung einzelner Untereinheiten an die F_1 -freien Thylakoidmembranen, der Bildung der einzelnen Stiele und des gesamten Grenzbereiches sollte schließlich der vollständige Komplex rekonstituiert werden.

2.0 Material und Methoden

2.1 Biochemische Methoden

2.1.0 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs



2.1.1 Isolation von Thylakoiden und Chlorophyllbestimmung

Isolationsmedium I	300 mM	Saccharose
	10 mM	Tricin/Cl, pH 8
	1 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl in H ₂ O bidest.
Isolationsmedium II	10 mM	Tricin/Cl, pH 8
	1 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl in H ₂ O bidest.

Thylakoide wurden aus Spinatblättern (*Spinacia oleracea*) der Sorte Polka isoliert. Das Alter der verwendeten Pflanzen betrug etwa 8 Wochen.

Frisch geerntete Spinatblätter (20 g) wurden gewaschen und von der Mittelrippe befreit. Der Aufschluß der Blätter erfolgte durch Homogenisieren mit 100 ml Isolationsmedium I in einem Waring Blendor. Das Homogenisat wurde durch eine Nylongaze (20 µM Porendurchmesser)

filtriert und bei 5000 g, 5 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 ml Medium I resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde mit dem Isolationsmedium II wiederholt. Nach der erneuten Zentrifugation (5000 g, 5 min) wurde das Sediment in 5 ml Isolationsmedium II aufgenommen.

Der Chlorophyllgehalt wurde in 80% Aceton nach der Methode von Arnon (1949) ermittelt und die Thylakoidsuspension mit Isolationmedium II auf 1 mg Chlorophyll/ml eingestellt.

Die gesamte Isolation ist in einem Kühlraum bei 4°C mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt worden.

2.1.2 Präparation der F₁-freien Thylakoidmembranen

Die Herstellung der F₁-freien Thylakoiden erfolgte durch Inkubation mit Natriumrhodanid (Fiedler et al. 1994). Dafür wurden frisch isolierte Thylakoide (Chlorophyllkonzentration 1mg/ml) 2 Minuten mit Natriumrhodanid (Endkonzentration 2 M) im Eisbad gerührt. Zur Trennung des Überstandes von den Membranen wurde die Suspension zentrifugiert (12000 x g , 5 Minuten , 4°C). Das Sediment wurde anschließend in 40 ml Isolationsmedium II resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs sind die F₁-freien Thylakoide in 2–3 ml Isolationsmedium II aufgenommen worden.

Die Chlorophyllkonzentration wurde nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt.

2.1.3 Rekonstitutionsverfahren (nach Andreo et al.1982, modifiziert)

Inkubationsmedium	20 mM 0,2 mg/ml	Tricin, pH 7,8 BSA in H ₂ O bidest.
Medium I	0,4 M 0,02 M 0,01 M 0,25 mg/ml	Saccharose Tricin, pH 7,8 NaCl BSA in H ₂ O bidest.
Medium II	0,4 M 0,02 M 0,01 M	Saccharose Tricin, pH 7,8 NaCl in H ₂ O bidest.

Für die Rekonstitution chimärer Teilkomplexe wurden die F₁-freien Thylakoidmembranen (Chlorophyllmenge 0,5 mg) und die zur Rekonstitution zugefügten isolierten F₁ Untereinheiten im Inkubationsmedium (~ 0,35 ml; Endvolumen des Rekonstitutionsansatzes betrug 0,5

ml) im Dunkeln und bei Raumtemperatur 30 Minuten langsam gerührt. Nicht gebundenes Protein wurde durch Zentrifugation (10 min bei 10000 x g) von den Membranen getrennt. Nach der Resuspension des Pellets in 1 ml Medium I wurde die Thylakoidsuspension erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit Medium II wiederholt.

Die für die Rekonstitutionen verwendeten F₁ Untereinheiten aus *Bacillus thermophilus* wurden freundlicher Weise von Dr. T. Hisabori und Dr. Y. Kato-Yamada zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Isolation der Teilkomplexe

Die Isolation der rekonstituierten chimären Teilkomplexe erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Pick und Racker (1979).

2.1.4.1 Solubilisation

Solubilisationsmedium	400 mM	Saccharose
	20 mM	Tricin, pH 8,0
	5 mM	MgCl ₂
	400 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	10 g/l	Natriumcholat (w/v)
	60 mM	Octylglucosid in H ₂ O bidest.

Der Thylakoidsuspension wurde unter ständigem Rühren in einem Volumenverhältnis von 1:1 das Solubilisationsmedium zugesetzt. Das Gemisch wurde 15 min bei 4°C im Dunkeln langsam gerührt. Anschließend wurden die solubilisierten Proteine durch Ultrazentrifugation (208000 x g; 1h; 4°C) von den Membranbestandteilen getrennt. Nach der Zentrifugation wurde das Volumen des Überstandes bestimmt und auf Eis für die Ammoniumsulfat-Fällung aufbewahrt.

2.1.4.2 Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat

Lagermedium	200 mM	Saccharose
	20 mM	Tricin, pH 8,0
	5 mM	MgCl ₂
		in H ₂ O bidest.

Die Fällung der Proteine erfolgte bei 4°C unter langsamen Rühren durch tropfenweise Zugabe gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (pH 7,0) bis zu einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 45 %. Danach wurde die Suspension weitere 20 Minuten gerührt und anschließend bei

10000 x g 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde im Lagermedium (200µl) resuspendiert und direkt für die Zentrifugation im Saccharosegradienten verwendet .

2.1.4.3 Saccharosegradient

Gradientenmedium (2x)	60 mM 1 mM 4 g/l	Tris/Succinat, pH 6,8 EDTA Triton in H ₂ O bidest.
--------------------------	------------------------	--

Der Gradient beinhaltete folgende Saccharose-Konzentrationsstufen (w/v): 40 %; 30 %; 24,25 %; 18,50 %; 12,75 %. Die Stufen des Gradienten wurden durch Verdünnung der 40% Saccharoselösung (in 1x Gradientenmedium) mit dem 1x Gradientenmedium hergestellt. Das Volumen jeder Gradientenstufe betrug 900µl. Der Gradient wurde durch Überschichten der einzelnen Stufen mit absteigender Saccharosekonzentration erstellt.

Die im Lagermedium resuspendierte Proteinlösung wurde mit dem 1x Lagermedium so verdünnt, dass sie beim Auftragen nicht einsank sondern auf der Oberfläche verblieb. Anschließend wurde der Gradient bei 4°C und 125 000 x g 16 Stunden lang zentrifugiert. Die Fraktionierung des Gradienten wurde mit Hilfe einer Hohlnadel durchgeführt. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die einzelnen Fraktionen im Anschluß mit Probenpuffer versetzt.

2.2 Methoden zur Identifizierung der Komplexe

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung der Proteine und Proteinkomplexe entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Die verwendeten Gele bestanden aus einem 15% Trenngel und einem 5 % Sammelgel.

Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth)	30 % 0,8 %	Acrylamid (w/v) Bisacrylamid (w/v) in H ₂ O bidest.
APS	10 %	Ammoniumperoxodisulfat (w/v)
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris/Cl, pH 6,8 SDS (w/v) in H ₂ O bidest.

Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris/Cl, pH 8,9 SDS (w/v) in H ₂ O bidest.
Elektrodenpuffer (5x)	0,5 % 0,25 M 1,92 M	SDS (w/v) Tris Glycin in H ₂ O bidest.
Probenpuffer (5x)	10 % 25 % 0,025 % 25 % 250 mM	SDS (w/v) Glycerin (w/v) Bromophenolblau (w/v) Mercaptoethanol (w/v) Tris/Cl, pH 8 in H ₂ O bidest.

Zusammensetzung der Gele:

	15 % Trenngel	5 % Sammelgel
Trenn-/Sammelgelpuffer (ml)	37	6
Acrylamidlösung (ml)	40	5
H ₂ O bidest. (ml)	7,7	18
TEMED (ml)	0,04	0,03
APS (ml)	0,25	0,2

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Aliquots der Gradientenfractionen mit dem Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Laufzeit der Gele betrug bei 200 V und 30 mA mindestens 12 Stunden.

2.2.2 Silberfärbung von Proteinen

Fixierlösung (1 h)	30 % 10 %	Ethanol (w/v) Essigsäure (w/v) in H ₂ O
Inkubator (1h)	30 % 0,5 % 0,2 % 0,5 %	Ethanol (w/v) Natriumacetat (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ (w/v) Glutaraldehyd (w/v) in H ₂ O bidest.
Färberlösung (30 min)	0,1 % 0,01 %	AgNO ₃ (w/v) Formaldehyd (w/v) in H ₂ O bidest.

Wässern		H ₂ O bidest.
Entwickler	2,5 %	Natriumcarbonat (w/v)
	0,01 %	Formaldehyd (w/v) in H ₂ O bidest.
Stopp-Lösung	50 mM	EDTA in H ₂ O bidest.

Zur Färbung der Proteine im SDS-Gel wurde wegen ihrer hohen Empfindlichkeit die Färbemethode mit Silbernitrat (Heukeshoven und Dernick 1988) ausgewählt. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ng Protein pro Bande.

Jedes Gel wurde direkt nach dem Beenden der Elektrophorese für eine Stunde mit einer Fixierlösung inkubiert. Nach dem Entfernen des Fixierers wurde das Gel ebenfalls eine Stunde in einer Inkubationslösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem Silbernitrat (Färberlösung) erfolgte nach dreifachem Wässern jeweils 10 Minuten. Die Entwicklung des Gels dauerte je nach aufgetragener Proteinmenge 5 bis 10 Minuten und wurde nach dem Verwerfen des Entwicklers mit Stopp-Lösung beendet.

2.2.3 Quantitative Bestimmung von Proteinbanden nach Tal et al. (1985)

Färberlösung	0,05 %	Coomassie Brilliant Blue R-250 (1% ethanolische Stammlösung)
	14 %	Trichloressigsäure in H ₂ O bidest.
Entfärber	7%	Essigsäure
	5%	Ethanol in H ₂ O bidest.

Zur quantitativen Bestimmung der Untereinheit δ wurde die Coomassie-Proteinfärbung verwendet. Diese Methode ermöglicht einen quantitativen Vergleich der Banden von Proteinen ähnlicher Basizität. Die Färbungsintensität der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R-250 ist proportional zur Anzahl positiver Ladungen eines Proteins (1,5 bis 3 Farbstoffmoleküle/Ladung) (Tal et al. 1985).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel 18 h mit einem festgelegten Volumen (4 ml pro cm³ des Gels) an Coomassie-Färberlösung inkubiert.

Nach dem Entfärben (Entfärber-Lösung) bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes (6-8 Std.) wurden die blau gefärbten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Jede der ausgeschnittenen Banden wurde anschließend in einem Eppendorf-Gefäß mit DMSO (1ml) 18

Stunden bei 37°C bis zum vollständigen Entfärben der Gelstückes inkubiert. Ebenso wurden die Proben des Gelhintergrundes wie auch des δ Standards untersucht. Die spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration des im Detergens aufgelösten Farbstoffes erfolgte bei 595 nm. Die Absorption des Hintergrundes wurde von den Werten für die einzelnen δ Banden entsprechend abgezogen. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Banden wurde anhand der bekannten Menge (4 bzw. 9 μg) des im Gel mit aufgetrennten δ Standards ermittelt.

2.2.4 Western Blot

Kathodenpuffer	40 mM	Aminocaprinsäure
	20 mM	Tris/Cl, pH 9
	20 %	Methanol (w/v) in H ₂ O bidest.
Anodenpuffer	75 mM	Tris/Cl, pH 7,4
	20 %	Methanol (w/v) in H ₂ O bidest.
Ponceau S-Lösung	0,2 %	Ponceau S (w/v)
	3 %	TCA (w/v)
		in H ₂ O bidest.

Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden zuerst entweder auf eine PVDF Membran (Milipore, Eschborn, Deutschland) oder auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Typ Protan 0,1 – 0,45 μm) übertragen. Die PVDF Membranen wurden bevorzugt für die hydrophoben Proteine (Untereinheiten des F₀ Komplexes) verwendet.

Das Gel wurde mit der Membran in einem Semi-dry-Sandwich-Aufbau zwischen je drei Lagen Blotting Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) und der Membran plaziert. Die Reihenfolge beim Aufbau des Blottes beginnend von der Anode war wie folgt: drei Lagen im Anodenpuffer getränktes Blotting Papier, die Membran, das Gel, drei Lagen im Kathodenpuffer getränktes Blotting Papier. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte innerhalb von eine Stunde bei eine Stromstärke von 0,8 mA/cm² in einer Semi-dry-Blot Apparatur (Multiphor II, Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Die Effektivität des Proteintransfers wurde durch kurze Inkubation der Membran mit Ponceau S-Lösung überprüft. Die Proteinbanden färben sich dabei rötlich. Das Färbemittel wurde im Anschluß mit bidestilliertem Wasser ausgewaschen.

Blocklösung	5%	Kasein in TBS-Puffer
TBS-Puffer	50 mM 0,9 %	Tris/Cl, pH 7 NaCl in H ₂ O bidest.
TBS-T-Puffer	50 mM 0,9 % 0,05 %	Tris/Cl, pH 7 NaCl Tween 20 in H ₂ O bidest.
Verdünnungspuffer für den Primärantikörper		
	1%	BSA
	2 %	NaN ₃ in TBS - Puffer
Sekundärantikörper	Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper aus Ziegen gegen Kaninchen – IgG (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), Verdünnung 1 : 15000.	

Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu vermeiden, wurde die Membran mit einer Kasein-Lösung inkubiert. Die Inkubation mit der Kasein-haltigen Blocklösung erfolgte entweder 30 Minuten bei 37°C oder 12 Stunden bei 4°C. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit dem TBS-T-Puffer gewaschen.

Die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper betrug eine Stunde. Der Verdünnungsfaktor hing von dem verwendeten Antikörper ab und lag zwischen 1000 und 5000. Nach einer dreimaligen Waschung mit TBS-T-Puffer wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem sekundären Antikörper folgte ein erneutes Waschen mit dem TBS-T-Puffer.

Die Detektion der markierten Proteine wurde mit Hilfe des BM Chemilumineszenz Blotting Substrats (Boehringer, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Kodak X-OMAT Film für 1 bis 15 min exponiert, anschließend für 1 min entwickelt (Agfa G150 Entwickler) und nach kurzem Wässern 1 min fixiert (AGFA G334 Röntgen Schnellfixierbad).

Der Antikörper gegen den F₁ Komplex aus *Bacillus thermophilus* wurde freundlicherweise von Dr. Kato-Yamada zu Verfügung gestellt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Nährmedien für die Anzucht der *E. coli* Zellen

LB (Luria Bertani) Medium	1 %	Pepton (w/v)
	0,5 %	Hefeextrakt (w/v)
	0,5 %	NaCl (mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt) (w/v) in H ₂ O
2YT – Vollmedium (Sambrock 1989)	1,6 %	Pepton (w/v)
	1 %	Hefeextrakt (w/v)
	0,5 %	NaCl (w/v) in H ₂ O

Zur Kultivierung der Bakterien auf Platten wurde das LB Medium mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt.

Alle Medien wurden vor dem Benutzen 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und alle weiteren Zusätze wie Antibiotika steril filtriert (Rotrand Filter, 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland). Da die Plasmide eine Ampicillinresistenz trugen, wurde nach dem Autoklavieren den Medien Ampicillin (100µg/ml) zugesetzt.

Für die Anzucht der flüssigen Kulturen wurden die Bakterien nach dem Animpfen aus einer Kolonie 12 bis 18 Stunden bei 37°C geschüttelt (200 Upm).

Die Kulturen auf den Agar-Platten wurden mindestens 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3.2 Herstellung der kompetenten Zellen

RF I	100 mM	Rubidiumchlorid
	50 mM	Manganchlorid
	30 mM	Kaliumacetat, pH 8,3
	10 mM	Kalziumchlorid in H ₂ O bidest.
RF II	10 mM	Rubidiumchlorid
	10 mM	MOPS (pH 6,8)
	30 mM	Kalziumchlorid
	15 %	Glycerin (w/v) in H ₂ O bidest.

Die kompetenten Zellen wurden durch Inkubation mit Rubidiumchlorid (Hanehau, 1983) gewonnen. Dafür wurden 100 ml LB Medium mit einem Milliliter über Nacht gewachsener Bakterienkultur angeimpft. Die Bakterien wuchsen bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 4°C und

2000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in RF I Medium (1/3 des Ausgangsvolumens) aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (2000 x g, 4°C, 15 min) wurde das Pellet in 1/12 des Ausgangsvolumens von RT II Medium vorsichtig resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden je 200µl Aliquots im flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 70°C aufbewahrt.

2.3.3 Transformation der Zellen

Die Transformation wurde mit der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Die Rubidiumchlorid-kompetenten Zellen (30 µl) wurden mit dem Plasmid (0,5 – 1µg DNA) zuerst 30 Minuten auf Eis und direkt danach 90 Sekunden bei 42°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 200 bis 700 µl LB Medium zugefügt und die ganze Suspension bei 37°C und 700 Upm 30 bis 90 Minuten geschüttelt. Zur Selektion der transformierten Zellen wurde die Suspension auf einer Agar-Platte ausgestrichen und 10 bis 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Isolation der Plasmid DNA

Für die Präparation von der Plasmid DNA wurde das QIAprep-Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das nach dem Prinzip einer Anionenaustauschchromatographie funktioniert. Die Isolation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.5 Heterologe Überexpression der plastidären γ Untereinheit

Das für die Expression der γ Untereinheit verwendete Plasmid phCG2 (atpC Gen aus Spinat, kloniert in einen pET – 23d Expressionsvektor; Hisabori et al. 1997) wurde freundlicherweise von Dr. T. Hisabori und Dr. Y. Kato zur Verfügung gestellt.

Die Überexpression wurde in dem BL21 Stamm des *E. coli* Bakteriums durchgeführt. Nach vorheriger Selektion auf einer Ampicillin-haltigen Agar-Platte wurde eine 3 ml Kultur mit transformierten Zellen angeimpft und bei 37°C für 12 h inkubiert. Im Anschluß wurde 1 ml für das Animpfen einer 500 ml Kultur verwendet. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 wurde die Produktion des zu exprimierenden Proteines mit 1 mM Isopropylthio- β -D-Galactoside (IPTG) induziert. Die Inkubationsbedingungen blieben dabei die gleichen wie für die 3 ml Kultur. Nach zwei Stunden wurden die Zellen bei 8000 Upm und 4°C sedimentiert,

in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt oder direkt für die Isolation der proteinhaltigen Inclusion Bodies verwendet.

2.3.6 Isolation der Inclusion Bodies

Verdünnungspuffer	30 mM	Tris/SO ₄ , pH 7,5
	30 mM	NaCl in H ₂ O bidest. (sterilisiert)
Wasch-Puffer	30 mM	Tris/SO ₄ , pH 8
	30 mM	NaCl
	1 M	Saccharose in H ₂ O bidest. (sterilisiert)

Die Präparation wurde nach der von Amano et al. (1994) beschriebenen Methode durchgeführt. Die die Inclusion Bodies enthaltenden Zellen wurden mit dem Verdünnungspuffer bis auf 0,3 g/ml verdünnt und in einem Branson Sonifer Typ 250 mit einer Mikrospritze für 10 min auf Stufe 2 im 50 % Modus in einem Wasserbad sonifiziert. Zur Trennung anderer Zellbestandteile von den Inclusion Bodies wurde die Suspension 10 min bei 8000 x g, zentrifugiert. Die im Sediment befindlichen Inclusion Bodies wurden mehrmals mit dem Puffer gewaschen und unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Anschließend wurden sie im flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.3.7 Isolation der Proteine aus Inclusion Bodies

Harnstoff-Puffer	8 M	Harnstoff
	50 mM	Tris, pH 8
	20 mM	EDTA
	1 mM	DTT in H ₂ O bidest.

Die Isolation der Proteine aus den Inclusion Bodies erfolgte nach dem Protokoll von Dr. Hisabori (persönliche Mitteilung). 20 μl der Inclusion Bodies – Suspension wurde auf Eis aufgetaut und in 200 μl Harnstoff-Puffer aufgelöst. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und nach dem Versetzen mit 200 μl gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (pH 7) für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Sedimentation der ausgefallenen Proteine (15000 x g, 5 min) wurden diese in 200 μl Harnstoff-Puffer aufgelöst und für drei Stunden gegen 50 mM Natriumhydrogencarbonat bei Raumtemperatur dialysiert (Slectra/Por, molecularporus Membrane).

Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Das im Überstand befindliche Protein wurde aufkonzentriert (Eppendorf, Centrifugal Filter Tubes; 1000 Da), anschließend die Proteinkonzentration mit dem BioRad Protein Assay (BioRad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.0 Ergebnisteil

3.1 Rekonstitutionsverfahren und Isolation der Teilkomplexe

3.1.1 Rekonstitution

Die Rekonstitutionsexperimente wurden mit Thylakoidpräparationen durchgeführt, die F_0 aber durch die Vorbehandlung keinen F_1 enthielten. CF_1 -freie Thylakoide und F_1 Untereinheiten (bzw. Untereinheiten-Kombinationen) wurden mit geeigneten Rekonstitutionsmedien zusammengebracht (Andreo et al. 1982) und danach die überschüssigen löslichen F_1 Untereinheiten durch Zentrifugation und Waschen entfernt. Das CF_0F_1 Untereinheitenaggregat wurde durch Detergenzien in Lösung gebracht und durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert (Kap. 2.1.4.3).

Die Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten stellt ein gängiges Verfahren zur Trennung von Proteinen und Proteinkomplexen dar. Die Separation erfolgt nach den Molekulargewichten. Während einer entsprechend langen Zentrifugation bis zum Gleichgewicht wandert jedes Protein im Gradienten bis zum Erreichen der Saccharosekonzentrationsstufe, die ihrer eigenen Dichte entspricht und verbleibt dort (Stryer, Biochemie). Dieses Verfahren wurde für die Bearbeitung der rekonstituierten, heterologen Teilkomplexe ausgewählt, weil es eine relativ schonende Trennungsmethode darstellt. Während der Ultrazentrifugation bleiben die Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern verhältnismäßig unbeeinflusst. Außerdem erfüllt das Verfahren noch ein weiteres, wichtiges Kriterium. Die Zentrifugation im Saccharosegradienten ermöglicht nicht nur die Reinigung der rekonstituierten Teilkomplexe von anderen Thylakoidmembranenproteinen, sondern erlaubt auch die Trennung der Teilkomplexe von den einzelnen, nachträglich abgelösten Komponenten. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte und dem damit verbundenen geänderten Wanderungsverhalten im Gradienten lassen sich diese während der Zentrifugation voneinander separieren.

Die Isolation der CF_1 -freien Thylakoidmembranen erfolgte durch eine Inkubation der Thylakoide mit Natriumrhodanid (Fiedler et al. 1994). Das CF_1 Ablösungsverfahren basiert auf der chaotropen Eigenschaft des Rhodanid-Ions (Hafeti et al. 1974). Chaotrope Ionen zeichnen eine stark delokalisierte Ladung aus, die eine störende Wirkung auf die geordnete Struktur von Wasser hat. Da die Wasserstruktur eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Proteinkomplexen spielt (Auswirkung auf hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und Coulomb-Wechselwirkungen), können sie auf diese Weise indi-

rekt auf die Proteinkomplexe wirken. Die chaotropen Ionen werden wirksam zur Trennung von Untereinheiten aus Proteinkomplexen und zum Lösen von membranassoziierten Proteinen verwendet.

Als weitere Bausteine für die Untersuchungen wurden einzelne F_1 -Untereinheiten bzw. Komplexe der bakteriellen ATPase aus *Bacillus thermophilus* (PS 3) verwendet. In einigen Experimenten wurde auch die γ Untereinheit aus dem F_1 der Chloroplasten ATP-Synthase von *Spinacia oleracea* verwendet. Die verwendeten F_1 Untereinheiten der TF_1TF_0 -ATPase aus *Bacillus thermophilus* sowie die plastidäre γ Untereinheit wurden über eine heterologe Überexpression gewonnen. (Kap. 2.3.5). Als Beispiel wurde in der Abbildung 3.1.1.1. (Spuren 2 und 3) die mit Hilfe dieses Verfahrens erhaltene γ Untereinheit des plastidären F_1 dargestellt. Die Bezeichnung TF_1 wird weiterhin im Text als Abkürzung für die Untereinheiten des thermophilen F_1 verwendet.

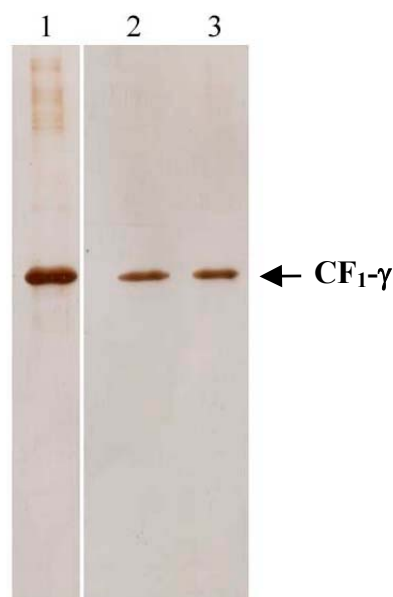


Abb. 3.1.1.1.: Durch heterologe Überexpression gewonnene plastidäre γ Untereinheit. 15 %iges silbergefärbtes SDS – Gel (Spur 2, 3 ~ 3 μ g Protein); Spur 1 - CF_1 - γ Standard (7 μ g).

Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen wird durch SDS-PAGE analysiert. Abbildung 3.1.1.2. zeigt das Proteinmuster solubilisierter Thylakoide vor (Spur 3) und nach CF_1 Ablösung durch NaSCN (Spur 4) nach Trennung im Dichtegradienten. Der Unterschied im Proteinmuster in beiden Fraktionen bezieht sich auf die Untereinheiten des F_1 Komplexes, die anhand des CF_1 Standardes (Spur 2) in der Spur 3, aber nicht in der Spur 4 zu erkennen sind. Die Untereinheiten des F_0 lassen sich dagegen durch Vergleich mit dem CF_1CF_0 Stan-

dard (Spur 1) in beiden Fraktionen identifizieren. Die den CF_1CF_0 Komplex beinhaltende Fraktion (Spur 3) stammt aus dem Gradientenbereich mit 30 % Saccharose. Dagegen stammt die den CF_0 Komplex enthaltende Fraktion (Spur 4) aus dem Bereich mit 24 % Saccharose.

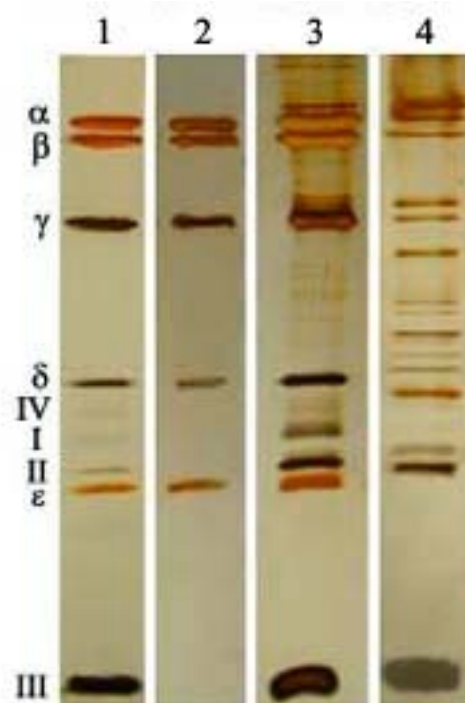


Abb. 3.1.1.2.: Proteinmuster solubilisierter Thylakoide vor und nach der Behandlung mit NaSCN in einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten. 15 %iges silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 - CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (7 μ g); Spur 2 - CF_1 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 3 und 4 - Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l): Thylakoidmembranproteine, die ohne (Spur 3) und nach (Spur 4) Inkubation mit NaSCN solubilisiert wurden.

3.1.2 Optimierung der Mg^{2+} Konzentration für die Rekonstitutionen

Nach Telfer et al. (1980) wirken Mg^{2+} -Ionen stabilisierend auf den gesamten Komplex der ATP-Synthase. Sie verhindern die elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Membranoberfläche und dem ebenfalls negativ geladenen F_1 . Die Rekonstitution von F_1 -freien Thylakoiden mit F_1 erfordert daher die Gegenwart von Mg^{2+} .

Die optimale Konzentration an Mg^{2+} -Ionen ist in verschiedenen Versuchsreihen experimentell bestimmt worden. Abbildung 3.1.2.1. zeigt einen Ausschnitt einer Versuchsreihe mit verschiedenen $MgCl_2$ Konzentrationen vom in den Rekonstitutionsansätzen mit isolierten ϵ Untereinheit und dem $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex aus *Bacillus thermophilus*. Die dargestellten Gelfragmente zeigen die Bindung gleicher Mengen der bakteriellen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit und der ϵ Untereinheit an

die F_1 -freien Thylakoidmembranen bei $MgCl_2$ -Konzentration von 5, 10 bzw. 30 mM (Spuren 4, 5, 6: analoge Fraktionen dreier Saccharosegradienten). Der Vergleich mit den aufgetragenen Standardproteinen (Spuren 1, 2, 3) und dem Kontrollansatz (Spur 7) der Rekonstitution (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügten F_1 Untereinheiten) ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der Bindungspartner und somit des rekonstituierten CF_0 - $\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ Teilkomplexes. Der Einfluß der verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen bei den an den CF_0 gebundenen TF_1 Proteinen, $\alpha_3\beta_3\gamma$ und ε , ist erkennbar. Eine die Rekonstitution beeinträchtigende Wirkung zeigte sich bei einer niedrigen wie auch zu hohen Mg^{2+} -Konzentrationen (Spuren 4, 6). Eine optimale Bindung wurde in dem Konzentrationsbereich von 10 mM von $MgCl_2$ beobachtet. Alle weiteren vorgestellten Rekonstitutionsexperimente sind mit einer Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM durchgeführt worden.

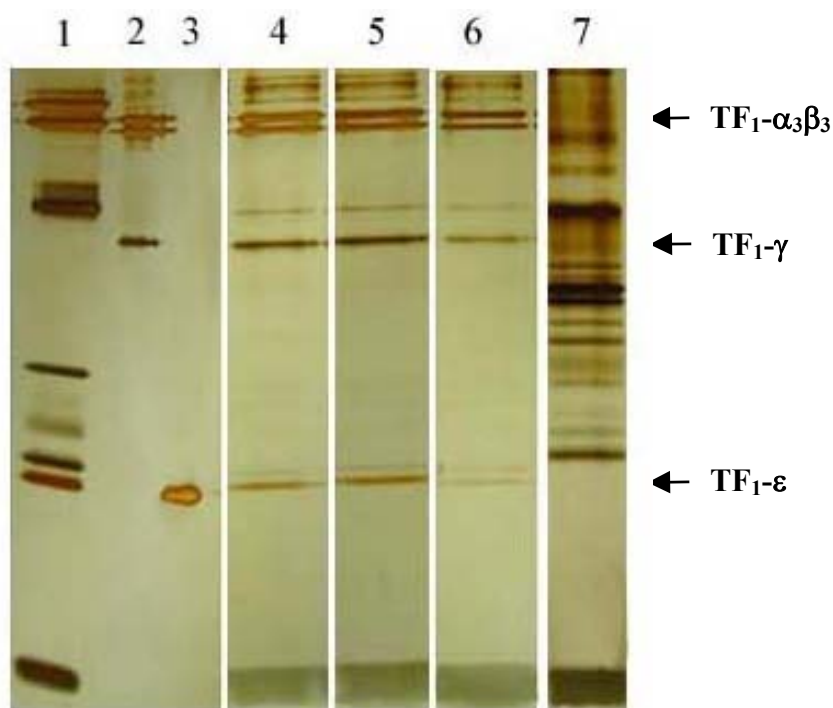


Abb. 3.1.2.1.: Bindung des bakteriellen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplexes und der ε Untereinheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen bei 5, 10 und 30 mM Konzentration von $MgCl_2$.

15 %iges silbergefärbtes SDS – Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (8 μg); Spur 2 – $TF_1\text{-}\alpha_3\beta_3\gamma$ (1 μg); Spur 3 – $TF_1\text{-}\varepsilon$ (0,5 μg); Spur 4 bis 6 – Fraktionen aus jeweils einem Saccharosegradienten (40 μl), alle beinhalten neben den Thylakoid-Membranproteinen den bei 5 mM (Spur 4), 10 mM (Spur 5) und 30 mM (Spur 6) $MgCl_2$ rekonstituierten $CF_0\text{-}\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ Teilkomplex; Spur 7 – Gradientenfraktion (40 μl) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte TF_1 -Untereinheiten).

Rekonstitutionsansätze (0,5 ml) - $TF_1\text{-}\alpha_3\beta_3\gamma$: 0,9 mg (ca. 2,5 nmol), $TF_1\text{-}\varepsilon$: 0,055 mg (5 nmol), Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

3.1.3 Kriterien der Identifizierung des rekonstituierten Komplexes

Für alle Rekonstitutionsexperimente diente als Kriterium für das Vorhandensein eines Komplexes die Gegenwart des CF_0 Komplexes mit der oder den verwendeten F_1 Untereinheiten in ein und der selben Spur eines SDS-Gels, die jeweils einer Fraktion aus einem Saccharosegradienten entsprechen.

Das Kriterium für die Existenz eines Komplexes beruht auf dem Prinzip der Trennung der relativ kleinen Proteine von den relativ großen Proteinkomplexen im Saccharosegradienten während einer Ultrazentrifugation. Freies und gebundenes Protein erscheinen demgemäß in verschiedenen Fraktionen.



Abb. 3.1.3.1.: Isolierter CF_1CF_0 Komplex aus Spinat-Thylakoiden (8 μ g). 15 %iges silbergefärbtes SDS – Gel.

Die Identifizierung der einzelnen Komponenten der rekonstituierten Teilkomplexe erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung durch Vergleich mit den Standardproteinen und den Proteinen des Kontrollansatzes. Als Standardproteine wurden die im Rekonstitutionsansatz aktuell verwendeten F_1 Untereinheiten des bakteriellen bzw. plastidären Enzyms und der isolierte CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (Abb. 3.1.3.1.) verwendet.

Bei der Zentrifugation im Saccharosegradienten erscheinen Proteine, die im Gradienten ein ähnliches Wanderungsprofil aufweisen, in der gleichen Fraktion.

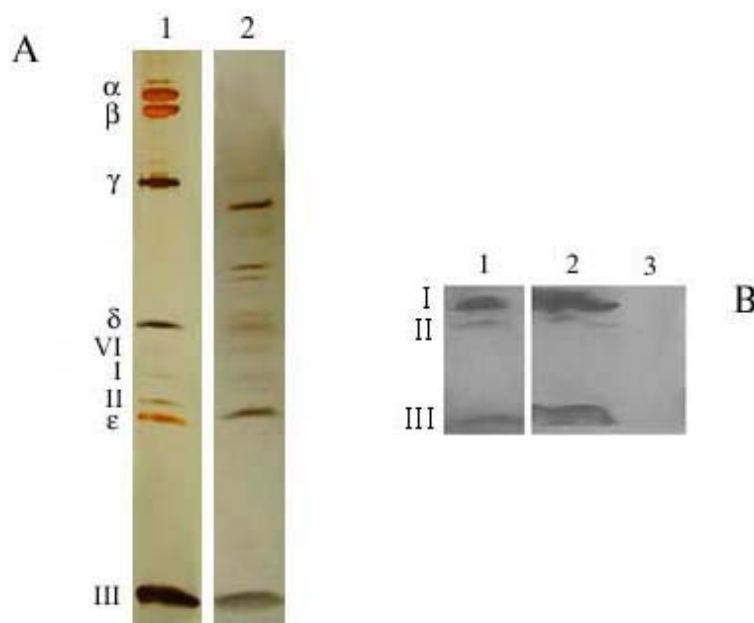


Abb. 3.1.3.2.A., B.: Isolierter CF_0 Komplex aus Spinat-Thylakoiden. Gelelektrophoretische Auftrennung (A) und Western Blot-Analyse (B).

Abb. 3.1.3.2.A.: 15 %iges, silbergefärbtes SDS – Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (8 μ g); Spur 2 – Fraktion (40 μ l) des Saccharosegradienten (aus dem Gradientenbereich mit ca. 24 % Saccharose): solubilisierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen mit dem CF_0 Komplex.

Abb. 3.1.3.2.B.: Immunologischer Nachweis der Untereinheiten I, II und III aus dem CF_0 Komplex. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – Fraktion (30 μ l) des Saccharosegradienten mit solubilisierten Proteinen der F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 3 – CF_1 Komplex aus Spinat (5 μ g).

Durch Gegenwart anderer Thylakoidmembranproteine war zum Teil eine genaue Identifizierung der Proteine schwierig. Besonders viele Thylakoidmembranproteine traten in den Fraktionen auf, die dem Molekulargewicht zwischen 12 und 30 kDa entsprachen. Hierin befanden sich auch die drei Untereinheiten des CF_0 Komplexes: I (20,8 kDa), II (16,5 kDa) und IV (26,4 kDa). Deren Bestimmung war im Gegensatz zu der aufgrund des niedrigeren Molekulargewichts immer gut erkennbaren Untereinheit III (Proteolipid 7,9 kDa) häufig nicht möglich. Zur eindeutigen Identifizierung der Bindungspartner (F_1 Untereinheiten und CF_0 Komplex) wurde daher in den meisten Fällen zusätzlich eine Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Abbildung 3.1.3.2. (A und B) zeigt das Ergebnis der Immunmarkierung der Proteine in den die Untereinheit III erhaltenden Fraktionen des Saccharosegradienten. Die Gegenwart der zwei weiteren Untereinheiten des CF_0 Komplexes, I und II, konnte jedesmal nachgewiesen werden. Alle Untersuchungen weisen genau und ausschließlich auf das Vorkommen der Untereinheiten im CF_0 Komplex hin. Die Untereinheit III konnte daher als „Marker“ für den CF_0 Komplex herausgezogen werden.

3.1.4 Bindungsspezifität an die F_1 -freien Thylakoidmembranen

Um festzustellen, ob eventuell unspezifische Wechselwirkungen mit den F_1 -freien Thylakoidmembranen eine Rolle spielen sind Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen fremden Proteinen durchgeführt worden. Die für die Untersuchung ausgewählten Proteine waren Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuklease A (13 kDa). Bei allen Bindungsversuchen der oben genannten Proteine an die F_1 -freien Thylakoidmembranen wurden die gleichen experimentellen Bedingungen wie bei der Bindung der F_1 Untereinheiten eingehalten, ebenso erfolgte die Solubilisierung und die Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten wie bei den Rekonstitutionsversuchen.

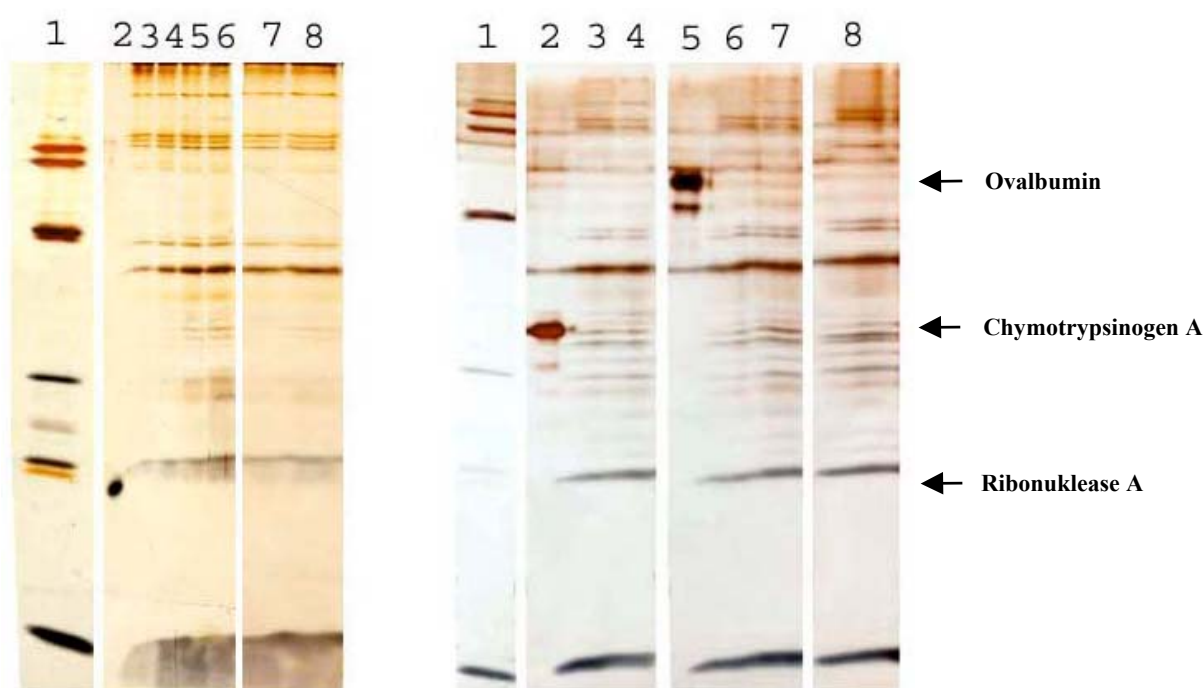


Abb. 3.1.4.1.A., B.: Bindung von Ribonuklease A (Gel A), Chymotrypsinogen A und Ovalbumin (Gel B) an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. 15 %ige, silbergefärbte SDS – Gele.

Abb. 3.1.4.1.A.: Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (7 μ g); Spur 2 - Ribonuklease A (0,5 μ g); Spuren 3 – 6 - Fraktionen der Saccharosegradienten (40 μ l): nach vorheriger Inkubation mit Ribonuklease A solubilierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 7 und 8 - Fraktionen (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte Ribonuklease A).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - Ribonuklease A: 0,07 mg; Chlorophyllmenge: 0,5 mg.

Abb. 3.1.4.1.B.: Spur 1 - CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (7 μ g); Spur 2 - Chymotrypsinogen A (0,5 μ g); Spur 5 - Ovalbumin (0,5 μ g); Spuren 3, 4 und 6, 7 - Fraktionen der Saccharosegradienten (40 μ l): nach vorheriger Inkubation mit Chymotrypsinogen A (Spuren 3 und 4) bzw. Ovalbumin (Spur 6 und 7) solubilierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 8 - Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügten Chymotrypsinogen bzw. Ovalbumin).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - Chymotrypsinogen A: 0,125 mg bzw. Ovalbumin: 0,215 mg; Chlorophyllmenge: 0,5 mg.

Die Abbildung 3.1.4.1. gibt das Resultat dieser Experimente wieder. Für alle drei Proteine wurde ein negatives Ergebnis erhalten. Keines der drei Proteine konnte in den den CF_0 enthaltenden Gradientenfractionen identifiziert werden.

Im Weiteren wurde versucht an die F_1 -freien Thylakoidmembranen Untereinheiten der ATPase zu binden, die keinen direkten Kontakt zu dem F_0 Komplex aufweisen. Diese Voraussetzung erfüllen die beiden Untereinheiten α und β (Mellwig et al. 2003).

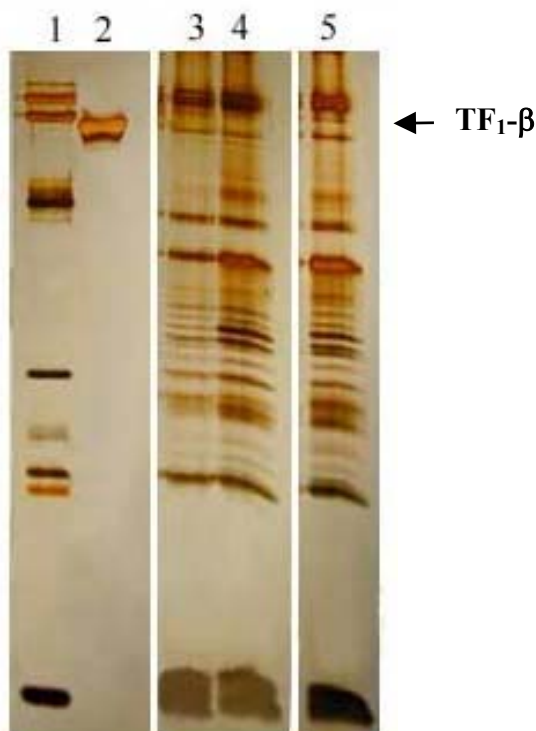


Abb. 3.1.4.2.: Bindung der bakteriellen β Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen.

15 %iges, silbergefärbtes SDS – Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat; Spur 2 - TF_1 - β (0,8 μ g); Spur 3, 4 – Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l): nach vorheriger Inkubation mit der bakteriellen β Untereinheit solubilisierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 5 – Gradientenfraction (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte β Untereinheit).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - TF_1 - β : 0,4 mg (7,5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Abbildung 3.1.4.2. demonstriert das Ergebnis eines Rekonstitutionsversuches mit der TF_1 - β Untereinheit. In den Gradientenfractionen die den F_0 -Komplex enthielten, konnte zwischen den im Gel aufgetrennten Thylakoidmembranproteinen keine Bande gefunden werden, die als die β Untereinheit bestimmt werden konnte. Eine Bildung eines CF_0 - β Komplexes konnte somit erwartungsgemäß nicht beobachtet werden.

Der Rekonstitutionsansatz beinhaltete in einem Volumen von 0,5 ml CF_1 -Thylakoide (0,5 mg Chlorophyll) ca. 0,5 nmol CF_0 (Strotmann et al. 1998) und 0,4 mg β Untereinheit, was bei

einem Molekulargewicht von 53 kDa ca. 7,5 nmol entspricht. Die β Untereinheit war im Ansatz im 15-fachen Überschuß gegenüber dem CF_0 .

3.2 Wechselwirkungen zwischen dem CF_0 Komplex und F_1 Untereinheiten im zentralen Stielbereich

Die in diesem Kapitel beschriebenen Rekonstitutionsexperimente charakterisieren die Interaktionen zwischen dem plastidären F_0 Komplex und den vermutlichen Untereinheiten des zentralen Stiels.

3.2.1 Bindung der TF_1 - ϵ Untereinheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen

In einem Rekonstitutionsansatz wurden CF_1 -freie Thylakoidvesikel mit isolierter ϵ Untereinheit von *Bacillus thermophilus* inkubiert. In einem Volumen von 0,5 ml waren Thylakoide, entsprechend 0,5 mg Chlorophyll, und 0,055mg ϵ Untereinheit enthalten. 0,5 mg Chlorophyll entsprechen ca. 0,5 nmol CF_0 (Strotmann et al. 1998), 0,055 mg ϵ , das ein Molekulargewicht von 11 kDa, ca. 5 nmol, d. h. die ϵ Untereinheit war im Rekonstitutionsansatz gegenüber CF_0 im 10-fachen Überschuß vorhanden.

Die Abbildung 3.2.1.1. zeigt das Ergebnis des Bindungsversuches. Die Spuren 3 - 5 auf dem SDS-Gel sind aufeinander folgende Fraktionen des Saccharosegradienten; Fraktionen 4 und 5 beinhalten den CF_0 . Es zeigt sich deutlich, dass nach vorheriger Inkubation mit der ϵ Untereinheit dieses Protein in den CF_0 Fraktionen erscheint. Durch den Vergleich mit den Standardproteinen (Spur 1) und den Ausgangsproteinen für die Rekonstitution (Spuren 2 und 6) lassen sich die Bindungspartner, die bakterielle ϵ Untereinheit und die Untereinheiten des F_0 Komplexes, identifizieren, wobei ϵ auch an Hand der rötlichen Färbung erkannt werden kann. Die Abwesenheit der ϵ Bande in Spur 6 bestätigt die Richtigkeit der Identifizierung des ϵ Proteins und weist damit eindeutig auf einen aus der Rekonstitution resultierenden heterologen CF_0 - ϵ Teilkomplex. Die in der Abbildung 3.2.1.1. gezeigten Fraktionen stammen aus dem Gradientenbereich mit einer Saccharosekonzentration von ca. 24 %.

Um die Verteilung von freier und gebundener ϵ Untereinheit im Gradienten zu untersuchen, wurde zum Einen ein Gradient mit einem vollständigen Rekonstitutionsansatz und zum Anderen ein Gradient nur mit der ϵ Untereinheit alleine zentrifugiert.

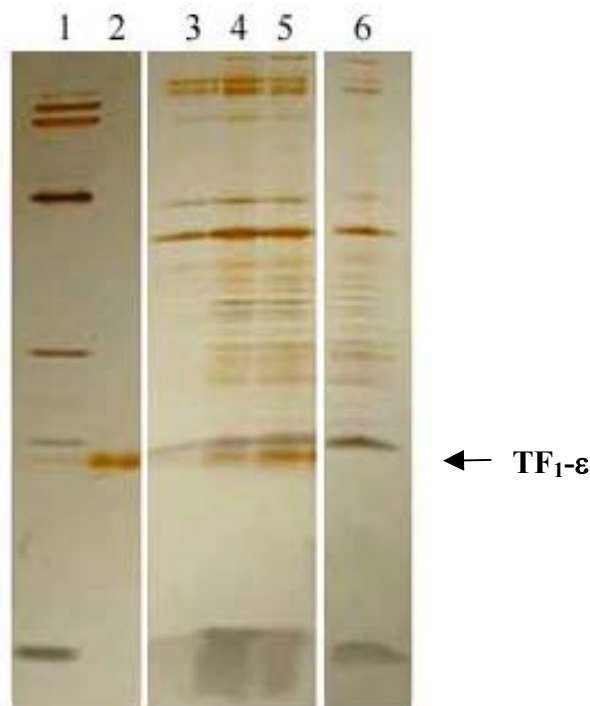


Abb. 3.2.1.1.: Bindung der bakteriellen ϵ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen.

15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 – CF_0CF_1 Komplex aus Spinat (7 μ g); Spur 2 – TF_1 - ϵ (0,5 μ g); Spuren 3 bis 5 – Fraktionen des Saccharosegradienten (jeweils 40 μ l): solubilisierte Thylakoidmembranproteine mit dem rekonstituierten CF_0 - ϵ Teilkomplex; Spur 6 – Fraktion des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte ϵ Untereinheit)

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0); TF_1 - ϵ : 0,055 mg (ca. 5 nmol).

Da die Verteilung eines Proteins innerhalb des Saccharosegradienten mit dem Molekulargewicht korreliert, würde im Vergleich zu der freien ϵ Untereinheit eine spezifische Wechselwirkung zwischen der ϵ Untereinheit und dem CF_0 Komplex zu einer Veränderung des Wanderungsverhaltens im Gradienten führen. Die Differenz im Molekulargewicht zwischen dem CF_0 - ϵ Teilkomplex und der ϵ Untereinheit beträgt 140 kDa.

Der Unterschied im Laufverhalten der freien TF_1 - ϵ Untereinheit im Gegensatz zu der im Komplex mit dem CF_0 innerhalb des Saccharosegradienten ist auf den zwei dargestellten SDS-Gelen (Abb. 3.2.1.2.A., B.), deutlich bemerkbar. Die gleichvolumige Fraktionierung beider Gradienten (mit steigender Saccharosekonzentration von rechts nach links) ermöglicht untereinander die Darstellung analoger Fraktionen der beiden Proben.

Die an den CF_0 Komplex gebundene ϵ Untereinheit (Abb. 3.2.1.2.A.) blieb im oberen Bereich der Gradientenstufe, welche ca. 24 % Saccharose enthält. Die freie ϵ Untereinheit (Abb.

3.2.1.2.B.) ist dagegen nur in den Fraktionen mit niedrigerer Saccharosekonzentration (ca. 12 %) vorhanden.

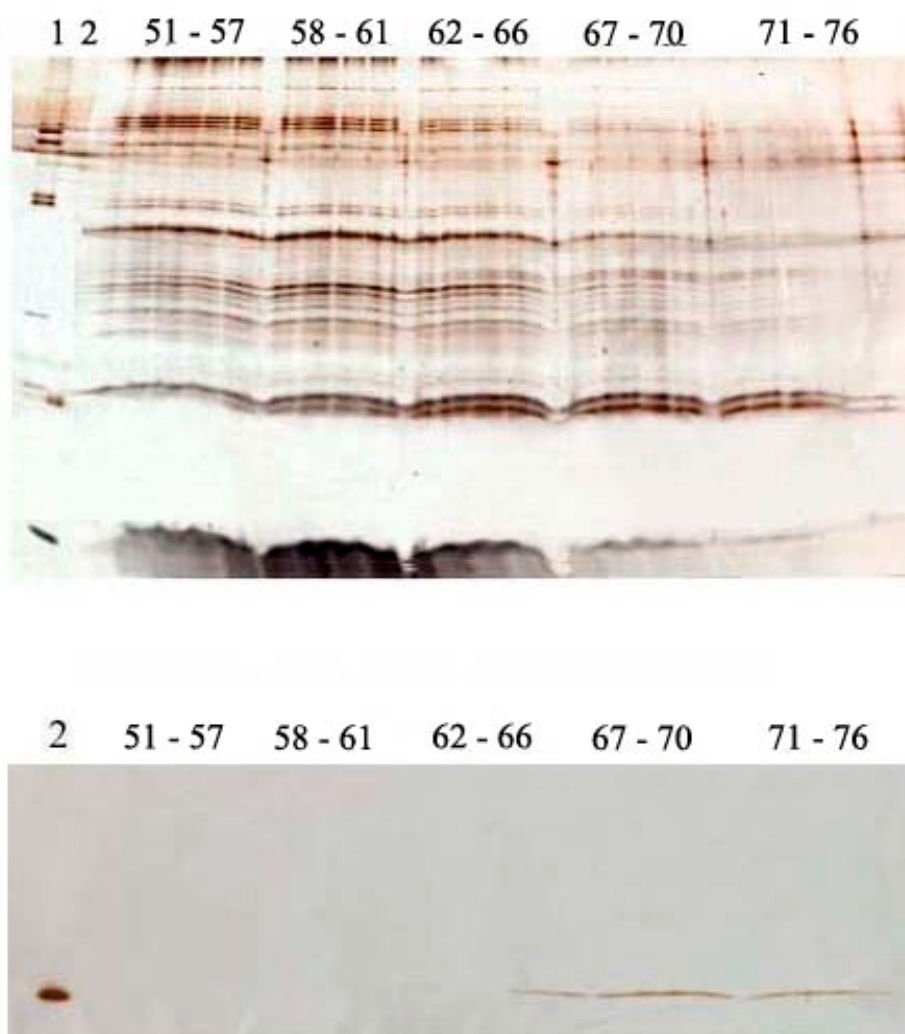


Abb. 3.2.1.2.A., B.: Verteilung der an den plastidären F_0 Komplex gebundenen (Gel A) bzw. freien (Gel B) bakteriellen ϵ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* innerhalb des Saccharosegradienten. 15 %ige, silbergefärbte SDS-Gele.

Gel A: Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 - $TF_1\text{-}\epsilon$ (0,3 μ g); **Gel B:** Spur 1 - $TF_1\text{-}\epsilon$ (0,4 μ g); **Gel A und B:** Spuren 51 bis 76 - Gradientenfraktionen (jeweils 20 μ l) mit aufsteigender Saccharosekonzentration von 12,75 % (nicht alle abgebildet), 18,5 % und 24,25 % (von rechts nach links). Fraktionsvolumen ca. 50 μ l. Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - Chlorophyllmenge: 0,5 mg; $TF_1\text{-}\epsilon$: 0,055 mg (ca. 5 nmol).

3.2.2 Bindung der N-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen

An Hand der Literaturdaten wird vermutet, dass die N-terminale Domäne der ϵ Untereinheit für die Interaktion mit dem F_0 Komplex zuständig sein soll (Capaldi et al. 2000). Die weiteren

Experimente hatten daher das Ziel zu überprüfen, ob die isolierte N-terminale Domäne der ϵ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an den plastidären F_0 Komplex bindet.

Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.2.2.1.A. gezeigt. Das überexprimierte N-terminale Fragment beinhaltet die ersten 98 Aminosäuren vom N-Terminus und hat ein Molekulargewicht von 9,438 kDa (Kato-Yamada et al. 1999). Es wurde in ca. 15-fachem molaren Überschuß zu CF_1 -freien Thylakoidvesikeln gegeben. Die Spuren 3 bis 5, die die Proteine des CF_0 beinhalten, enthalten nach der Inkubation mit der N-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit zusätzlich auch dieses Peptid (Abb. 3.2.2.1.A.).

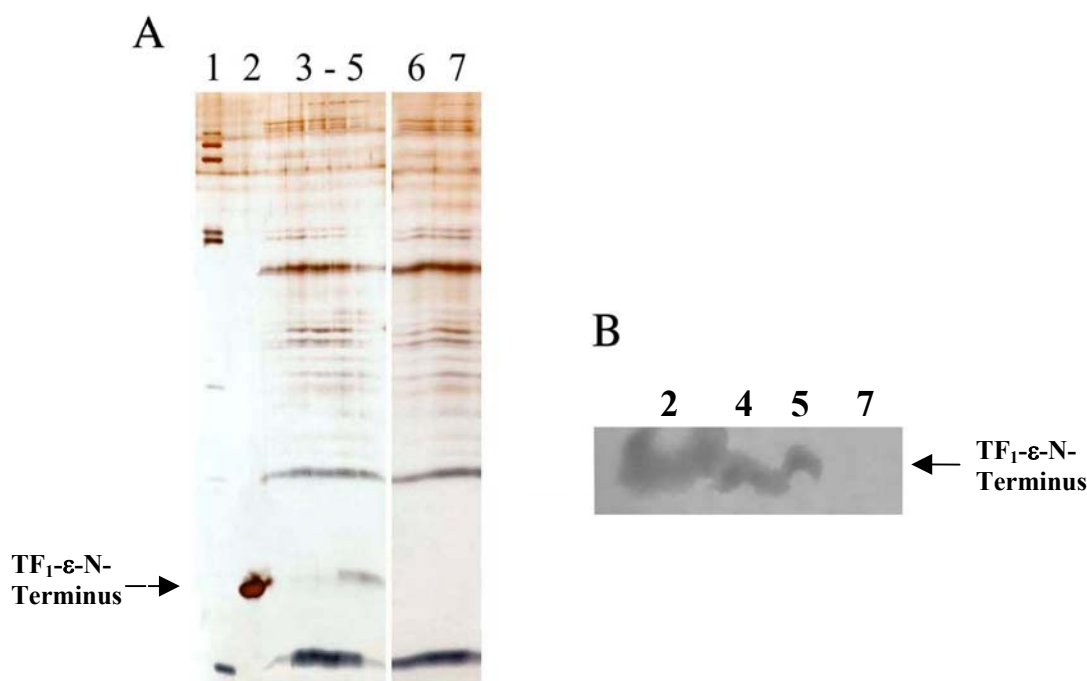


Abb. 3.2.2.1.A., B.: Bindung der N-terminalen Domäne der bakteriellen ϵ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. Gelelektrophoretische Auftrennung (A) und Western Blot-Analyse (B).

Abb. 3.2.2.1.A.: 15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – TF_1 - ϵ -N-Terminus (0,5 μ g); Spur 3 bis 5 – Fraktionen des Saccharosegradienten (jeweils 40 μ l): solubilisierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen mit dem aus der Rekonstitution resultierenden CF_0 - ϵ -N-Terminus Teilkomplex; Spur 6 und 7 – Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte N-terminale Domäne der ϵ Untereinheit).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - N-terminale Domäne der ϵ Untereinheit: 0,07 mg (ca. 7,4 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Abb. 3.2.2.1.B.: Immunologischer Nachweis der N-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit mit dem anti- TF_1 Antikörper. Spur 2 – N-Terminus der ϵ Untereinheit (0,5 μ g); Spur 4 und 5 – Fraktionen des Saccharosegradienten (30 μ l): solubilisierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen mit dem CF_0 - ϵ -N-Terminus Teilkomplex; Spur 7 – Gradientenfraktion (30 μ l) des Kontrollansatzes. Verdünnung des Antikörpers: 1: 1000.

Um einen Fehler bei der Identifizierung der N-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit auszuschließen, wurde zusätzlich eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.2.2.1.B.). Das Resultat der Immunmarkierung der Proteine in den zwei Fraktionen des Saccharosegradienten mit dem anti – TF1 Antikörper (Spuren 4 und 5 auf der Abb. 3.2.2.1.B.) bestätigte das vorherige Ergebnis der Gelelektrophorese. Im Gegensatz zu der Kontrollfraktion (Abb. 3.2.2.1.B. Spur 7) konnte die Gegenwart des N-terminalen Teils der ϵ Untereinheit in beiden Fraktionen des Gradienten nachgewiesen werden.

3.2.3 Rekonstitution des membrangebundenen CF_0 mit γ und $\gamma\epsilon$

Abbildung 3.2.3.1. und 3.2.3.2. demonstrieren Ergebnisse von Bindungsexperimenten mit homologen und heterologen F_1 -Untereinheiten. Im ersten Fall (Abb. 3.2.3.1.) wurde die durch eine Überexpression gewonnene plastidäre γ Untereinheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen gebunden. Das Ziel des zweiten Experimentes war die Rekonstitution des mutmaßlichen so genannten zentralen Stiels.

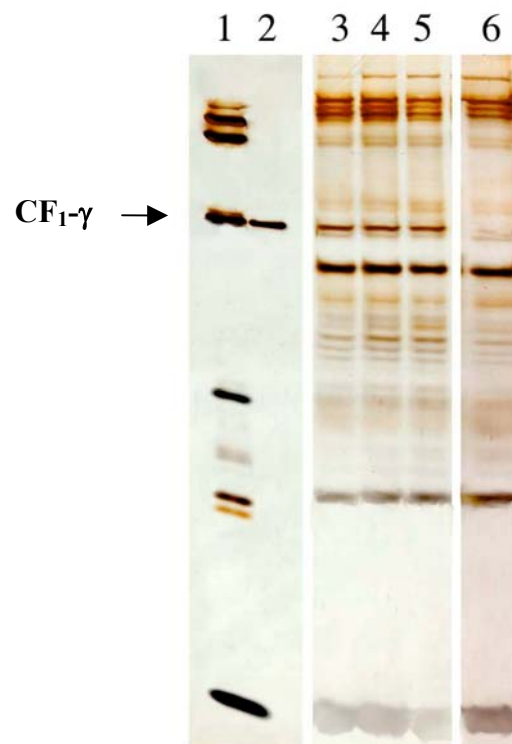


Abb. 3.2.3.1.: Bindung der plastidären γ Untereinheit aus Spinat an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. 15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – plastidäre γ Untereinheit (1 μ g); Spur 3 bis 5 – Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l): solubilisierte Thylakoidmembranenproteine mit dem aus der Rekonstitution resultierenden CF_0 - γ Teilkomplex; Spur 6 – Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte γ Untereinheit).
Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0); CF_1 - γ : 0,16 mg (ca. 5 nmol).

Hierzu wurde ein Bindungsversuch unter gleichzeitiger Zugabe der plastidären γ und bakteriellen ε Untereinheit (gewonnen durch heterologe Überexpression) aus *Bacillus thermophilus* an den in der Thylakoidmembran liegenden F_0 Komplex durchgeführt (Abb. 3.2.3.2.). Wie in den Abbildungen erkennbar ist, war die Rekonstitution in beiden Fällen erfolgreich. In den entsprechenden Fraktionen des Saccharosegradienten ließen sich die solubilisierten Teilkomplexe $CF_0\text{-}\gamma$ (Abbildung 3.2.3.1. Spur 3 - 5) und $CF_0\text{-}\gamma\varepsilon$ (Abbildung 3.2.3.2.A. Spuren 4 - 8) erkennen.

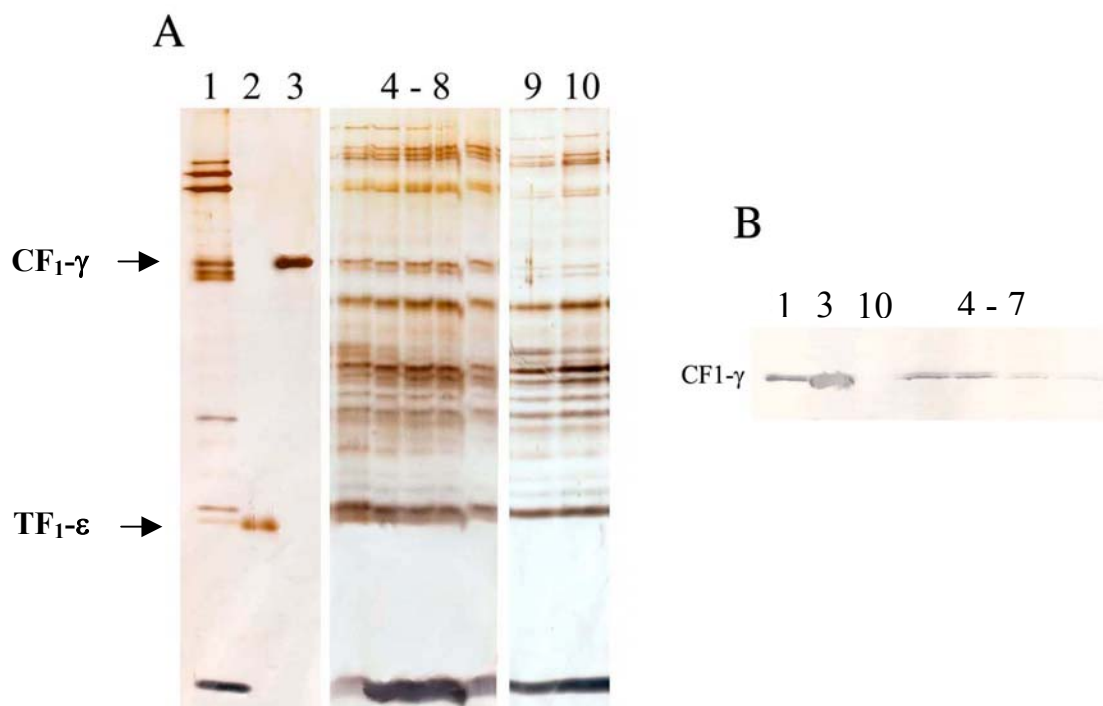


Abb. 3.2.3.2.A., B.: Bindung der plastidären γ Untereinheit aus Spinat und der bakteriellen ε Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. Gelelektrophoretische Auftrennung (A) und Western Blot-Analyse (B)

Abb. 3.2.3.2.A.: 15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μg); Spur 2 – $TF_1\text{-}\varepsilon$ (0,5 μg); Spur 3 – $CF_1\text{-}\gamma$ (1 μg); Spur 4 bis 8 - Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μl): solubilierte Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen mit dem aus der Rekonstitution resultierenden $CF_0\text{-}\gamma\varepsilon$ Teilkomplex; Spur 9 und 10 – Fraktion (40 μl) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte γ und ε Untereinheit).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - $CF_1\text{-}\gamma$: 0,16 mg (ca.5 nmol); $TF_1\text{-}\varepsilon$: 0,066 μg (ca. 6 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0);

Abb. 3.2.3.2.B.: Immunologischer Nachweis der plastidären γ Untereinheit mit dem anti- $CF_1\text{-}\gamma$ Antikörper. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (3 μg); Spur 3 – $CF_1\text{-}\gamma$ (1 μg); Spuren 4 bis 7 - Fraktionen des Saccharosegradienten (30 μl): Thylakoidmembranenproteine mit dem $CF_0\text{-}\gamma\varepsilon$ Teilkomplex. Spur 10 – Fraktion (30 μl) des Kontrollansatzes. Verdünnung des Antikörpers 1 : 5000.

In den Fraktionen (Abb. 3.2.3.2.A. Spuren 4 bis 8) in denen nach der Gelelektrophorese der $CF_0\text{-}\gamma\varepsilon$ Teilkomplex identifiziert werden konnte, wurde ergänzend die Gegenwart der plasti-

dären γ Untereinheit durch Immunmarkierung mit dem anti- γ Antikörper getestet. Das Resultat (Abb. 3.2.3.2.B. Banden 4 bis 7) deckt sich mit dem Ergebnis der Vergleichsanalyse. In allen Fraktionen konnte die plastidäre γ Untereinheit nachgewiesen werden.

3.2.4 Bindung des thermophilen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplexes in Abwesenheit und Gegenwart der ε Untereinheit

Die Abbildung 3.2.4.1.A. zeigt das Ergebnis eines Bindungsversuches der $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. In der Abbildung 3.2.4.1.B. ist ein entsprechender Versuch in Gegenwart der bakteriellen ε Untereinheit dargestellt.

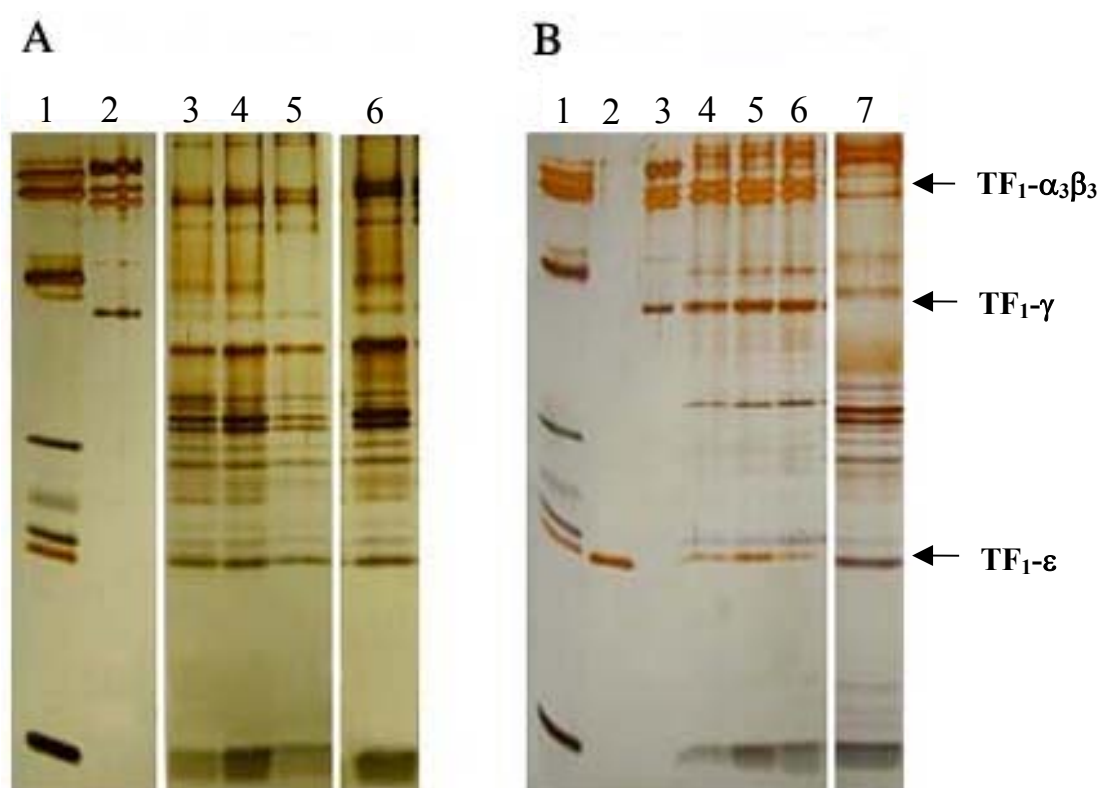


Abb. 3.2.4.1.A., B.: Bindung des bakteriellen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplexes allein (Gel A) und in Gegenwart der bakteriellen ε Untereinheit (Gel B) an F_1 -freie Thylakoidmembranen aus Spinat. 15 %ige, silbergefärbte SDS-Gele.

Abb. 3.2.4.1.A.: Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex aus *Bacillus thermophilus* (2 μ g); Spur 3 bis 5 – Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l) aus dem Bindungsexperiment der bakteriellen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 6 – Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügten $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) – $TF_1-\alpha_3\beta_3\gamma$: 0,9 mg (ca. 2,5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Abb. 3.2.4.1.B.: Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – $TF_1-\varepsilon$ (0,5 μ g); Spur 3 – $TF_1-\alpha_3\beta_3\gamma$ (2 μ g); Spur 4 bis 6 – Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l), solubilisierte Proteine der Thylakoidmembranen mit dem aus der Rekonstitution resultierenden $CF_0-\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ Teilkomplex; Spur 7 – Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügten $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex und ε Untereinheit).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) – $TF_1-\alpha_3\beta_3\gamma$ 0,9 mg (ca. 2,5 nmol); $TF_1-\varepsilon$ 0,083 mg (ca. 7,5 nmol); Chlorophyllmenge 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Der Vergleich beider Bilder (Abb. 3.2.3.2.A. Spuren 3, 4, 5 und in 3.2.3.2.B. Spuren 4, 5, 6) zeigt, dass eine effiziente Bindung der bakteriellen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit nur in der Gegenwart der ε Untereinheit stattgefunden hat. Die Spuren 4, 5 und 6 auf dem Gel B beinhalten den solubilierten $CF_0\text{-}\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ Teilkomplex. Auf dem Gel A (Spuren 3, 4 und 5) sind dagegen keine oder nur sehr schwache Banden zu erkennen, die den Untereinheiten α , β und γ zugeordnet werden können. Auch bei Veränderung der experimentellen Bedingungen (z.B. Inkubationszeit der Bindungspartner im Rekonstitutionsmedium; Reihenfolge beim Zusammenpipettieren des Rekonstitutionsansatzes; Länge und Geschwindigkeit der Zentrifugation nach der Rekonstitution; Zusammensetzung der Rekonstitution- und Waschmedien und dem Mengenverhältnis der Bindungspartnern - Daten nicht gezeigt) wurde kein positives Ergebnis erzielt.

Die Ergebnisse der Bindung des $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplexes in Anwesenheit und Gegenwart der ε Untereinheit liefern zusammen einen eindeutigen Hinweis für eine unterstützende Rolle der ε Untereinheit bei der Bindung des bakteriellen $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplexes an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. Eine schwache Affinität zwischen dem $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex und dem F_0 Teil des plastidären Enzyms kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Der Rekonstitutionsansatz beinhaltete in einem Volumen von 0,5 ml CF_1 -freie Thylakoidvesikel (ca. 0,5 nmol CF_0), den $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex (ca. 2,5 nmol) und die ε Untereinheit (7,5 nmol). Dementsprechend war der $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex in 5-fachem und die ε Untereinheit in 15-fachem Überschuss gegenüber dem CF_0 Komplex.

3.3 Wechselwirkungen im peripheren Stielbereich der ATP-Synthase

Die in diesem Kapitel beschriebenen Resultate aus den Bindungsexperimenten charakterisieren die Interaktionen zwischen der δ Untereinheit und dem F_0 Komplex sowie zwischen der δ Untereinheit und den Untereinheiten der katalytischen Region.

3.3.1 Bindung der bakteriellen δ Untereinheit an F_1 -freie Thylakoidmembranen

Eine eventuelle Interaktion zwischen der δ Untereinheit und dem plastidären F_0 Komplex wurde durch die Bindung der bakteriellen δ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an F_1 -freien Thylakoidmembranen getestet. Der Rekonstitutionsansatz beinhaltete in einem Volumen von ca. 0,5 ml CF_1 -freie Thylakoidvesikel, 0,5 mg Chlorophyll entsprechend, und die

isolierte δ Untereinheit 0,08 mg. Die verwendete Chlorophyllmenge entspricht ca. 0,5 nmol CF_0 (Strotmann et al. 1998), 0,08 mg δ bei einem Molekulargewicht von 15,5 kDa ca. 5 nmol, d.h. das Mengenverhältnis im Ansatz zwischen dem CF_0 und der δ Untereinheit betrug 1: 10. Die Experimente lieferten einen eindeutigen Nachweis einer Wechselwirkung zwischen der δ Untereinheit und dem CF_0 Komplex; der CF_0 - δ Teilkomplexes konnte im Saccharosegradienten abgetrennt werden (Abb. 3.3.1.1.A., Spuren 3 und 4). Nach der Ultrazentrifugation befand sich der CF_0 - δ Teilkomplex im Bereich des Gradienten mit ca. 24 % Saccharose.

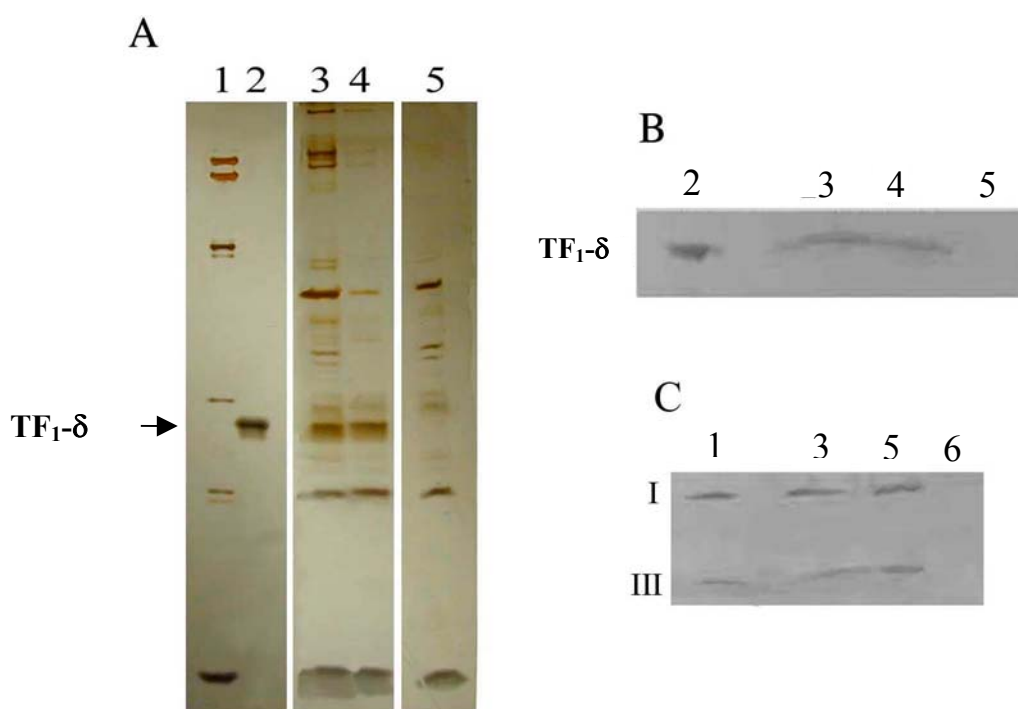


Abb. 3.3.1.1.A., B., C.: Bindung der bakteriellen δ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. Gelelektrophoretische Auftrennung (A) und Western Blot-Analyse (B) und (C).
Abb. 3.3.1.1.A.: 15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 - CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 - TF_1 - δ Untereinheit (0,5 μ g); Spur 3, 4 - Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l): solubilisierte Proteine der Thylakoidmembran mit dem aus der Rekonstitution resultierenden CF_0 - δ Teilkomplex; Spur 5 – Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte δ Untereinheit). Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - TF_1 - δ : 0,08 mg (ca. 5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).
Abb. 3.3.1.1.B.: Immunologischer Nachweis der δ Untereinheit mit dem anti- TF_1 Antikörper. Spur 2 – TF_1 - δ (0,3 μ g); Spur 3, 4 – Fraktionen des Saccharosegradienten (30 μ l): solubilisierte Proteine der Thylakoidmembranen mit dem CF_0 - δ Teilkomplex; Spur 5 – Fraktion (30 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte δ Untereinheit). Verdünnung des Antikörpers 1 : 2000.
Abb. 3.3.1.1.C.: Immunologischer Nachweis der Untereinheiten I, III aus dem CF_0 Komplex. Spur 1 – CF_0CF_1 Komplex aus Spinat (2 μ g); Spur 3 – Fraktion des Saccharosegradienten (30 μ l) mit den solubilisierten Proteinen der Thylakoidmembranen und dem CF_0 - δ Teilkomplex; Spur 5 – Fraktion (30 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte δ Untereinheit); Spur 6 – CF_1 Komplex aus Spinat-Thylakoiden (2 μ g). Verdünnung des Antikörpers 1 : 1000.

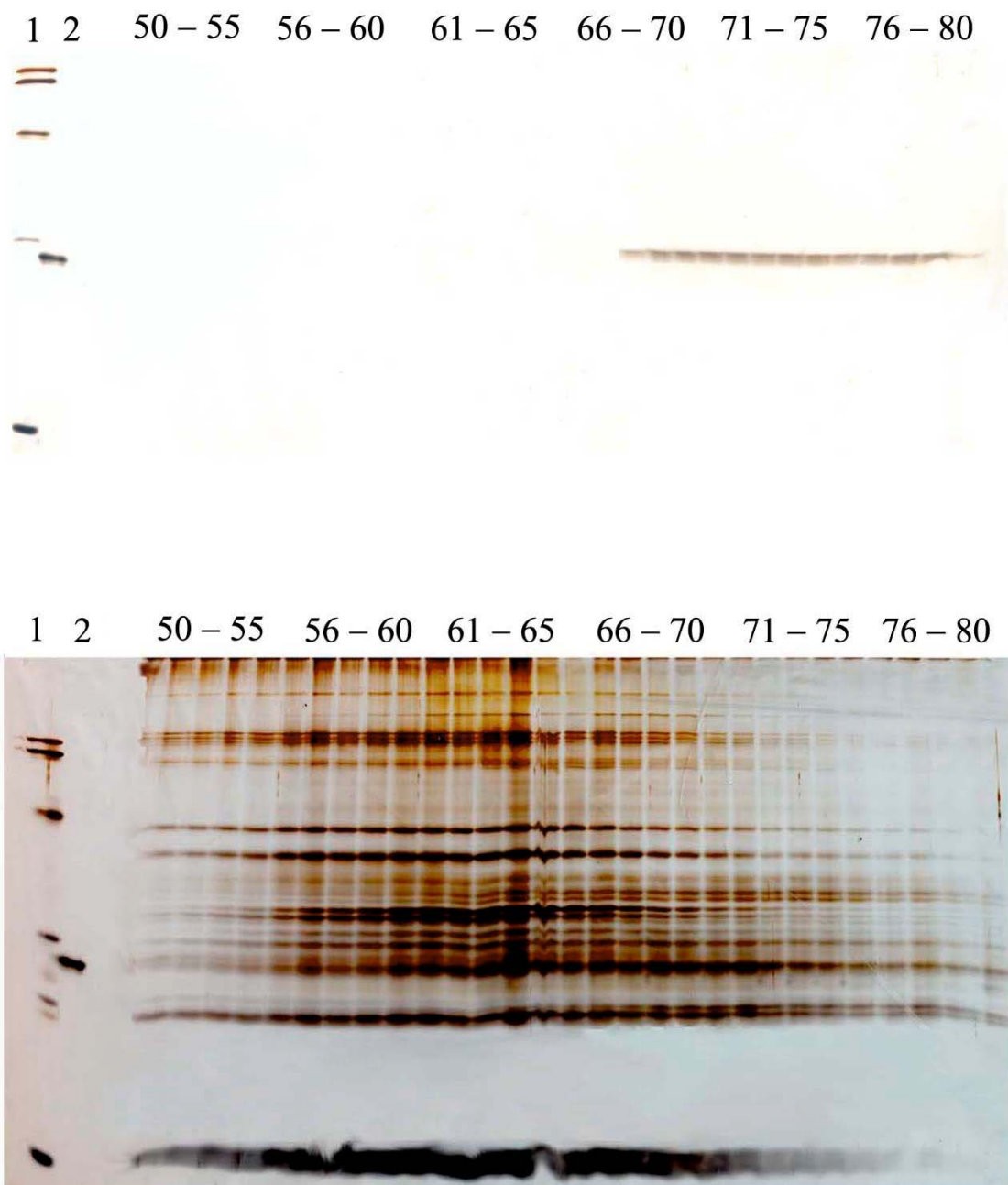


Abb. 3.3.1.2.A., B.: Aufteilung der ungebundenen (Gel A) und an den CF₀ Komplex gebundenen δ Unter-einheit (Gel B) innerhalb eines Saccharosegradienten. 15 %ige, silbergefärbte SDS-Gele.

Gel A und B: Spur 1 – CF₁CF₀ Komplex aus Spinat (5 μg); Spur 2 - TF₁-δ (0,5 μg); Spuren 50 bis 80 - Gradientenfractionen (jeweils 20 μl) mit aufsteigender Saccharosekonzentration von 12,75 % (nicht alle abgebildet), 18,5 % und 24,25 % (von rechts nach links). Fraktionsvolumen ca. 50 μl.

Die zusätzlich durchgeführte Western Blot-Analyse bestätigte das Resultat der Silberfärbung. Die Immunmarkierung mit dem anti-δ Antikörper führte zu einem Nachweis der bakteriellen

δ Untereinheit in allen Fraktionen ausgenommen der Fraktion des Kontrollansatzes (Abb. 3.3.1.1.B. Spuren 3, 4). Auch die Untereinheiten I und III des plastidären F_0 Komplexes konnten auf diese Weise mit dem anti – I, III Antikörper in der die δ Untereinheit enthaltende Fraktionen (Abb. 3.3.1.1.C. Spur 3) nachgewiesen werden.

Abbildung 3.3.1.2. zeigt in zwei SDS-Gelen die Verteilung von der freien (Abb. 3.3.1.2.A.) und der gebundenen (Abb. 3.3.1.2.B.) δ Untereinheit in den einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten. Die freie δ Untereinheit (Abb. 3.3.1.2.A.) blieb nach der Zentrifugation im oberen Gradientenbereich d. h. bei niedriger Saccharosekonzentration (ca. 12 %). Die an dem CF_0 Komplex gebundene δ Untereinheit (Abb. 3.3.1.2.B.) wurde dagegen im unteren Bereich des Gradienten gefunden, was einer Saccharosekonzentration von ca. 24 % entspricht. Dieser Vergleich zeigt, dass es sich bei der Lokalisation von der δ Untereinheit im Gradient nicht um eine zufällige sondern um eine durch spezifische Bindung an den CF_0 Komplex vermittelte Verteilung handelt.

3.3.2 Affinität der bakteriellen δ Untereinheit zum plastidären CF_0 Komplex

Das Maß für die Bindungsaffinität zweier Proteinmoleküle ist die Dissoziationskonstante K_d . Nach dem die Interaktion zwischen der bakteriellen δ Untereinheit und dem plastidären F_0 Komplex nachgewiesen wurde, wurde im Weiteren die Dissoziationskonstante bestimmt.

Dazu wurden Bindungsexperimente mit konstanter Chlorophyllkonzentration (1 mg/ml) und somit auch konstanter Konzentration des in den Membranen vorhandenen F_0 Komplexes (1 μ M) und fünf verschiedenen Konzentrationen der δ Untereinheit (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 35 μ M) im Ansatz durchgeführt. Aus einer Serie von Rekonstitutionsexperimenten ergab sich in den einzelnen Ansätzen eine durchschnittliche Konzentration des an die F_1 -freien Thylakoidmembranen gebundenen δ von $0,19 \pm 0,09 \mu$ M (bei 5 μ M δ), $0,43 \mu$ M $\pm 0,09 \mu$ M (bei 10 μ M δ), $0,77 \mu$ M $\pm 0,1 \mu$ M (bei 15 μ M δ), $1,02 \mu$ M $\pm 0,08 \mu$ M (bei 20 μ M δ), $1,01 \mu$ M $\pm 0,11 \mu$ M (bei 30 μ M δ) und $1,01 \mu$ M (bei 35 μ M δ).

Aus dem bekannten Mengenverhältnis zwischen Chlorophyll und F_1 Komplex, das 1 nmol CF_1 pro mg Chlorophyll (Strotmann et al. 1998) beträgt, wurde die Konzentration des CF_0 ermittelt.

Die Menge der gebundenen δ Untereinheit wurde nach Färbung der Proteinbande im SDS-Gel mit Coomassie Brilliant Blue spektrophotometrisch bestimmt. Eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Verfahrens befindet sich im Methodenteil (Kap. 2.2.3).

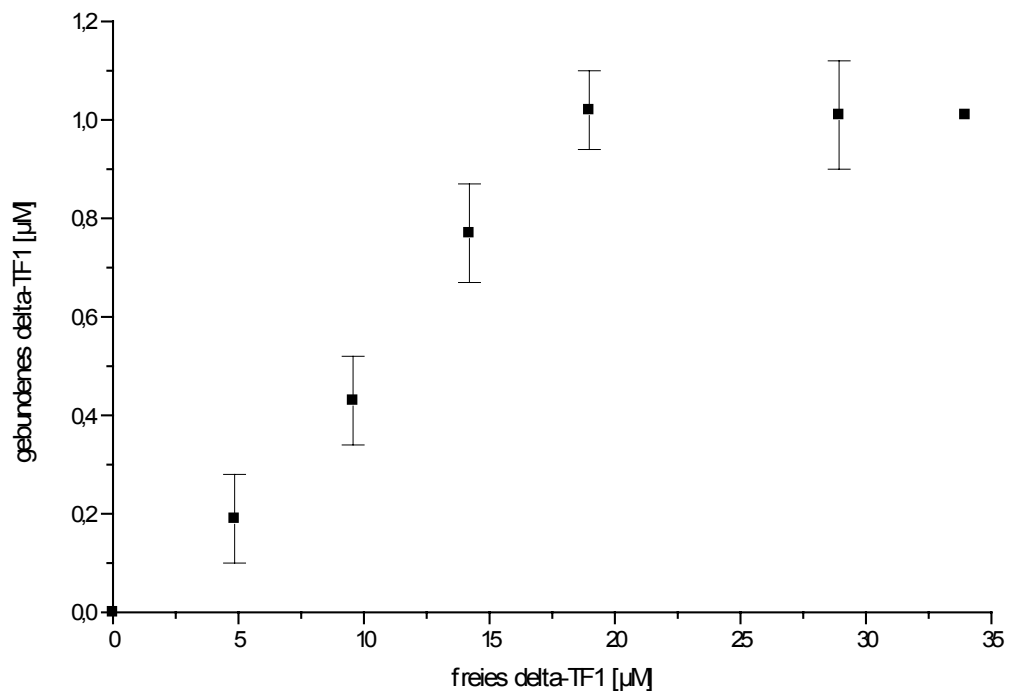


Abb. 3.3.2.1.: Graphische Darstellung der Wechselbeziehung zwischen der Menge der an die F₁-freien Thylakoidmembranen gebundenen und der im Rekonstitutionsansatz befindlichen bakteriellen δ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus*.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.3.2.1. zusammengefaßt. Die Grafik zeigt die Menge der an die F₁-freien Thylakoidmembranen gebundenen δ Untereinheit als Funktion der im Rekonstitutionsansatz befindlichen Konzentration von freier δ Untereinheit. Nach Absättigung der bei der verwendeten Chlorophyllmenge vorhandenen CF₀ Komplexe konnte bei ansteigender Konzentration der δ Untereinheit im Rekonstitutionsansatz keine weitere Änderung der Menge des an die F₁-freien Thylakoidmembranen gebundenen δ Moleküls beobachtet werden.

Die aus diesen Daten errechnete Dissoziationskonstante für die Bindung der bakteriellen δ Untereinheit an den plastidären F₀ Komplex liegt im mikromolaren Bereich zwischen 9 und 12 μM ($10,5 \mu\text{M} \pm 1,5 \mu\text{M}$).

3.3.3 Wechselwirkung der δ Untereinheit mit dem F₀ und den Untereinheiten α und β

Die Literatur enthält unterschiedliche Informationen über die Bindung zwischen der δ Untereinheit und den Untereinheiten des F₁ Köpfchens: α und β . Als Bindungspartner für die δ

Untereinheit werden α , β oder beide Untereinheiten vorgeschlagen (Lill et al. 1996, Ogilvie et al. 1997, Wilkens 2000). Hier wurde versucht, die Untereinheit α und β , die ohne weitere F_1 Untereinheiten nicht mit F_0 interagieren (Abb. 3.3.3.1.), mit Hilfe von der δ Untereinheit an die F_1 -freien Thylakoide zu binden.

Zu diesem Zweck wurden zwei Rekonstitutionsansätze vorbereitet. Sie beinhalteten neben den Thylakoiden die α oder die β Untereinheit und zwar entweder ohne oder mit δ Untereinheit. Die Rekonstitutionsansätze beinhalteten in einem Volumen von 0,5 ml CF_1 -freie Thylakoidvesikel (äquivalent ca. 0,5 nmol CF_0), δ Untereinheit (ca. 5 nmol) und β sowie α Untereinheit (jeweils ca. 7,5 nmol). Die δ Untereinheit war in Relation zu dem CF_0 Komplex im 10-fachen, α und β in 15-fachen Überschuß.

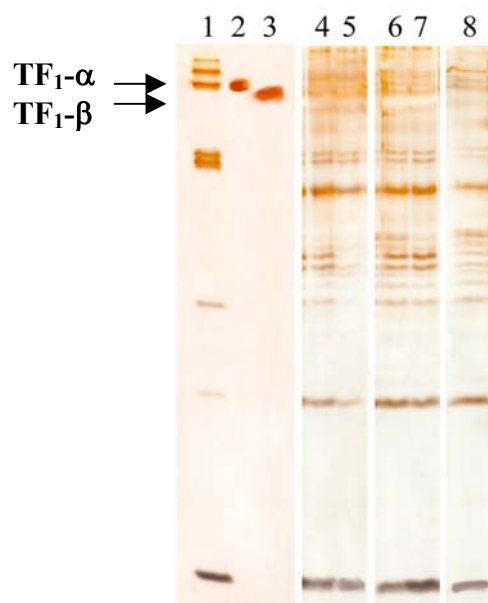


Abb. 3.3.3.1.: Bindung der α bzw. β Untereinheiten aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen.

15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 – CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – TF_1 - α (0,8 μ g); Spur 3 – TF_1 - β (0,8 μ g); Spur 4 bis 7 – Fraktionen (40 μ l) des Saccharosegradienten aus den Bindungsexperimenten der α Untereinheit (Spuren 4 und 5) und der β Untereinheit (Spuren 6 und 7) an die F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 8 – Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte Untereinheit α oder β).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml); TF_1 - α bzw. TF_1 - β : 0,4 μ g (ca. 7,5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Die Abbildungen 3.3.3.1. und 3.3.3.2. stellen eine Zusammenfassung der Resultate dar. Die Ergebnisse zeigen, dass ohne die δ Untereinheit weder eine Bindung von α noch eine Bindung von β erfolgt.

In Gegenwart von δ konnte dagegen neben der δ Untereinheit in den F_0 Fraktionen auch die α Untereinheit identifiziert werden. Mit der isolierten β Untereinheit wurde dagegen auch in Gegenwart von δ keine Bindung an den F_0 gefunden. Das Resultat schließt die δ Untereinheit als starken Bindungspartner für die β Untereinheit aus und bestätigt einen Kontakt zwischen der δ Untereinheit und α . Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse wurde über eine Immunmarkierung der Proteine mit dem anti-TF₁ Antikörper in den entsprechenden Fraktionen bestätigt (Abb. 3.3.3.2.B.).

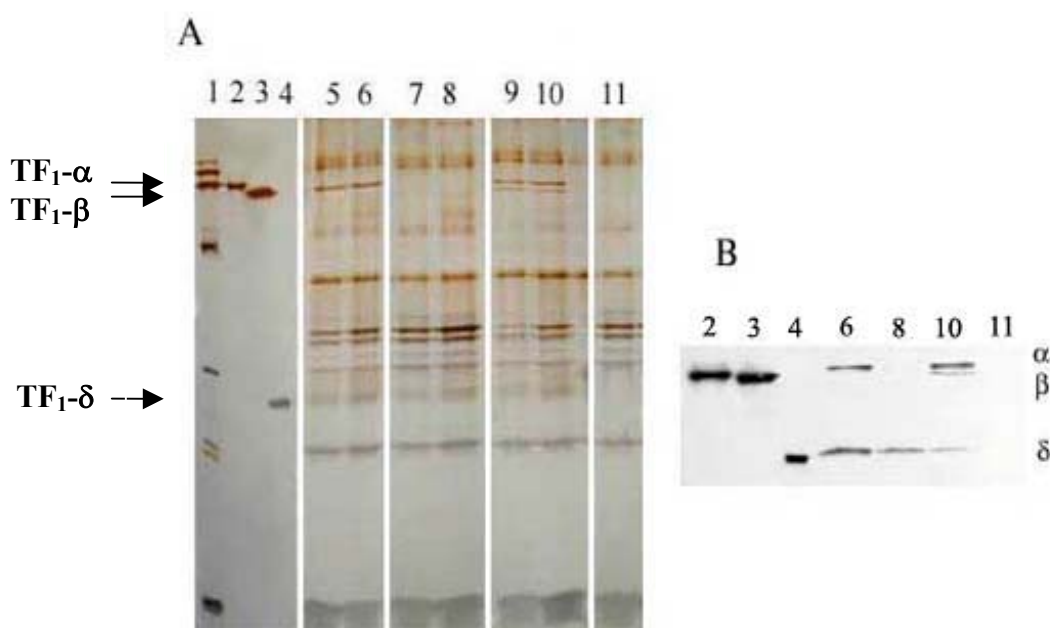


Abb. 3.3.3.2.A., B.: Bindung der Untereinheiten α , β und δ der bakteriellen ATP-Synthase aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. Gelelektrophoretische Analyse (A), Western Blot-Analyse (B).

Abb. 3.3.3.2A.: 15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 – CF₁CF₀ Komplex aus Spinat (5 μ g); Spur 2 – TF₁- α (1 μ g); Spur 3 – TF₁- β (1 μ g); Spur 4 – TF₁- δ (0,5 μ g); Spuren 5 bis 10 – Fraktionen (40 μ l) des Saccharosegradienten aus den Bindungsexperimenten der Untereinheiten α und δ (Spuren 5 und 6), β und δ (Spuren 7 und 8), α , β und δ (Spuren 9 und 10) an die F_1 -freien Thylakoidmembranen; Spur 11 - Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte TF₁ - Untereinheiten).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml); TF₁- α , - β : 0,4 mg (ca. 7,5 nmol); TF₁- δ : 0,077 mg (ca. 5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF₀).

Abb. 3.3.3.2B.: Immunologischer Nachweis der Untereinheiten α , β und δ mit dem anti - TF₁ Antikörper.

Spur 2 - TF₁- α (0,5 μ g); Spur 3 -TF₁- β (0,5 μ g); Spur 4 – TF₁- δ (0,5 μ g) ; Spuren 6, 8 und 10 – je 30 μ l einer Gradientenfraktion aus den Bindungsexperimenten der TF₁ Untereinheiten an die F_1 -freien Thylakoidmembranen: α und δ (Spur 6), β und δ (Spur 8), α , β und δ (Spur 10); Spur 11 - Fraktion (30 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte TF₁-Untereinheiten). Verdünnung des Antikörpers: 1 : 1000.

Eine dritte Versuchsreihe hatte das Ziel, die Wechselwirkungen zwischen allen dreien in einem Rekonstitutionsansatz befindlichen Untereinheiten (α , β und δ) der F_1 Domäne des bakteriellen Enzyms zu untersuchen.

Die Spuren 9 und 10 in der Abbildung 3.3.3.2.A. weisen nach, dass die Rekonstitution eines CF_0 - $\alpha\beta\delta$ Komplexes aus den isolierten Untereinheiten möglich ist. Alle drei F_1 Untereinheiten des bakteriellen Enzyms konnten auch durch den anti – TF_1 Antikörper (Abb. 3.3.3.2.B. Spur 10) markiert werden.

Die Zusammenfassung aller Experimente zeigt Interaktionsflächen zwischen CF_0 und δ , δ und α sowie α und β . Die Voraussetzung für das Vorhandensein eines peripheren Stiels, der mit den Untereinheiten a und b des F_0 und α und β des F_1 den Stator bildet, sind damit gegeben.

3.4 Bindung von γ , δ und ε an F_0

Die Rekonstitution des gesamten Grenzbereiches zwischen dem membranständigen protonentranslozierenden Teil des Enzyms und dessen katalytischen Region war das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente. Die Rekonstitutionen sind unter Verwendung heterologer Komponenten durchgeführt worden. Die Untereinheiten δ und ε stammen aus dem bakteriellen Enzym von *Bacillus thermophilus*, F_0 und die γ Untereinheit dagegen aus der plastidären ATPase aus Spinat-Thylakoiden.

Das Volumen der Rekonstitutionsansätze betrug 0,5 ml. Sie beinhalteten CF_1 -freie Thylakoidmembranvesikel (ca. 0,5 nmol CF_0) und entsprechend 3,5 nmol γ Untereinheit, 3,5 nmol δ Untereinheit und 6 nmol ε Untereinheit. Dementsprechend betrug das Mengenverhältnis zwischen dem CF_0 und den γ bzw. δ Untereinheiten 1 : 7 und 1 : 12 zwischen dem CF_0 und der ε Untereinheit.

Die gleichzeitige Rekonstitution beider Stielbereiche mit dem F_0 Komplex wurde anhand von zwei Bindungsexperimenten untersucht. Die δ Untereinheit war dabei in Gegenwart jeweils einer Untereinheit des zentralen Stiels, γ (Abb. 3.4.1.A) oder ε (Abb. 3.4.1.B), vorhanden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Abb. 3.4.1.A. und B.) der Proteine der entsprechenden Fraktionen des Saccharosegradienten zeigt die aus beiden Bindungsexperimenten resultierenden, solubilisierten Teilkomplexe: CF_0 - $\gamma\delta$ (Abb. 3.4.1.A. Spuren 4, 5) und CF_0 - $\varepsilon\delta$ (Abb. 3.4.1.B. Spuren 5 und 6).

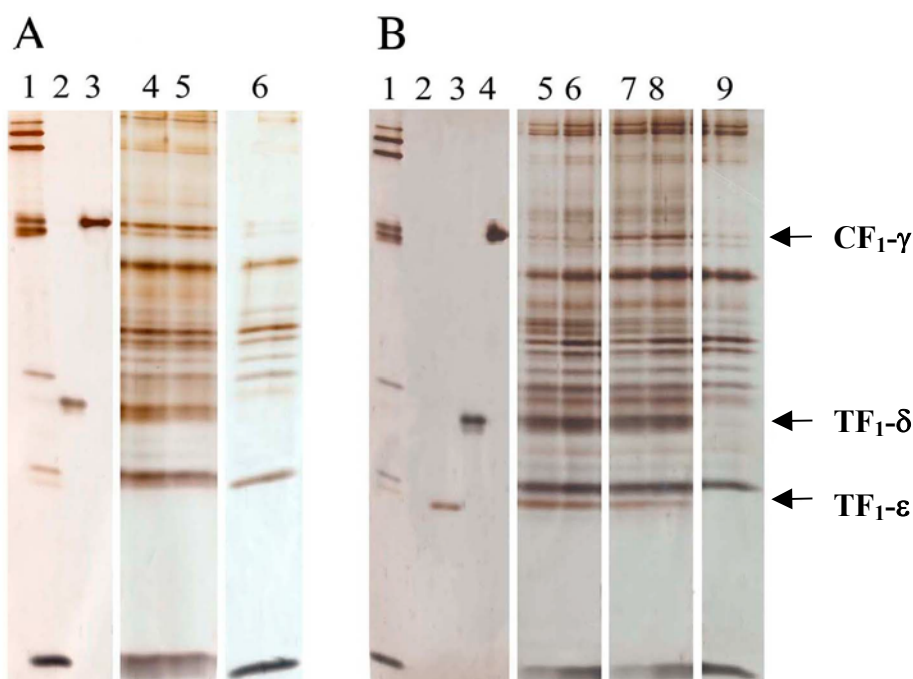


Abb. 3.4.1.A., B.: Bindung der bakteriellen δ und plastidären γ Untereinheit (Gel A), der bakteriellen δ und ϵ Untereinheit (Gel B) und der bakteriellen δ , ϵ und plastidären γ Untereinheit (Gel B) an die F_1 -freien Thylakoidmembranen. 15 %ige, silbergefärbte SDS-Gele.

Abb. 3.4.1.A.: Spur 1 - CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (7 μ g); Spur 2 – $TF_1\text{-}\delta$ (0,5 μ g); Spur 3 – $CF_1\text{-}\gamma$ (0,5 μ g); Spuren 4, 5 - Fraktionen des Saccharosegradienten (40 μ l): solubilisierte Thylakoidmembranproteine mit dem rekonstituierten $CF_0\text{-}\gamma\delta$ Teilkomplex; Spur 6 - Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte γ und δ Untereinheiten).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml); $CF_1\text{-}\gamma$: 0,112 mg (ca. 3,5 nmol); $TF_1\text{-}\delta$: 0,055 mg (ca. 3,5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Abb. 3.4.1.B.: Spur 1 - CF_1CF_0 Komplex aus Spinat (7 μ g); Spur 2 – $TF_1\text{-}\epsilon$ (0,5 μ g); Spur 3 – $TF_1\text{-}\delta$ (0,5 μ g); Spur 4 – $CF_1\text{-}\gamma$ (0,5 μ g); Spuren 5 - 8 - Fraktionen des Saccharosegradienten (jeweils 40 μ l): solubilisierte Thylakoidmembranproteine mit den rekonstituierten $CF_0\text{-}\epsilon\delta$ (Spuren 5 und 6) und $CF_0\text{-}\gamma\epsilon\delta$ (Spuren 7 und 8) Teilkomplexen; Spur 9 - Fraktion (40 μ l) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte Untereinheiten: γ , δ und ϵ).

Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - $CF_1\text{-}\gamma$: 0,112 mg (ca. 3,5 nmol); $TF_1\text{-}\epsilon$: 0,066 mg (ca. 6 nmol); $TF_1\text{-}\delta$: 0,055 mg (ca. 3,5 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol CF_0).

Nach den Rekonstitutionen von Teilen der Verbindungsregion der $CF_0\text{-}\gamma\delta$ und der $CF_0\text{-}\epsilon\delta$ Teilkomplexe wurde versucht, alle drei Untereinheiten γ , δ und ϵ an die F_1 -freien Thylakoidmembranen zu binden.

Das positive Ergebnis der Rekonstitution ist in der Abbildung 3.4.1.B (Spuren 7 und 8) gezeigt. In den Fraktionen (Spuren 7 und 8) des Saccharosegradienten lassen sich die TF_1 Untereinheiten ϵ und δ , die plastidäre γ Untereinheit und die Untereinheiten des plastidären F_0 Komplexes nachweisen.

3.5 Rekonstitution des gesamten CF₀F₁ Komplexes

Schließlich wurde die Rekonstitution der gesamten F₁ Domäne der ATP-Synthase aus isolierten F₁ Untereinheiten mit F₁-freien Thylakoidmembranen zu einer gesamten ATPase durchgeführt.

Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 0,5 ml ca. 0,5 nmol CF₀ entsprechende CF₁-freie Thylakoidvesikel, jeweils ca. 9 nmol der α und β Untereinheiten, ca. 3,5 nmol γ Untereinheit, ca. 4 nmol δ Untereinheit und ca. 7 nmol ϵ Untereinheit.

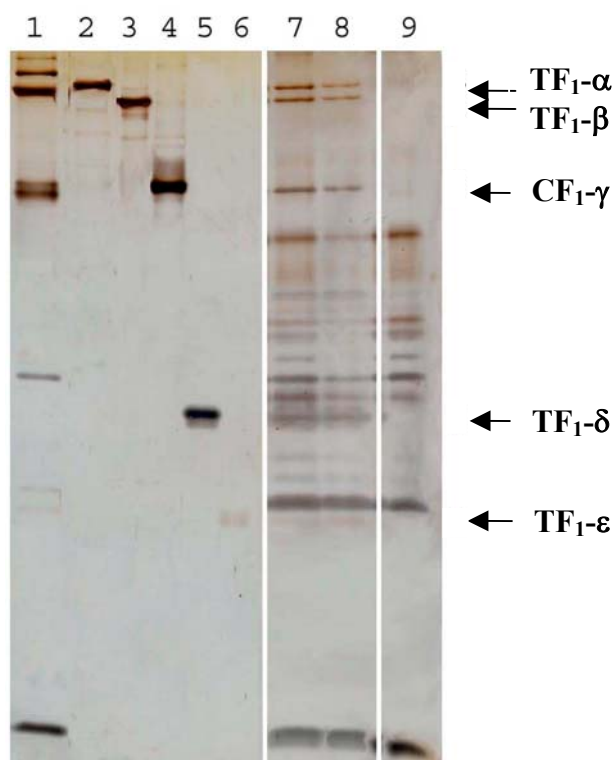


Abb. 3.5.1.: Bindung der F₁ Untereinheiten: α , β , δ und ϵ des Enzyms aus *Bacillus thermophilus* und der plastidären γ Untereinheit an die F₁-freien Thylakoidmembranen. 15 %iges, silbergefärbtes SDS-Gel. Spur 1 - CF₁CF₀ Komplex aus Spinat (5 µg); Spur 2, 3, 5, 6 - TF₁ Untereinheiten: α , β , δ , ϵ (jeweils 0,5 µg); Spur 4 – plastidäre γ Untereinheit (0,5 µg); Spur 7 und 8 – Fraktionen des Saccharosedichtegradienten (40 µl) solubilisierte Proteine der F₁-freien Thylakoidmembranen mit dem rekonstituierten CF₀- $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ Komplex; Spur 9 - Fraktion (40 µl) des Kontrollansatzes (Rekonstitutionsansatz ohne zugefügte F₁-Untereinheiten). Rekonstitutionsansatz (0,5 ml) - TF₁- α , - β : je 0,5 mg (ca. 9 nmol); CF₁- γ : 0,112 mg (ca. 3,5 nmol); TF₁- δ : 0,06 mg (ca. 4 nmol); TF₁- ϵ : 0,08 mg (ca. 7 nmol); Chlorophyllmenge: 0,5 mg (ca. 0,5 nmol).

Der in der Abbildung 3.5.1. dargestellte Ausschnitt eines SDS-Gels enthält zwei aufeinander folgende Fraktionen (Spuren 7 und 8) des Saccharosegradienten aus dem Bindungsexperiment der bakteriellen α , β , δ und ϵ Untereinheiten und der plastidären γ Untereinheit an die F₁-

freien Thylakoidmembranen. In den zwei Fraktionen konnten mit Hilfe der Standardproteine alle Untereinheiten der F_1 Domäne wie auch die Untereinheiten des plastidären F_0 Komplexes identifiziert werden.

In der Fraktion des Kontrollansatzes (Spur 9), der die Proteine der F_1 -freien Thylakoidmembranen aber keine F_1 Untereinheiten enthielt, ließen sich wie erwartet die F_1 Untereinheiten nicht feststellen.

4.0 Diskussion

Protonentransport und die ATP-Synthese verlaufen innerhalb der ATPase in räumlich voneinander getrennten Regionen, dem F_0 und dem F_1 . An der Kopplung der beiden Prozesse sind die drei Untereinheiten γ , δ und ϵ wesentlich beteiligt. Sie befinden sich zwischen den beiden Teilkomplexen und verbinden jeweils verschiedene Teile des F_0 und des F_1 miteinander.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der strukturellen Aspekte des Grenzbereiches zwischen dem protonentranslozierenden Teil und dem katalytischen Teil des Enzyms. Durch Bindung einzelner Untereinheiten und Untereinheiten-Kombinationen an den F_1 -freien membranengebundenen F_0 Teil sollten Bindungspartner identifiziert und charakterisiert werden. Die Resultate solcher Rekonstitutionen lieferten Informationen über den Aufbau des Komplexes in der Region, der bisher für die 3D-Strukturanalyse nicht zugänglich ist.

Aus praktischen Gründen (s. Einleitung) wurden für die Rekonstitutionen zumeist Untereinheiten aus verschiedenen ATP-Synthasen verwendet.

4.1 Rekonstitutionssystem

Neben der Rekonstitution des Komplexes aus Untereinheiten aus ein und demselben Organismus sind in der Literatur auch heterologe Rekonstitutionen beschrieben worden. Zahlreiche solcher Experimente betreffen die Rekonstitution der F_1 Domäne des Enzyms aus isolierten einzelnen Untereinheiten. Steinemann et al. (1994) haben mit dem Ergebnis einer teilweise wiederhergestellten Photophosphorylierung die δ und ϵ Untereinheiten in der F_1 Domäne aus Spinat durch die entsprechenden Untereinheiten aus *Synechocystis sp.* PCC6803 ersetzt. Ein hybrider F_1 Teilkomplex aus den α und β Untereinheiten aus *Bacillus thermophilus* und der plastidären γ und ϵ Untereinheit aus Spinat wurde von Hisabori et al. (1997) beschrieben. Weitere Beispiele sind aus *E. coli* und *Rhodospirillum rubrum* (Gromet-Elhanan et al. 1985), sowie für *Euglena gracilis* und *Spinacia oleracea* (Kahn 1982) beschrieben worden. In allen Fällen konnte eine ATPase-Aktivität des Teilenzyms gemessen werden.

Wenige Informationen findet man über die heterologe Rekonstitution des gesamten Enzyms. Beschrieben wurden hybride F_0F_1 -ATPasen, deren F_1 und F_0 Teilkomplexe aus *E. coli* und *Bacillus thermophilus* (Steffens et al. 1987), *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (Hsu et al. 1984) sowie *Propionigenium modestum* und *Bacillus thermophilus* (Laubinger et al. 1990) stammen. Bar-Zvi et al. (1985) berichteten über eine Rekonstitution der ATP-Synthase mit

Bestandteilen aus *Bacillus thermophilus* und *Lactuca sp.*. Galmiche et al. (1994) konnten eine Bindung der F₁ Domäne aus *Bacillus thermophilus* an den in Liposomen eingebauten plastidären CF₀ Komplex aus Spinat zeigen.

Die Kompatibilität zwischen Bestandteilen von ATP-Synthasen prokaryotischer und eukaryotischer Organismen überrascht nicht, da sowohl die Mitochondrien als auch die Plastiden prokaryotischen Ursprungs sind. Diese Beispiele der erfolgreichen Rekonstitution der ATP-Synthasen aus Komponenten unterschiedlicher Organismen deutet darauf hin, dass die Interaktionsflächen der einzelnen Untereinheiten konserviert sein müssen. Sie waren darüber hinaus Rechtfertigung dafür, die in dieser Dissertation aufgeworfenen Fragen ebenfalls mit Hilfe heterologer Rekonstitutionen anzugehen.

Als Basis eignet sich in besonderem Maße der vom F₁ befreite membranintegrierte F₀ Teil der chloroplastidären ATP-Synthase: zum Ersten ist die Besetzungsdichte der Thylakoidmembran mit ATP-Synthase vergleichsweise hoch, zum Zweiten läßt sich CF₁ vom CF₀ leicht, schonend und quantitativ entfernen, zum Dritten lassen sich die Thylakoide experimentell gut handhaben. So lassen sich beispielsweise gebundene Proteine von löslichen Proteinen einfach durch relativ niedrigtourige Zentrifugation trennen; anschließende Waschvorgänge können auf die gleiche Weise vorgenommen werden.

Entscheidend für eine erfolgreiche Rekonstitution ist das F₁ Ablösungsverfahren. Galmiche et al. beschrieben 1994 eine Behandlung mit Guanidiniumchlorid bzw. Natriumbromid. Die Behandlung mit Guanidiniumchlorid ergab keine vollständige Ablösung von F₁. Die Inkubation mit Natriumbromid wurde als effektiver beschrieben; gleichzeitig wurde aber eine schlechtere funktionelle Rekonstitution im Vergleich zu der Guanidiniumchlorid-Methode beobachtet. Ein drittes Verfahren unter Verwendung von EDTA erfordert eine lange Inkubationszeit (Bar-Zvi et al. 1985) und befreit die Membran auch nicht vollständig vom F₁.

Für die eigenen Experimente wurde die Inkubation mit Natriumrhodanid gewählt, weil sie im Gegensatz zu den oben aufgeführten Verfahren eine vollständige F₁ Ablösung bewirkte und eine sehr kurze Inkubationszeit erlaubte. Da eine strukturelle, aber keine funktionelle Rekonstitution angestrebt wurde, waren für die hier durchgeführten Versuche eine vollständige CF₁-Ablösung unter Erhalt der F₀ Integrität die ausschlaggebende Voraussetzung.

4.2 Rolle von Mg^{2+} -Ionen im Rekonstitutionsansatz

Den mono- und divalenten Kationen wird eine stabilisierende Rolle an dem in der Thylakoidmembran integrierten Komplex der ATP-Synthase zugewiesen. Die Funktion der Kationen beruht auf einer Neutralisation der negativen Oberflächenladung der Membran und des F_1 , die zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den beiden führen könnte (Searle et al. 1979, Strotmann et al. 1973, Strotmann et al. 1984).

Die Bedeutung von Kationen haben Reassemblierungsexperimente der CF_1 Domäne an den membrangebundenen CF_0 gezeigt. Die Rekonstitutionsraten (ermittelt aus der Aktivität der wiederhergestellten Photophosphorylation) waren in Gegenwart bivalenter Kationen deutlich höher als in deren Abwesenheit in den Rekonstitutionsansätzen (Telfer et al. 1980). Außer den divalenten Kationen sind auch mono- (Shoshan et al. 1973) und trivalente (Telfer et al. 1980) Kationen wirksam. Die Wirksamkeit war von der Ionenstärke abhängig und stieg proportional mit der Valenzzahl. So konnte mit monovalenten Ionen bei entsprechend höherer Konzentration die gleiche Rekonstitutionsrate erzielt werden wie mit divalenten Ionen.

In vivo wird vor allem den Mg^{2+} -Ionen eine Funktion bei der Assemblierung beider Teilkomplexe zugewiesen (Telfer et al. 1980). Auch die in dieser Arbeit beschriebenen Bindungsexperimente wurden in Gegenwart von Mg^{2+} durchgeführt. Die optimale Mg^{2+} -Konzentration wurde experimentell ermittelt und lag bei 10 mM (Kap. 3.1.2.). Von Telfer et al. (1980) wurden als wirksamste Mg^{2+} -Konzentration bei der Bindung des CF_1 an den membranintegrierten CF_0 1 bis 3 mM ermittelt. Andreo et al. (1982) haben die Reassemblierung der beiden Teilkomplexe der ATP-Synthase aus Spinat-Chloroplasten bei 1 mM Konzentration von Mg^{2+} -Ionen durchgeführt. In dem Fall wurde der CF_1 bzw. δ -freie CF_1 Komplex an die mit Hilfe von Natriumbromid vom CF_1 befreite Thylakoidmembranen gebunden.

4.3 Untersuchungen zu Wechselwirkungen im zentralen Stiel

Die Untereinheiten γ und ε sind Komponenten des so genannten zentralen Stiels. Laut der Stator-Rotor-Hypothese bilden die zwei Untereinheiten zusammen mit den Proteolipidzylinder des F_0 Teils eine Funktionseinheit, welche das rotierende Element des Enzyms darstellt (Hermolin et al. 1999; Weber, Senior 2003). Die durch den Protonenfluß getriebene Rotation des Proteolipidzylinders soll eine Übertragung von mechanischer Energie zu den drei katalytischen Zentren in den α/β -Paaren ermöglichen. Dadurch sollen die drei Zentren nacheinander

geöffnet und wieder geschlossen werden, wobei das Produkt ATP abgegeben und die Substrate ADP und P_i aufgenommen werden können. Die Bildung des ATPs in den abgeschlossenen hydrophoben katalytischen Stellen bedarf keiner weiteren Energiezufuhr.

4.3.1 Wechselwirkung zwischen der ϵ Untereinheit und dem F_0 Komplex

Die ϵ Untereinheit (*E. coli*; Wilkens et al. 1995; Uhlin et al. 1997) ist aus zwei Domänen zusammengesetzt. Die C-terminale Domäne (Position 91 – 138) besteht aus zwei antiparallelen α -Helices, die N-terminale Region (Position 1 – 86) wird dagegen aus 10 β -Faltblättern (Abb. 4.3.1.1.) gebildet.

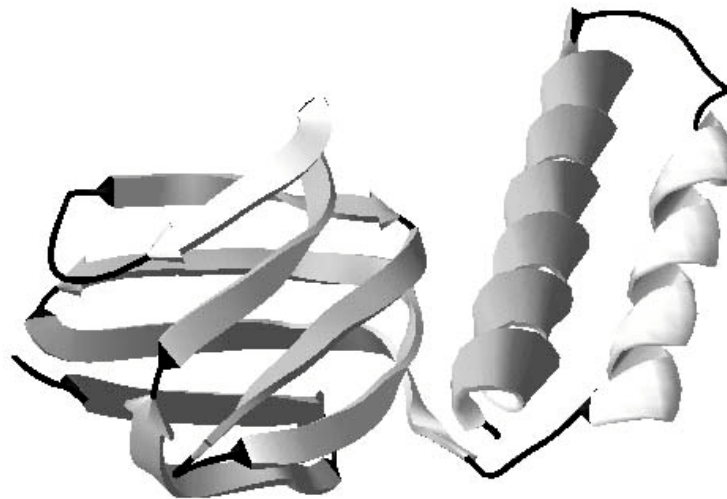


Abb. 4.3.1.1.: NMR-Struktur der ϵ Untereinheit aus *E. coli* (nach Wilkens et al. 1995). Zu erkennen sind die zwei Domänen des Proteins. Die C-terminale Domäne besteht aus zwei antiparallelen α -Helices; die N-terminale Domäne ist aus β -Faltblättern aufgebaut. Grafische Darstellung mit SWISS-Pdb-Viewer (Version 3.7).

Die beiden Proteindomänen werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten (Wilkens, Capaldi 1998). Die ϵ Untereinheit aus verschiedenen Organismen zeigt einen deutlichen Unterschied in der Primärproteinstruktur, die tertiäre und quartäre Struktur ist dagegen sehr ähnlich. Die in der Abb. 4.3.1.2. aufgeführten Aminosäuresequenzen der plastidären ϵ Untereinheit aus *Spinacia oleracea* und der aus *Bacillus thermophilus* weisen nur 35,3 % identische Aminosäuren auf.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Rekonstitutionsexperimente weisen eine Wechselwirkung zwischen der ϵ Untereinheit und dem F_0 Komplex nach. Ein aus der Rekonstitution resultie-

render CF₀-ε Teilkomplex (Kapitel 3.2.1, Kap. 3.4 und 3.5) konnte durch Saccharosedichte-
gradientenzentrifugation isoliert werden.

Dieses Resultat stimmt auch mit den derzeitigen Literaturdaten überein. Yoshida et al. (1977)
konnten in Rekonstitutionsversuchen die ε Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an einen in
Liposomen integrierten F₀ Komplex binden. Das gleiche Ergebnis homologer Rekonstitution
ist für die ATPase aus Spinat beschrieben worden (Richter et al. 1984).

```

Spinacia  -MTLNLCVLTPNRSIWNSEVKEIILSTNSGQIGVLPNHAPTATAVDIGILRIRLNDQWLT 59
Bacillus  MKTIHVSVVTPDGPVYEDDVEMVSVKAKSGELGILPGHIPLVAPLEISAARLKKGGKTQY 60
          *:::.*:** : ::::*: : : ::::**::*:**.* * .:::*. *:: :.:

Spinacia  LALMGGFARIGNNEITILVND AERGS D IDPQEAQQTLEIAEANLRKAEGKRQKIEANLAL 119
Bacillus  IAVSGGFLEVRPDKVTILAQA AERAEDIDVLR AKA AKERAERRLQSQQDDIDFKRAELAL 120
          :* : *** .: : :***.: ***..*** .*: : * ** .*:. :. : .*:***

Spinacia  RRARTRVEASNTISS 134
Bacillus  KRAMNRLSVAEMK-- 133
          :** .*:....:

```

Abb. 4.3.1.2.: Aminosäuresequenzvergleich der bakteriellen und plastidären ε Untereinheit der ATP-Synthase aus *Bacillus thermophilus* (Kato–Yamada et al. 2000) und *Spinacia oleracea* (Schmitz-Linneweber et al. 2001). Sequenzvergleich mit CLUSTALW (Version 1.82).

Bindungsexperimente mit einem Fragment der ε Untereinheit deuten darauf hin, dass die N-terminale Domäne für die Wechselwirkung des Proteins mit dem membranständigen F₀ Teil verantwortlich ist (Kap. 3.2.2).

Erste Hinweise einer Wechselwirkung zwischen der ε Untereinheit und der c Untereinheit stammen aus der ATP-Synthase aus Spinat-Chloroplasten. Süss (1986) beschreibt eine Kreuzvernetzung zwischen beiden Untereinheiten durch bifunktionalen Imidoester, was einen Beleg für die strukturelle Nähe beider Untereinheiten zueinander darstellt.

Cruz et al. (1997) haben durch Mutagenesestudien die Beteiligung der N-terminalen Domäne der ε Untereinheit an der Verbindung mit der c Untereinheit in der plastidären ATP-Synthase gezeigt. Drei ε-Deletionsmutanten mit jeweils 5, 10 und 20 deletierten Aminosäuren am N-Terminus wurden mit dem ε-freien CF₁ und im weiteren mit dem membrangebundenen CF₀ rekonstituiert. Die Deletionen führten in den rekonstituierten Komplexen zum Teil zu einer Inhibition der Protonentranslokation. In *E. coli* wirkten sich Deletionen von 16 und mehr Aminosäuren am N-Terminus als letal aus (Jounouchi et al. 1992).

Weitere Experimente mit der *E. coli* ATPase haben die Identifizierung der Kontaktstelle zwischen den ϵ und c Untereinheiten ermöglicht. Eingebaute Cysteine in den Positionen 26 – 33 des N-terminalen Teils der ϵ Untereinheit wurden mit Cysteinen in den Positionen 40, 42 und 44 der c Untereinheit durch Oxidation kovalent vernetzt (Zhang, Fillingame 1995; Hermolin et al. 1999). Diese Versuche belegen die räumliche Nähe des N-terminalen Bereiches der ϵ Untereinheit mit dem extramembranellen, hydrophilen loop der c Untereinheit.

Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen der ϵ Untereinheit und der Untereinheit c des F_0 Komplexes kommen aus einer Mutantanalyse des Bakteriums *Escherichia coli* (Zahng et al. 1994). In dem polaren loop der c Untereinheit wurde eine Mutation (Q42E) gefunden, die zu einem ungekoppelten Phänotyp führte. Diese Mutation konnte durch eine Mutation in der Position 31 der N-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit funktionell kompensiert werden. Die doppelte Mutante zeigte eine wiederhergestellte, durch ATP getriebene Protonentranslokation.

Eine funktionelle Wechselwirkung der ϵ Untereinheit mit den c-Monomeren des Proteolipidringes unterstützen auch Kreuzvernetzungsexperimente von Capaldi (2000). Die Kreuzvernetzung zwischen in der Position 31 der ϵ Untereinheit und 42 des c-Monomers eingebauten Cysteinresten hatte nur einen minimalen Effekt auf die Aktivität des Enzyms und die Protonentranslokation.



Abb. 4.3.1.3.: Kontaktstellen zwischen der ϵ und c Untereinheit in der ATP-Synthase aus *E. coli* (nach Rodgers et al. 2000, modifiziert). Die Strukturbereiche der ϵ Untereinheit (N-terminale Domäne), die an der gegenseitigen Interaktion mit der c Untereinheit beteiligt sind, sind in gelb und die der c Untereinheit (loop Region) in blau/rot dargestellt. Die Positionen der wichtigsten Aminosäuren wurden markiert.

In der Abbildung 4.3.1.3. ist die N-terminale Domäne der ϵ Untereinheit und der loop Bereich der c Untereinheit aus *E. coli* dargestellt. Die Aminosäuren, die an der Verbindung zwischen den beiden Untereinheiten beteiligt sind, wurden nummeriert.

Die genaue Art der Verbindung zwischen den c Untereinheiten im Proteolipidring und der ϵ Untereinheit ist nicht bekannt. Einen gleichzeitigen Kontakt mit allen c Untereinheiten im Ring hält man aufgrund der seitlichen Position der ϵ Untereinheit relativ zum Ring für unwahrscheinlich (Engelbrecht et al. 1997). Vorstellbar wäre ein permanenter Kontakt mit einigen Untereinheiten im Ring (Junge et al. 1997) oder eine von einem zum anderen wechselnde Verbindung (Fillingame et al. 1997).

Birkenhäger et al. (1999) haben mit Hilfe von mAbs (gegen den hydrophilen loop der c Untereinheit gerichtete Maus-Antikörper) die $\gamma\epsilon c$ Grenzfläche in *E. coli* untersucht. Die gleichzeitige Bindung des F_1 Komplexes und der Antikörper an den membranintegrierten F_0 suggeriert, dass nicht alle c-Monomere an der Interaktion mit den ϵ und γ Untereinheiten beteiligt sind.

Die Tatsache, dass die Modifikation der c-Monomere weder die ATPase-Aktivität noch die ATP-getriebene Protonentranslokation beeinträchtigte, schließt den von Fillingame (1997) vorgeschlagenen, wechselnden Kontakt von einem zum anderen c-Monomer aus. In diesem gegebenen Fall würde die Anwesenheit der mAbs das Wechseln der Kontakte zwischen den γ und ϵ Untereinheiten und den folgenden c-Monomeren im Proteolipidring stören und somit die Aktivität des Enzyms stark negativ beeinflussen.

Die Röntgenstrukturanalyse der mitochondrialen ATP-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigt, dass die ϵ Untereinheit fünf von zehn im Ring befindliche c-Monomere räumlich bedeckt (Stock et al. 1999). Ein engerer Kontakt wurde jedoch nur mit zwei c-Monomeren beobachtet.

4.3.2 Interaktion zwischen der γ Untereinheit und dem F_0 Komplex

Die erste Kristallstruktur des F_1 Teilkomplexes aus Mitochondrien (Abrahams et al. 1994) konnte nur einen Teil der γ Untereinheit, bestehend aus zwei langen umeinander gewundenen N- und C-terminalen α -Helices, zeigen. Neue strukturelle Details lieferte die Röntgenstrukturanalyse der γ Untereinheit aus *E. coli* (Hausrath et al. 1999). Hier sind in dem bisher unbekanntem Proteinbereich fünf α -helikale Elemente gefunden worden.

Die erfolgreiche Rekonstitution des CF₀- γ Teilkomplexes (Kap. 3.2.3, 3.4 und 3.5) weist auf einen natürlichen Kontakt zwischen beiden Bindungspartnern hin.

Ein vergleichbares Resultat wurde von Yoshida et al. (1977) für die ATP-Synthase aus dem Bakterium *Bacillus thermophilus* beschrieben. Hierbei wurde die isolierte γ Untereinheit an dem homologen, in die Liposomen integrierten F₀ Komplex gebunden.

Im Rahmen von Kreuzvernetzungsexperimenten war es Watts et al. (1995) möglich, die Kontaktstellen der beiden Untereinheiten γ und c einzugrenzen. Nach ihren Untersuchungen sollen die Positionen 202 – 230 der γ Untereinheit und wiederum der hydrophilen loop der c Untereinheit an der Verbindung beteiligt sein. Die Aminosäure Tyrosin in der Position 205 der γ Untereinheit konnte mit den in Position T43, Q42 und D44 der c Untereinheit eingebauten Cysteinresten vernetzt werden, ohne eine negative Auswirkung auf die Funktion des Enzyms zu erzeugen (Watts et al. 1996).

Hinweise auf einen Kontakt zwischen der γ Untereinheit und dem Proteolipidring lieferte auch eine Röntgen-Teilstrukturanalyse der ATP-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stock et al. 1999).

4.3.3 Wechselwirkungen zwischen der γ und ε Untereinheit sowie dem CF₀ Komplex

Der Versuch die ε und die γ Untereinheit an die F₁-freien Thylakoidmembranen zu binden, führte zur Ausbildung eines Teilkomplexes aus CF₀, der γ Untereinheit aus CF₁ und der ε Untereinheit aus TF₁ (Kap. 3.2.3). Die bakterielle γ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* im Komplex mit α und β Untereinheiten, als $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit, band alleine nicht an die F₁-freien Thylakoidmembranen (Kap. 3.2.4). Nur zusammen mit der ε Untereinheit wurde eine Bindung beobachtet und ein Teilkomplex CF₀- $\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ isoliert (Kap. 3.2.4). Die durch die ε Untereinheit vermittelte Bindung der $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit an den F₀ Komplex deutet auf eine wichtige Rolle der ε Untereinheit im Grenzbereich zwischen den F₁ und F₀ Teilkomplexen hin.

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch schwierig. Bei der Erklärung der fehlenden Bindung der bakteriellen γ Untereinheit (als $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit) an die F₁-freien Thylakoidmembranen müssen mehrere Aspekte berücksichtigt werden:

1. Die γ Untereinheit weist in den einzelnen Organismen große Unterschiede in der Primärstruktur auf (Walker et al. 1985). So ist die γ Untereinheit aus photosynthetischen Membranen um ca. 30 Aminosäuren länger als die der Bakterien und Mitochondrien. Dies könnte Auswir-

tet. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die γ Untereinheit innerhalb des F_1 beliebig auswechselbar ist, bezüglich der Assoziation mit dem F_0 jedoch nur in Grenzen.

2. Die Anwesenheit der α und β Untereinheiten könnte die stabile Bindung der γ Untereinheit an CF_0 in Abwesenheit der ε Untereinheit verhindern. Berücksichtigt man die Grösse und das Molekulargewicht des von drei Kopien der α und β Untereinheiten gebildeten Hexagons (339 kDa, Yoshida et al. 1975; Durchmesser 110 Å, Boekema et al. 1988) im Vergleich mit der viel kleineren γ Untereinheit (32 kDa, Yoshida et al. 1975), könnte man sich vorstellen, dass die Bindung der γ Untereinheit alleine nicht ausreicht, das $\alpha_3\beta_3$ Hexagon auf dem F_0 Teil festzuhalten (vgl. auch Abb. 4.3.3.3.) Die Anwesenheit der ε Untereinheit wäre dann erforderlich, um die Bindung des $\alpha_3\beta_3\gamma$ Subkomplexes an den F_0 zu unterstützen (Kap.3.2.4). Die unterstützende Funktion der ε Untereinheit könnte durch die Kontakte mit der γ Untereinheit einerseits und dem Proteolipid des F_0 realisiert werden. Die Verbindung des N-terminalen Teiles der ε Untereinheit mit der c-Untereinheit des Proteolipidringes wurde im Kap. 3.2.2 gezeigt und im Abschnitt 4.3.1 diskutiert.

Ebenfalls wurde basierend auf den Resultaten von Kreuzvernetzungsexperimenten eine Verbindung zwischen der ε Untereinheit und den α und β Untereinheiten beschrieben. Dafür soll der helikale, C-terminale Teil der ε Untereinheit verantwortlich sein (Buckley et al. 1999; Capaldi et al. 2000). Für die ATPase aus *E. coli* haben Dallmann et al. (1992) Kontakt zu einer, Tang et al. (1996) zu zwei β Untereinheiten beobachtet. Aggeler et al. (1995) dagegen haben eine Verbindung der ε mit einer α Untereinheit beschrieben.

Mit Hilfe des Kreuzvernetzungsverfahrens lassen sich zwei Aminosäureseitenketten innerhalb eines Proteins, bzw. zwei Untereinheiten eines Proteinkomplexes oder zwei verschiedene Proteine durch einen chemischen Vernetzer kovalent miteinander verbinden (Bäumert et al. 1989). Diese kovalente Vernetzung stellt eine künstliche, starre und starke Verbindung dar. Aus einer erfolgreichen Kreuzvernetzung kann somit nicht ohne Weiteres auf eine natürliche Interaktion zwischen den beiden vernetzten Proteinelementen geschlossen werden. Sie weist lediglich auf eine gewisse, vom Abstand der beiden funktionellen Gruppen der verwendeten Linker abhängige Nähe zwischen den beiden vernetzten Proteinelementen hin. Es ist daher im Fall von Dallmann et al. (1992), Tang et al. (1996) und Aggeler et al. (1995) nicht eindeutig, ob wirklich eine natürliche, feste Kontaktstelle zwischen der ε und den α und β Untereinheiten vorliegt.

Gegen einen permanenten Kontakt zwischen der ε Untereinheit und dem $\alpha_3\beta_3$ Hexagon sprechen im Weiteren die funktionellen Implikationen, die sich aus dem Funktionsmodell des En-

zyms ergeben. Eine dauerhafte Verbindung zwischen der ϵ Untereinheit und einer α bzw. β Untereinheit würde bedeuten, dass Rotor und Stator fest miteinander verbunden wären, was einer Rotation während des katalytischen Vorganges verhindern würde. Möglich wäre jedoch ein „Einrasten“, wenn das aktive in das nicht-aktive (latente) Enzym übergeht.

Die plastidäre ATP-Synthase ist im Gegensatz zu der „respiratorischen“ ATPase der Mitochondrien und Bakterien, die permanent aktiv sind, ein latentes Enzym. Bei Belichtung des Chloroplasten wird ein elektrochemisches Potential ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) über die Thylakoidmembran aufgebaut, welche die ATP-Synthase auf bis jetzt unbekannte Weise reversible aus dem latenten in den aktiven Zustand überführt. Der biologische Sinn besteht darin, dass bei absinkendem ΔpH (durch Dunkelheit bzw. Schwachlicht) die dann thermodynamisch begünstigte ATP-Hydrolyse vermieden wird, was einer ATP-Verschwendung entsprechen würde (Strotmann et al. 1984).

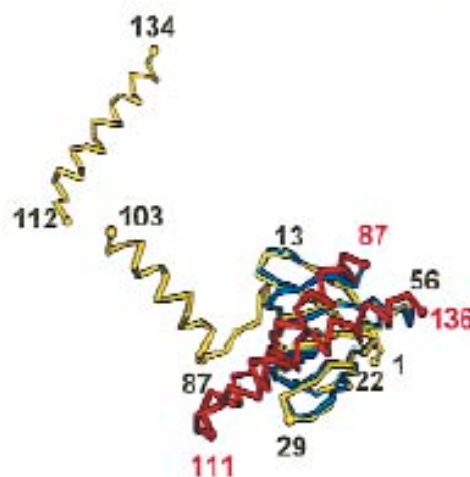


Abb. 4.3.3.2.: Strukturelle Organisation der ϵ Untereinheit im $\gamma\epsilon$ Komplex aus *E. coli* (nach Rodgers et al. 2000). Die N-terminale Domäne (in blau) der ϵ Untereinheit ist durch zwei Helices (in rot) verdeckt, welche die Struktur der C-terminalen Domäne der isolierten ϵ Untereinheit wiedergeben. Die C-terminale Domäne der ϵ Untereinheit ist in gelb dargestellt. Zu beachten ist der Unterschied in der Position des C-Terminus im $\gamma\epsilon$ Komplex und der isolierten ϵ Untereinheit relativ zu dem N-terminalen Teil.

Die Aktivierung des Enzyms ist unter anderem mit einer Änderung der Position und der Konformation der ϵ Untereinheit verbunden (Richter et al. 1987). Die Autoren beobachteten in den Chloroplasten eine durch Licht induzierte Änderung der Konformation der ϵ Untereinheit und damit verbunden einen wechselnden Zugang für den gegen ϵ gerichteten Antikörper. Es wird vermutet, dass die ϵ Untereinheit zwei verschiedene Konformationen annehmen kann (Tsunoda et al. 2001), was durch den Vergleich der Röntgenstrukturanalysen des $\gamma\epsilon$ Komple-

xes aus *E. coli* (Rodgers et al. 2000) und der isolierten ϵ Untereinheit (Uhlin et al. 1997) nahegelegt wird.

In der von Rodgers et al. (2000) beschriebenen Struktur bilden die beiden α -Helices der C-terminalen Domäne eine fast senkrechte Position zueinander und zum N-Terminus (Abb. 4.3.3.2.). Dagegen zeigten die beiden α -Helices des C-Terminus in der isolierten ϵ Untereinheit eine enge Haarnadel-Struktur und lagen parallel zum N-Terminus (Uhlin et al. 1997). Es wäre vorstellbar, dass der Übergang des aktiven Enzyms in die latente Form eine Folge des Wechsels der ϵ Untereinheit von der „parallelen“ zur „senkrechten“ Konformation ist. In der „senkrechten“ Konformation wäre der Abstand zwischen der C-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit und dem $\alpha_3\beta_3$ Hexagon verringert, was insbesondere für die β Untereinheit in der offenen Konformation (β open) gelten würde. Hierdurch könnte es zu sterischen Konflikten kommen, die die Aktivität des Enzyms hemmen könnten.

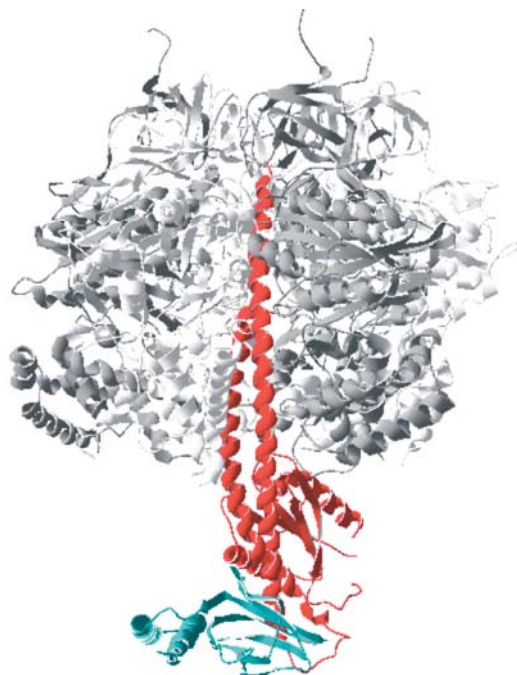


Abb. 4.3.3.3.: Kristallstruktur des DCCD inhibierten F_1 Komplexes aus Rinderherz-Mitochondrien, im Querschnitt (nach Gibbons et al. 2000). Die katalytische Region stellt aufgrund ihrer Größe (in grau) den Hauptteil des Enzyms dar. Die in das Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons hineinragende γ Untereinheit ist in rot; die N- und C-terminale Domäne der ϵ Untereinheit ist mit blau gekennzeichnet. Zu beachten ist die strukturelle Nähe zwischen der N-terminalen Domäne der ϵ Untereinheit und dem unteren Bereich der γ Untereinheit. Diese Region der ϵ und γ Untereinheit stellt die Verbindung zum Proteolipidring dar. Grafische Darstellung mit dem SWISS-Pdb-Viewer (Version 3.7).

Die Wichtigkeit einer stabilen Interaktion zwischen der γ und ε Untereinheit für die Funktion der ATP-Synthase wurde im plastidären (Steropopulos et al. 1994) und bakteriellen (Aggeler et al. 1992; Skakoon, Dunn 1993) Enzym festgestellt. Es wurde dabei gezeigt, dass die Bindung über die N-terminale Domäne der ε Untereinheit erfolgt. Essentiell für die Interaktion sind die Aminosäuren: Serin, Threonin, Histidin in den Positionen 10, 38 und 43 (Tang, Capaldi 1996). Diese biochemischen Daten wurden durch die Röntgenstrukturanalyse des F_1 Komplexes aus *E. coli* (Rodgers, Wilce 2000) und Rinderherz-Mitochondrien (Gibbons et al. 2000 - Abbildung 4.3.3.3.) bestätigt.

Die Literaturdaten bezüglich des Einflusses der ε Untereinheit auf die Bindung zwischen den F_1 und F_0 Teilkomplexen sind nicht einheitlich. Dunn et al. (1981) berichteten über die wichtige Rolle der ε Untereinheit bei der Bindung der F_1 Domäne an den in Liposomen integrierten F_0 Komplex. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der ε -freie EF_1 Komplex aus *E. coli* nicht an den EF_0 Teil des Enzyms band (Sternweis 1978, Sternweis et al. 1980). Für die ATP-Synthase aus *Bacillus thermophilus* ist die Beteiligung der zwei Untereinheiten ε und δ an der Verbindung der F_1 und F_0 Teilkomplexe beschrieben worden (Yosida et al. 1977). Im Gegensatz dazu war für die Bindung des F_1 an den F_0 Komplex aus Spinat-Chloroplasten die Gegenwart der ε Untereinheit nicht notwendig (Patrie, McCarthy 1984; Cruz et al. 1995).

3. Zur Erklärung der fehlenden Bindung der $\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit an die F_1 -freien Thylakoidmembranen muß ferner berücksichtigt werden, dass ein wesentliches Element der Verbindung zwischen dem F_1 Köpfchen und dem F_0 Komplex, nämlich der so genannte periphere Stiel, fehlt. Diese Verbindung wird von den δ und b Untereinheiten gebildet. Durch deren Abwesenheit könnte die beobachtete (Kap. 3.2.4) unterstützende Rolle der ε Untereinheit verbunden sein.

4.4 Interaktion zwischen den Untereinheiten im peripheren Stielbereich

Zusammen mit den Untereinheiten I und II (in Bakterien als b bezeichnet) formt die δ Untereinheit den so genannten peripheren Stiel, der die zweite Verknüpfung des F_0 Komplexes mit dem katalytischen Köpfchen darstellt (Böttcher et al. 1998; Böttcher et al. 2000; Del Rizzo et al. 2002; Mellwig et al. 2003). Durch diese Verbindung sollen die α und β Untereinheiten gegen die rotierende Achse $c_n\varepsilon\gamma$ festgehalten werden (Kato-Yamada et al. 1998; Sambongi et al. 1999; Andrews et al. 2001; Weber et al. 2003). Die Beteiligung der δ Untereinheit an der zweiten Verbindung setzt somit einen Kontakt zum Köpfchen des F_1 wie auch zum F_0 voraus.

4.4.1 Kontakt der δ Untereinheit zum F_0 Komplex

Die Ausbildung einer Bindung der δ Untereinheit zum F_0 Komplex ist durch die durchgeführten Rekonstitutionsexperimente (Kap. 3.3.1, Kap. 3.4 und 3.5) nachgewiesen worden; sie implizieren eine Wechselwirkung zwischen der bakteriellen δ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* und dem plastidären CF_0 Komplex.

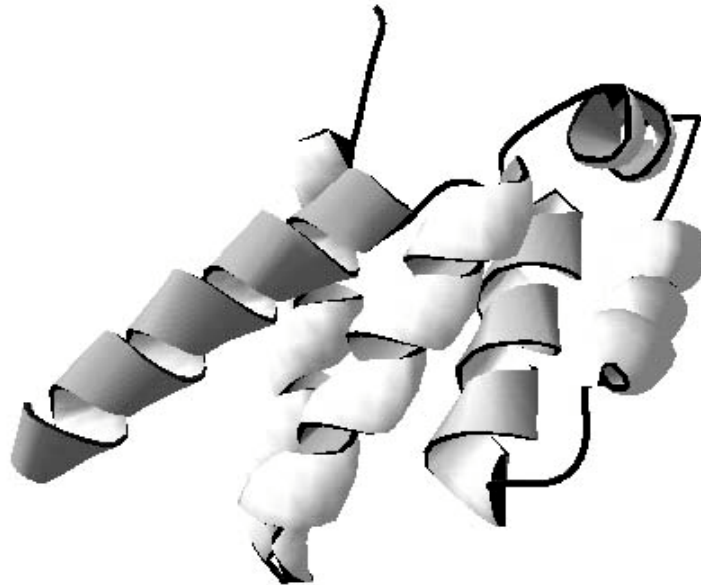


Abb. 4.4.1.1.: NMR-Struktur der N-terminalen Domäne der δ Untereinheit aus *E. coli* (nach Wilkens et al. 1997). Das 134 Aminosäure lange Fragment ist aus 6 α - Helices aufgebaut. Graphische Darstellung mit dem SWISS-Pdb-Viewer (Version 3.7).

Die Struktur der δ Untereinheit aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen ist teilweise bekannt. Der N-terminale Bereich (134 Aminosäuren) ist aus 6 α -Helices aufgebaut (Abb. 4.4.1.1.). Die C-terminale Domäne soll ebenso überwiegend helikalen Charakter haben (Wilkens et al. 1997). Durch Kreuzvernetzung zweier in den Positionen 64 und 140 eingebauter Cysteinreste ist die strukturelle Nähe dieser beiden Domänen nachgewiesen worden (Ziegler et al. 1994). Zwischen den einzelnen Organismen zeigt die δ Untereinheit eine sehr niedrige Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (Dunn et al. 2000). Die Sequenzen der δ Untereinheit aus Spinat und *Bacillus thermophilus* weisen nur 36,3 % Identität auf (Abb. 4.4.1.2., berechnet mit CLUSTALW).

Die Resultate vieler Experimente zeigen eine wichtige Rolle der δ Untereinheit in dem F_1F_0 Grenzbereich. Yoshida et al. (1977) konnten die δ Untereinheit aus *Bacillus thermophilus* an

dem in Liposomen eingebauten F_0 Komplex binden. 1976 konnten Younis et al. an präparativ gewonnenen F_1 -freien Thylakoidmembranen aus Spinat die δ Untereinheit alleine und in Kombination mit anderen plastidären F_1 Untereinheiten binden. Smith et al. (1975) und Futai et al. (1974) berichteten von einer unterstützenden Rolle der δ Untereinheit bei der Bindung des δ -freien F_1 an den F_0 in der ATP-Synthase aus *E. coli*.

Nelson et al. (1974) haben bei der homologen Rekonstitution des δ -freien CF_1 mit dem membranintegrierten CF_0 aus den Chloroplasten von *Lactuca sp.*, *Pisum sativum* und *Spinacia oleracea* in Anwesenheit von der δ Untereinheit deutlich höhere Photophosphorylierungsraten gemessen. Engelbrecht et al. (1988) und Andreo et al. (1982) berichteten, dass ohne die δ Untereinheit zwar eine strukturelle, aber keine funktionelle Rekonstitution des CF_1 mit dem CF_0 durchgeführt werden konnte. Dagegen konnten Patrie et al. (1984) in einem ohne Anwesenheit der δ Untereinheit rekonstituierten plastidären $CF_1(-\delta)CF_0$ Komplex teilweise die Photophosphorylierung wiederherstellen.

```

Spinacia  ASKLTAKPRGGALGTRMVDSTASRYASALADVADVTGTLEATNSDVEKLIRIFSEE-PVY 59
Bacillus  -----MNQEVIAKRYASALFQIALEQQQLDRIEEDVRAVRQALAEENGEFL 45
          : * .***** : :*  * * :  :.**. : : :*: .

Spinacia  YFFANPVISIDNKRSVLDEIITTSGLQPHTANFINILIDSERINLVKEILNEFEDVFNKI 119
Bacillus  SLLSYPKLSLDQKKALIREAFAG--VSTPVQNTLLLLLHRFRGLVPELAGTVSRPRSTT 103
          ::: * :*:*:*:*: * ::  :.. . * : :*: : .*:.* * : . . . ..

Spinacia  T-GTEVAVVTSVVKLENDHLAQIAKGVQKITGAKNVRIKTVIDPSLVAGFTIRYGNESK 178
Bacillus  ARGIAKAVAYSGAASTDEELRALSDVFAQKVGKQTLEIENIIDPELIGGVNVRIGN---R 160
          : *  ** . * .  :*: *  :.. . : .* :*:.**:***.*:*.*: * **  :

Spinacia  LVDMSVKKQLEEIAAQLEMDDVTLAV 204
Bacillus  IYDGSVSGQLERIRRQLIG----- 179
          : * ** . *** . *  **

```

Abb. 4.4.1.2.: Aminosäuresequenzvergleich der bakteriellen und plastidären δ Untereinheit der ATPase aus *Bacillus thermophilus* (Ohta et al. 1988) und *Spinacia oleracea* (Bichler et al. 1990). Sequenzvergleich durch CLUSTALW (Version 1.82).

Untersuchungen zur Identifizierung der Kontaktstellen weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen der δ Untereinheit und dem F_0 Komplex über eine Verbindung mit den Untereinheiten I und II (in Bakterien b und b^c) realisiert wird (Dunn et al. 2000). Die strukturelle Nähe der beiden Untereinheiten (I und δ) konnte durch die Bildung von Nulllängen-Kreuzvernetzungen in der chloroplastidären ATPase gezeigt werden (Beckers et al. 1992).

In der mitochondrialen ATP-Synthase haben Joshi et al. (1997) und Mao et al. (1997) durch in die C-terminale Domäne der δ Untereinheit eingeführte Deletionen, diese Region als die für den Kontakt mit der Untereinheit b zuständig identifiziert.

Collinson et al. 1994 konnte durch Rekonstitution und Isolation des entstandenen Teilkomplexes die Interaktion des δ Untereinheitenäquivalents, OSCP, mit der b Untereinheit experimentell nachweisen.

Beim Bakterium *E. coli* wurde die Wechselwirkung der beiden Untereinheiten über eine analytische Ultrazentrifugation untersucht (Dunn et al. 1998). Der ermittelte Sedimentationskoeffizient des b(34-156) δ Teilkomplexes wies auf eine Bindung der beiden Untereinheiten an ihren Enden und nicht auf einen seitlichen Kontakt hin. Durch diese Art der Verbindung könnte die notwendige Länge von mehr als 125 Å erreicht werden um als zweite Stiel dienen zu können (Dunn 2000). Schließlich ist *in vivo* auch die Beteiligung der δ Untereinheit an der Verbindung des F_0 Komplexes mit dem F_1 Köpfchen mit Hilfe des two-hybrid Systems aus Hefe gezeigt worden (Sawada et al. 1997).

4.4.2 Kontakt des zweiten Stiels mit den Untereinheiten des katalytischen Zentrums

Wie im Ergebnisteil (Kap. 3.3.3) beschrieben, konnte keine Bindung der α und β Untereinheiten aus *Bacillus thermophilus* an die F_1 -freien Thylakoidmembranen beobachtet werden. In Gegenwart der δ Untereinheit wurde dagegen eine Bindung der α Untereinheit gezeigt. Die β Untereinheit band dagegen nur, wenn außer der δ Untereinheit auch α anwesend war (Kap. 3.3.3).

Die Resultate belegen die Rolle des δ - α Kontaktes für die Funktion des peripheren Stiels. Verschiedene Kreuzvernetzungsexperimente (Mendel-Hartvig et al. 1991; Tozer et al. 1986; Bragg et al. 1986) bestätigen die strukturelle Nähe und den möglichen Kontakt zwischen den beiden Proteinen. Durch diese Untersuchungen und durch Mutagenesestudien wurden die N-terminalen Domänen beider Untereinheiten als die für diese Bindung zuständigen identifiziert. Die ersten 30 Aminosäuren an dem N-Terminus von der α Untereinheit und die ersten 15 Aminosäuren der N-terminalen Domäne der δ Untereinheit wurden dafür als essentiell beschrieben (Dunn et al. 1980; Maggio et al. 1988).

Durch Immunoelektronenmikroskopie (Wilkens et al. 2000) und Fluoreszenzresonanzverfahren (Engelbrecht et al. 1998) wurde die Position der δ Untereinheit am apikalen Pol des $\alpha_3\beta_3$

Hexagons bestimmt. Damit wurde zusätzlich auch die strukturelle Nähe der δ Untereinheit zur N-terminalen Domänen der α Untereinheit bewiesen.

Offen bleibt bei der Bindung der δ Untereinheit derzeit, ob es sich um eine Wechselwirkung mit allen drei α Untereinheiten des katalytischen Zentrums oder um eine Wechselwirkung mit nur einer handelt. Häsel et al. (1999) postulieren einen Kontakt mit nur einer α Untereinheit. Wilkens et al. (2000) halten dagegen aufgrund der Position der δ Untereinheit auf der Spitze des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons, einen Kontakt mit allen drei α Untereinheiten, die zusammen eine Kontaktstelle bilden könnten, für wahrscheinlicher.

Lill et al. (1996) fanden nach Einbau von Cysteinen in verschiedenen Positionen der δ Untereinheit neben Kreuzvernetzungen mit der α Untereinheit auch eine mit der Position 62 der β Untereinheit. Hierbei scheint es sich anhand der eigenen Resultate jedoch nicht um eine natürliche Bindung zu handeln, die zur Interaktion zwischen δ und $\alpha_3\beta_3$ wesentlich beiträgt.

4.4.3 Affinität der bakteriellen δ Untereinheit zum chloroplastidären F_0 Komplex

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen der δ Untereinheit des bakteriellen Enzyms aus *Bacillus thermophilus* und dem plastidären F_0 Komplex aus Spinat wurde die Dissoziationskonstante der F_0 - δ Verbindung bestimmt (Kap. 3.3.2). Der ermittelte Wert liegt bei 9 bis 12 μM ($10,5 \mu\text{M} \pm 1,5 \mu\text{M}$) und stimmt mit dem von Dunn und Chandler (1998) für die $b\delta$ Verbindung in der ATP-Synthase aus *E. coli* ermittelten Wert überein. Die mit Hilfe einer analytischen Ultrazentrifugation bestimmte Dissoziationskonstante für die Interaktion der beiden isolierten Proteine liegt zwischen 5 bis 10 μM .

Für die Verbindung der δ Untereinheit mit dem $\alpha_3\beta_3$ Subkomplex wurden, abhängig von der angewendeten Methode, Dissoziationskonstanten von 100 nM (Wagner et al. 1988) oder weniger als 0,8 nM (Häsler et al. 1999). K_d -Werte für andere Ligand-Rezeptor-Interaktionen liegen ebenfalls im nanomolaren Bereich und betragen z.B. für Angiotensin 1,7 nM (Ishida et al. 1999) und für Ferritin 4,7 nM (Hulet et al. 1999). Für ein Antikörper-Ribosom Bindungspaar wurde sogar eine Dissoziationskonstante von nur 0,04 nM ermittelt (Hanes et al. 1998).

Eine von Dunn et al. (1998) diskutierte Möglichkeit zur Kompensation der niedrigen Affinität der δ Untereinheit zum F_0 Komplex könnte in einem zusätzlichen Kontakt der b Untereinheit mit dem $\alpha_3\beta_3$ Teilkomplex liegen. Sie beobachteten eine Kreuzvernetzung zwischen der b Untereinheit und den α und β Untereinheiten. Dem widersprechen jedoch die eigenen Ergeb-

nisse, die gezeigt haben, dass weder α noch β alleine an den membranintegrierten F_0 bindet und die Beobachtungen, dass der δ -freie F_1 Komplex mit dem F_0 -Teil des Enzyms keine stabile Bindung eingehen kann (Wilkens et al. 1997; Sawada et al. 1997). Diese Daten implizieren, dass wenn eine direkte Verbindung vorhanden sein sollte, diese von geringerer Bedeutung ist.

Nach verbreiteter Auffassung soll der zweite Stiel dem während der Katalyse auftretenden Drehmoment der γ Untereinheit entgegenwirken. Das über Rotationsexperimente ermittelte Drehmoment beträgt $40 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ (Noji et al. 1997; Yasuda et al. 1998), was bei einem 120° Rotationswinkel der γ Untereinheit einem Wert von ungefähr 50 kJ mol^{-1} entspricht (Häsler et al. 1999). Man müßte erwarten, dass bei der angenommenen Funktion des zweiten Stiels die freie Energie sowohl der δ -b als auch der δ - $\alpha_3\beta_3$ Verbindungen größer ist als die für das Drehmoment des Rotors. Dies ist für die Bindung der δ Untereinheit an den $\alpha_3\beta_3$ Subkomplex der Fall, wenn die niedrigste Dissoziationskonstante von $0,8 \text{ nM}$ (Häsler et al. 1999) zu Grunde gelegt wird; sie entspricht einem ΔG° von $51,9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die anhand der Formel $\Delta G^\circ = -RT \ln K_d$ (R – Gaskonstante: $8,3145 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$; T – Temperatur 298 K) aus dem Wert der eigenen Dissoziationskonstante (Kap. 3.3.2.) berechnete freie Energie der Verbindung zwischen der δ Untereinheit und dem F_0 Komplex liegt dagegen bei $28,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($\pm 0,4$). Sie würde nicht ausreichen, um dem Drehmoment des Rotors zu widerstehen.

Untersuchungen von Suzuki et al. (2000) implizieren dagegen, dass die Verbindung b- δ stark genug sein könnte. Suzuki et al. exprimierten einen $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon b_2$ Komplex aus *Bacillus thermophilus*, deren b Untereinheit nur aus der cytoplasmatischen Domäne mit zusätzlich eingebauten Cysteinen am N-Terminus bestand. Zwischen den eingeführten Cysteinen und dem Cystein 109 der γ Untereinheit wurde anschließend eine kovalente Kreuzvernetzung erzeugt, die in einem vollständigem Verlust der ATPase-Aktivität resultierte. Weitere Behandlung mit dem Detergens Lauryldimethylaminoxid (LDAO) führte zur Trennung der Verbindung zwischen der b und δ Untereinheit und einer Wiederherstellung der Hydrolyse-Aktivität. In wie weit diese an einem nicht unerheblich modifizierten Modellsystem erzielten Ergebnisse aussagekräftig sind, muß allerdings zunächst offen bleiben.

Ungeklärt ist auch, ob der durch Rotationsexperimente mit Teilkomplexen *in vitro* bestimmte Drehmoment dem in Vollständigen entspricht.

Des Weiteren wurden in den von Noji et al. (1997) beschriebenen Rotationsexperimenten neben den Aktinfilamenten mit dem Drehmoment von 40 pN nm rotierenden γ Untereinheit auch welche mit einem geringeren Drehmoment von weniger als $23 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ beobachtet. Eine

ähnliche Streuung wurde von Hisabori et al. (1999) für die γ Untereinheit im CF_1 gesehen. Das Drehmoment lag hier zwischen 20 und 40 pN · nm. Bei einem Drehmoment von 20 pN · nm (entspricht 25 kJ mol⁻¹) wäre die in dieser Arbeit ermittelte Stärke der δ -b Verbindung von 28,3 kJ mol⁻¹ ausreichend.

Der zweite Stiel wird zum großen Teil von der cytoplasmatischen Domäne der b Untereinheit gebildet. Dieser durchspannt als eine α -helikale Struktur einen relativ langen Bereich von ca. 40 - 45 Å von der Membranoberfläche bis zur Spitze des $\alpha_3\beta_3$ Hexagon (Capaldi et al. 1994). Mutagenesestudien in der cytoplasmatischen Domäne der b Untereinheit aus *E. coli* weisen auf eine Flexibilität des zweiten Stiels hin. Die b Untereinheit konnte um 11 Aminosäuren deletiert werden, was einer Verkürzung um ca. 16 Å entspricht, ohne die ATPase-Aktivität des Enzyms zu beeinträchtigen (Sorgen et al. 1998). Insertionen von sieben Aminosäuren resultierten in einem normalen Phänotyp. Mutanten mit Insertionen zwischen 11 und 14 zeigten keine signifikante Auswirkung auf die ATP getriebene Protonentranslokation. Eine Verlängerung um ca. 20 Å (ca. 50 % der Länge des zweiten Stieles) durch Insertion von 14 Aminosäuren wirkten sich lediglich auf die Expression des Enzyms in der Membran der Bakterien aus (Sorgen et al. 1999). Diese Experimente weisen darauf hin, dass der zweite Stiel keine starre Struktur darstellt. Eine starre Struktur würde durch die eingefügten Insertionen bzw. Deletionen die Struktur des Enzymkomplexes extrem verzerren, was zu einer Beeinträchtigung der Funktion führen würde.

Untersuchungen von Capaldi et al. (2000) unterstützen die Aussage von Suzuki et al. (2000) über die Flexibilität der b Untereinheit. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte an solubilisierten ATP-Synthasen aus *E. coli* in Anwesenheit von AMP-PNP-Mg⁺² („ATP-Zustand“) eine Verkürzung des Enzyms um ca. 10 % (entspricht 15 – 20 Å) im Vergleich zu den mit ADP-Mg⁺² inkubierten beobachtet werden. Dieser Effekt ist auf eine Nukleotid-abhängige Änderung der Länge des peripheren und des zentralen Stiels zurückzuführen. Im „ATP-Zustand“ lagen das $\alpha_3\beta_3$ Hexagon und der F_0 so nah beieinander, dass der periphere und der zentrale Stiel nur schwach zu beobachten waren.

Auch die Hypothese der „elastischen“ ATPase von Cherepanov et al. (1999) basiert auf den Eigenschaften der b Untereinheit. Laut dieser These wird die Energie jeder 30°-Drehung des Proteolipidringes relativ zur Untereinheit a als Spannung im $b_2\delta$ -Stators gespeichert.

In diesem Kapitel wurden einige funktionelle Aspekte sowie Eigenschaften des zweiten Stiels in Bezug auf die für die δ -b Interaktion ermittelte Dissoziationskonstante diskutiert. Unter der Annahme eines Drehmomentes des Rotors von 40 pN · nm (Noji et al. 1997) ist die in dieser

Arbeit ermittelte δ -b Bindungsenergie nicht groß genug, um dem Drehmoment entgegenzuwirken. Somit kann der K_d -Wert keine Bestätigung für die Stator – Funktion darstellen. Anhand der zurzeit bekannten Literaturdaten ist es jedoch nicht möglich eine eindeutige Aussage über die für eine Stator – Funktion erforderliche δ -b Bindungsenergie zu treffen. Ob bei der Interaktion mit der δ Untereinheit die von Sorgen et al. (1998) beschriebene hohe Flexibilität der b Untereinheit eine Rolle spielen könnte, bleibt noch zu erforschen.

5.0 Zusammenfassung

Für die Funktion der ATP-Synthase stellt der Grenzbereich zwischen dem protonentranslozierenden F_0 Teil und dem katalytischen F_1 Komplex eine herausragende Rolle dar. Durch hochauflösende Elektronenmikroskopie wurden in dieser Region zwei Strukturen identifiziert, die man als zentralen und peripheren Stiel bezeichnet.

Der zentrale Stiel wird aus den F_1 Untereinheiten γ und ε gebildet; an der Ausbildung des peripheren Stiels sollen die beiden F_0 Untereinheiten b (bzw. b_1 und b_2) sowie die F_1 Untereinheit δ beteiligt sein. Im derzeit gängigen Funktionsmodell der ATP-Synthase bildet der zentrale Stiel zusammen mit dem Proteolipid-Zylinder den Rotor, der periphere Stiel zusammen mit der Untereinheit a des F_0 und dem $\alpha_3\beta_3$ -Köpfchen des F_1 den Stator.

Trotz intensiver Bemühungen konnte bisher noch keine vollständige Strukturanalyse des Enzyms erhalten werden. Viele Details aus dem betrachteten Grenzbereich sind daher unbekannt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente hatten als Ziel, die Bedeutung der kleinen F_1 Untereinheiten γ , δ und ε genauer zu erforschen. Hierfür wurden durch Bindungen von isolierten Untereinheiten oder von Kombinationen dieser Untereinheiten an F_1 -freie, den vollständigen F_0 enthaltenden Chloroplastenthylakoide verschiedene F_1F_0 Teilkomplexe rekonstituiert. Die Thylakoidmembran diente als Matrix für die korrekte Assemblierung. Die erhaltenen Komplexe wurden anschließend durch Detergenzien aus der Membran extrahiert und solubilisiert, durch Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten isoliert und mit Hilfe der SDS-PAGE-Elektrophorese und Western Blot analysiert.

Da bekannt war, dass Untereinheiten der ATP-Synthase aus verschiedenen Organismen funktionsfähige Hybridkomplexe bilden können, wurden zumeist die leicht zugänglichen und stabilen Polypeptide aus der ATP-Synthase des Bakterium *Bacillus thermophilus* verwendet.

Für die ε Untereinheit wurde eine stabile Bindung mit dem F_0 Komplex nachgewiesen. Weitere Experimente mit einem Fragment der ε Untereinheit ergaben, dass die N-terminale Domäne für die Verbindung verantwortlich ist. Auch die γ Untereinheit bindet alleine an den CF_0 .

Durch gleichzeitige Inkubation der γ und der ε Untereinheit mit den F_1 -freien Thylakoidmembranen konnte ein CF_0 - $\gamma\varepsilon$ Teilkomplex gewonnen werden. Für die Bindung der

$\alpha_3\beta_3\gamma$ Einheit an den plastidären F_0 Komplex war die Anwesenheit der ε Untereinheit essentiell.

Die δ Untereinheit allein bindet ebenfalls an den F_1 -freien membranintegrierten CF_0 Komplex. Die nähere Charakterisierung der δ - F_0 Interaktion ergab eine Dissoziationskonstante von $10,5 \mu\text{M} (\pm 1,5)$. Die Bindungsenergie reicht nicht aus, um dem vermuteten Drehmoment des Rotors von 40 pN nm (Noji et al. 1997) entgegenzuwirken. Aus diesen Ergebnissen kann daher keine Bestätigung für die angenommene Funktion des peripheren Stiels abgeleitet werden.

In Rekonstitutionsexperimenten zur Interaktion zwischen der δ Untereinheit und den Untereinheiten der katalytischen Region wurde ein stabiler Kontakt zwischen den Untereinheiten δ und α identifiziert; zwischen δ und β konnte keine stabile Bindung beobachtet werden.

Mit der Bindung der bakteriellen δ und ε mit der plastidären γ Untereinheit an die F_1 freien Thylakoidmembranen gelang es im weiteren, den gesamten Grenzbereich von der Membranseite her darzustellen.

Abschließend konnte mit den bakteriellen α , β , δ und ε Untereinheiten zusammen mit der plastidären γ Untereinheit und dem CF_0 die gesamte membranintegrierte ATP-Synthase rekonstituiert werden.

6.0 Literaturverzeichnis

- Abrahams J. P., Leslie A. G. W., Lutter R., Walker J. E.,** (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621 – 628.
- Abrahams J. P., Buchanan S. K., Van Raaij M. J., Fearnley I. M., Leslie A. G. W.,** (1996) The structure of bovine F₁-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9420-4.
- Aggeler R., Chicas-Cruz K., Cai S. X., Keana J. F., Capaldi R. A.,** (1992) Introduction of reactive cysteine residues in the epsilon subunit of *Escherichia coli* F₁ ATPase, modification of these sites with tetrafluorophenyl azide-maleimides, and examination of changes in the binding of the epsilon subunit when different nucleotides are in catalytic sites. *Biochemistry* 31, 2956 – 2961.
- Aggeler R., Haughton M. A., Capaldi R. A.,** (1995) Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the beta subunits and the gamma and epsilon subunits of the *Escherichia coli* F₁-ATPase. Structural implications and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 270, 9185 – 9191.
- Amano T., Tozawa K., Yoshida M., Murakami H.,** (1994) Spatial precision of a catalytic carboxylate of F₁-ATPase β subunit probed by introducing different carboxylate-containing side chains. *FEBS Lett.* 348, 93 – 98.
- Andreo C. S., Patrie W. J., McCarthy R. E.,** (1982) Effect of ATPase activation and the delta subunit of coupling factor 1 on reconstitution of photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 257, 9968 – 9975.
- Andrwes S. H., Peskova B., Polar M., Herlihy V., Nakamoto R.,** (2001) Conformation of the gamma subunit at the gamma-epsilon-c interface in the complete *Escherichia coli* F₁-ATPase complex by site-directed spin labeling. *Biochemistry* 10664 – 10670.
- Archinard P., Godinot C., Comte J., Gautheron D. C.,** (1986) Topography of oligomycin sensitivity conferring protein in the mitochondrial adenosinetriphosphatase-ATP synthase. *Biochemistry* 25, 3397 – 33404.
- Arnon D. I.,** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Physiol.* 24, 1 – 5.
- Assadi-Porter F., Fillingame R. H.,** (1995) Proton-translocating carboxyl of subunit c of F₁F₀ H(+)-ATP synthase: the unique environment suggested by the pK_a determined by ¹H NMR. *Biochemistry* 34, 16186 – 16193.
- Bar-Zavi D., Yosida M., Shavit N.,** (1985) Photoaffinity labeling of the TF₁-ATPase from the thermophilic bacterium PS3 with 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ADP. *Biochim. Biophys. Acta.* 807, 293 – 299.
- Bäumert H. G., Fasold H.,** (1989) Cross-Linking Techniques. *Methods Enzymol.* 172, 584 – 601.
- Beckers G., Berzborn R. J., Strotmann H.,** (1992) Zero-length crosslinking between subunits delta and I of the H(+)-translocating ATPase of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1101, 97 – 104.
- Belogradov G. I., Tomich J. M., Hatefi Y.,** (1995) ATP synthase complex. Proximities of subunits in bovine submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 270, 2053 – 2060.
- Bennum A., Racker E., (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1325 – 1331.
- Berzborn R.J., Finke W.,** (1989) Localization and orientation of subunit delta of spinach chloroplast ATP-synthase within the CF₀ CF₁ complex. 2. Identification of C-terminal residues of delta, exposed on the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* 44, 480 – 486.
- Berzborn R.J., Schlitter J.,** (2003) Does F₁-ATPase subunit gamma turn in the wrong direction? *FEBS Lett.* 533, 1 – 8.

- Bichler J., Herrmann R.G.,** (1990) Analysis of the promoters of the single-copy genes for plastocyanin and subunit delta of the chloroplast ATP synthase from spinach. *Eur. J. Biochem.* 190, 415 – 426.
- Birkenhäger R., Hoppert M., Decker-Hebestreit G., Mayer F., Altendorf K.,** (1995) The F₀ complex of the *Escherichia coli* ATP synthase. Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy. *Eur. J. Biochem.* 230, 58 – 67.
- Birkenhäger R., Greie J. Ch., Altendorf K., Decker-Hebestreit G.,** (1999) F₀ complex of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 264, 385 – 396.
- Boekema E. J., Schmidt G., Gräber P., Berden J.,** (1988) Structure of the ATP-synthase from chloroplast and mitochondria studied by electron microscopy. *Z. Naturforsch.* 43c, 219 – 225.
- Boyer P. D.,** (1989) *Faseb. J.* 3, 2164 – 2178.
- Boyer P. D.,** (2000) Catalytic site forms and control in ATP synthase catalysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 252 – 262.
- Böttcher B., Schwarz L., Gräber P.,** (1998) Direct indication for the existence of a double stalk in CF₀F₁. *J. Mol. Biol.* 281, 757 – 762.
- Böttcher B., Gräber P.,** (2000) The structure of the H(+)-ATP synthase from chloroplasts and its subcomplexes as revealed by electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1458, 404-416.
- Bragg P. D., Hou C.,** (1986) Effect of disulfide cross-linking between alpha and delta subunits on the properties of the F₁ adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 851, 385 – 394.
- Braig K., Menz R.I., Montgomery M. G., Leslie A. G. W., Walker J. E.,** (2000) Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase inhibited by Mg(2+) ADP and aluminium fluoride. *Structure* 8, 567 – 573.
- Buckley N. M., Cruz J. A., Cohen W. S., McCarthy R. E.,** (1999) The ε subunit of the chloroplast ATP synthase of *Pisum sativum*. *Photosynthesis Research* 59, 137 – 145.
- Capaldi RA, Aggeler R, Turina P, Wilkens S.,** (1994) Coupling between catalytic sites and the proton channel in F₁F₀-type ATPases. *Trends Biochem Sci.* 19, 284-289.
- Capaldi R. A., Schulenberg B.,** (2000) The epsilon subunit of bacterial and chloroplast F(1)F(0) ATPases. Structure, arrangement, and role of the epsilon subunit in energy coupling within the complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 263 – 269.
- Capaldi R. A., Schulenberg B., Murray J., Aggeler R.,** (2000) Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Exp. Biol.* 203, 29 – 33.
- Cherepanov D. A., Mulkidjanian A. Y., Junge W.,** (1999) Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase. *FEBS Lett.* 449, 1 – 6.
- Collinson I. R., van Raaij M. J., Runswick M. J., Fearnley I. M., Skehel J. M., Orriss G. L., Miroux B., Walker J. E.,** (1994) ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence. *J. Mol. Biol.* 242, 408 – 421.
- Cruz J. A., Harfe B., Radkowski CH. A., Dann M. S., McCarthy R. E.,** (1995) Molecular dissection of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase of spinach. *Plant. Physiol.* 109, 1379 – 1388.
- Cruz J. A., Radkowski C. A., McCarty R. E.,** (1997) Molecular dissection of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase of spinach. *Plant. Physiol.* 113, 1185 – 1192.
- Dallmann H. G., Flynn T. G., Dunn S. D.,** (1992) Determination of the 1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl)-carbodiimide-inducer cross-link between the β and ε subunits of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 18953 – 18960.

- Deckers-Hebestreit G., Altendorf K.,** (1996) The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 791 – 824.
- Deckers-Hebestreit G., Greie J.C., Stalz W. D., Altendorf K.,** (2000) The ATP synthase of *Escherichia coli*: structure and function of F(0) subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 364 – 373.
- Del Rizzo P.A, Bi Y., Dunn S. D., Shilton B. H.,** (2002) The "second stalk" of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry* 41, 6875 – 6884.
- DeRosier D. J.,** (1998) The Turn of the Screw: The Bacterial Flagellar Motor. *Cell* 93, 17 – 20.
- Dmitriev O.Y., Jones P.C., Fillingame R.H.** (1999) Structure of the subunit c oligomer in the F₁F_o ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7785 – 7790.
- Dimroth P.,** (2000) Operation of the F(0) motor of the ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 374 – 386.
- Dunn S. D., Heppel L. A., Fullmer C. S.,** (1980) The NH₂-terminal portion of the alpha subunit of *Escherichia coli* F₁ ATPase is required for binding the delta subunit. *J. Biol. Chem.* 255, 6891 – 6896.
- Dunn S. D., Heppel L. A.,** (1981) Properties and functions of the subunits of the *Escherichia coli* coupling factor ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 421 - 436.
- Dunn S. D., Chandler J.**(1998) Characterization of a b₂delta complex from *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 8646 – 8651.
- Dunn S. D., McLachlin D. T. Revington M.,** (2000) The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1458 , 356 – 363.
- Engelbrecht S., Junge W.,** (1988) Purified subunit delta of chloroplast coupling factor CF₁ reconstitutes photophosphorylation in partially CF₁-depleted membranes. *Eur. J. Biochem.* 172, 213 – 218.
- Engelbrecht S., Althoff G., Junge W.,** (1990) Reconstitution of photophosphorylation in EDTA-treated thylakoids by added chloroplast coupling factor 1 (ATPase) and chloroplast coupling factor 1 lacking the delta subunit. Structural or functional? *Eur. J. Biochem.* 189, 193 – 197.
- Engelbrecht S., Junge W.,** (1997) ATP synthase: a tentative structural model. *FEBS Lett.* 414, 485-491.
- Engelbrecht S., Gikas E., Marx O., Lill H.,** (1998) Fluorescence resonance energy transfer mapping of subunit delta in spinach chloroplast F₁ ATPase. *Eur. J. Biochem.* 252, 277 – 283.
- Fiedler H., Ponomarenko S., von Gehlen N., Strotmann H.,** (1994) Proton gradient-induced changes of interaction between CF₀ and CF₁ as probed by cleavage with NaSCN. *Biochim. Biophys. Acta.* 1188, 29 – 34.
- Fillingame R. H.,** (1997) Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J Exp. Biol.* 200, 217-24.
- Fillingame R. H., Jones P. C., Jiang W., Valiyaveetil F. I., Dimitriev O. Y.,** (1998) Subunit organization and structure in the F₀ sector of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1365, 135 – 142.
- Fillingame R. H., Jiang W., Dimitriev O. Y., Jones P. C.,** (2000) Structural interpretations of F(0) rotary function in the *Escherichia coli* F(1)F(0) ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 387 – 403.
- Fillingame R. H., Angerine C.M., Dimitriev O.Y.,** (2002) Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 1555, 29 – 36.

- Fromme P., Boekema E. J., Gräber P.,** (1987) Isolation and Characterization of a supramolecular complex of *Escherichia coli*. *Z. Naturforsch.* 42c, 1239 – 1245.
- Futai M., Sternweis P. C., Heppel L. A.,** (1974) Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 71, 2725 – 2729.
- Galanis M., Mattoon J. R., Nagley P.,** (1989) Amino acid substitutions in mitochondrial ATP synthase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to venturicin or ossamycin resistance. *FEBS Lett.* 249, 333 – 336.
- Galmiche J. M., Pezennec S., Zhao R., Girault G., Baeuerlein E.,** (1994) The prokaryotic thermophilic TF1-ATPase is functionally compatible with the eukaryotic CF₀-part of the chloroplast ATP-synthase. *FEBS Lett.* 338, 152 - 156.
- Gibbons C., Montgomery M. G., Leslie A. G. W., Walker J.,** (2000) The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1055 – 1061.
- Girvin M. E., Fillingame R. H.,** (1993) Helical structure and folding of subunit c of F1F₀ ATP synthase: 1H NMR resonance assignments and NOE analysis. *Biochemistry* 32, 12167-77.
- Girvin M. E., Rastogi V. K., Abildgaard F., Markley J. L., Fillingame R. H.,** (1998) Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F1F₀ ATP synthase. *Biochemistry* 37, 8817 – 8824.
- Gromet-Elhanan E. Z., Khananashvili D., Weiss S., Kanazawa H., Futai M.,** (1985) ATP synthesis and hydrolysis by a hybrid system reconstituted from the beta-subunit of *Escherichia coli* F1-ATPase and beta-less chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 260, 12635 – 12640.
- Groth G., Walker J.,** (1997) Model of the c-subunit oligomer in the membrane domain of F-ATPases. *FEBS Lett.* 410, 117 – 123.
- Groth G., Strotmann H.,** (1999) New results about structure, function and regulation of chloroplast ATP synthase (CF₀CF₁). *Physiologia Plantarum* 106, 142 – 148.
- Groth G.,** (2000) Molecular models of the structural arrangement of subunits and the mechanism of proton translocation in the membrane domain of F(1)F(0) ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 417 – 427.
- Groth G., Pohl E.,** (2001) The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 276, 1345 – 1352.
- Hafeti Y., Hanstein W. G.,** (1974) Destabilization of membranes with chaotropic ions. *Methods Enzymol.*;31(Pt A), 770-90.
- Hanes J., Jermutus L., Weber-Bornhauser S., Bosshard HR., Pluckthun A.,** (1998) Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 14130 – 14135.
- Hara K. Y., Noji H., Bald D., Yasuda R., Kinosita K., Yosida M.,** (2000) The role of the DELSEED motif of the beta subunit in rotation of F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275, 14260 – 14267.
- Hara KY, Kato-Yamada Y, Kikuchi Y, Hisabori T, Yoshida M.,** (2001) The role of the beta DELSEED motif of F1-ATPase: propagation of the inhibitory effect of the epsilon subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 23969 – 23973.
- Hartzog P. E., Cain B. D.** (1993) Mutagenic analysis of the a subunit of the F1F₀ ATP synthase in *Escherichia coli*: Gln-252 through Tyr-263. *J. Bacteriol.* 175, 1337 - 1343.
- Hatch L. P., Cox G. B., Howitt S. M.,** (1995) The essential arginine residue at position 210 in the alpha subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity. *J. Biol. Chem.* 270, 29407 – 29412.

- Hausrath A. C., Grüber G., Matthews B. W., Capaldi R. A.,** (1999) Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia coli* F(1) ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 13697 – 13702.
- Häsler K., Engelbrecht S., Junge W.,** (1998) Three-stepped rotation of subunits gamma and epsilon in single molecules of F-ATPase as revealed by polarized, confocal fluorometry. *FEBS Lett.* 426, 301 – 304.
- Häsler K., Pänke O., Junge W.,** (1999) On the stator of rotary ATP synthase: the binding strength of subunit delta to $(\alpha\beta)_3$ as determined by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 38, 13759 – 13765.
- Hermolin J., Dmitriev O.Y., Zhang Y., Fillingame R.H.** (1999) Defining the domain of binding of F1 subunit epsilon with the polar loop of F0 subunit c in the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 17011 – 17016.
- Hisabori T., Kato Y., Motohashi K., Kroth-Pancic P., Strotmann H., Amano T.,** (1997) The regulatory functions of the gamma and epsilon subunits from chloroplast CF1 are transferred to the core complex, $\alpha_3\beta_3$, from thermophilic bacterial F1. *Eur. J. Biochem.* 247, 1158 – 1165.
- Hisabori T., Kondoh A., Yosida M.,** (1999) The gamma subunit in chloroplast F(1)-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Lett.* 463, 35 – 38.
- Hisabori T., Konno H., Ichimura H., Strotmann H., Bald D.,** (2002) Molecular devices of chloroplast F(1)-ATP synthase for the regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1555, 140-6.
- Hoppe J., Montecucco C., Friedl P.,** (1983) Labeling of subunit b of the ATP synthase from *Escherichia coli* with a photoreactive phospholipid analogue. *J. Biol. Chem.* 258, 2882 – 2885.
- Hoppe J., Sebald W.,** (1984) The proton conducting F0-part of bacterial ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 768, 1 – 27.
- Howitt S. M., Cox G. B.,** (1992) Second-site revertants of an arginine-210 to lysine mutation in the a subunit of the F0F1-ATPase from *Escherichia coli*: implications for structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9799 – 9803.
- Hsu S. Y., Scuda M., Kanazawa H., Tsuchiya T., Futai M.,** (1984) Comparison of F1's of oxidative phosphorylation from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and demonstration of interchangeability of their subunits. *Biochemistry* 23, 988 – 993.
- Hulet SW., Hess EJ, Debinski W., Arosio P., Bruce K., Powers S., Connor JR.,** (1999) Characterization and distribution of ferritin binding sites in the adult mouse brain. *J Neurochem.* 72, 868 - 874.
- Ishida J., Asada S., Daitoku H., Fujiwara K., Kon Y., Sugaya T., Murakami K., Nakajima T., Kasuya Y., Fukamizu A.,** (1999) Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells. *Int. J. Mol. Med.* 3, 263-270.
- Jäger H., Birkenhäger R., Stalz W. D., Altendorf K., Deckers-Hebestreit G.,** (1998) Topology of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 251, 122 – 132.
- Jones P. C., Fillingame R. H.,** (1998) Genetic fusions of subunit c in the F0 sector of H⁺-transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. *J. Biol. Chem.* 273, 29701 – 29705.
- Joshi S., Cao G. J., Nath J., Shah J.,** (1997) Oligomycin sensitivity conferring protein (OSCP) of bovine heart mitochondrial ATP synthase: high-affinity OSCP-Fo interactions require a local alpha-helix at the C-terminal end of the subunit. *Biochemistry* 36, 10936 – 10943.
- Jounouchi M., Takeyama M., Noumi T., Moriyama Y., Maeda M.,** (1992) Role of the terminal region of the ϵ subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (F₁F₀). *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 87 – 94.

- Junge W., Lill H., Engelbrecht S.,** (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *TIBS*. 22, 420 – 423.
- Kahn J. S.,** (1982) The ϵ Subunit of the Chloroplast Coupling Factor 1 from *Euglena gracilis*. *Plant. Physiol.* 70, 451-455.
- Karrasch S., Walker J. E.,** (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.* 290, 379 – 384.
- Kato Y., Matsui T., Tanaka N., Muneyuki E., Hisabori T., Yoshida M.,** (1997) Thermophilic F₁-ATPase is activated without dissociation of an endogenous inhibitor, epsilon subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 24906 – 24912.
- Kato-Yamada Y., Noji H., Yasuda R., Kinoshita K., Yosida M.,** (1998) Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 19375 – 19377.
- Kato-Yamada Y., Bald D., Koike M., Motohashi K., Hisabori T., Yoshida M.,** (1999) Epsilon subunit, an endogenous inhibitor of bacterial F(1)-ATPase, also inhibits F(0)F(1)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 33991 – 33994.
- Kato-Yamada Y., Yoshida M., Hisabori T.,** (2000) Movement of the helical domain of the epsilon subunit is required for the activation of thermophilic F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275, 35746-35750.
- Laubinger W., Deckers-Hebestreit G., Altendorf K., Dimroth P.,** (1990) A hybrid adenosinetriphosphatase composed of F₁ of *Escherichia coli* and F₀ of *Propionigenium modestum* is a functional sodium ion pump. *Biochemistry* 29, 5458 – 5463.
- Lichter T., Kellner E., Lill H.,** (1998) The coupling region of F₀F₁ ATP synthase: binding of the hydrophilic loop of subunit c to F₁. *FEBS Lett.* 431, 419 – 422.
- Lill H., Burkovski A., Altendorf K., Junge W., Engelbrecht S.,** (1993) Complementation of *Escherichia coli* unc mutant strains by chloroplast and cyanobacterial F₁-ATPase subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* 1144, 278 – 284.
- Lill H., Hensel F., Junge W., Engelbrecht S.,** (1996) Cross-linking of engineered subunit delta to (alpha₃)₃ in chloroplast F-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271, 32737 – 32742.
- Maggio M. B., Personage D., Senior A. E.,** (1988) A mutation in the alpha-subunit of F₁-ATPase from *Escherichia coli* affects the binding of F₁ to the membrane. *J. Biol. Chem.* 263, 4619 – 4623.
- Mason, J.G., Whitfeld P.R.,** (1990) The gamma-subunit of spinach chloroplast ATP synthase: isolation and characterisation of cDNA and genomic clones. *J. Plant. Mol. Biol.* 14, 1007-1018.
- Matsui T., Yoshida M.,** (1995) Expression of the wild-type and the Cys-/Trp-less alpha 3 beta 3 gamma complex of thermophilic F₁-ATPase in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1231, 139 – 146.
- Mao Y., Mueller D. M.,** (1997) Structural interactions of the oligomycin sensitivity-conferring protein in the yeast ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 8 – 16.
- McLachlin D. T., Bestard J. A., Dunn S. D.,** (1998) The b and delta subunits of the *Escherichia coli* ATP synthase interact via residues in their C-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 273, 15162-8.
- McLachlin D. T., Coveny A. M., Clark S. M., Dunn S. D.,** (2000) Site-directed cross-linking of b to the alpha, beta, and a subunits of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 275, 17571 – 17577.
- Mellwig C., Böttcher B.,** (2003) A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts. *J Biol Chem.* 278, 18544-18549.
- Mendel-Hartvig J., Capaldi R. A.,** (1991) Structure-function relationships of domains of the delta subunit in *Escherichia coli* adenosine triphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1060, 115 – 124.

- Menz R. I., Walker J. E., Leslie A. G. W.,** (2001) Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell* 106, 331 – 341.
- Miller M. J., Oldenburg M., Fillingame R. H.,** (1990) The essential carboxyl group in subunit c of the F1F0 ATP synthase can be moved and H(+)-translocating function retained. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4900 – 4904.
- Miyauchi M., Tozawa K., Yoshida M.,** (1995) F1-ATPase alpha-subunit made up from two fragments (1-395, 396-503) is stabilized by ATP and complexes containing it obey altered kinetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1229, 225 – 232.
- Mellwig C., Böttcher B.,** (2003) A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 278, 18544 – 18549.
- Nakamoto R. K., Ketchum C. J., Kuo P. H., Peskova Y. B., Al-Shawi M. K.,** (2000) Molecular mechanisms of rotational catalysis in the F(0)F(1) ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 289-299.
- Nelson N., Kanner B. I., Gutnick D. L.,** (1974) Purification and properties of Mg²⁺-Ca²⁺ adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2720 – 2729.
- Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K.Jr.** (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386, 299 – 302.
- Noji H., Häslner K., Junge W., Kinoshita K., Yosida M., Engelbrecht S.,** (1999) Rotation of *Escherichia coli* F(1)-ATPase. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 260, 597 – 599.
- Ogilvie I., Aggeler R., Capaldi R. A.,** (1997) Cross-linking of the delta subunit to one of the three alpha subunits has no effect on functioning, as expected if delta is a part of the stator that links the F1 and F0 parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 16652 – 16656.
- Ohta S., Yohda M., Ishizuka M., Hirata H., Hamamoto T., Otawara-Hamamoto Y., Matsuda K., Kagawa Y.,** (1988) Sequence and over-expression of subunits of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3. *Biochim. Biophys. Acta.* 933, 141-155.
- Omote H., Sambonmatsu N., Saito K., Sambongi Y., Iwamoto-Kihara A., Yanagida T., Wada Y., Futai M.,** (1999) The gamma-subunit rotation and torque generation in F1-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 7780 – 7784.
- Orriss G. L., Leslie A. G.W., Braig K., Walker J. E.,** (1998) Bovine F1-ATPase covalently inhibited with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: the structure provides further support for a rotary catalytic mechanism. *Structure* 6, 831 – 837.
- Patrie W. J., McCarthy E. R.,** (1984) Specific binding of coupling factor 1 lacking the delta and epsilon subunits to thylakoids. *J. Biol. Chem.* 259, 11121 – 11128.
- Pänke O., Gumbinowski K., Junge W., Engelbrecht S.,** (2000) F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF(o)EF(1). *FEBS. Lett.* 472, 34 – 38.
- Pick U., Racker E.,** (1979) Purification and reconstitution of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 254, 2793 – 2799.
- Rastogi V. K., Girvin M. E.,** (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402, 263 – 268.
- Ren H., Allison W. S.,** (2000) On what makes the gamma subunit spin during ATP hydrolysis by F(1). *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 221 – 233.
- Revington M., McLachlin D. T., Shaw G. S., Dunn S.,** (1999) The dimerization domain of the b subunit of the *Escherichia coli* F(1)F(0)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 31094 – 31101.
- Richter M. L., Patrie W. J., McCarthy E. R.,** (1984) Preparation of the epsilon subunit and epsilon subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutively active forms. *J. Biol. Chem.* 259, 7371 – 7373.

- Richter M. L., McCarthy R. E.,** (1987) Energy-dependent changes in the conformation of the ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 262, 15037 – 15040.
- Rodgers A. J., Wilkens S., Aggeler R., Morris M. B., Howitt S. M., Capaldi R. A.,** (1997) The subunit delta-subunit b domain of the Escherichia coli F1F0 ATPase. The B subunits interact with F1 as a dimer and through the delta subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 31058 – 31064.
- Rodgers A. J., Capaldi R. A.,** (1998) The second stalk composed of the b- and delta-subunits connects F0 to F1 via an alpha-subunit in the Escherichia coli ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 29406 – 29410.
- Rodgers A. J., Wilce M. C.,** (2000) Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1051 – 1054.
- Sabbert D., Engelbrecht S., Junge W.,** (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* 381, 623 – 625.
- Sambongi Y., Iko Y., Tanabe M., Omote H., Iwamoto-Kihara A., Ueda I., Yanagida T., Wada Y., Futai M.,** (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* 286, 1722 – 1724.
- Sawada K., Kuroda N., Watanabe H., Moritani-Otsuka C., Kanazawa H.,** (1997) Interaction of the delta and b subunits contributes to F1 and F0 interaction in the Escherichia coli F1F0-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 31047 – 31053.
- Schmitz-Linneweber C., Maier R.M., Alcaraz J. P., Cottet, A., Herrmann R.G., and Mache R.,** (2001) The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *J. Plant Mol. Biol.* 45, 307-315.
- Schneider E., Altendorf K.,** (1985) All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (F₀) of Escherichia coli ATP synthase (F1F₀). *EMBO J.* 4, 515 – 518.
- Schnick C., Forrest L. R., Sansom M. S. P., Goth G.,** (2000) Molecular contacts in the transmembrane c-subunit oligomer of F-ATPases identified by tryptophan substitution mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 49 – 60.
- Schulenberg B., Wellmar F., Lill H., Junge W., Engelbrecht S.,** (1997) Cross-linking of chloroplast F0F1-ATPase subunit epsilon to gamma without effect on activity. Epsilon and gamma are parts of the rotor. *Eur. J. Biochem.* 249, 134 – 141.
- Searle G. F. W., Barber J.,** (1979) The interaction of an amphipathic fluorescence probe, 2-p-toluidinonaphthalene-6-sulphonate, with isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 545, 288 – 292.
- Seelert H., Poetsch A., Dencher N. A., Engel A., Stahlberg H., Müller D. J.,** (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* 405, 418 – 419.
- Senior A. E., Nadanaciva S., Weber J.,** (2002) The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553, 188 – 211.
- Shirakihara Y., Leslie A. G. W., Abrahams J. P., Walker J. E., Ueda T., Sekimoto Y., Kambara M., Saika K., Kagawa Y., Yosida M.,** (1997) The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer. *Structure* 5, 825 – 836.
- Shoshan V., Shavit N.,** (1973) On the reconstitution of photophosphorylation in chloroplast membranes. *Eur. J. Biochem.* 37, 355 – 360.
- Singht S., Turina P., Bustamante C. J., Keller D. J., Capaldi R.** (1996) Topographical structure of membrane-bound Escherichia coli F1F0 ATP synthase in aqueous buffer. *FEBS Lett.* 397, 30 – 34.
- Skakoon E. N., Dunn S. D.,** (1993) Location of conserved residue histidine-38 of the epsilon subunit of Escherichia coli ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 272-8.
- Smith J. B., Sternweis P. C.,** (1975) Restoration of coupling factor activity to Escherichia coli ATPase missing the delta subunit. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 62, 764 – 771.

- Steffens K., Di Gioia A., Deckers-Hebestreit G., Altendorf K.,** (1987) Structural and functional relationship of ATP synthases (F1F0) from *Escherichia coli* and the thermophilic bacterium PS3. *J. Biol. Chem.* 262, 6334-6338.
- Steinemann D., Lill H., Junge W., Engelbrecht S.,** (1994) Over-production, renaturation and reconstitution of delta and epsilon subunits from chloroplast and cyanobacterial F1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187, 354 – 359.
- Sternweis P. C.,** (1978) The ϵ subunit of *Escherichia coli* coupling factor 1 is required for its binding to the cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 253, 3123 – 3128.
- Sternweis P. C., Smith J. B.** (1980) Characterization of inhibitory (ϵ) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 19, 526 - 531.
- Sorgen P. L., Caviston T. L., Perry R. C., Cain B.D.,** (1998) Deletions in the second stalk of F1F0-ATP synthase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 273, 27873-27878.
- Sorgen P. L., Bubb M. R., Cain B. D.,** (1999) Lengthening the second stalk of F(1)F(0) ATP synthase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274, 36261 – 36266.
- Soteropoulos P., Ong A. M., McCarthy R.E.,** (1994) Alkylation of cysteine 89 of the gamma subunit of chloroplast coupling factor 1 with N-ethylmaleimide alters nucleotide interactions. *J Biol Chem.* 269, 19810 – 19816.
- Stock D., Leslie A. G., Walker J. E.,** (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286, 1700 – 1705.
- Strotmann H., Hesse H., Edelmann K.** (1973) Quantitative determination of coupling factor CF1 of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 314, 202 – 210.
- Strotmann H., Bickel-Sandkötter S.,** (1984) Structure, function and regulation of chloroplast ATPase. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35, 97 – 120.
- Strotmann H., Shavit N.,** (1998) Photophosphorylation. *Concept in Photobiology: Photosynthesis et Photomorphogenesis.*
- Stryer L.,** *Biochemie 1990, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH*
- Süss K. H.,** (1986) Neighbouring subunits of CF₀ and between CF₁ and CF₀ of the soluble chloroplast ATP synthase (CF₁-CF₀) as revealed by chemical protein cross-linking. *FEBS Lett.* 201, 63 – 68.
- Suzuki T., Suzuki J., Mitome N., Ueno H., Yoshida M.,** (2000) Second Stalk of ATP Synthase. *J. Biol. Chem.* 275, 37902 – 37906.
- Tal M., Silberstein A., Nusser E.,** (1985) Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J. Biol. Chem.* 260, 9976-9980.
- Tanabe M., Nishio K., Iko Y., Sambongi Y., Iwamoto-Kihara A., Wada Y., Futai M.,** (2001) Rotation of a complex of the gamma subunit and c ring of *Escherichia coli* ATP synthase. The rotor and stator are interchangeable. *J. Biol. Chem.* 276, 15269 – 15274.
- Tang C., Capaldi R.A.,** (1996) Characterization of the interface between gamma and epsilon subunits of *Escherichia coli* F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271, 3018 - 3024.
- Telfer A., Barber J., Jagendorf A.T.,** (1980) Electrostatic control of chloroplast coupling factor binding to thylakoid membranes as indicated by cation effects of electron transport and reconstitution of photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 591, 331 – 345.
- Tiedge H., Schäfer G., Mayer F.,** (1983) An electron microscopic approach to the quaternary structure of mitochondrial F1-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 132, 37 – 45.
- Tozer R. G., Dunn S. D.,** (1986) Column centrifugation generates an intersubunit disulfide bridge in *Escherichia coli* F1-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 161, 513 – 518.
- Tsunoda S. P., Rodgers A. J., Aggeler R., Yoshida M., Capaldi R.A.,** (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 898 – 902.
- Uhlin U., Cox G.B., Guss J.M.,** (1997) Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure* 5, 1219 – 1230.

- Valiyaveetil F. I., Fillingame R. H.,** (1998) Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 16241 – 16247.
- van Raaij M. J., Abrahams J.P., Leslie A. G. W., Walker J. E.,** (1996) The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 6913 – 6917.
- Vik S. B., Antonio B. J.,** (1994) A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. *J. Biol. Chem.* 269, 30364 – 30369.
- Wagner R., Apley E.C., Engelbrecht S., Junge W.**(1988) The binding of eosin-labeled subunit δ to the isolated chloroplast ATPase, CF₁, as revealed by rotational diffusion in solution. *FEBS Lett.* 230, 109 – 115.
- Walker J. E., Fearnley I. M., Gay N. J., Gibson B. W., Northrop F. D., Powerll S. J., Runswick M. J., Saraste M., Tybulewicz V. L. I.,** (1985) Primary Structure and Subunit Stoichiometry of F₁-ATPase from Bovine Mitochondria. *J. Mol. Biol.* 184, 677 – 701.
- Wang S., Vik S. B.,** (1994) Single amino acid insertions probe the alpha subunit of the *Escherichia coli* F1F0-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 3095 – 3099.
- Watts S. D., Zhang Y., Fillingame R. H., Capaldi R. A.,** (1995) The gamma subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF1F0) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F0 part. *FEBS Lett.* 368, 235 – 238.
- Watts S. D., Tang C., Capaldi R. A.,** (1996) The stalk region of the *Escherichia coli* ATP synthase. Tyrosine 205 of the gamma subunit is in the interface between the F1 and F0 parts and can interact with both the epsilon and c oligomer. *J. Biol. Chem.* 271, 28341 - 28347.
- Weber J., Senior A. E.,** (1997) Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1319, 19 – 58.
- Weber J., Senior A. E.,** (2000) ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 300 – 309.
- Weber J., Wilke –Mounts S., Senior A.E.,** (2002) Quantitative determination of binding affinity of delta-subunit in *Escherichia coli* F1-ATPase: effects of mutation, Mg²⁺, and pH on K_d. *J. Biol. Chem.* 277, 18390 – 18396.
- Weber J., Wilke –Mounts S., Senior A. E.,** (2003) Identification of the F1-binding surface on the delta-subunit of ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 13409 – 13416.
- Wetzel CM., McCarthy R. E.,** (1993) Aspects of subunit interaction in the chloroplast ATP synthase (II). *Plant. Physiol* 102, 251 – 259.
- Wilkins S., Dahlquist F. W., McIntosh L. P., Donaldson L. W., Capaldi R. A.,** (1995) Structural features of the epsilon subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 2, 961 – 967.
- Wilkins S., Dunn S. D., Chandler J., Dahlquist F.W., Capaldi R. A.,** (1997) Solution structure of the N-terminal domain of the delta subunit of the *E. coli* ATPsynthase. *Nat. Struct. Biol.* 4, 198 – 201.
- Wilkins S., Capaldi R. A.,** (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F1 and F0 parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1365, 93 – 97.
- Wilkins S., Zhou J., Nakayama R., Dunn S. D., Capaldi R. A.,** (2000) Localization of the delta subunit in the *Escherichia coli* F(1)F(0)-ATPsynthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F(1). *J. Mol. Biol.* 295, 387 – 391.
- Yamada H., Moriyama Y., Maeda M., Futai M.,** (1996) Transmembrane topology of *Escherichia coli* H(+)-ATPase (ATP synthase) subunit a. *FEBS Lett.* 390, 34 – 38.
- Yasuda R., Noji H., Kinosita K., Yosida M.,** (1998) F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* 93, 1117 – 1124.
- Yoshida M., Sone N., Hirata H., Kagawa Y.,** (1975) A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. Purification, properties, and reconstitution. *J. Biol. Chem.* 250, 7910 – 7916.

-
- Yosida M., Okamoto H., Sone N., Hirata H., Kagawa Y.,** (1977) Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 936 – 940. .
- Younis H. M., Winget G. D., Racker E.,** (1977) Requirement of the δ subunit of chloroplast coupling factor 1 for photophosphorylation. J. Biol. Chem. 252, 1814 – 1818.
- Zahng Y., Oldenburg M., Fillingame R. H.,** (1994) Suppressor mutations in F1 subunit epsilon recouple ATP-driven H⁺ translocation in uncoupled Q42E subunit c mutant of Escherichia coli F1F0 ATP synthase. J. Biol. Chem. 269, 10221 – 10224.
- Zahng Y., Fillingame R. H.,** (1995) Subunits coupling H⁺ transport and ATP synthesis in the Escherichia coli ATP synthase. Cys-Cys cross-linking of F1 subunit epsilon to the polar loop of F0 subunit c. J. Biol. Chem. 270, 24609 – 24614.
- Zhou Y., Duncan T. M., Bulygin V. V., Hutcheon M. L., Cross R. L.,** (1996) ATP hydrolysis by membrane-bound Escherichia coli F0F1 causes rotation of the gamma subunit relative to the beta subunits. Biochim. Biophys. Acta. 1275, 96 – 100.
- Zhou Y., Duncan T. M., Cross R. L.,** (1997) Subunit rotation in Escherichia coli FoF1-ATP synthase during oxidative phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 10583 – 10587.
- Ziegler M., Xiao R., Prefensky H. S.,** (1994) Close proximity of Cys64 and Cys140 in the delta subunit of Escherichia coli F1-ATPase. Biol. Chem. 269, 4233 – 4239.

Danksagung

Bei Prof. Dr. H. Strotmann möchte ich mich für die stete Betreuung und die Möglichkeit bedanken, am Institut für Biochemie der Pflanzen promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. H. Weiss danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Dr. T. Hisabori und Dr. Y. Kato–Yamada bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten Plasmide und Proteine der ATPase aus *Bacillus thermophilus*.

Markus, Claudia B., Claudia S. und Erik danke ich für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Für die Warmherzigkeit und Hilfsbereitschaft insbesondere in den ersten Monaten meiner Anwesenheit im Institut bedanke ich mich bei Frau Rita Reidegeld und Irina Volfson.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die herzliche Aufnahme und angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere bedanke ich mich bei meiner „Adoptiv“-Arbeitsgruppe: Claudia S., Claudia B., Nicole, Erik und Jan für die fachliche Hilfe, ermutigenden Worte aber auch lustigen Momente, die das manchmal frustrierende Doktoranden-Leben heiterer gestaltet haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Mama, meine Großeltern und meinen Bruder, deren Zuwendung und Zuspruch mich all die Jahre stets begleitet haben und an Markus, der mich besonders in den letzten Monaten mit Tat und Kraft unterstützt hat.