

Chloroplastidäre F-ATPase – Molekulare Regulation
durch das Phytotoxin Tentoxin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von
Erik Meiß
aus Krefeld

Oktober 2006

Aus dem Institut für Biochemie der Pflanzen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Georg Groth
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Jürgen Schumann

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Struktur	1
1.1.1	F ₀ -Komplex	1
1.1.2	F ₁ -Komplex	4
1.2	Katalytischer Mechanismus	5
1.2.1	Protonentranslokation	5
1.2.2	Nukleotidumsetzung	6
1.2.3	Rotation	8
1.3	Regulation	8
1.3.1	Endogene Faktoren	10
1.3.2	Inhibitoren	11
1.4	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Biologisches Material	14
2.3	Allgemeine Arbeiten	14
2.3.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> Bakterien	15
2.3.2	Transformationskompetente Zellen	15
2.3.3	Transformation	16
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	16
2.3.5	SDS-Gelfärbung mit Silber	17
2.3.6	SDS-Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue	17
2.3.7	Immunologische Analyse	18
2.4	Expression und Reinigung des katalytischen F ₁ -Teilkomplexes von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	20
2.4.1	Expression	20
2.4.2	Reinigung	20
2.5	ATPase-Aktivitätsmessungen	21
2.6	Bestimmung der im Komplex gebundenen Nukleotide	23
2.7	Rotationsexperimente	26
2.7.1	Biotinylierung des F ₁ -Komplexes	26

2.7.2	Herstellung von Streptavidin-beschichteten Kunststoffkugeln . . .	27
2.7.3	Herstellung Nickel-NTA-beschichteter Glasplatten	29
2.7.4	Einzelmolekülexperimente	29
3	Ergebnisse	33
3.1	Präparation des F ₁ -Komplexes	33
3.2	Aktivitätsmessungen	34
3.2.1	Kinetische Parameter	34
3.2.2	Einfluss von Tentoxin	34
3.2.3	Modulatoren der Tentoxin-Wirkung	38
3.3	Nukleotidbestimmung	44
3.4	Rotationsexperimente	44
3.4.1	Messprinzip	45
3.4.2	Analyse der ATP-abhängigen Rotation	47
3.4.3	Kinetische Analyse der Rotationspausen	55
3.4.4	Analyse der Rotororientierung während der Rotationspausen . .	61
4	Diskussion	65
4.1	<i>bulk</i> -Experimente	65
4.1.1	Kinetische Parameter	65
4.1.2	Einfluss von Tentoxin	66
4.1.3	Modulatoren der Tentoxin-Wirkung	67
4.1.4	Nukleotidbestimmung	70
4.2	Rotationsexperimente	71
4.2.1	Analyse der ATP-abhängigen Rotation	72
4.2.2	Drehmoment	75
4.2.3	Kinetische Analyse der Rotationspausen	75
4.2.4	Analyse der Rotororientierung während der Rotationspausen . .	77
4.3	Modell der Tentoxin-Wirkung	79
4.3.1	Inhibierung	80
4.3.2	Reaktivierung	81
5	Zusammenfassung	87
6	Sequenzvergleiche	89

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP-PNP	5'-Adenylyl-imidodiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP γ S	Adenosin-5'-(γ -thio)-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BP ₁	F ₁ -Komplex der ATPase aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CF ₁	F ₁ -Komplex der ATPase aus <i>Spinacia oleracea</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F ₁	F ₁ -Komplex der ATPase
F _o	F _o -Komplex der ATPase
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
LDAO	<i>N,N</i> -Dimethyldodecylamin- <i>N</i> -oxid
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
OD	optische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
TF ₁	F ₁ -Komplex der ATPase aus <i>Bacillus PS3</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tentoxin
U	Units



1 Einleitung

Eine zentrale Eigenschaft des Lebens ist der Stoffwechsel. Die Umsetzung von zellulären Metaboliten bildet die Grundlage aller Lebensprozesse. Dabei laufen endergone und exergone Reaktionen ab. Die wichtigste, energiereiche Verbindung im Primärstoffwechsel stellt das Adenosintriphosphat dar, kurz ATP. Es erfüllt in der Zelle die Aufgabe eines Energiemediators und wird auch als zentrale Energiewährung der Zelle bezeichnet.

Unter Mangel an Sauerstoff wird ATP im Cytosol der Zellen über die Glykolyse bereitgestellt, wohingegen unter aeroben Bedingungen die ATP-Synthese durch Elektronentransportketten an speziellen membranintegralen Enzymkomplexen erfolgt. Diese befinden sich bei Prokaryonten in der Zellmembran, bei höher organisierten Tieren und Pflanzen in der inneren Membran von Mitochondrien bzw. Chloroplasten. Die Redoxreaktionen der Atmungskette bzw. der Photosynthese erzeugen dabei eine elektrochemische Potentialdifferenz in Form eines pH-Gradienten über die Membran, der durch die membranintegrale F_0F_1 -ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP verwendet wird.

1.1 Aufbau und Struktur

Die F_0 -ATPasen von Prokaryonten, Tieren und Pflanzen sind strukturell und funktionell hoch konservierte Multienzymkomplexe, die je nach Spezies aus 8–18 verschiedenen Untereinheiten bestehen. Sie nutzen eine elektrochemische Potentialdifferenz zur Synthese der energiereichen Verbindung ATP aus bzw. verbrauchen Energieäquivalente zur Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten. Strukturell kann man den Komplex in zwei Domänen unterteilen, welche über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander gekoppelt sind und als F_0 und F_1 bezeichnet werden [1]. Ein Strukturmodell der bakteriellen F_0F_1 -ATP-Synthase ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

1.1.1 F_0 -Komplex

Der membranintegrale F_0 -Teilkomplex katalysiert den Protonenfluss durch die Membran und besteht bei der chloroplastidären ATPase aus vier nicht identischen Untereinheiten mit einer Stöchiometrie von I_1 , II_1 , III_{14} , IV_1 [2]. Homologe Untereinheiten bei F_0 -Komplexen anderer Spezies werden mit a (IV), b (I und II) und c (III) bezeichnet. In strukturellen Untersuchungen mit Hilfe von Rasterkraft- und Elektronenmikroskopie

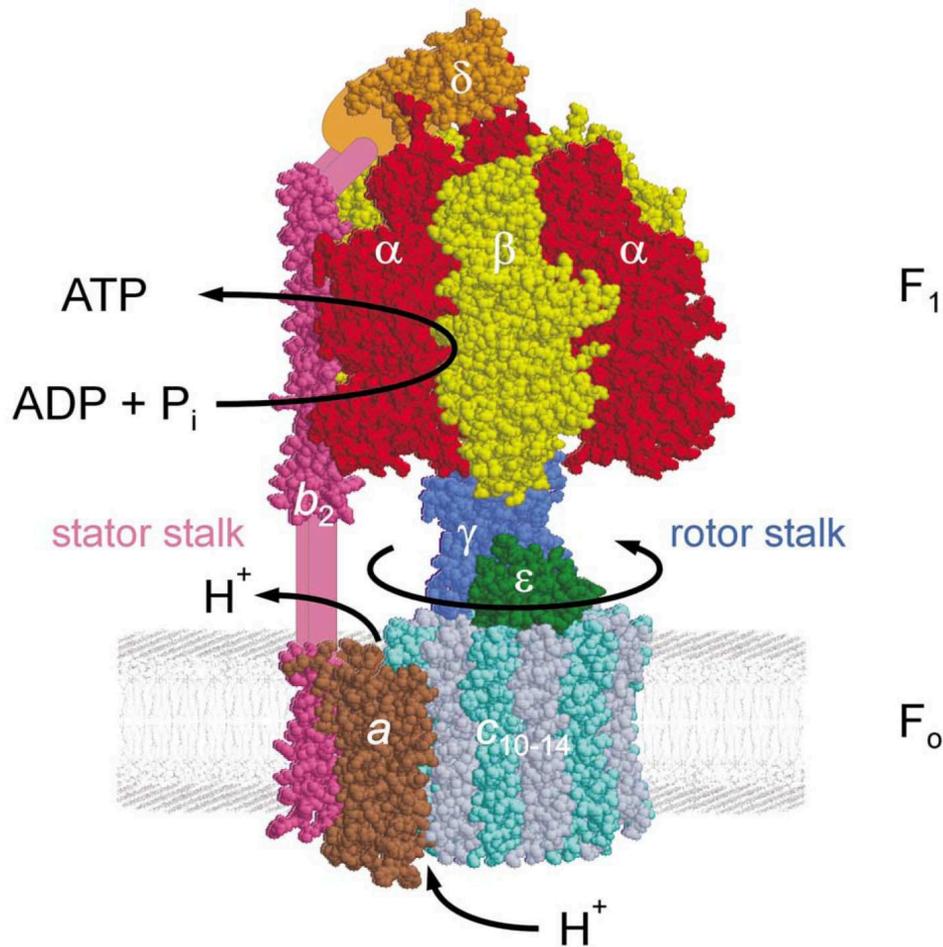


Abb. 1.1: Struktureller Aufbau der bakteriellen F₀F₁-ATP-Synthase. Für dieses Modell wurden Strukturdaten der jeweiligen Untereinheiten zusammen dargestellt bzw. im Falle der Untereinheit a ein Modell basierend auf biochemischen Experimenten und Sekundärstrukturvorhersagen verwendet. Der F₁-Bereich besteht aus einem Komplex von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, der F₀-Teilkomplex aus $a b_2 c_{10-14}$, wobei $\gamma\epsilon c_n$ zum Rotor gezählt und die übrigen Untereinheiten als Stator bezeichnet werden. Untereinheiten a und c sind an der Translokation der Protonen über die Membran beteiligt und die daraus resultierende Drehung des c-Multimers wird über die γ -Untereinheit welche in die Kavität des $\alpha_3\beta_3$ Hexamers ragt, in Konformationsänderungen der β -Untereinheit übertragen. An den Kontaktflächen zwischen den α -Untereinheiten und β -Untereinheiten findet die Synthese bzw. Hydrolyse von ATP statt. Das Hexamer wird durch die δ - und b -Untereinheiten wieder mit Untereinheit a verbunden und dient als Widerlager zum $\gamma\epsilon c_n$ -Rotor, welcher sich in dieser Darstellung in ATP-Syntheserichtung dreht.



sowie in röntgenkristallographischen Analysen wurde eine tonnenförmige Anordnung mehrerer c-Untereinheiten mit einer außen angelagerten Untereinheit a und zwei Kopien von b detektiert [2–6], wobei die Anzahl der c-Untereinheiten von Spezies zu Spezies variierte. Bei der mitochondrialen ATP-Synthase aus Hefe wurden 10 Kopien [3], bei *Ilyobacter tartaricus* 11 [4,7], bei *Spinacia oleracea* 14 [2] und bei dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* 15 Kopien detektiert. Indirekte Methoden durch gentechnisch fusionierte c-Untereinheiten deuten bei *Escherichia coli* und bei dem thermophilen *Bacillus PS3* auf eine Kopienzahl von 12 bzw. 10 [8,9] hin.

Die NMR-Struktur einer einzelnen c-Untereinheit, wegen ihrer Hydrophobizität auch Proteolipid genannt, zeigt zwei antiparallele α -Helices, welche über eine kurze polare Schleife miteinander verbunden sind und eine Art Haarnadel formen [10]. Die Konformation der C-terminalen Helix ist zudem pH-abhängig und zeigt bei pH 5 eine eher gestreckte, bei pH 8 eine abgewinkelte Struktur [11]. In der hochaufgelösten Struktur des Proteolipidringes aus *Ilyobacter tartaricus* ist diese Helix nach außen orientiert, wohingegen die N-terminale Helix in die Kavität des Ringes weist. Die polaren Schleifen der c-Untereinheiten zeigen zur Kontaktstelle des F_1 -Teilkomplexes und vermitteln hier die Bindung zwischen dem Proteolipidring und der γ -Untereinheit bzw. ϵ -Untereinheit [3]. Diese drei Untereinheiten werden auch als Rotor bezeichnet und drehen sich während der Katalyse relativ zu den übrigen, als Stator zusammengefassten Untereinheiten des F_o - und F_1 -Teilkomplexes [12].

Die zweite Verbindung zwischen F_1 und F_o wird im Falle des bakteriellen Enzyms durch das Dimer der beiden langgestreckten, α -helikalen b-Untereinheiten ermöglicht, welche auch als periphärer Stiel bezeichnet werden [13,14]. Die Struktur dieses Dimers kann in drei Bereiche eingeteilt werden. Der hydrophobe N-Terminus, welcher die ersten 34 Aminosäurereste umfasst, ist in der Membran verankert und bildet Kontakte zu der a-Untereinheit aus. Die α -helikale Struktur dieses Teiles konnte durch NMR-Experimente bestimmt werden [15]. Es schließt sich ein Bereich an, welcher für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten wichtig ist [16] und eine *coiled-coil*-Struktur ausbildet [17]. Der C-Terminus dagegen interagiert mit den Untereinheiten α und δ des F_1 -Teilkomplexes [18,19].

Von Untereinheit a sind bisher keine Strukturdaten bekannt. Durch Sekundärstrukturvorhersagen und Markierungsversuche in *E. coli* konnten fünf membrandurchspannende Helices identifiziert werden. Der N-Terminus ist zum Periplasma, der C-Terminus zum Cytoplasma orientiert [20].



1.1.2 F₁-Komplex

An dem membranassoziierten F₁-Teilkomplex findet die katalytische Umsetzung von ADP und Phosphat zu ATP bzw. die Rückreaktion statt. Der Komplex besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten, die nach abnehmendem Molekulargewicht mit α , β , γ , δ und ϵ bezeichnet werden und speziesunabhängig in einer Stöchiometrie von 3:3:1:1:1 vorkommen [21]. Im Gegensatz zum F_o-Teilkomplex konnte die Struktur fast vollständig aufgeklärt werden.

Mitte der 1990er Jahre wurde die $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Kernstruktur aus Rinderherzmitochondrien gelöst [22]. Weitere Strukturuntersuchungen an verschiedenen Spezies wie Hefe [3], Spinat [23,24] und Prokaryonten [25,26] belegten dann den hohen Grad an struktureller und funktioneller Konservierung.

Die Untereinheiten α und β sind alternierend in einem pseudohexagonalen Komplex angeordnet, in dessen Kavität Teile der langgestreckten γ -Untereinheit ragen [22]. α und β gleichen sich in ihrem groben Aufbau und können in je drei verschiedene Bereiche unterteilt werden. Auf einen α -helikalen Bereich am C-Terminus, der zum F_o-Teilkomplex orientiert ist, folgt ein zentraler Abschnitt bestehend aus α -Helices und β -Faltblättern. Hier sind auch die Nukleotidbindestellen lokalisiert, welche an den Kontaktflächen der α - und β -Untereinheiten liegen und durch sogenannte Walker-A-Motive (*P-loop*) gebildet werden. Aus den sechs Kontaktflächen ergeben sich sechs Nukleotidbindestellen, welche in je drei katalytische und drei nicht katalytische Bindestellen differenziert werden können. Die katalytischen Bindestellen werden zum größten Teil von den β -Untereinheiten gebildet, die katalytisch nicht aktiven von den α -Untereinheiten. Zudem besitzen die katalytischen Stellen einen Glutamatrest, der die korrekte Koordination des an der Katalyse beteiligten Wassers vermittelt und den nicht katalytischen Bindestellen fehlt [27]. Der N-terminale Bereich der Untereinheiten ist schließlich durch β -Faltblätter charakterisiert.

Die γ -Untereinheit besteht aus zwei antiparallelen α -helikalen Bereichen am N- und C-Terminus, die sich zu einer *coiled-coil*-Struktur zusammenlagern. Mit diesem Teil ragt die Untereinheit in das $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer hinein [28]. Der übrige Bereich der γ -Untereinheit enthält α -helikale Elemente sowie β -Faltblattstrukturen, die an der Interaktion mit der ϵ -Untereinheit und des Proteolipidringes beteiligt sind [3,29]. Die chloroplastidäre Untereinheit besitzt zudem eine regulatorische Sequenz, die die sogenannte Thiolmodulation des pflanzlichen Enzyms durch Thioredoxin vermittelt. Strukturelle Daten dieser



Modulation sind bisher aber nicht bekannt. Die γ -Untereinheit wird zusammen mit der ε -Untereinheit auch als zentraler Stiel bezeichnet.

Die Struktur der bakteriellen ε -Untereinheit konnte durch röntgenkristallographische und spektroskopische Experimente aufgeklärt werden und zeigt eine Unterteilung in zwei Domänen [28–31]. Der N-terminale Bereich ist durch eine sogenannte β -Sandwich-Struktur gekennzeichnet, welche die Bindung zur γ -Untereinheit vermittelt [32,33]. Der C-Terminus besteht aus zwei α -Helices, welche entweder in einer zusammengefalteten oder einer langgestreckten Form existieren. Die Orientierung wird von Katalyseparametern, wie z. B. dem elektrochemischen Potential oder der Nukleotidkonzentration, beeinflusst und man beschreibt die Funktion der ε -Untereinheit als Schalter zwischen Hydrolyse und Synthese [34–36].

Die δ -Untereinheit ist Teil des peripheren Stiels und erfüllt strukturelle Aufgaben, indem sie über Wechselwirkungen mit den b-Untereinheiten und der α -Untereinheit die Kopplung des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers mit den Statoruntereinheiten des F_o -Komplexes vermittelt. Die N-terminale Domäne konnte spektroskopisch aufgeklärt werden und besteht aus sechs zu einem Bündel zusammengelagerten α -Helices [37]. Diese Domäne interagiert im intakten Komplex mit dem N-Terminus der α -Untereinheit, was durch die röntgenkristallographische Strukturaufklärung des mitochondrialen, peripheren Stiels bestätigt wurde [38].

1.2 Katalytischer Mechanismus

Analog der strukturellen Unterteilung in F_o - und F_1 -Teilkomplex kann die katalytische Arbeitsweise des Gesamtkomplexes in Protonentranslokation und Nukleotidumsetzung differenziert werden.

1.2.1 Protonentranslokation

Die elektrochemische Potentialdifferenz, welche durch die oxidative Phosphorylierung oder photosynthetische Elektronentransportreaktionen entsteht, liefert die treibende Kraft der ATP-Synthese. Die Translokation von Protonen über die Membran erzeugt vermutlich eine Drehung des Proteolipidringes relativ zur Untereinheit a. Ein Modell dieser Interaktion ist in Abbildung 1.2 A dargestellt. Durch einen Halbkanal in der a-Untereinheit gelangen Protonen zur Untereinheit c, wodurch der Aspartatrest 61 protoniert wird. Eine Konformationsänderung der C-terminalen Helix treibt durch sterische



Interaktionen mit dem kristischen Argininrest 210 der α -Untereinheit die Rotation des Proteolipidringes an. Nach einer kompletten Drehung des Proteolipidringes wird die c -Untereinheit wieder deprotoniert und das Proton durch einen Halbkanal auf die andere Membranseite geschleust [11, 39]. Die mit der Protonentranslokation verbundene Rotation des Proteolipidringes durch eine elektrochemische Potentialdifferenz konnte direkt beobachtet werden [40] und verläuft, vom Lumen aus betrachtet, im Uhrzeigersinn.

Entsprechende Beobachtungen der Drehung des c -Multimers durch ATP-Hydrolyse belegen die enge Kopplung zwischen Protonentranslokation und Nukleotidumsetzung [41–44] und unterstreichen die Bedeutung der Rotation als zentralen, katalytischen Mechanismus.

1.2.2 Nukleotidumsetzung

Durch die Protonentranslokation und die damit verbundene Rotation des Proteolipidringes und der γ -Untereinheit werden Konformationsänderungen im $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer, vornehmlich in der β -Untereinheit, erzeugt, welche die mechanistische Grundlage der Nukleotidumsetzung sind. In dem von Boyer vorgeschlagenen *binding-change*-Mechanismus [45, 46], der durch die Strukturauflösung des mitochondriellen F_1 -Teilkomplexes [22] unterstützt wurde, nehmen die drei katalytischen β -Untereinheiten verschiedene Konformationen ein und zeigen unterschiedliche Substrataffinitäten. Die Asymmetrie der β -Untereinheiten wird durch die zentrale γ -Untereinheit bestimmt, welche durch ihre Rotation die sequentielle Umwandlung der Katalysezentren steuert. Dabei durchläuft jede katalytische Nukleotidbindestelle der β -Untereinheiten während einer Drehung um 360° folgende Konformationen: β_{DP} (fest), β_{TP} (locker) und β_E (offen). Die Energie wird nicht direkt zur Umsetzung von ADP und Phosphat zu ATP benutzt, sondern für die Freisetzung des festgebundenen Produktes aufgewendet. Durch die Strukturaufklärung von katalytischen Zwischenstufen kann der zyklische Ablauf mittlerweile auf atomarer Ebene nachvollzogen werden [1, 47–49] und ist in Abbildung 1.2B für die ATP-Hydrolyse schematisch dargestellt. In Abhängigkeit von der Substratkonzentration variiert die Zahl der gleichzeitig besetzten, katalytischen Bindungsstellen zwischen eins (*uni-site*), zwei (*bi-site*) und drei (*tri-site*) [50]. Neuere Rotationsexperimente unterstützen dabei im nano- bis millimolaren ATP-Konzentrationsbereich einen *bi-site*-Mechanismus [51].

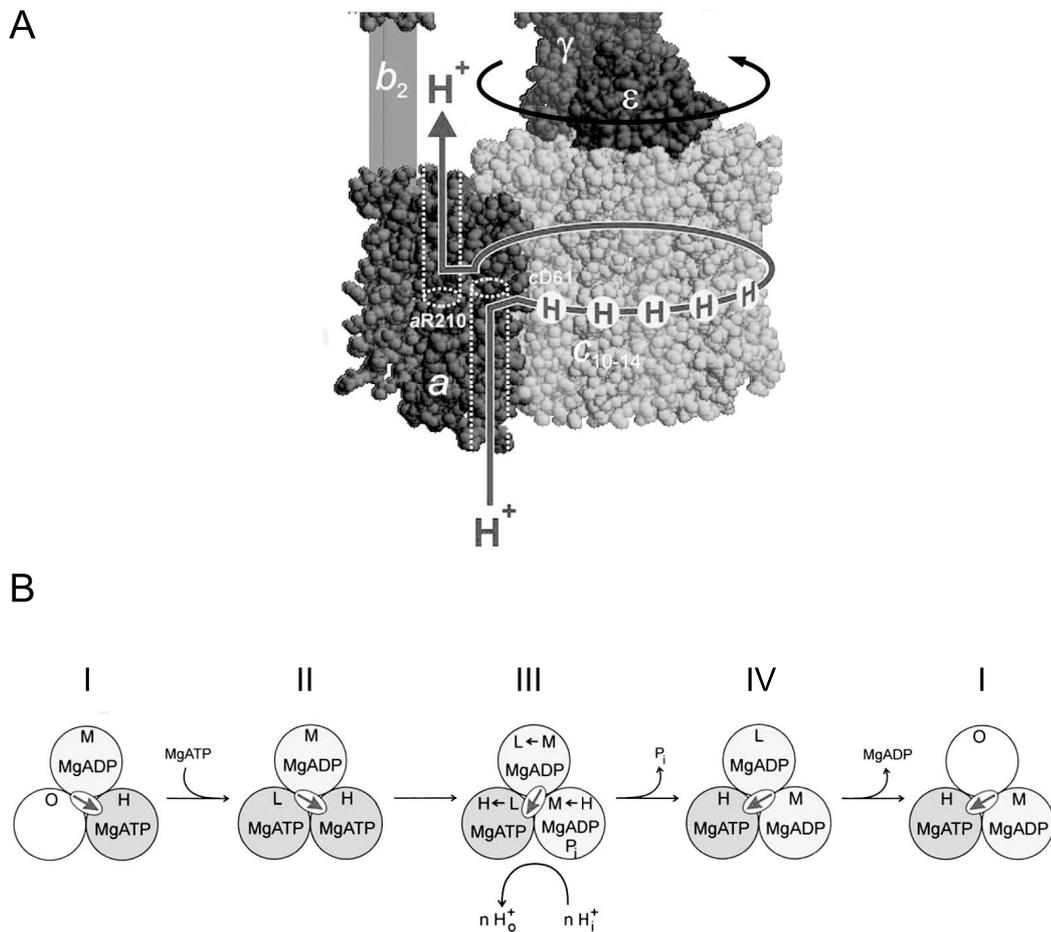


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der katalytischen Mechanismen. (A) Modell der Protonentranslokation durch den F_0 -Teilkomplex. Protonen passieren einen Halbkanal in Untereinheit a, protonieren den Aspartatrest 61 einer c-Untereinheit, welche durch Konformationsänderung der C-terminalen Helix den Proteolipidring um eine c-Untereinheit weiter dreht. Nach einer ganzen Umdrehung gibt dieser Aspartatrest 61 das Proton an einen anderen Halbkanal der a-Untereinheit ab und steht für die erneute Protonierung zur Verfügung. (B) Sequentielle Umwandlung der drei katalytischen Nukleotidbindestellen im F_1 -Teilkomplex während der ATP-Hydrolyse. Die Bindestellen sind als Kreise, die Orientierung der γ -Untereinheit als Elipse mit Pfeil dargestellt. Katalytische Konformationen sind mit O, offen; H, hohe Affinität; M, mittlere Affinität; L, niedrigste Nukleotidaffinität bezeichnet. Nach Bindung von ATP in der offenen Stelle (I \rightarrow II) erfolgt die Drehung der γ -Untereinheit um 90° . Dabei findet die ATP-Hydrolyse in der Bindungstasche H statt (II \rightarrow III). Nach Freisetzung von Phosphat und einer weiteren Drehung von γ um 30° (III \rightarrow IV) folgt die Freisetzung von ADP und die Rückführung in den Ausgangszustand (IV \rightarrow I); modifiziert nach [1].



1.2.3 Rotation

Die Rotation als zentrale Grundlage der Katalyse von F_0F_1 -ATP-Synthasen wurde erst über biochemische und spektroskopische Experimente indirekt nachgewiesen [52–55], später durch die direkte Beobachtung der Drehbewegung eindrucksvoll gezeigt [56]. Dabei wurde der F_1 -Komplex über die β -Untereinheiten auf einem Objektträger immobilisiert. Bei Anwesenheit von ATP konnte die unidirektionale Rotation eines an die γ -Untereinheit gekoppelten Aktinfilaments über Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Abbildung 1.3 A und B). Versuche mit F_1 -Teilkomplexen aus anderen Spezies zeigten, dass die Rotation ein konservierter Arbeitsmechanismus der F_0F_1 -ATP-Synthase ist [57–60]. Durch Verbesserungen im experimentellen Aufbau gelang die Auflösung der Rotation in 120° -Schritten [61], welche später in Teilschritte von 90° und 30° differenziert werden konnten [62–64]. Dabei treibt die Bindung von ATP den ersten Teilschritt um 90° , die Freisetzung des Phosphates den 30° -Teilschritt [64]. Beide Teilschritte werden durch zwei ca. 1 ms lange Ereignisse separiert (Abbildung 1.3 C und D), wobei die Hydrolysereaktion von ATP mit keiner Drehung verbunden ist. Die Schrittgeschwindigkeit ist unabhängig von der ATP-Konzentration, was einem einheitlichen Reaktionsmechanismus von nanomolaren bis sättigenden Substratkonzentrationen mit einem konstanten Drehmoment von ca. 40 pN nm [51] entspricht. Damit liegt der Wirkungsgrad der durch den Komplex geleisteten Arbeit pro 120° -Schritt im Vergleich mit der freien Energie eines ATP-Moleküls unter *in vivo*-Bedingungen bei ca. 100 % [61,65].

Der direkte Beweis der Kopplung von Rotation und ATP-Hydrolyse bzw. -Synthese gelang mit dem Einsatz magnetischer Kugeln, welche an die γ -Untereinheit gebunden, die mechanische Drehung dieser Untereinheit durch Elektromagnete ermöglichte. In Abhängigkeit der Drehrichtung konnte die ATP-Synthese bzw. ATP-Hydrolyse durch Messung der Substratkonzentration festgestellt werden [65,66].

1.3 Regulation

Die Energie zur Synthese von ATP durch die F_0F_1 -ATP-Synthase wird über die elektrochemische Potentialdifferenz bereitgestellt [67], wobei die Aktivität des chloroplastidären Enzyms von verschiedenen Parametern beeinflusst wird. So regulieren der transmembrane Protonengradient, der Redoxzustand der γ -Untereinheit, der intrinsische Inhibitor ϵ sowie die Nukleotidbeladung die Reaktionsgeschwindigkeit. Zusätzlich verändern exogene Stoffe wie z. B. Phytotoxine die Aktivität des F_0F_1 - bzw. F_1 -Komplexes.

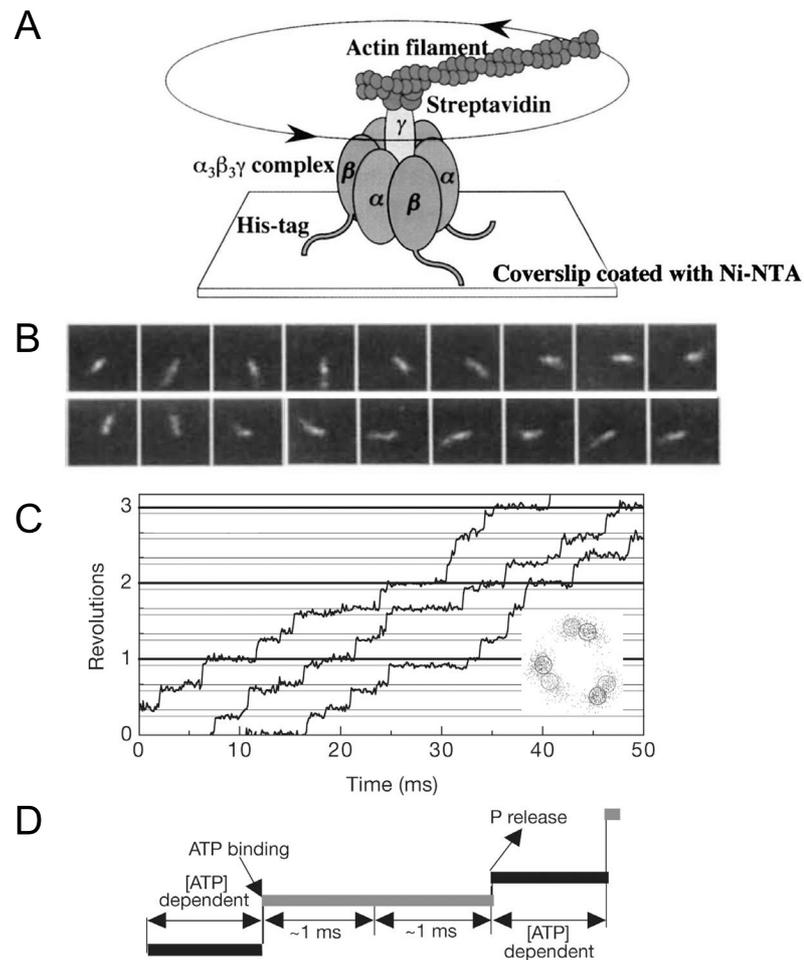


Abb. 1.3: Prinzip und Datenanalyse von Rotationsexperimenten. (A) Schematischer Versuchsaufbau der Einzelmolekülexperimente. Der katalytische Teilkomplex ist über Histidinreste auf einem Objektträger immobilisiert und ein Aktinfilament über eine Biotin-Streptavidin-vermittelte Kopplung mit der γ -Untereinheit verbunden. (B) Einzelbilder der unidirektionellen Rotation eines Aktinfilamentes während der ATP-Hydrolyse des immobilisierten F_1 -Komplexes mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 0,5 U/s. Die Filamentlänge beträgt 2,6 μm , die ATP-Konzentration 2 mM [56]. (C) Schrittweise Rotation bei niedrigeren ATP-Konzentrationen (20 μM), höherer zeitlicher Auflösung und kleinen, an die γ -Untereinheit gekoppelten Goldkugeln (40 nm Durchmesser). Graue Linien sind jeweils 30° unter den schwarzen Linien eingezeichnet. Das kleine Schaubild innerhalb der Graphik zeigt die Position der Goldkugel während der Rotation, wobei sechs bevorzugte Orientierungen im Abstand von 30° bzw. 90° auftreten. (D) Schema der Rotation. Bindung von ATP treibt die Rotation um 90° voran, wonach zwei ca. 1 ms Ereignisse folgen. Die anschließende Freisetzung von Phosphat ist für den 30°-Schritt verantwortlich [62, 64].



1.3.1 Endogene Faktoren

Der durch die Elektronentransportreaktionen induzierte Protonengradient aktiviert die F_0F_1 -ATP-Synthase wahrscheinlich über elektrostatisch bedingte Abstößungen zwischen dem F_0 - und F_1 -Komplex [68, 69].

Eine Regulationsmöglichkeit der Enzymaktivität ist die durch Thioredoxin vermittelte Thiolmodulation, welche bei bakteriellen und mitochondriellen F-ATPasen fehlt. Durch die Reduzierung der Disulfidbrücke zwischen γCys_{199} und γCys_{205} innerhalb der regulatorischen Sequenz von γ ist eine ATP-Synthese auch bei geringerem Protonengradienten möglich, was einer Hydrolyse von ATP bei schwacher Elektronentransportrate entgegenwirkt [70–73]. Der isolierte F_1 -Komplex zeigt dagegen nach Reduktion der Cysteine eine erhöhte Hydrolyseaktivität [72, 73], was in Einzelmolekülexperimenten mit der Abnahme der Anzahl und Länge von Rotationspausen verbunden war [74, 75].

Die ε -Untereinheit wird für den isolierten und membrangebundenen F_1 -Komplex als Inhibitor der ATP-Hydrolyse beschrieben, deren Ablösung durch Alkohole oder Detergenzien die Umsatzrate stark erhöht [76, 77]. Ohne ε ist die Synthese von ATP durch den F_0F_1 -Komplex nicht mehr möglich. Es wurden zwei Strukturen aufgeklärt, bei denen die Orientierung der α -helikalen Bereiche einmal kompakt und einmal langgestreckt und in Interaktion mit der 'DELSEED'-Sequenz der β -Untereinheit beschrieben wurde. In der langgestreckten Konformation findet ATP-Synthese, jedoch keine Hydrolyse statt. In der kompakten Form ist die Hydrolyse aktiviert, so dass ε auch als Schalter zwischen den beiden Katalyserichtungen bezeichnet wird [28, 29, 35, 36, 78].

Eine weitere Beeinflussung der Enzymaktivität erfolgt über die Nukleotidbeladung. Die ATPase kann während der Hydrolyse durch ADP inaktiviert werden, welches entweder aus dem Medium aufgenommen, oder nach der Hydrolyse nicht vom Komplex freigesetzt wurde [79–81]. In *bulk*-Experimenten ist demnach eine schnelle Anfangshydrolyse, in der noch keine ADP-inaktivierten Komplexe vorliegen, von einer langsameren *steady-state*-Phase zu unterscheiden. Während dieser Phase liegt das Enzym als Mischung von inhibierten und nicht inhibierten Molekülen vor. Die Besetzung der nicht katalytischen Nukleotidbindestellen wirkt dabei der ADP-Inhibierung ebenso entgegen [82–87] wie die Anwesenheit von Phosphat, wohingegen Azid die Inaktivierung verstärkt [80, 88, 89]. In Rotationsexperimenten konnte diese Inaktivierung langen Rotationspausen zugeordnet und mit Hilfe der mechanischen Drehung der γ -Untereinheit durch Einsatz magnetischer Kugeln sogar überwunden werden [90, 91].



1.3.2 Inhibitoren

Neben den beschriebenen Regulationsmöglichkeiten wird die chloroplastidäre F-ATPase selektiv von pflanzenspezifischen Inhibitoren in ihrer Aktivität beeinflusst. So inhibieren Dio-9 [92], Phloridzin [93] und Synthalin [94] die ATP-Synthese und -Hydrolyse.

Tentoxin, ein Toxin aus verschiedenen phytopathogenen Pilzen der *Alternaria*-Spezies, inhibiert die ATP-Hydrolyse des F_1 -Komplexes bzw. die ATP-Hydrolyse und die ATP-Synthese des F_0F_1 -Komplexes sensitiver Pflanzen wie Baumwolle, Kohl und Spinat [95–97]. Dabei vermittelt die Bindung eines Tentoxin-Moleküls die vollständige Inaktivierung der ATPase, wohingegen eine Überwindung der Inhibierung durch Bindung eines zweiten, möglicherweise dritten, Toxinmoleküls stattfindet. Im Fall des F_1 -Komplexes ist sogar eine Stimulierung von 200–300 % der Aktivität beschrieben [98–100]. Die Struktur des toxininhibierten Komplex konnte im Falle des chloroplastidären Enzyms aus *Spinacia oleracea* gelöst und die hochaffine Bindungsstelle bestimmt werden, welche in Abbildung 1.4 B dargestellt ist [24]. Tentoxin bindet im oberen Teil des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers an der Kontaktstelle zwischen α und β und bildet Wasserstoffbrücken zum Aspartat 83 der β -Untereinheit aus. Der Hauptteil der Bindungstasche liegt jedoch auf der α -Untereinheit, welche über hydrophobe Reste mit dem Toxin wechselwirkt (α Leu₆₃, α Leu₆₅, α Val₇₅, α Tyr₂₃₇, α Leu₂₃₈ und α Met₂₇₄). Durch gezielte Austausch von betreffenden Aminosäureresten konnte bei sensitiven Pflanzenspezies eine Tentoxin-Resistenz erzielt, bzw. resistente Spezies in sensitive umgewandelt werden [101–104]. In röntgenkristallographischen Strukturbestimmungen weist die β -Untereinheit des inhibierten Komplexes eine geschlossene Konformation, analog zu β_{DP} und β_{TP} des mitochondrialen Enzyms, auf. Die Stabilisierung dieser Konformation durch Bindung eines Toxinmoleküls unterbricht wahrscheinlich die sequentielle Umwandlung der Nukleotidbindestellen während der Katalyse [24, 105]. Ein anderer Mechanismus der Inhibierung könnte in der gestörten Kooperativität zwischen den katalytischen Bindestellen liegen [106]. Beide Modelle erklären die Tatsache, dass die *uni-site*-Hydrolyse unbeeinflusst bleibt [107]. Die Reaktivierung der F-ATPase durch die Bindung eines zweiten oder dritten Inhibitors ist dagegen noch weitgehend ungeklärt und von verschiedenen katalytischen Zuständen des Enzyms abhängig [99, 100, 108]. Bei ersten Versuchen im Einzelmolekülexperiment konnte unter hohen Konzentrationen an Tentoxin das Fehlen langer Pausen beobachtet werden, was mit einer Verminderung der ADP-Inaktivierung erklärt wurde [109]. Durch Aminosäureaustausch eines kritischen

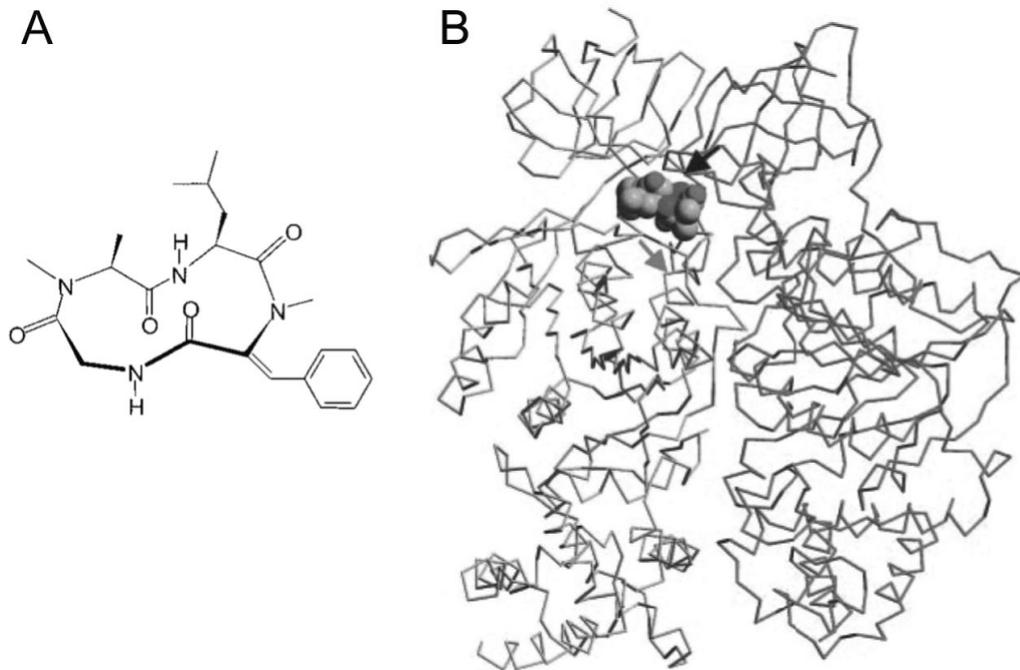


Abb. 1.4: Struktur der chloroplastidären F-ATPase komplexiert mit Tentoxin. (A) zeigt die Strukturformel des zyklischen Tetrapeptids Tentoxin (*cyclo*-[L-MeAla¹-L-Leu²-Me Δ^2 Phe³-Gly⁴]). (B) Darstellung des Peptidrückgrades eines α - β -Paares mit komplexiertem Inhibitor. Die Bindungstasche befindet sich an der oberen Kontaktstelle der Untereinheiten (α hellgrau, links; β dunkelgrau, rechts), wobei eine Arretierung durch Tentoxin stattfindet (angedeutet durch Pfeile) und die Transformation von der geschlossenen in die offene Konformation gehemmt wird.

Restes in der β -Untereinheit (β Ser₆₆Ala) war der verwendete bakterielle F₁-Komplex bedingt sensitiv gegenüber Tentoxin und zeigte eine 60%ige Inhibierung. Eine Reaktivierung des Komplexes mit einer höheren Aktivität, verglichen mit den unbehandelten Enzym, konnte hingegen nicht beobachtet werden, sondern nur eine partielle Aufhebung der Inhibierung [103].



1.4 Zielsetzung

Die Struktur und Funktionsweise der F_0F_1 -ATP-Synthase ist bis auf Teile des membranständigen F_0 -Komplexes recht gut charakterisiert. Hingegen ist die Regulation des chloroplastidären Enzyms komplex und weitgehend ungeklärt. So ist die molekulare Funktionsweise der Redoxregulierung noch nicht aufgeklärt und die Wirkweise von pflanzenspezifischen Inhibitoren sehr lückenhaft. Die einzige bekannte Struktur des pflanzlichen Enzyms mit gebundenem Inhibitor ist die des CF_1 -Komplexes mit Tentoxin [24].

In der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Regulation der chloroplastidären F_1 -ATPase durch Tentoxin untersucht und in Einzelmolekülexperimenten mit molekularen Ereignissen während der Katalyse verknüpft werden. Dabei sollten so Daten über die noch mechanistisch unverstandene Reaktivierung gewonnen werden.

Die Versuche sollten mit dem noch nicht in der Literatur beschriebenen F_1 -Komplex aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* durchgeführt werden, da hierfür ein System zur heterologen Expression in *E. coli* etabliert war und der BP_1 -Komplex die gleiche Sensitivität gegenüber Tentoxin aufwies wie das Enzym aus *Spinacia oleracea* (persönliche Mitteilung T. Hisabori). Durch freundliche Unterstützung von T. Hisabori wurde eine Mutante zur Verfügung gestellt, welche in Rotationsexperimenten charakterisiert werden konnte.

Aus der Kombination von biochemischen Experimenten und Einzelmolekülmessungen sollte ein Regulationsmodell der Inhibierung und Reaktivierung durch Tentoxin auf molekularer Ebene aufgestellt werden.



2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Ni-NTA-Superflow wurde von der Firma Qiagen, Hilden bezogen. Die in den Rotationsexperimenten verwendeten Maleimidderivate lieferte Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, USA, das SH-Silan Toshiba Silicones, GE Silicones, Wilton, USA. Die carboxylierten Kunststoffkugeln wurden von Polysciences, Inc., Warrington, USA bezogen, wohingegen EDC und Sulfo-NHS von Pierce, Rockford, USA stammten. Streptavidin lieferte Sigma Aldrich, St. Louis, USA, ebenso den Inhibitor Tentoxin. Das ATP-Derivat ATP γ S wurde von Fluka Riedel-de-Haën, Seelze bezogen. Das für die Nukleotidbestimmung verwendete ATP Biolumineszenz Assay Kit CLS II lieferte Roche Applied Science, Penzberg.

2.2 Biologisches Material

Der für die heterologe Expression des F₁-Komplexes benutzte Bakterienstamm BL21 (DE3) Δ unc (uncB–D) war ein durch Insertion veränderter Stamm, ausgehend von BL21 (DE3) (Genotyp: *E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻mb⁻) gal (DE3)). Durch die stabile Insertion einer Tetracyclinresistenz in das Bakteriengenom waren die Zellen dieses Bakterienstammes nicht in der Lage eine funktionsfähige ATP-Synthase zu exprimieren (BL21(DE3)unc Δ 702 (Tc^r, asnA::Tn10)) [110, 111].

In den Expressionsvektor pTR19 [112], der auf dem Vektor pTrc99A (Stratagene) basiert, wurde die Gensequenz des F₁-Komplexes von *Thermosynechococcus elongatus*(BP₁) mit den kodierenden Sequenzen für BP₁ α , BP₁ β _{His} (10 zusätzliche Histidinreste am N-Terminus) und BP₁ γ _{A125C/V222C} einkloniert. Expressionsstamm und Expressionsvektor (pTR BP_{1rot}) wurden freundlicherweise von Dr. T. Hisabori zur Verfügung gestellt.

2.3 Allgemeine Arbeiten

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Sterile Lösungen wurden entweder autoklaviert (20 min, 120 °C, 1,1 bar) oder sterilfiltriert (Rotrand Filter, 0,2 μ m, Schleicher & Schuell, Dassel).



2.3.1 Anzucht von *Escherichia coli* Bakterien

Festkulturen wurden durch Transfer der zur Verfügung gestellten Bakteriensuspension mit Hilfe einer sterilen Impföse auf eine Agar-Platte (LB-Medium, 1,5 % Agar Agar (w/v)) hergestellt. Das Medium enthielt als Selektionsmarker 12,5 % Tetracyclin (w/v). Im Anschluss wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Vorkulturen transferierte man etwas Zellmaterial einer einzelnen Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit 12,5 % Tetracyclin (w/v) und ließ die Kultur bei 37°C und 200 Upm auf einem Kulturschüttler (SM 30/ TH 30; Edmund Bühler) über Nacht inkubieren.

LB-Medium:	Tetracyclin:
10 g/l Bactotrypton	25 mg/ml Tetracyclin
5 g/l Hefeextrakt	gelöst in EtOH
5 g/l NaCl	
autoklaviert	sterilfiltriert

2.3.2 Transformationskompetente Zellen

Die Herstellung von transformationskompetenten *Escherichia coli* Zellen des Stammes BL21 (DE3)Δunc (uncB–D) wurde nach Hanahan [113] durchgeführt.

Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 200 Upm auf einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 15 min bei 2000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 30 ml RF_I-Puffer resuspendiert, eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (4°C, 15 min, 2000 g). Nach Resuspension in 10 ml RF_{II}-Puffer und 15 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert.

RF _I -Puffer:	RF _{II} -Puffer:
100 mM RbCl	10 mM RbCl
50 mM MnCl	10 mM MOPS
30 mM Kaliumacetat	30 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	15 % Glycerin (w/v)
mit HAc auf pH 5,8 eingestellt	mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt



2.3.3 Transformation

Nach der RbCl-Methode hergestellte, gefrierkompetente *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe der Hitzeschockmethode [113] mit Plasmid-DNA transformiert.

Dafür wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng DNA gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 60 sec. Nach 2 Minuten auf Eis wurde 250 µl LB-Medium zugesetzt und zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz 30 min bei 37 °C in einem Thermomixer geschüttelt (300 Upm, Thermomixer kompakt; Eppendorf). Danach wurde der Ansatz auf LB-Festkulturplatten ausgestrichen, welche als Selektionsmarker 100 µg/ml Ampicillin (w/v) und 12,5 % Tetracyclin (w/v) enthielten, und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [114] bestand aus einem 5 % igen Sammelgel und einem 12 % igen Trenngel. Zur Anwendung kamen Mighty Small Gele (8 × 10 cm, 0,75 mm Stärke) in Mighty Small Gelkammern (Mighty Small SE 250; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). Die Elektrophorese dauerte bei 25–30 mA durchschnittlich 2 h.

Sammelgel (2 ml):

5 % Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8 (v/v)

100 mM Tris/HCl pH 6,8

0,08 % SDS (w/v)

0,07 % APS (w/v)

1,5 µl/ml TEMED

Trenngel (5 ml):

12 % Acrylamid/ Bisacrylamid 30:0,8 (v/v)

600 mM Tris/HCl pH 8,8

0,16 % SDS (w/v)

0,03 % APS (w/v)

0,67 µl/ml TEMED

Laufpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % SDS (w/v)

2fach Probenpuffer:

100 mM Tris/HCl pH 6,8

2 % SDS (w/v)

0,02 % Bromphenolblau (w/v)

20 % Glycerin (w/v)

2 % beta-Mercaptoethanol (v/v)



2.3.5 SDS-Gelfärbung mit Silber

Ausgehend von der Versuchsvorschrift von Heukeshoven und Dernik [115] wurde das Protokoll wie folgt modifiziert. Das Polyacrylamid-Gel wurde 5 min in 50 ml Fixierer inkubiert und anschließend 5 min in Inkubator geschwenkt. Nach fünfmaliger Inkubation mit aufgekochtem bidest. Wasser für je 1 min, wurde das Gel dann 5 Minuten mit Silbernitratlösung behandelt. Nach Entfernung der Silberlösung und kurzer Wässerung entwickelte man das Gel in 50 ml Natriumcarbonatlösung. Durch Zusatz von 1/10 Volumen an Zitronensäure stoppte die Entwicklung. Zur Archivierung der entwickelten Gele, wurden diese mindestens 10 Minuten in bidest. H₂O geschwenkt und anschließend in EG-Puffer für 30 min inkubiert. Die so behandelten Polyacrylamid-Gele konnten nun zwischen zwei Geltrocknungsfolien gelegt und an der Luft über Nacht getrocknet werden.

Fixierer:

30 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Inkubator:

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

Silbernitratlösung:

0,1 % AgNO₃ (w/v)
0,07 % Formaldehyd (v/v), frisch zugesetzt

Natriumcarbonatlösung:

2,5 % Na₂CO₃ (w/v)
0,07 % Formaldehyd (v/v), frisch zugesetzt

Zitronensäure:

2,3 M Zitronensäure

EG-Puffer:

50 % EtOH (v/v)
2 % Glycerin (w/v)

2.3.6 SDS-Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Aufkochen des Gels in Coomassie-Lsg. für 5–8 Minuten färbte Proteine an, welche nach dem anschließenden Entfärben des Polyacrylamid-Gels in Entfärber (zwei bis dreimaliges Aufkochen und Austausch der Entfärbelösung) detektiert werden konnten.

Coomassie-Lsg.:

0,1 % Coomassie R-250 (w/v)
50 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Entfärber:

30 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)



2.3.7 Immunologische Analyse

Zur immunologischen Detektion von Untereinheiten oder Modifikationen des F₁-Teilkomplexes wurden die in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Dazu wurden vier Blotpapiere in Gelgröße in Transferpuffer geschwenkt und luftblasenfrei auf die Anode gelegt. Danach folgten die ebenfalls angefeuchtete Nitrocellulosemembran, das SDS-Polyacrylamid-Gel, welches vorher für 10 Minuten in Transferpuffer inkubiert wurde und abschließend vier angefeuchtete Blotpapiere. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Portran, Schleicher & Schuell, Dassel) wurde mit Hilfe einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Multiphor II Nova Blot, LKB, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) für 1 h bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm²) durchgeführt.

Durch eine optionale Ponceau-Färbung, der auf der Membran immobilisierten Proteine, konnte die Vollständigkeit des Transfers überprüft werden. Hierfür wurde die Membran kurz in Ponceau-Färbelösung geschwenkt und anschließend wieder mit bidest. Wasser abgespült. Transferierte Proteine konnten so angefärbt und mit einem Bleistift markiert werden.

Die selektive Markierung der immobilisierten Proteine erfolgte über eine antikörperspezifische Reaktion. Hierfür wusch man die Nitrocellulosemembran dreimal mit PBS-T für je 5 min und inkubierte sie anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindestellen über Nacht bei RT mit BSA-Puffer. Nachdem überschüssiges BSA durch zweimaliges Spülen mit PBS entfernt wurde, fand die Immunomarkierung im Falle der biotinylierten γ -Untereinheit mit dem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:7000; Pierce; verdünnt in PBS + 0,2% BSA) für 1 h bei RT statt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in PBS-T und einmal für 10 min in dest. Wasser inkubiert, wonach durch Schwenken in Entwicklerlösung die Farbreaktion der Alkalischen-Phosphatase die biotinylierte Untereinheit spezifisch markierte (Reaktionsschema siehe Abbildung 2.5). Das Waschen mit dest. Wasser stoppte die Farbreaktion.

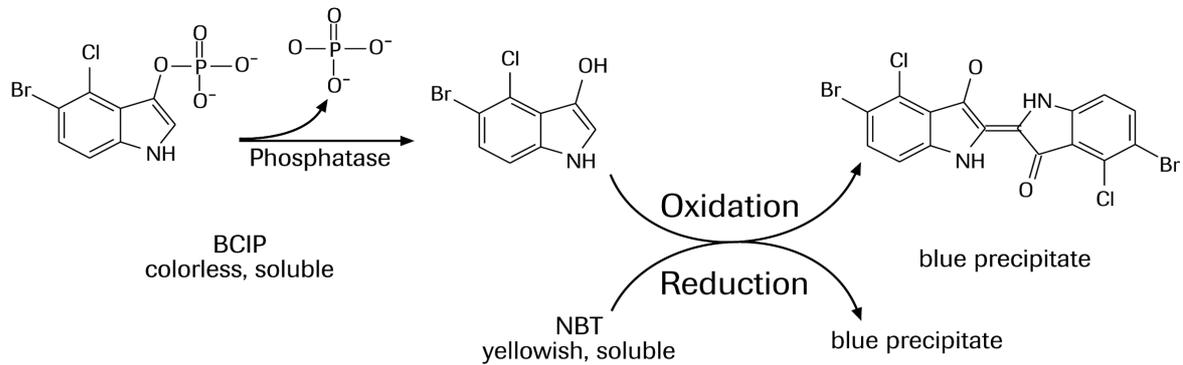


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Farbreaktion durch die antikörperassoziierte Alkalische-Phosphatase. Das farblose Substrat BCIP wird dabei durch die Streptavidin konjugierte Alkalische-Phosphatase dephosphoryliert und das entstehende Intermediat durch Reaktion mit NBT zum blauen Endprodukt oxidiert. Das hierdurch reduzierte NBT-Produkt ist ebenfalls blau und verstärkt die Farbreaktion (modifiziert nach Roche; 2003).

Transferpuffer:
 25 mM Tris
 150 mM Glycin
 20 % MeOH (v/v)
 0.1 % SDS (w/v)

PBS-T:
 0,1 % Tween 20 (v/v)
 in PBS-Puffer

Ponceau-Färbelsg:
 0,5 % Ponceau S (w/v)
 gelöst in 1 % Essigsäure (v/v)

PBS:
 8 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄
 0,24 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4 mit HCl eingestellt

Entwicklerlösung:
 100 mM Tris/HCl, pH 9,5
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 0,03 % NBT (v/v)
 0,02 % BCIP (v/v)

BSA-Puffer:
 2 % BSA (w/v)
 gelöst in PBS-T



2.4 Expression und Reinigung des katalytischen F_1 -Teilkomplexes von *Thermosynechococcus elongatus*

2.4.1 Expression

Der F_1 -Komplex ($\alpha_3\beta_3\gamma$) von *Thermosynechococcus elongatus* (BP_1) wurde mit Hilfe des Expressionsplasmids pTR BP_{1rot} , welches die Gene für $BP_1\alpha$, $BP_1\beta_{His}$ (10 Histidinreste am N-Terminus) und $BP_1\gamma_{A125C/V222C}$ beinhaltet, im Expressionsstamm BL21 (DE3) Δunc ($uncB-D$) exprimiert.

Dazu wurden zwei Reagenzgläser mit je 4 ml 2YT-Medium jeweils mit einer Kolonie der Festkulturplatte angeimpft und Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ als Selektionsmarker zugesetzt. Die Vorkultur wurde bei 37°C und 200 Upm auf einem Schüttelinkubator (SM 30/ TH 30; Edmund Bühler) 8 h kultiviert, um anschließend fünf mit Schikanen versehenen 5 l Erlenmeyerkolben mit je 2 l 2YT-Medium 1:2000 mit der Vorkultur zu inokulieren. Nach Zusatz von 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 0,2 mM IPTG schüttelten die Kulturen bei 37°C und 120 Upm 19 h lang. Durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 4°C und 5400 g (J2-21 Kühlzentrifuge, JA 10; Beckmann) wurden die Zellen sedimentiert und nach Resuspension in ca. 60 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und erneuter Zentrifugation von Mediumrückständen befreit. Das Zellmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert. Die Ausbeute betrug 15–20 g Zellmaterial.

2YT-Medium:	Ampicillin:	IPTG:
10 g/l Bactotrypton	100 mg/ml	1 M gelöst in bidest. H_2O
16 g/l Hefeextrakt	gelöst in bidest. H_2O	
5 g/l NaCl		
autoklaviert	sterilfiltriert	sterilfiltriert

2.4.2 Reinigung

Zur Präparation des F_1 -Komplexes resuspendierte man ca. 15 g Zellmasse in 75 ml eiskaltem Aufschlusspuffer, setzte 0,004% (w/v) PMSF zu und schloss die Zellen mit Hilfe einer French-Press-Zelle (Sim-Aminco FA-031-40K; Spectronic Instruments) bei 1300 psi auf. Nicht aufgebrochene Zellen sowie grobe Zelltrümmer wurden durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 Upm (Allegra 64, F-650, Beckmann Coulter) abgetrennt. In der folgenden Hitzedenaturierung, bei der der Überstand für 10 min bei 55°C in einem Wasserbad (SW 20c; Julabo) inkubiert wurde, aggregierte der



Hauptteil der *E. coli* Proteine und konnte anschließend bei 4°C und 14000 Upm (Allegra 64, F-650; Beckmann Coulter) für 20 min abzentrifugiert werden. Der hitzestabile F₁-Komplex hingegen verblieb nicht denaturiert im Überstand.

Dieser Überstand wurde anschließend in einer präparativen Metallchelate-Chromatographie eingesetzt und über spezifische Interaktionen der zusätzlichen 10 Histidine an den β -Untereinheiten (Deka-Histags) des F₁-Komplexes mit dem Säulenmaterial (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) die rekombinanten Proteinkomplexe weiter gereinigt. Dazu gab man den Überstand langsam (1 ml/min) über 15 ml Ni-NTA-Säulenmaterial, welches vorher mit 45 ml Aufschlußpuffer äquilibriert worden war. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 150 ml Puffer von der Säule gewaschen, die Elution der F₁Teilkomplexe erfolgte dann durch Zusatz von 45 ml Puffer mit 250 mM Imidazol. Das Volumen der Elutionsfraktion wurde in einem Ultrafiltrationskonzentrator (Amicon Ultra MWCO 100 kDa; Millipore) bei 20°C und 4000 g in einem Ausschwingrotor (Hettich Universal 32R) auf ca. 0,5 ml eingengt.

In der anschließenden Gelfiltration wurde die Proteinlösung auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte, selbst gepackte Säule (1 × 30 cm; Sephadex HR S300, Sigma) gegeben und bei einer Flussrate von 0,4 ml/min von Imidazol und dissoziierten Untereinheiten befreit. Dies geschah mit Hilfe eines HPLC-Systems (BioSys PP-2000; Beckmann) mit angeschlossenem Fraktionssammler (Sc 100; Beckmann). Proteinhaltige Fraktionen wurden gesammelt und in einem Ultrafiltrationskonzentrator (Amicon Ultra MWCO 100 kDa; Millipore) bei 20°C und 4000 g auf ca. 2 ml eingengt. Die Proteinlösung wurde mit Glycerin in einer Endkonzentration von 10% (v/v) versetzt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Aufschlußpuffer:

50 mM KPi pH 7,0

100 mM KCl

5 mM MgCl₂

50 mM Imidazol

PMSF:

1% PMSF (w/v)

gelöst in EtOH

Gelfiltrationspuffer:

50 mM HEPES/KOH pH 7,0

100 mM KCl

1 mM EDTA

2.5 ATPase-Aktivitätsmessungen

Zur Bestimmung kinetischer Parameter der katalytischen Reaktion des F₁-Komplexes der ATP-Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus* wurde die enzymatische Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat in *bulk*-Experimenten analysiert.



Hierbei konnte der Einfluß von Tentoxin und anderer Mediumzusätze bestimmt und mit den Werten der in den Rotationsexperimenten erhaltenen Daten verglichen werden.

Alle Reaktionen wurden soweit nicht anders angegeben, bei 25°C und 5 mM ATP durchgeführt. Bei Experimenten mit Inhibitor, wurde der F₁-Teilkomplex mindestens 5 Minuten vor den Messungen mit den angegebenen Konzentrationen an Inhibitor inkubiert und der entsprechende Reaktionspuffer ebenfalls mit gleicher Inhibitorkonzentration versetzt. Die Mg-abhängige ATPase-Aktivität wurde mit Hilfe eines ATP-regenerierenden System gemessen. Dabei wurde das entstandene ADP durch Pyruvatkinase unter Verbrauch von Phosphoenolpyruvat zu ATP umgesetzt und stand wieder für die Hydrolysereaktion zur Verfügung. Das in diesem Schritt entstandene Pyruvat wurde durch die Lactatdehydrogenase unter Oxidation von NADH zu Lactat umgesetzt. Die hydrolyseabhängige Oxidation von NADH konnte in einem Spektralphotometer (DU 640; Beckmann) aufgezeichnet werden.

In den Messungen, welche in einer Mikroküvette (100 µl; Hellma) stattfanden, wurden 55 µl Reaktionspuffer ARS und die angegebenen Konzentrationen an Inhibitor 2 min vor der Messung auf 25°C erwärmt und dann die Absorption bei 340 nm für ca. 30 sec aufgezeichnet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl F₁-Komplex (0,5–2 µg) gestartet und die Hydrolyse für 8–60 min untersucht.

Bei Versuchen mit ATPγS, welches in dem oben beschriebenen ATP-regenerierenden System zu ATP umgesetzt würde, erfolgte die Untersuchung der Hydrolyseaktivität über die photometrische Bestimmung von freiem Phosphat nach Taussky und Schorr [116]. Dazu wurden 80 µl des vortemperierten Reaktionspuffers PB mit ca. 10 µg F₁ vermischt und nach definierten Zeiten 20 µl Aliquots entnommen und mit dem gleichen Volumen an eiskalter TCA-Lösung vermischt. Durch Zusatz von 20 µl Farbreagenz und einer 1 minütigen Inkubation bei 37°C konnte die Menge an freiem anorganischem Phosphat dann photometrisch bei 740 nm bestimmt werden.

In ATP-Hydrolysemessreihen bei erhöhten Temperaturen oder ADP-Zusatz wurde die Hydrolyseaktivität des F₁-Komplexes ebenfalls durch Bestimmung der Phosphatfreisetzung untersucht.



Reaktionspuffer ARS:
 50 mM HEPES/KOH pH 8,0
 100 mM KCl
 5 mM MgCl₂
 5 mM ATP
 0,2 mM NADH
 2 mM Phosphoenolpyruvat
 7 U Pyruvatkinase
 10 U Laktatdehydrogenase

TCA-Lösung:
 1 M Trichloressigsäure (w/v)
 in bidest. H₂O

Reaktionspuffer PB:
 50 mM Tris/HCl pH 7,8
 100 mM KCl
 5 mM ATPγS oder ATP
 5 mM MgCl₂

Farbreagenz:
 50 mg/ml FeSO₄ · 7 H₂O
 1,6 % Ammoniumheptamolybdat (w/v)
 50 mM H₂SO₄

2.6 Bestimmung der im Komplex gebundenen Nukleotide

Der F₁-Teilkomplex verfügt über sechs Nukleotidbindestellen, wobei sich drei auf den β-Untereinheiten befinden und an der Katalyse direkt beteiligt sind. Die anderen drei nichtkatalytischen Bindestellen befinden sich an den Kontaktstellen der α- und β-Untereinheiten und haben strukturelle und/oder regulatorische Eigenschaften [22].

Die Bestimmung der im Komplex gebundenen Nukleotide an den Nukleotidbindestellen des F₁-Komplexes während der *steady-state*-Hydrolyse wurde in drei Schritten durchgeführt. Nach der Entfernung des nicht gebundenen ATP erfolgte die Säurefällung des Enzyms und Freisetzung der gebundenen Nukleotide. Im dritten Schritt wurden mit Hilfe der Luziferase-Reaktion die freigesetzten Nukleotide quantifiziert. Im Gegensatz zur in der Literatur beschriebenen Methode der Entfernung von nicht gebundenen ATP durch 2–3 maliges Passieren einer Entsalzungssäule [117] wurde in dieser Arbeit der F₁-Komplex an einer Ni-NTA-Matrix immobilisiert und die Entfernung des ATP über Waschung der Matrix erzielt. Hierdurch gelang eine vollständige Entfernung der nicht gebundenen Nukleotide, bei gleichzeitig niedrigem Proteinverlust, so dass das Signal-Hintergrund-Verhältnis erheblich verbessert werden konnte.

Gereinigter BP₁-Komplex wurde zur Entfernung von EDTA über eine PD10-Säule (PD10-Sephadex G25 M; Amersham Bioscience) in Bindepuffer umgepuffert. Die Proteinlösung wurde nun mindestens 30 min bei RT mit äquilibriertem Ni-NTA-Superflow inkubiert und nicht gebundene Proteine durch Waschung mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer entfernt. Durch den Zusatz von einem Volumen Bindepuffer erhielt man eine pipettierbare Suspension von immobilisiertem F₁-Komplex.



Die Hydrolysereaktion wurde durch Zusatz von 35 μl dieser BP_1 -Suspension zu 65 μl Reaktionsmedium gestartet und für 7–8 Minuten bei RT durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde dann in einem Zentrifugationssäulchen mit Fritte (QIAprep Zentrifugationssäulchen; Qiagen, bei denen die Silika-Gel-Membran entfernt wurde) bei 1300 g für 15 sec zentrifugiert und so der immobilisierte F_1 -Komplex von Reaktionsmedium befreit. Durch zweimaliges Waschen mit 350 μl Reaktionspuffer ohne ATP und anschließendes Waschen mit Waschpuffer wurde unspezifisch gebundenes ATP entfernt. Anschließend wurde die mit F_1 -Komplex beladene Ni-NTA-Matrix 30 min mit 100 μl 3 M HClO_4 auf Eis inkubiert. Die säurekatalysierte ATP-Hydrolyse durch HClO_4 ist aufgrund der Stabilität von ATP (in starken Säuren und 0°C einige Stunden) vernachlässigbar [118]. Nach Zentrifugation wurde das Eluat, welches nun die freigesetzten Nukleotide enthielt, durch Zusatz von 100 μl 3 M KOH und 50 μl 1 M HEPES/KOH pH 8,0 neutralisiert und bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung der im Reaktionsansatz immobilisierten Enzymmenge wurde die im Zentrifugationsröhrchen befindliche Ni-NTA-Matrix nach dem dreimaligen Waschen anstatt mit HClO_4 , mit 100 μl Imidazolpuffer für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration nach Bradford laut Herstellerangaben (Bio-RAD Protein Assay; Bio RAD) im Eluat bestimmt (ca. 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Gefälltes KClO_4 im neutralisierten Eluat wurde durch 5 minütige Zentrifugation bei RT und 14000 g sedimentiert. 30 μl des Überstandes ($\ddot{\text{U}}_I$) wurden mit 30 μl H_2O verdünnt und jeweils 10 μl für die ATP-Bestimmung eingesetzt. Für die Bestimmung des gebundenen ADP wurden 30 μl $\ddot{\text{U}}_I$ mit 45 μl PK-Puffer versetzt und für 1 h bei RT inkubiert, so dass das ADP, welches bei der vorangegangenen ATP-Bestimmung von $\ddot{\text{U}}_I$ nicht detektiert wurde, in ATP umgesetzt werden konnte. Nach 5 minütiger Hitzeinaktivierung bei 90°C wurde denaturierte Pyruvatkinase abzentrifugiert (5 min, 14000 g, RT) und so Überstand II ($\ddot{\text{U}}_{II}$) erhalten. 10 μl $\ddot{\text{U}}_{II}$ wurden mit 30 μl H_2O verdünnt und jeweils 10 μl für die Messung eingesetzt.

Die Bestimmung der gebundenen Nukleotide erfolgte über das Luziferin-Luziferase-System (ATP Biolumineszenz Assay Kit CLS II; Roche). Hierbei katalysiert das Enzym Luziferase aus *Photinus pyralis* die oxidative Decarboxylierung von D-Luziferin (Abbildung 2.6). Die ATP-abhängige Reaktion erfolgt unter Emission von Licht, welche bei niedrigen ATP-Konzentrationen direkt proportional zur ATP-Konzentration im Reaktionsansatz ist und so eine Quantifizierung selbst von sehr geringen ATP-Mengen ermöglicht (10^{-11} M, 10^{-15} mol ATP im Messansatz). 500 μl Puffer L und 50 μl Luziferase-Lsg.

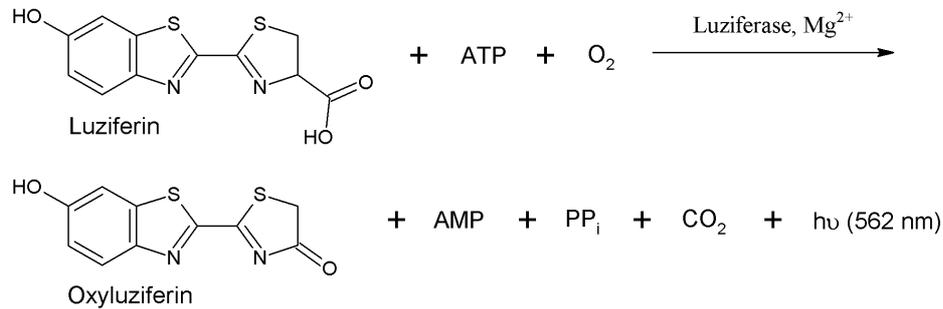


Abb. 2.6: Verlauf der Luziferase-katalysierten Oxidation von Luziferin unter Emmission von Licht (nach Roche, 2004).

wurden gemischt, das Signal mit einem Luminometer (LKB Wallac 1250) aufgenommen und mit einem angeschlossenen Schreiber (LBK Bromma 2210) aufgezeichnet. 10 μl verdünnter Überstand I oder II wurden zupipettiert und die Lumineszenz gemessen. Zur internen Kalibrierung wurden danach zweimal 5 μl einer 2 μM ATP-Lsg. zugesetzt und ebenfalls die Lumineszenz detektiert. Als Negativkontrolle und zur Detektion von unspezifisch an die Matrix gebundenen Nukleotiden, wurde in den voran beschriebenen Versuchen 1:1 verdünntes Ni-NTA-Superflow benutzt, welches nicht mit BP₁ beladen wurde.

Bindepuffer:
50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl

Reaktionsmedium:
50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl
5 mM MgCl₂
5 mM ATP

Waschpuffer:
50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM K₂SO₄
5 mM MgSO₄

Imidazol-Puffer:
0,5 M Imidazol pH 8,0
0,5 M NaCl

PK-Puffer:
10 mM HEPES/KOH pH 8,0
1 mM MgCl₂
2 mM Phosphoenolpyruvat
7 U Pyruvatkinase

Puffer L:
100 mM Tris/Acetat pH 7,75
2 mM EDTA



2.7 Rotationsexperimente

Der in diesen Experimenten verwendete Versuchsansatz basiert auf der von Noji et al. [56] entwickelten direkten Beobachtung der unidirektionalen Rotation der γ -Untereinheit während der ATP-Hydrolyse. In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen, konnte nach Fixierung des F_1 -Teilkomplexes auf einem Objektträger die hydrolyseabhängige Rotation von Kunststoffkugeln, welche an die rotierende γ -Untereinheit gekoppelt waren, mittels Phasenkontrastmikroskopie beobachtet werden.

2.7.1 Biotinylierung des F_1 -Komplexes

Die für die Rotationsexperimente nötige Kopplung von Protein und Kunststoffkugel erfolgte über eine Biotin-Streptavidin vermittelte Bindung. Dabei wurde die γ -Untereinheit des F_1 -Komplexes mit Biotin und die Kunststoffkugeln mit Streptavidin kovalent funktionalisiert (Abbildung 2.7).

Zur Aktivierung der Cysteinreste $BP_1\gamma_{C125}$ und $BP_1\gamma_{C222}$ wurden diese durch 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in DTT-Puffer reduziert. Dafür wurden nach der präparativen Metallchelate-Chromatographie 1–2 ml des gereinigten F_1 -Komplexes mit dem DTT-haltigen Puffer auf 2,5 ml verdünnt und über eine PD10-Säule (PD10-Sephadex G25 M; Amersham Bioscience) ein Pufferaustausch durchgeführt. Zur Entfernung des überschüssigen DTT und möglicher dissoziierter Untereinheiten reinigte man den F_1 -Komplex mit Hilfe einer Gelfiltrationsäule (Superdex 200 HR 10/30; Amersham Bioscience), welche mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert war. Die Elutionsfraktionen des F_1 wurden vereinigt, die Proteinkonzentration nach Bradford laut Herstellerangaben (Bio-RAD Protein Assay, Bio RAD) bestimmt und mit einem 5 molaren Überschuss an Biotin-Maleimid (Biotin-PEAC5-Maleimid; Dojindo) versetzt. In der 20 minütigen Inkubation bei RT wurde Biotin über die Cysteine $\gamma_{(C125/C222)}$ mit der γ -Untereinheit kovalent gebunden. Abschließend wurde der biotinylierte F_1 -Komplex über eine Gelfiltration (PD10 Sephadex G25 M; Amersham Bioscience) von überschüssigem Biotin-Maleimid befreit, mit 10 % Glycerin als Endkonzentration versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

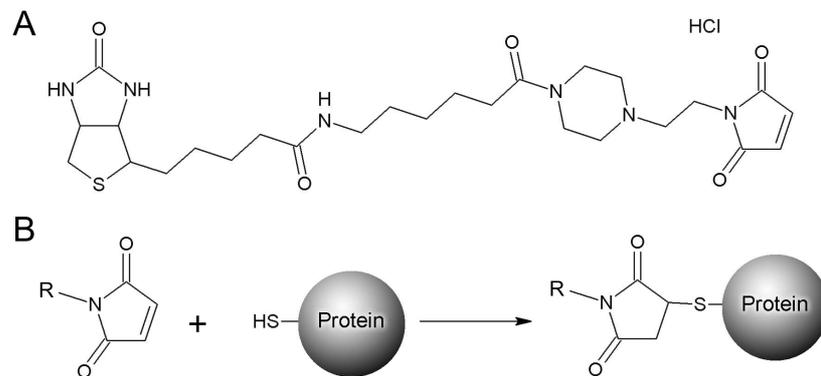


Abb. 2.7: (A) Strukturformel von Biotin-PEAC5-Maleimid, welches zur kovalenten Kopplung von Biotin an die rotierende γ -Untereinheit des F_1 -Komplexes verwendet wurde. (B) Schematische Darstellung der Reaktion der Maleimidgruppe des Biotin-PEAC5-Maleimid mit einem der beiden Thiolgruppen der γ -Untereinheit.

DTT-Puffer:
50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl
10 mM DTT

Gelfiltrationspuffer:
50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl

sterilfiltriert

2.7.2 Herstellung von Streptavidin-beschichteten Kunststoffkugeln

200 μ l einer 2,5 % igen Suspension von carboxylierten Kunststoffkugeln (Durchmesser 200 oder 350 nm; Polysciences Inc., USA) wurden dreimal durch Zentrifugation bei 9400 g, 15 min und 4 °C und anschließender Resuspension in je 500 μ l 50 mM MES/KOH pH 5,0 gewaschen. Die Kugeln wurden erneut in 500 μ l MES-Puffer resuspendiert, mit 250 μ l einer 20 mg/ml EDC-Lösung (Pierce) und 250 μ l einer 55 mg/ml Sulfo-NHS-Lösung (Pierce) gut gemischt und anschließend im Dunkeln 15 min bei RT geschwenkt. Hierbei reagierte die Carboxylgruppe mit dem Carbodiimid EDC zu einem O-Acylisoharnstoff-Intermediat welches mit einer Aminogruppe, z.B. von Streptavidin, zu einer Amidbindung weiterreagiert (Abbildung 2.8). Dementsprechend wurde nach dreimaliger Waschung der EDC behandelten Kugeln durch Zentrifugation und Resuspension in je 500 μ l 100 mM KP_i pH 8,0 die Kugeln in 250 μ l KP_i -Puffer resuspendiert und mit 250 μ l einer Streptavidin-Lösung (0,25 mg gelöst in KP_i -Puffer) gemischt und 2 h bei RT geschwenkt. Nach Zentrifugation und Resuspendierung in KP_i -Puffer, dem zuvor 30 mM Hydroxylamin zugesetzt wurde, reagierten die noch freien Acylisoharn-

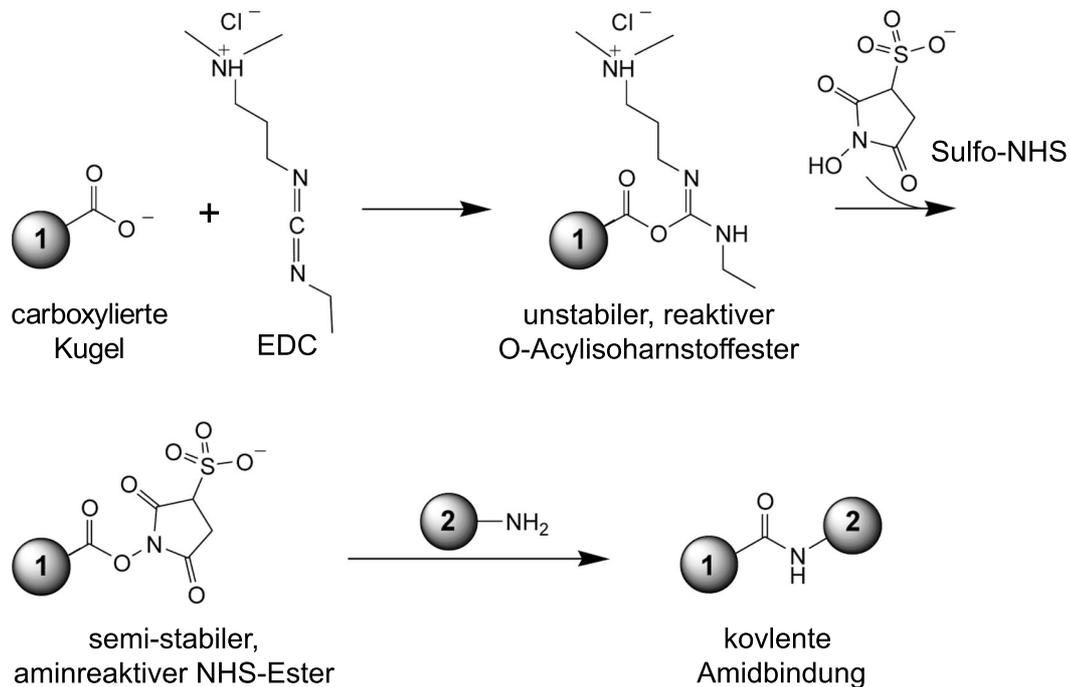


Abb. 2.8: Reaktionsverlauf der kovalenten Kopplung von Streptavidin an carboxylierte Kugeln. Im ersten Schritt reagiert die Carboxylgruppe der Kunststoffkugeln (1) mit dem Carbodiimid EDC zu einem O-Acylisoharnstoff-Intermediat welches durch Zusatz von Sulfo-NHS in einen semi-stabilen, aminreaktiven NHS-Ester überführt wird. Dieser reagiert mit einer Aminogruppe, z. B. von Streptavidin (2), zu einer stabilen Amidbindung. (Roche, 2003)

stoffgruppen mit dem Überschuss an Hydroxylamin. Nach 30 minütigem Schwenken bei RT wurden die Kunststoffkugeln mit 500 µl KP_i -Puffer gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 500 µl Puffer L aufgenommen und bei 4°C gelagert. Für Rotationsexperimente wurden die funktionalisierten Kugeln dreimal durch Zentrifugation (9400 g, 4°C, 15 min) und Resuspension in je 50 µl Puffer AB gewaschen.

Puffer L:
 100 mM KP_i pH 8,0
 0,1 % BSA (w/v)
 0,05 % Tween 20 (v/v)
 0,1 % NaN_3 (w/v)

Puffer AB:
 50 mM HEPES/KOH pH 8,0
 100 mM KCl
 0,2 mM MgCl_2
 0,1 % BSA (w/v)



2.7.3 Herstellung Nickel-NTA-beschichteter Glasplatten

Die Fixierung des F_1 -Teilkomplexes während der Rotationsexperimente wurde durch die Interaktion zwischen immobilisierten Nickel-Ionen und den zusätzlichen Histidinresten am N-Terminus der β -Untereinheit vermittelt. Die spontane Anheftung von F_1 -Komplexen über ionische Wechselwirkungen an nicht funktionalisierte Glasoberflächen wurde zwar schon in Rotationsexperimenten mit dem F_1 -Teilkomplex der chloroplastidären ATPase aus *Spinacia oleracea* ausgenutzt (Hisabori, 1999), doch der Anteil korrekt orientierter Proteinkomplexe, mit dem in diesem Versuchsteil beschriebenen System, war erheblich höher. Zudem lösten sich während der Beobachtungszeit von 5 Minuten weniger Komplexe von dem Objektträger, was die Datensammlung deutlich erleichterte.

24×36 mm Objektträgerglasplatten (Matsunami Glas Ind., Japan) wurden 2–3 Tage in 10 M KOH gelagert, mit Milli-Q-Wasser 10 mal gespült und dann in Silan-Puffer 3 h bei 60°C inkubiert. Nach Spülung mit Milli-Q-Wasser trockneten die Platten bei 120°C 1 h im Trockenschrank. Durch die einstündige Inkubation in 10 mM DTT bei RT wurden die SH-Gruppen reduziert. Nach Entfernen des DTT durch fünfmalige Spülung mit Milli-Q-Wasser reagierten diese Gruppen dann mit einer Maleimid-NTA-Lösung über Nacht bei RT. Die so kovalent gebundenen NTA-Gruppen wurden nach dreimaligem Waschen mit Milli-Q-Wasser bei abschließender Lagerung in 30 mM NiSO_4 mit Nickelkationen beladen (Abbildung 2.9). Für die Rotationsexperimente wurden die Glasplatten zehnmal mit Milli-Q-Wasser gespült und sorgfältig getrocknet.

Silan-Puffer:

50 % Ethanol (v/v)

1 % Essigsäure (v/v)

0,2 % (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (v/v)

Maleimid-NTA-Lösung:

2,5 mg/ml Maleimid-C3-NTA

50 mM KP_i pH 7,0

2,5 mM EDTA

50 % Ethanol (v/v)

2.7.4 Einzelmolekülexperimente

Für die Einzelmolekülmessungen wurden Beobachtungskammern hergestellt, welche aus einem mit Nickel-NTA-funktionalisierten Objektträger (24×36 mm), einem Deckglas (18×18 mm) und zwei 50 μm Abstandhalter bestanden (Abbildung 2.10). Dafür wurden aus 50 μm starker Kunststoffolie 2×30 mm große Rechtecke geschnitten, diese sehr

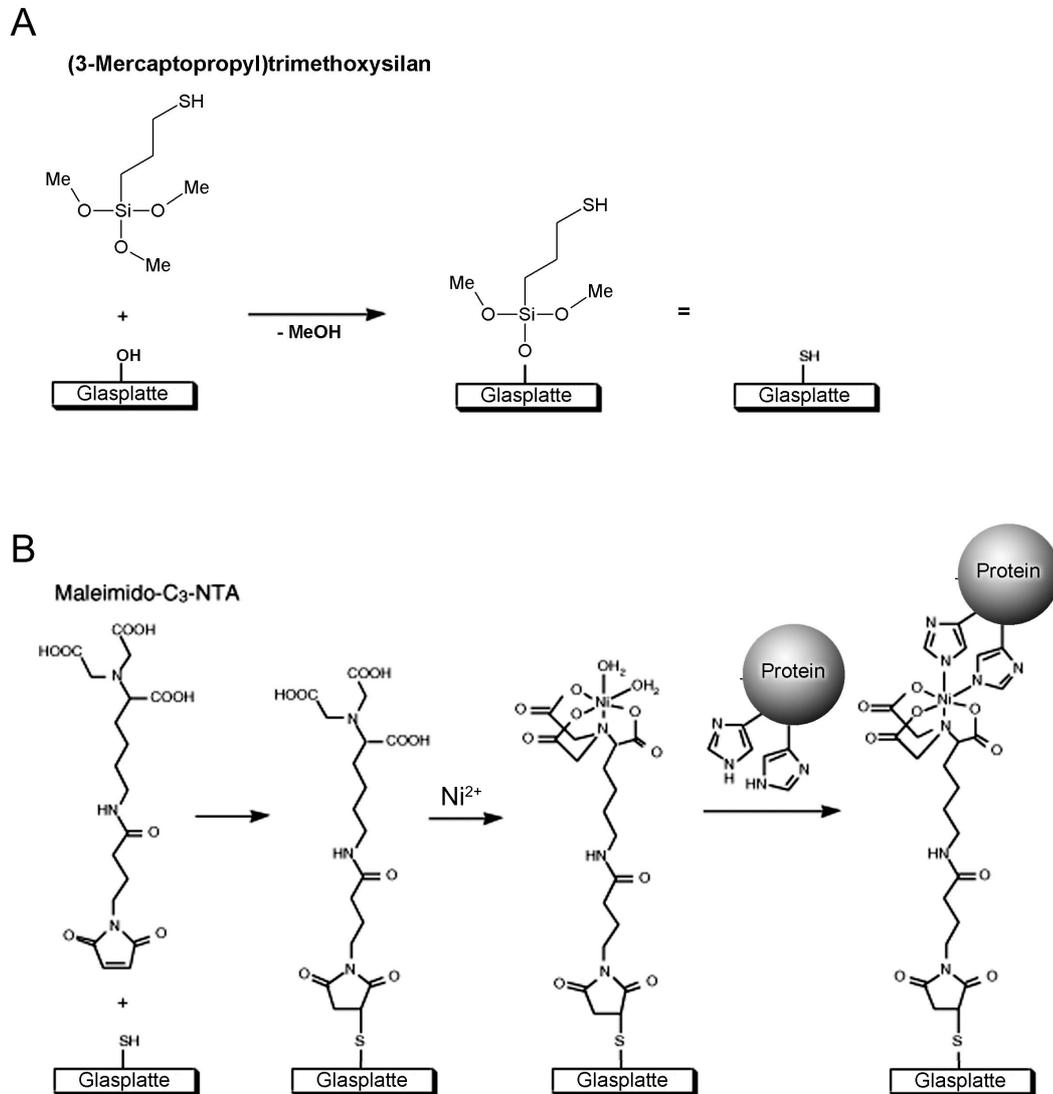


Abb. 2.9: Schematisch dargestellter Verlauf der Funktionalisierung von Glassplatten mit Nickel-NTA. In (A) ist die Silanisierung der Glasoberfläche mit (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan gezeigt, woran sich in (B) die kovalente Kopplung des Maleimid-C₃-NTA anschloß. Die NTA-Gruppen wurden durch Inkubation in NiSO₄ mit Nickelkationen beladen, so daß zum Zwecke der Rotationsexperimente F₁-Komplexe an die Glasoberfläche gebunden werden konnten (Dojindo, 1999).



dünn mit Vakuumfett bestrichen und im Abstand von ca. 10 mm längs auf den mit Ni-NTA funktionalisierten Objektträger gelegt. Nach Auflage des Deckgläschens auf die Abstandhalter, konnte durch Versiegelung der Längskanten mit einem schnell trocknenden Lack die Beobachtungskammer fertig gestellt werden. 15 μ l einer Suspension von biotinyliertem F₁-Komplex (0,08 μ M Endkonzentration verdünnt in Verdünnungspuffer) wurden in die Kammer pipettiert und nach zwei Minuten nicht anhaftende Komplexe mit 40 μ l Puffer A entfernt. Dabei wurde an einer der offenen Seiten der Beobachtungskammer mit einem Blotpapier die vorhandene Flüssigkeit abgesaugt und gleichzeitig auf der gegenüberliegenden Seite der entsprechende Puffer einpipettiert, so dass zu jeder Zeit die Beobachtungskammer mit Flüssigkeit gefüllt war. Anschließend wurden 15 μ l mit Streptavidin überzogene Kunststoffkugeln (200 oder 350 nm Durchmesser; Polysciences) einpipettiert. Nach 15 min wurden nicht anhaftende Kugeln mit 40 μ l Puffer A gewaschen und die Hydrolyse durch 15 μ l Reaktionspuffer gestartet. Bei Versuchen mit Inhibitorzusatz enthielt der letzte Waschpuffer und der Reaktionspuffer die angegebene Konzentration an Toxin, wobei nach Zusatz des Waschpuffers die Beobachtungskammer 30 min bei RT inkubiert wurde. Die Rotation wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (IX-70; Olympus, Tokyo) beobachtet und mit Hilfe einer CCD-Kamera (ICCD-350F, Video Scope, USA) auf 8 mm Videoband aufgezeichnet. Die Daten wurden mit den Programmen CREST Image und Stepviewer (von Dr. R. Yasuda zur Verfügung gestellt) ausgewertet.

Verdünnungs-Puffer:

50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl
0,1 % BSA (w/v)

Puffer A:

50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl
0,2 mM MgCl₂

Reaktionspuffer:

50 mM HEPES/KOH pH 8,0
100 mM KCl
0,2 mM MgCl₂
10 μ M ATP
2 mM Phosphoenolpyruvat
7 U Pyruvatkinase

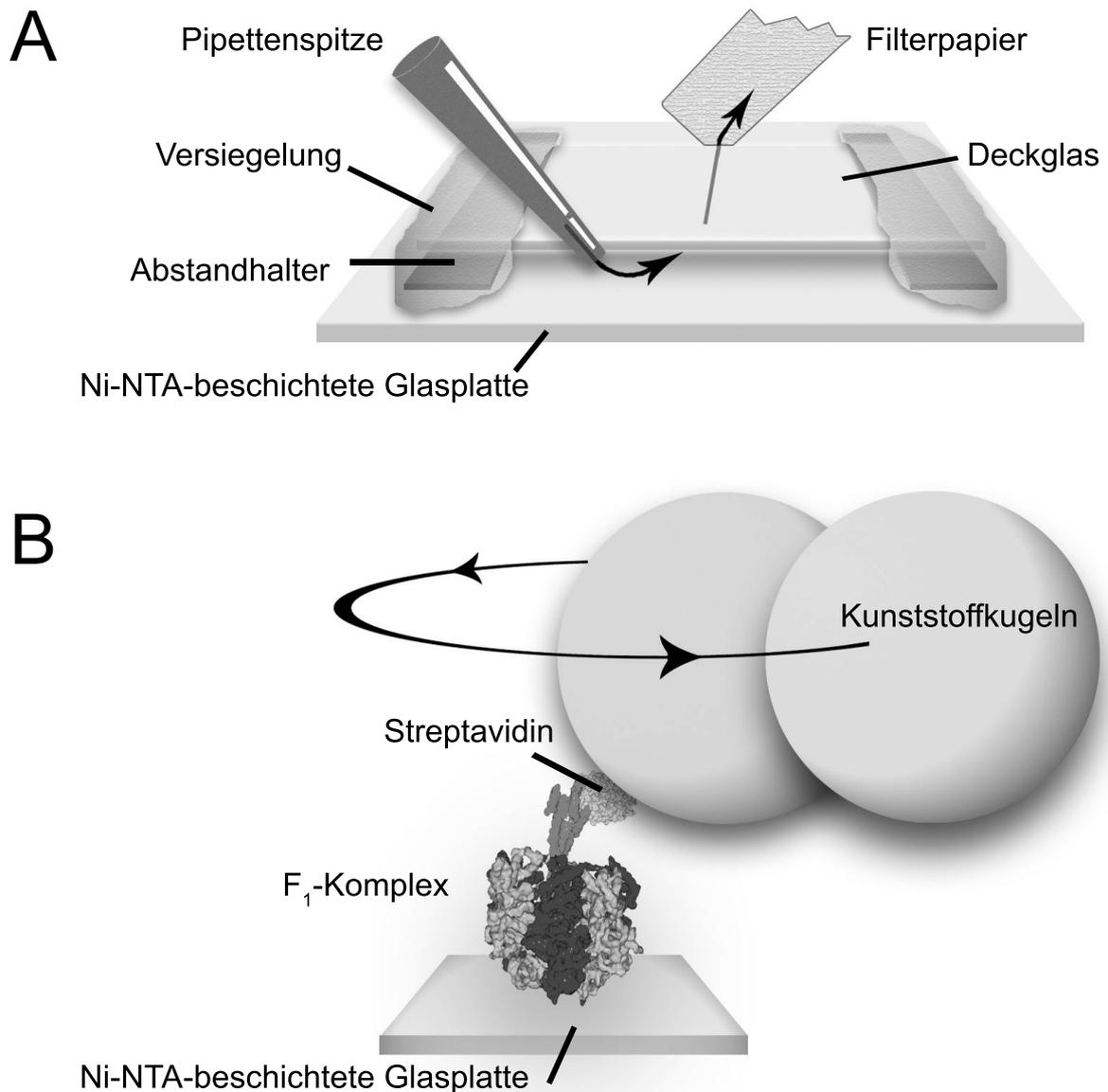


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Rotationsexperimente. In (A) ist der Aufbau der Beobachtungskammer sowie die Prozedur des Pufferaustausches durch Einpipettieren von Puffer auf der einen Seite und das Absaugen des alten Puffers mittels Filterpapier auf der anderen Seite der Kammer gezeigt. (B) Eine nicht maßstabsgetreue Ausschnittsvergrößerung der Beobachtungskammer. Dargestellt ist der über Dekahistags fixierte F₁-Komplex mit gekoppelten Kunststoffkugeln. Die Rotation der biotinylierten γ -Untereinheit wird über Streptavidin auf die Kunststoffkugeln übertragen, deren Bewegung mittels eines Phasenkontrastmikroskops analysiert werden kann. Die angegebene Rotationsrichtung bezieht sich auf die Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat.



3 Ergebnisse

3.1 Präparation des F₁-Komplexes

Der katalytische F₁-Komplex der ATP-Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus* wurde wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Im coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel sind die drei Untereinheiten α (54,3 kDa), β (54,0 kDa) und γ (35,9 kDa) des BP₁-Komplexes deutlich zu erkennen (Abbildung 3.1 A). Zusätzlich sind schwache Banden im höhermolekularen Bereich des Geles detektierbar. Die Reinheit des präparierten F₁-Komplexes konnte mit Hilfe einer computerbasierten Quantifizierung durch das Programm ImageJ (Version 1.36; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) auf über 98 % bestimmt werden und genügte somit den Anforderungen der anschließenden Experimente.

In den Einzelmolekülexperimenten wurde die durch ATP-Hydrolyse angetriebene Rotation der γ -Untereinheit über Kunststoffkugeln verfolgt, welche über Streptavidin und Biotin an die rotierende Untereinheit gekoppelt waren. Die hierfür nötige Verknüpfung von Biotin mit der γ -Untereinheit wurde mit Hilfe einer Immunodetektion und einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat als Antiserum nachgewiesen. Abbildung 3.1 B zeigt das Ergebnis einer solchen Immunodetektion nach abgeschlossener Farbreaktion. Neben einem leichten Signal unterhalb der Laufrhöhe der β -Untereinheit ist auf Höhe der γ -Untereinheit ein eindeutiges Signal zu detektieren, welches somit die erfolgreiche Biotinylierung der rotierenden Untereinheit bestätigt.

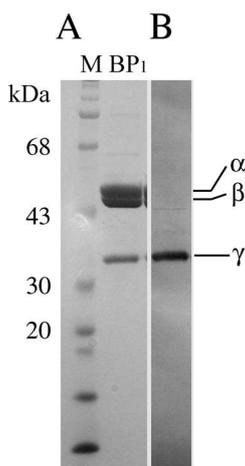


Abb. 3.1: Gelelektrophoretische Analyse der Präparation des F₁-Teilkomplexes (A) sowie Immunodetektion der Biotinylierung der γ -Untereinheit (B). (A) Darstellung eines coomassiegefärbten 12 % igen SDS-Polyacrylamidgels. Hierzu wurden 2 μ g des gereinigten und biotinylierten F₁-Komplexes aufgetragen. Als Größenstandard in Spur M dienten 3 μ l Proteinmarker (Prestained SDS-PAGE Standard, broad range; Bio-Rad, USA). (B) Der entsprechende Immunoblot des biotinylierten F₁-Komplexes. Als Antiserum wurde ein Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Pierce; USA) benutzt.



3.2 Aktivitätsmessungen

3.2.1 Kinetische Parameter

Zur Bestimmung grundlegender Parameter der ATP-Hydrolyse durch den katalytischen, biotinylierten F_1 -Komplex BP_1 aus *Thermosynechococcus elongatus* wurde die Substratabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit untersucht. Die Messwerte folgten dabei einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m -Wert von $62,9 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ATP und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $9,4 \pm 0,3 \mu\text{mol ATP pro Minute und mg Enzym}$. Bezogen auf die Reaktion eines Enzymmoleküls und der aus der Aminosäuresequenz ermittelten Molekülmasse von $360,8 \text{ kDa}$ entsprach dies einer maximalen Umsatzrate k_{app} von $56,4 \pm 1,8 \text{ ATP pro Sekunde}$. Unter der Annahme, dass pro Umdrehung drei ATP hydrolysiert werden, ergab sich eine maximale Umdrehungsgeschwindigkeit von $18,8 \pm 0,6 \text{ U/s}$. Aus der Umsatzrate leitete sich nach der Gleichung $k_{on}^{ATP} = k_{app}/[\text{ATP}]$ ein k_{on}^{ATP} von ca. $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ab.

3.2.2 Einfluss von Tentoxin

Inhibierende und reaktivierende Einflüsse von Tentoxin auf die Hydrolyseaktivität des F_1 -Komplexes aus tentoxinsensitiven Spezies wie z. B. Spinat oder Baumwolle sind in der Literatur gut dokumentiert [119]. Durch die Tatsache, dass bisher weder Protokolle zur heterologen Expression noch gezielten Mutation der katalytischen Grundeinheit vorliegen, waren diese Untersuchungen auf sogenannte *bulk*-Experimente beschränkt, bei denen einer oder mehrere Katalyseparameter der Gesamtheit aller eingesetzten Enzyme bestimmt wurden. Durch die Klonierung und Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolles für den katalytischen F_1 -Teilkomplex aus *Thermosynechococcus elongatus*, eröffnete sich die Möglichkeit auf beiden Ebenen, der Einzelmolekülmessung und im *bulk*-Experiment, den Effekt von Tentoxin auf die Hydrolyseaktivität zu untersuchen. Erste Untersuchungen im *bulk*-Experiment zeigten die schon vorher gut dokumentierten inhibierenden und reaktivierenden Einflüsse von Tentoxin. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Bei Zusatz von $5\text{--}10 \mu\text{M}$ Tentoxin im Messpuffer zeigte sich eine fast vollständige Inhibierung, mit einer Restaktivität von ca. 30 %. Bei hohen Tentoxin-Konzentrationen wurde hingegen die Inhibierung aufgehoben und die Hydrolyserate sogar gegenüber der Aktivität ohne Toxin erhöht. So reaktivierte 1 mM Tentoxin während der Messung die Enzymaktivität auf $144,5 \pm 0,8 \%$

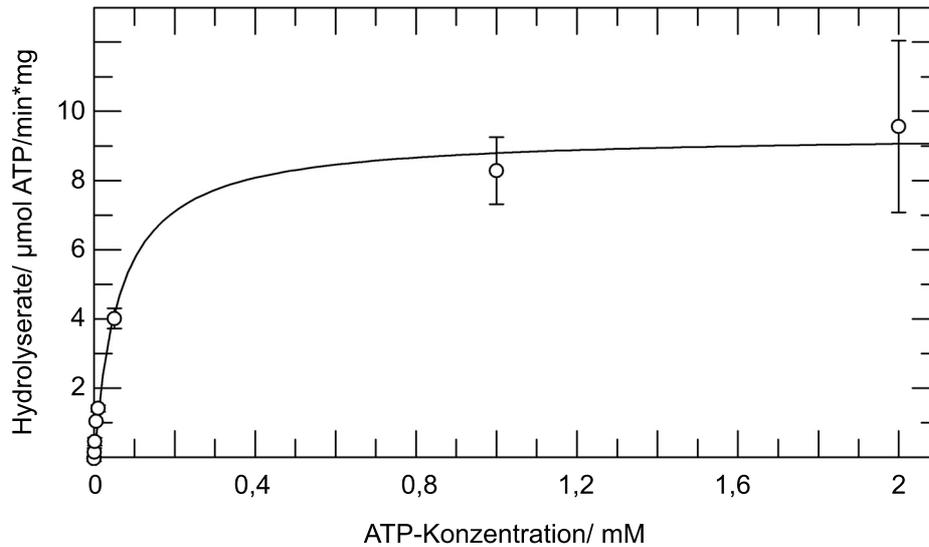


Abb. 3.2: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Die Hydrolyseaktivität wurde mit Hilfe eines ATP-regenerierenden Systems und der dadurch gekoppelten Oxidation von NADH bei 23 °C photometrisch bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Enzym gestartet und die Anfangsgeschwindigkeit vor Erreichen der *steady-state*-Phase für die Auswertung verwendet. Bei ATP-Konzentrationen von 50–2000 μM wurden 0,17 μg des biotinylierten BP₁ eingesetzt, bei Konzentrationen von 1–10 μM 0,44 μg und bei 0,1–0,5 μM ATP 0,88 μg Enzym. Die dargestellten Messwerte repräsentieren jeweils mindestens drei unabhängige Messungen. Die Regressionskurve nach der Michaelis-Menten-Gleichung, $V = V_{\max} \cdot [ATP]/K_m + [ATP]$ wurde mit dem Programm Grafit erstellt. $V_{\max} = 9,4 \pm 0,3 \mu\text{mol ATP pro Minute}$, $K_m = 62,9 \pm 0,01 \mu\text{M ATP}$.

der Aktivität ohne Toxin. Unter der Annahme, dass die Inhibierung durch die Bindung eines ersten Tentoxinmoleküls und die Reaktivierung durch ein zweites gebundenes Toxin vermittelt wird, konnten die jeweiligen Dissoziationskonstanten berechnet werden. Für die inhibierende Bindestelle wurde ein K_{d1} von $0,73 \pm 0,36 \mu\text{M}$ und für die reaktivierende Stelle K_{d2} von $83,8 \pm 26,0 \mu\text{M}$ ermittelt.

Der Verlauf der Hydrolyseaktivität des F₁-Teilkomplexes kann, abhängig von der Substratkonzentration [85], in zwei bis drei Abschnitte, unterteilt werden. Einer hohen Anfangsgeschwindigkeit folgt eine langsamere *steady-state*-Rate. Dieses Phänomen ist auf eine Inaktivierung durch ADP zurückzuführen, welches aus dem Medium aufgenommen oder nach der Hydrolyse nicht vom Komplex freigesetzt wird. Der ADP-bindende Komplex kann dann in einen katalytisch inaktiven ADP-bindenden Komplex übergehen [120, 121]. Nach dieser Konformationsänderung in den aktiven ADP-

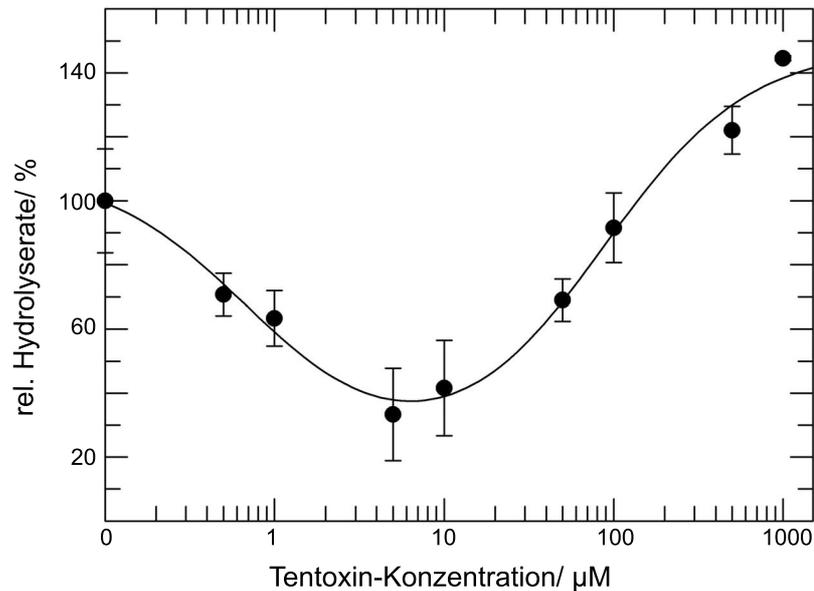
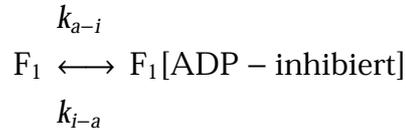


Abb. 3.3: Einfluss von niedrigen und hohen Tentoxin-Konzentrationen auf die ATP-Hydrolyserate des F_1 -Komplexes. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von je $0,2 \mu\text{g}$ biotinyliertem Enzym gestartet und bei 23°C und 2mM ATP durchgeführt. Bei Versuchen mit Tentoxin enthielt der Messpuffer die angegebene Konzentration an Toxin. Zudem wurde die jeweils eingesetzte Enzymlösung mindestens 5 Minuten vor dem Versuch mit der angegebenen Tentoxinkonzentration, im Falle der Versuche ohne Toxin, mit Wasser versetzt. Die *steady-state*-Raten der ATP-Hydrolyse wurden mit einem ATP-regenerierendem System und der damit verbundenen Oxidation von NADH bestimmt, wobei jeder Wert den Durchschnitt aus mindestens drei unabhängigen Messungen repräsentiert. Die Aktivität ohne Toxin wurde auf 100 % gesetzt. Die eingezeichnete Regressionskurve wurde unter der Annahme von zwei unabhängigen Bindungsstellen mit Bindekonstanten $K_{d1} = 0,73 \pm 0,36 \mu\text{M}$ und $K_{d2} = 83,8 \pm 26,0 \mu\text{M}$ berechnet.

bindenden Komplex und dem Abdissoziieren des ADP kann der Komplex mit der Katalyse von ATP fortfahren. So stellt sich ein Gleichgewicht zwischen ADP-inhibierten und nicht ADP-inhibierten Komplexen ein. In Abbildung 3.4 ist so ein Verlauf dargestellt. Man erkennt die schnelle Anfangskinetik und die folgende, langsamere *steady-state*-Kinetik. Trug man wie in Abbildung 3.5 A die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Zeit auf, ergab sich ein exponentieller Abfall mit einer Zeitkonstante t von $0,045 \pm 0,01 \text{s}^{-1}$. Nach Gleichung



ergaben sich für k_{a-i} und k_{i-a} Raten von $0,034\text{ s}^{-1}$ bzw. $0,011\text{ s}^{-1}$ und damit Halbwertszeiten des aktiven und ADP-inhibierten Komplexes von 29 s bzw. 88,9 s.

In der Literatur ist bei mittleren ATP-Konzentrationen noch eine intermediäre Phase beschrieben, welche der *steady-state*-Phase vorgelagert und von geringerer Aktivität gekennzeichnet ist. Die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit wird hier mit der langsamen Besetzung der nicht-katalytischen Nukleotidbindungsstellen durch Nukleotide aus dem Medium erklärt. Die Besetzung dieser Bindestellen vermindert laut Literatur die statistische Inaktivierung des Komplexes durch ADP. Bei genügend hoher ATP-Konzentration erfolgt die Beladung der nicht katalytischen Bindestellen sehr schnell und die mittlere Phase ist nicht mehr detektierbar. Dies war in den vorgestellten Experimenten der Fall. Der Aktivitätsverlauf mit inhibierenden Konzentrationen an Tentoxin erschien dagegen eher einphasig mit konstanter Geschwindigkeit. In Messungen bei hohen Konzentrationen an Tentoxin war dagegen die Anfangsgeschwindigkeit sehr niedrig und ähnelte der des Tentoxin-inhibierten Komplexes. Danach beschleunigte sich mit zunehmender Beobachtungszeit die Hydrolyserate. Diese Reaktivierung durch hohe Tentoxin-Konzentrationen folgte wie auch die in Abwesenheit von Toxin gemessene ADP-Inhibierung des Komplexes einer exponentiellen Funktion mit einer Zeitkonstanten t von $0,0026 \pm 0,00001\text{ s}^{-1}$ bei 2 mM und $0,0017 \pm 0,0002\text{ s}^{-1}$ bei $10\text{ }\mu\text{M}$ ATP (Halbwertszeit = $384,6 \pm 1,5\text{ s}$ bzw. $588,2 \pm 69,2\text{ s}$) (Abbildung 3.5 B). Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der Reaktivierung nicht nur von der Zeit, sondern auch von der Substratkonzentration abhing. Bei niedrigen ATP-Konzentrationen war die Hydrolyserate geringer als die Referenzaktivität in Messungen ohne Toxin und glich daher eher der des inhibierten Komplexes.

In zusätzlichen *bulk*-Experimenten konnte eine Reaktivierung durch Tentoxin auch bei $10\text{ }\mu\text{M}$ ATP beobachtet werden, was den Bedingungen der Rotationsexperimente entsprach. In Abbildung 3.6 ist die starke ATP-Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Reaktivierung dargestellt, wohingegen die Inhibierung durch niedrige Konzentrationen an Tentoxin unabhängig von diesen Parametern war.

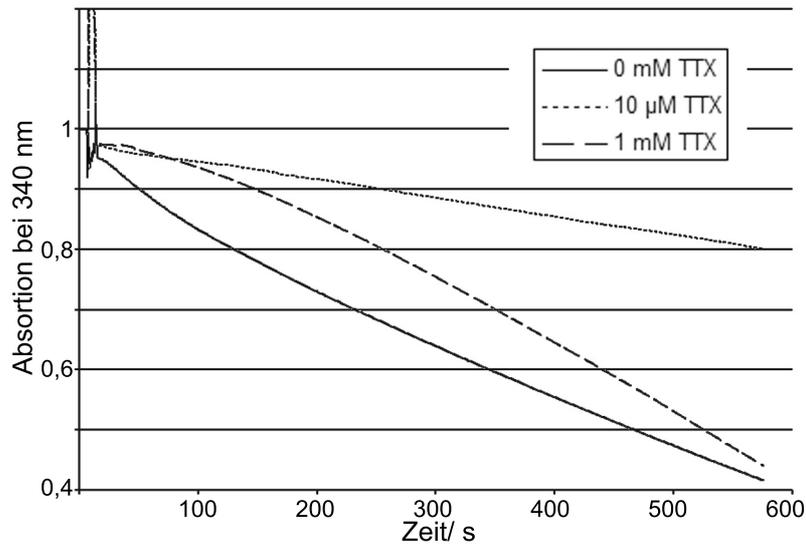


Abb. 3.4: Exemplarische Zeitverläufe der ATP-Hydrolyse durch BP_1 bei verschiedenen Tentoxin-Konzentrationen. Dargestellt ist die photometrische Detektion von NADH bei 340 nm, welche über ein ATP-regenerierendes System mit der ATP-Hydrolyse des F_1 -Komplexes gekoppelt war. Das auf 23 °C temperierte Reaktionsmedium enthielt dabei 2 mM ATP und die angegebene Konzentration an Toxin. Die jeweils zum Start der Reaktion verwendete Enzymlösung (je 0,2 μ g BP_1) wurde mindestens 5 min vor Versuchsbeginn mit der entsprechenden Konzentration an Tentoxin oder mit Wasser im Fall ohne Toxin versetzt.

3.2.3 Modulatoren der Tentoxin-Wirkung

Im Gegensatz zu der gut dokumentierten Wirkung von Tentoxin auf sensitive Spezies, sowie der Anzahl der Bindestellen mit den jeweiligen Bindekonstanten, bzw. die genaue Lokalisierung der inhibierenden Bindestelle ist wenig über die genaue Wirkung von Tentoxin auf molekularer Ebene bekannt. In der Struktur des chloroplastidären F_1 -Komplexes mit gebundenem Tentoxin [24] liegt die β -Untereinheit in ihrer geschlossenen Konformation vor, so dass die Bindung eines Tentoxin-Molekül die β -Untereinheit in ihrer geschlossenen Konformation arretiert und so die sequentielle Umwandlung der katalytischen Nukleotidbindestellen zwischen β_{DP} (fest), β_{TP} (locker) und β_E (offen) unterbindet.

Die reaktivierende Wirkung von Tentoxin wird auf eine verminderte ADP-Inhibierung zurückgeführt [109]. In Einzelmolekülexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass bei hohen Tentoxin-Konzentrationen die charakteristischen, langen Rotationsspausen, welche auf eine Inhibierung durch ADP zurückzuführen sind [86,90], fehlen.

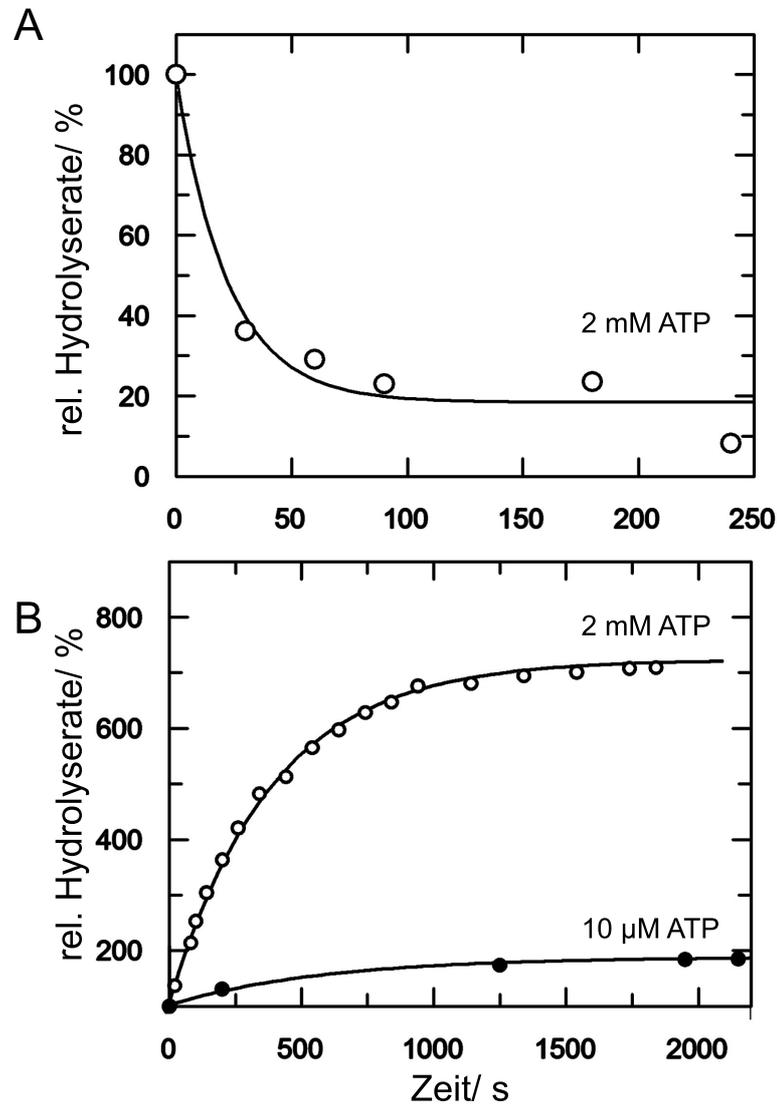


Abb. 3.5: Kinetik der Inaktivierung und Reaktivierung von BP_1 . (A) Inaktivierung durch ADP während der ATP-Hydrolyse. Relative Raten der ATP-Hydrolyse bezogen auf die Anfangsgeschwindigkeit (100 %). Durch Auftrag gegen die Zeit ergab sich ein exponentieller Abfall mit einer Zeitkonstanten t von $0,045 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. (B) Kinetik der Reaktivierung von BP_1 durch hohe Tentoxin-Konzentrationen während der ATP-Hydrolyse. Über jeweils 10 s gemittelte Hydrolyseraten wurden relativ zur Anfangsgeschwindigkeit (= 100 %) gegen die Zeit aufgetragen. Die Analyse der Reaktivierungskinetik wurde bei niedrigen ATP-Konzentrationen, wie sie auch im Rotationsexperiment verwendet wurden ($10 \mu\text{M}$) und bei sättigender Substratkonzentration (2 mM) durchgeführt. In beiden Fällen ergab sich ein exponentieller Zusammenhang mit Zeitkonstanten von $0,0017 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ bei $10 \mu\text{M}$ und $0,0026 \pm 0,00001 \text{ s}^{-1}$ bei 2 mM ATP.

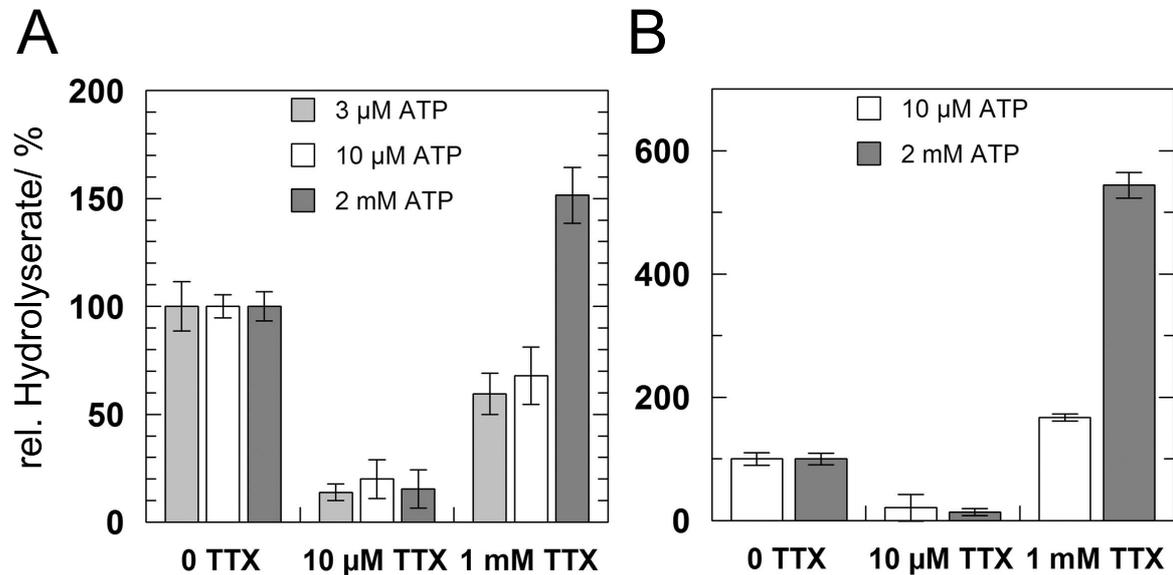


Abb. 3.6: Abhängigkeit der Reaktivierung durch Tentoxin von der ATP-Konzentration und der Beobachtungszeit. Die angegebenen *steady-state*-Raten wurden in (A) zwischen der siebten und achten Minute aus der Extinktionsdifferenz der NADH-Konzentrationen des ATP-regenerierenden Systems, welches mit der ATP-Hydrolyse gekoppelt war, berechnet; in (B) wurde die Extinktionsdifferenz zwischen der 59. und 60. Minute verwendet. Die errechneten Messwerte der Versuche ohne Toxinzusatz wurden willkürlich auf 100 % gesetzt und die anderen Werte relativ dazu berechnet. Alle Werte repräsentieren den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Bei Versuchen mit Tentoxin enthielt der Messpuffer die angegebene Konzentration an Toxin. Die zugesetzten Enzymlösungen wurden ebenfalls vor Versuchsbeginn mit Toxin inkubiert (mindestens 5 min bei Experimenten mit 2 mM ATP, mindestens 30 min bei 3 bzw. 10 μ M ATP). Die Inhibierung durch Tentoxin zeigt keine Abhängigkeit von der Substratkonzentration bzw. der Beobachtungszeit und lag bei allen Versuchen zwischen 80 und 90 %. Bei hohen Konzentrationen an Toxin fand ebenfalls in allen Versuchen eine Reaktivierung statt. Das Ausmaß und somit die relative Aktivität bezogen auf die Hydrolyserate ohne Tentoxin variierten aber stark. Während bei Beobachtungszeiten von ca. 10 Minuten die Aktivität der reaktivierten Komplexe unter sättigender ATP-Konzentration über der Referenzaktivität ohne Toxin lag, waren die Aktivitäten bei niedrigeren ATP-Konzentrationen mit ca. 60 % deutlich niedriger als ohne Tentoxin. Bei längeren Experimenten war auch bei 10 μ M ATP eine echte Reaktivierung mit einer höheren Aktivität als ohne Toxin zu verzeichnen.



In vorbereitenden *bulk*-Experimenten wurden verschiedene Zusätze und Substrate eingesetzt, um mögliche Angriffspunkte der Inhibierung und Reaktivierung des F_1 -Teilkomplexes aus *Thermosynechococcus elongatus* durch Tentoxin während der Katalyse aufzuzeigen.

In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse der verschiedenen *bulk*-Experimente dargestellt. Alle Reaktionen fanden, wenn nicht anders angegeben bei 23°C und 5 mM ATP statt. Die Werte repräsentieren die *steady-state*-Raten zwischen der siebten und achten Versuchsminute. In dieser Versuchsperiode war die Reaktivierung durch hohe Tentoxin-Konzentrationen voll ausgeprägt (siehe Abbildung 3.5 B). Bei den Messungen ohne Zusätze zeigte sich die schon erwähnte deutliche Inhibierung und Reaktivierung (Abbildung 3.7 A).

Enthielten die Reaktionsansätze 5 mM ADP (Abb. 3.7 C) so konnte eine leicht verminderte, aber dennoch deutliche Inhibierung der Hydrolyserate durch Tentoxin beobachtet werden. Die Reaktivierung des F_1 -Komplexes durch hohe Konzentrationen an Tentoxin während der Hydrolyse in Gegenwart von ADP wurde hingegen von 150–200 % auf ca. 300 % verstärkt.

Durch Zusatz von 5 mM Azid (Abb. 3.7 D), einer Verbindung, welche die Inaktivierung des F_1 -Komplexes durch ADP verstärkt [90], sah man eine etwas schwächere Inhibierung, was aber durch die sehr geringe Restaktivität schwer zu quantifizieren war. Der geringen Auswirkung auf die Tentoxin-Inhibierung stand die starke Erhöhung der Reaktivierungsrate gegenüber. Hohe Konzentrationen an Tentoxin schienen somit das Enzym vor der ADP-Inaktivierung zu schützen.

In Abbildung 3.7 E ist der Einfluss von 0,1 % LDAO, einem Detergenz, welches als Aktivator für die ATP-Hydrolyse von F_1 -Teilkomplexen bekannt ist, dargestellt. Die Aktivierung durch LDAO wird mit einer Verminderung der ADP-Inaktivierung während der Hydrolyse erklärt, dessen exakter Angriffspunkt aber noch ungeklärt ist [86,90]. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich wie auch bei Azid-Zusatz keine gravierende Änderung auf die Inhibierung durch Tentoxin. Demgegenüber war kein Reaktivierungseffekt durch hohe Toxinkonzentrationen mehr zu detektieren, die Aktivität lag sogar unter der des Tentoxin-freien Komplexes.

Ein weiterer möglicher Vorgang während der Katalyse, der durch Tentoxin beeinflusst werden könnte, ist die Hydrolyse selbst, d.h. die Spaltung von ATP in ADP und anorganischem Phosphat. Durch Einsatz eines nur sehr langsam zu hydrolysierenden Substrates, wie z. B. ein ATP γ S-Analogon (ATP γ S) wird die Hydrolyse zum

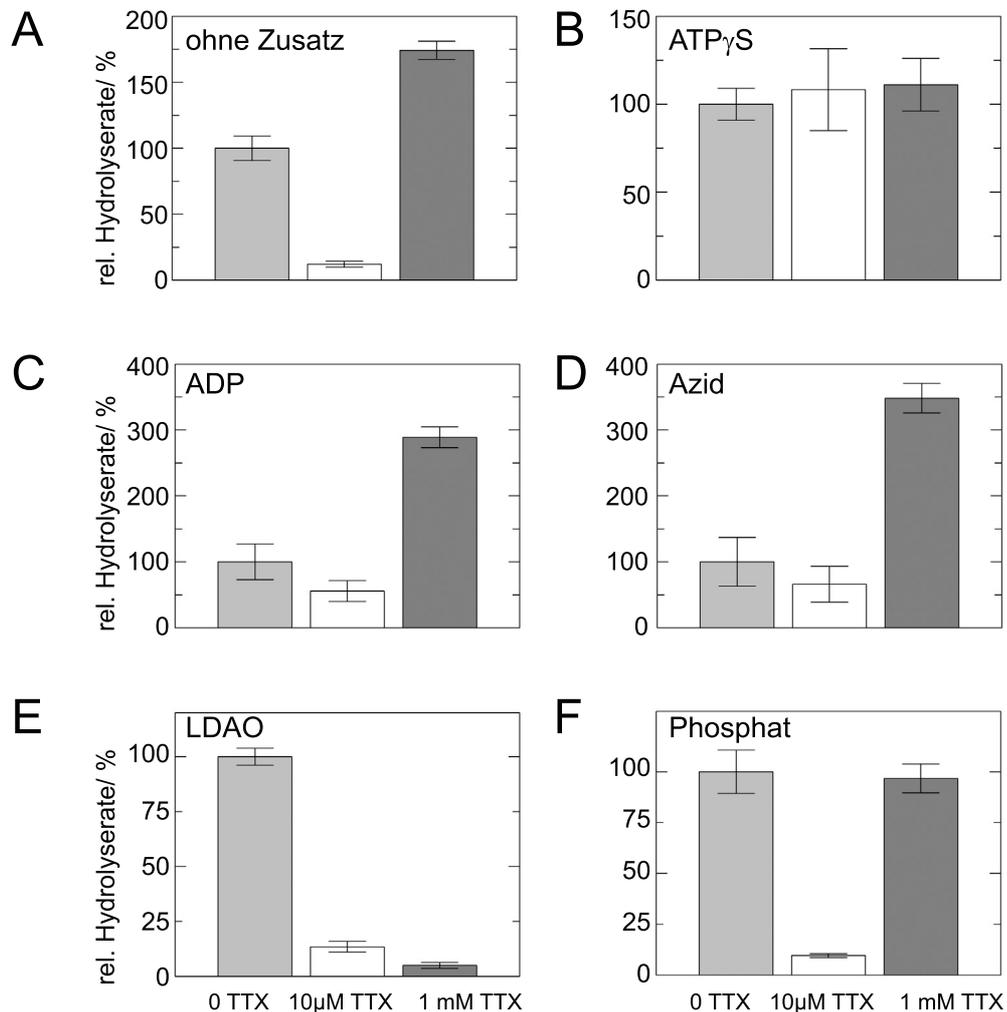


Abb. 3.7: Beeinflussung der inhibierenden und reaktivierenden Effekte von Tentoxin auf die *steady-state*-Rate durch Zusätze im Hydrolysemedium. Die Messung der ATPase-Aktivität wurde bei (A), (D), (E) und (F) mit Hilfe eines ATP-regenerierenden Systems und der damit gekoppelten Oxidation von NADH photometrisch durchgeführt. Bei (B) und (C) wurde die Hydrolyserate kolorimetrisch über die Freisetzung von anorganischem Phosphat bestimmt. Alle Versuche, außer (B) wurden mit 5 mM ATP als Substrat und bei 23 °C durchgeführt. Als Substrat in Versuch (B) diente 5 mM ATP γ S bei 37 °C Messtemperatur. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zusatz von Enzym gestartet und die Rate der Hydrolyse zwischen der siebten und achten Minute bestimmt. Zusätze in den Experimenten waren: (C) 5 mM ADP, (D) 5 mM NaN₃, (E) 0,1 % LDAO, (F) 50 mM KP_i pH 8,0. In den Versuchen mit Tentoxin enthielt der Messpuffer die angegebene Konzentration an Toxin und die entsprechende Enzymlösung wurde mit der selben Tentoxin-Konzentration mindestens 5 min vor Reaktionsstart inkubiert. Die Daten entsprechen dem Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Messungen.



Tab. 3.1: Zusammenfassung der relativen *steady-state*-Raten. Die Hydrolyseraten wurden jeweils auf die Bedingung ohne Tentoxin bezogen, und in % angegeben. Der Einfluss der Zusätze auf die ADP-Inaktivierung ist durch Pfeile angezeigt. Azid verstärkt z. B. diese Inaktivierung, so dass die Aktivität des Komplexes durch Zusatz von Azid niedriger war. Da der reaktivierte Komplex eine geringere ADP-Inaktivierung aufwies, war die resultierende relative Hydrolyserate, bezogen auf den Komplex ohne Tentoxin, stark erhöht.

Zusatz	Effekt auf die ADP-Inaktivierung	ohne Tentoxin [%]	Inhibierung [%]	Reaktivierung [%]
—		100 ± 9,3	12,0 ± 2,2	174,3 ± 6,9
ATP γ S		100 ± 9,1	108,3 ± 23,3	111,1 ± 15,0
ADP	↑	100 ± 27,2	55,6 ± 15,7	288,9 ± 15,6
Azid	↑	100 ± 36,9	66,1 ± 27,0	348,3 ± 22,6
LDAO	↓	100 ± 3,9	13,5 ± 2,5	5,0 ± 1,2
Phosphat	↓	100 ± 10,6	9,6 ± 0,9	96,7 ± 7,1

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Sollte Tentoxin, inhibierend und/oder reaktivierend, auf die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse selbst wirken, so müssten bei der Umsetzung von ATP γ S ebenfalls inhibierende und reaktivierende Effekte durch Tentoxin zu detektieren sein. In Abbildung 3.7B ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen waren keine Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten, so dass das molekulare Ereignis der Spaltung von ATP in ADP und Phosphat somit nicht von Tentoxin beeinflusst wird.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für Tentoxin ist die Produktfreisetzung (ADP und Phosphat). Der Zusatz von ADP zum Hydrolysemedium wurde in Abbildung 3.7C schon besprochen. Als zweites Katalyseprodukt entsteht Phosphat, welches zuerst aus der Nukleotidbindestelle freigesetzt wird, wohingegen das entstandene ADP erst nach einer weiteren Drehung um 120° abdissoziiert. Der Enzymkomplex mit diesem freien ADP kann nun statistisch in den inaktiven ADP-bindenden Komplex übergehen. In Versuch F wurde dem Medium 50 mM Phosphat zugesetzt. Wiederum war kein Einfluss auf die Tentoxin-Inhibierung festzustellen, wohingegen sich die Aktivität des reaktivierten Komplexes sowie die des nicht mit Toxin inkubierten gleichen und der reaktivierende Effekt demnach nicht mehr zu detektieren war. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.



3.3 Nukleotidbestimmung

Neben den drei katalytischen Nukleotidbindestellen besitzt der F_1 -Teilkomplex noch drei weitere Nukleotidbindestellen, denen strukturell stabilisierende oder regulatorische Aufgaben zugesprochen werden. So wird eine Verminderung der ADP-Inaktivierung mit der Besetzung dieser nichtkatalytischen Bindestellen während der ATP-Hydrolyse erklärt [85, 87], und in Versuchen mit F_1 -Komplexen, bei denen die nichtkatalytischen Bindestellen keine Nukleotide mehr binden konnten, war eine schnelle und vollständige Inaktivierung zu beobachten [83, 87]. Wegen des Zusammenhanges zwischen der Tentoxin-vermittelten Reaktivierung und der verminderten ADP-Inaktivierung, der in Einzelmolekülmessungen erstmals dokumentiert wurde [109], wurden die gebundenen Nukleotide während der *steady-state*-Phase der Hydrolysereaktion bestimmt.

Bei diesen Messungen wurde die Gesamtheit der am Komplex gebundenen Nukleotide gemessen, so dass man nicht zwischen katalytischen und nichtkatalytischen Bindestellen differenzieren konnte. Der frisch präparierte F_1 -Komplex hatte vor der Hydrolysereaktion ca. ein ATP- und drei ADP-Moleküle gebunden (Abbildung 3.8 Pröp), welche er durch zweimalige Waschung fast vollständig verlor. Lediglich ca. 0,3 Moleküle ADP blieben pro Komplex fest gebunden. Während der *steady-state*-Phase der Hydrolysereaktion ohne Zusätze blieben nach zweimaliger Waschung des Komplexes ca. zwei ADP-Moleküle gebunden. Der Gehalt an gebundenen ADP-Molekülen fiel mit ca. 0,3 stark ab, sobald Tentoxin zugesetzt wurde. Hierbei konnte im Hinblick auf die Anzahl an Nukleotiden kein Unterschied zwischen inhibierenden und reaktivierenden Konzentrationen an Tentoxin beobachtet werden.

3.4 Rotationsexperimente

Untersuchungen an einzelnen Proteinkomplexen können wichtige Einblicke in den katalytischen Ablauf der enzymvermittelten Reaktion bringen und stellen, neben Strukturuntersuchungen und *bulk*-Experimenten, ein wichtiges Werkzeug zur Auflösung der an der Katalyse beteiligten molekularen Ereignisse dar. So konnte Mitte der 1990er Jahre die durch kinetische Messungen und die atomare Auflösung der Struktur postulierte Drehung innerhalb des F_1 -Teilkomplexes als zentrale, molekulare Arbeitsweise verifiziert werden. Neben indirekten Methoden [52–55] konnte später die Rotation der γ -Untereinheit während der Hydrolyse von ATP direkt über ein an dieser Untereinheit gebundenes, fluoreszierendes Aktinfilament beobachtet werden [56].

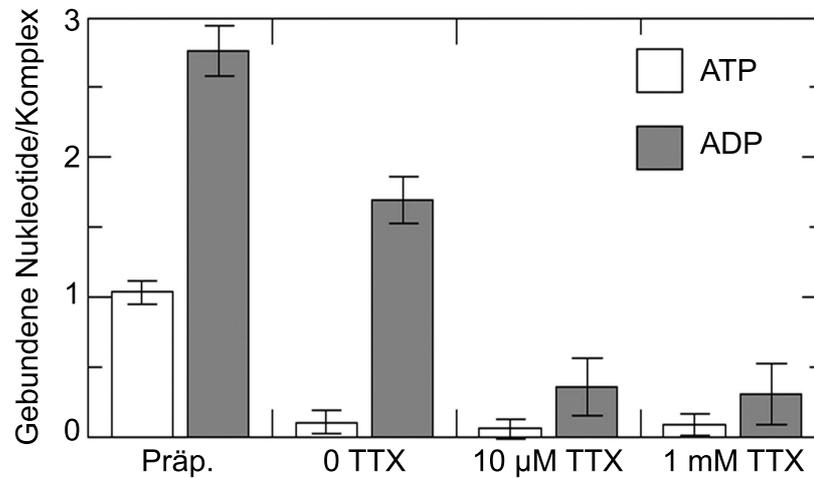


Abb. 3.8: Bestimmung der gebundenen Nukleotide des F_1 -Komplexes unter Hydrolysebedingungen während der *steady-state*-Phase. Der Gehalt an komplexgebundenen Nukleotiden wurde, analog der *bulk*-Experimente, während der *steady-state*-Phase ermittelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von an Ni-NTA-Säulenmaterial immobilisierten BP_1 -Komplexen gestartet und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die entsprechenden Aktivitätsmessungen. Der Gehalt an fest gebundenen Nukleotiden wurde nach zweimaligem Waschen mit Hydrolysemedium ohne ATP und anschließender Säurefällung des F_1 -Komplexes mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Reaktion bestimmt. Die dargestellten Werte repräsentieren den Durchschnitt von mindestens 5 unabhängigen Messungen.

3.4.1 Messprinzip

Die Untersuchung der Rotationsbewegung der γ -Untereinheit während der Katalyse geschah durch direkte Beobachtung von Kunststoffkugeln, die an die rotierende Untereinheit gekoppelt waren, während der Gesamtkomplex über die β -Untereinheiten auf einem Objektträger immobilisiert war (Abbildung 3.9 A). Die ATP-getriebene Rotation der γ -Untereinheit konnte über die gekoppelte Rotation der Kunststoffkugeln beobachtet werden, wie dies in B dargestellt ist. Dabei repräsentiert jedes Einzelbild eine Momentaufnahme während der Drehung. In C ist eine Umdrehung vergrößert dargestellt und Pfeile unterhalb der Bildsequenz verdeutlichen dabei die Orientierung der γ -Untereinheit zum jeweiligen Zeitpunkt der Rotation. Die Beobachtungsdaten wurden durch eine computergestützte Analyse, bei der die Richtung und Geschwindigkeit der Rotation, die Häufigkeit und Länge von Rotationspausen, sowie die Orientierung der γ -Untereinheit während der Katalyse bestimmt wurden, ausgewertet.

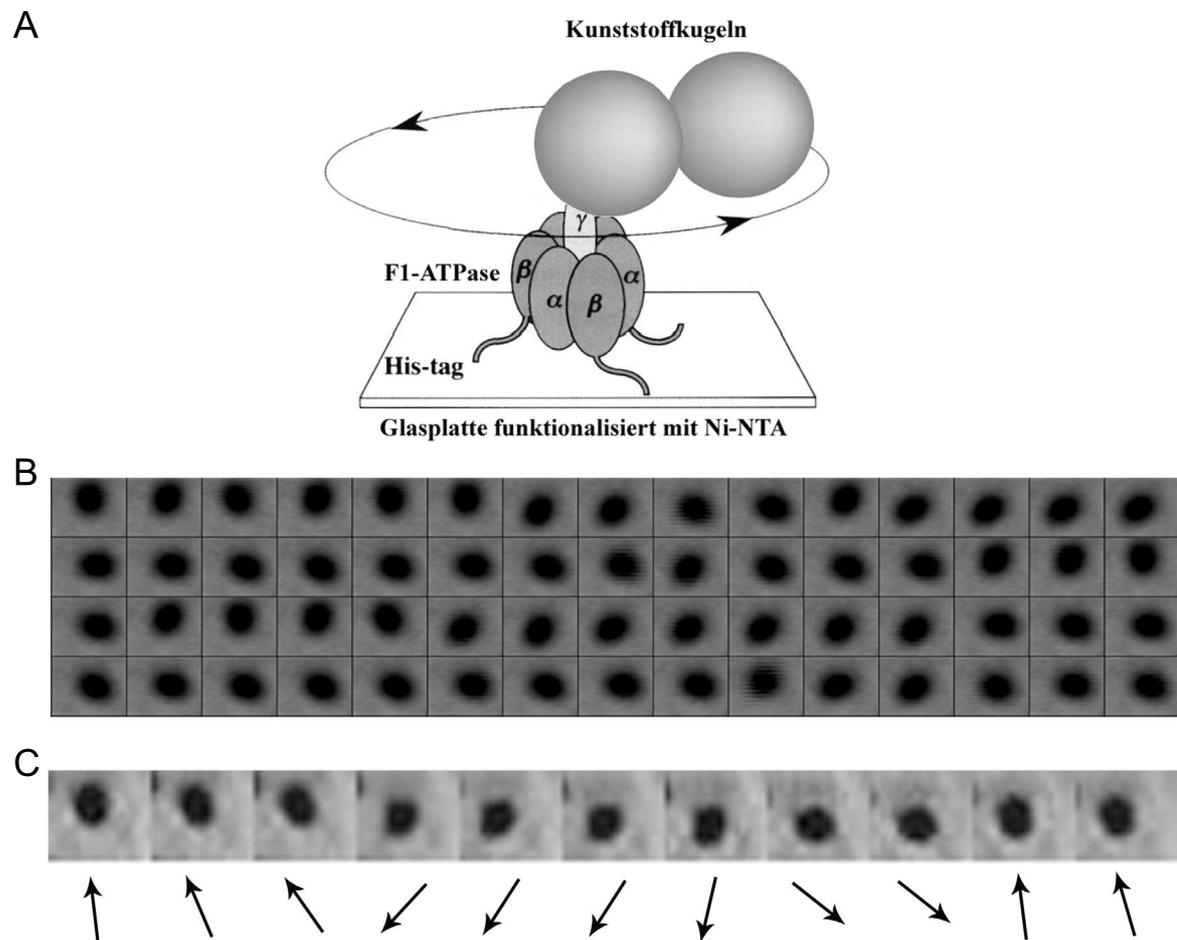


Abb. 3.9: Schematischer Versuchsaufbau der Rotationsexperimente und Darstellung der aufgezeichneten Drehbewegung. (A) zeigt die experimentelle Anordnung von F₁-Komplex und gekoppelten Kunststoffkugeln auf einem Objektträger. Der F₁-Teilkomplex wurde über 10 Histidinreste am N-terminalen Ende der β -Untereinheiten auf der mit Ni-NTA funktionalisierten Glasplatte immobilisiert. Die starke Kopplung von Streptavidin beschichteten Kunststoffkugeln an die biotinylierte γ -Untereinheit ermöglichte die mikroskopische Beobachtung der Drehung, welche aufgezeichnet und analysiert werden konnte. In (B) ist eine solche Aufzeichnung als Bildsequenz dargestellt (Zeit zwischen den Aufnahmen 80 ms). Von links nach rechts gelesen ergab sich eine Rotation der Kunststoffdoppelkugel (Durchmesser der Einzelkugel: 200 nm) gegen den Uhrzeigersinn mit ca. 0,7 U/s. Zur besseren Erkennung ist in (C) eine einzelne Umdrehung dargestellt, wobei die jeweilige Orientierung der Doppelkugel während der Rotation durch Pfeile unter der Bildsequenz angezeigt wird. Bei der eingesetzten Kombination von 0,5 μ M ATP und Kugeldurchmessern von 200 nm waren die 120°-Schritte deutlich zu erkennen. Dabei sprang die γ -Untereinheit von einer der drei ATP-Wartepositionen zur nächsten.



3.4.2 Analyse der ATP-abhängigen Rotation

Summiert man die Rotationen der γ -Untereinheit während der Hydrolyse auf und trägt diese gegen die Beobachtungszeit auf, so erhält man den Zeitverlauf der ATP-getriebenen Drehbewegung. Die Steigung der entstehenden Linie ist proportional zur Umdrehungsgeschwindigkeit.

Zur Untersuchung des Einflusses von Tentoxin auf die Rotation des F_1 -Teilkomplexes wurden die Einzelmolekülexperimente mit inhibierenden und reaktivierenden Konzentrationen an Toxin durchgeführt ($10\ \mu\text{M}$ = Inhibierung, $1\ \text{mM}$ = Reaktivierung) und mit der Situation ohne Tentoxin verglichen.

In Abbildung 3.10 ist das Ergebnis dieser Versuche dargestellt. Die Rotation wurde bei 23°C , $10\ \mu\text{M}$ ATP im Medium und Kugeldurchmessern von $350\ \text{nm}$ für 5 Minuten beobachtet. In den Fällen mit Toxinzusatz enthielt der Reaktionspuffer die angegebene Konzentration an Tentoxin und die immobilisierten Komplexe wurden für mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit dem Toxin inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionskammern gegen Verdunstung versiegelt und auf dem Objektträgertisch des Mikroskops arretiert. Durchschnittlich wurden pro fertiggestellter Reaktionskammer drei bis vier Partikel untersucht. Um in dieser Zeit die ATP-Konzentration konstant zu halten, war im Reaktionsmedium Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat vorhanden, welche das entstandene ADP in ATP umsetzten. Die Rotation wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera mit 30 Bildern pro Sekunde aufgezeichnet.

Die Rotation der γ -Untereinheit war ohne Tentoxin schnell, von einigen kurzen ($\leq 1\ \text{s}$) Pausen unterbrochen. Ca. 10 % der Beobachtungszeit verharrte der Komplex in diesen Pausen. Diese Rotationsphasen mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von ca. $4\text{--}5\ \text{U/s}$ wurden jedoch auch regelmäßig von langen ($\geq 10\ \text{s}$) Pausen unterbrochen. Diese langen Pausen sind charakteristisch für die ATP-Hydrolyse durch F_1 -Komplexe und werden durch Inaktivierung mit ADP ausgelöst [90]. Insgesamt machten diese langen Pausen ca. 30 % der Gesamtzeit aus. Hieraus resultierte eine Durchschnittsgeschwindigkeit über die gesamte Beobachtungsdauer von ca. $2\ \text{U/s}$ mit einer sehr hohen Standardabweichung von ca. 50 %.

In Experimenten unter inhibierenden Konzentrationen von Tentoxin wurden deutlich weniger Umdrehungen während der Beobachtungszeit detektiert. Die Rotation war wie bei Versuchen ohne Toxin von einigen kurzen Pausen ($\leq 1\ \text{s}$, ca. 12 % der Zeit) und regelmäßigen langen Pausen ($\geq 10\ \text{s}$, ca. 25 % der Beobachtungsdauer) unterbrochen.

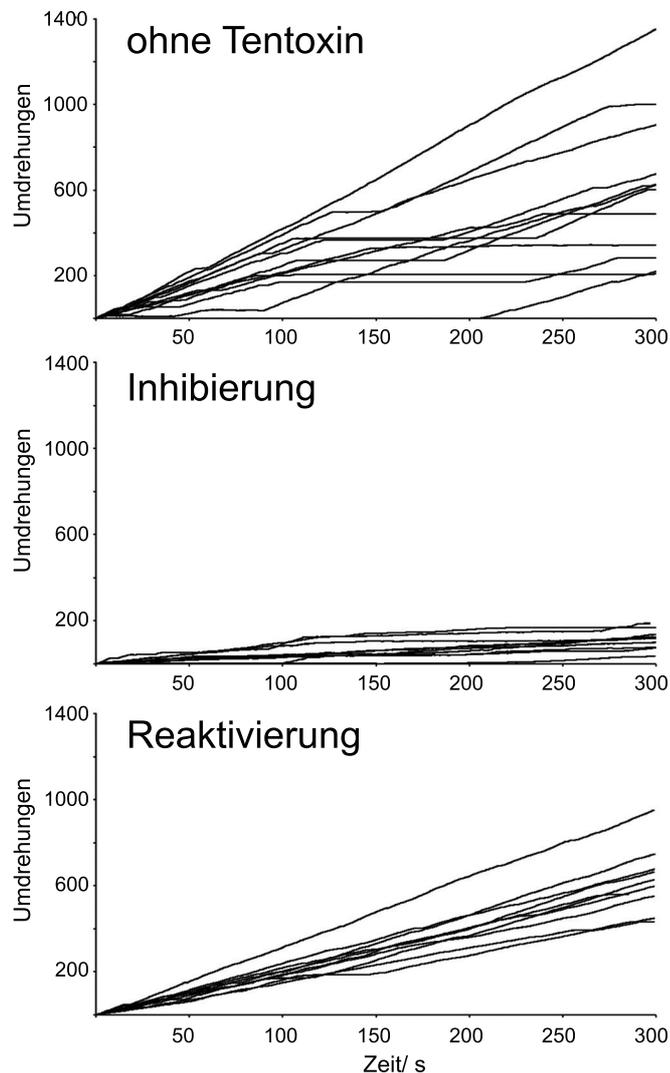


Abb. 3.10: Darstellung von Zeitverläufen der ATP-getriebenen Rotation der γ -Untereinheit über die gesamte Messzeit des Einzelmolekülexperimentes. Die Experimente wurden ohne Tentoxin sowie unter inhibierenden und reaktivierenden Bedingungen durchgeführt. Die beobachteten Rotationen der Einzelmolekülexperimente wurden für jeden Partikel (Anzahl an untersuchten Molekülen: 0 mM Tentoxin = 12; 10 μ M TTX = 10; 1 mM TTX = 11) aufsummiert und gegen die Zeit aufgetragen. Waagerechte Abschnitte bedeuten Rotationspausen. Immobilisierte F_1 -Komplexe wurden mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit der entsprechenden Tentoxin-Konzentration versetzt und die Reaktion durch Pufferaustausch gegen Reaktionspuffer, der neben 10 μ M ATP und der angegebenen Konzentration an Tentoxin zusätzlich ein ATP-regenerierendes System enthielt, gestartet. Die Rotation der an die γ -Untereinheit gebundenen Kunststoffdoppelkugeln (je 350 nm Durchmesser) wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops beobachtet und analysiert.



Tab. 3.2: Zusammenfassung der Pausenverteilung während der Hydrolysereaktion des BP₁-Komplexes. Alle Pausen innerhalb eines Intervalls wurden summiert, durch die Gesamtbeobachtungszeit dividiert und mit 100 % multipliziert. Hieraus ergab sich der prozentuale Anteil dieser Intervalle an der Gesamtbeobachtungszeit in Prozent. Partikelanzahl und Gesamtbeobachtungszeit waren ohne Tentoxin 12 (3600 s), unter inhibierenden Bedingungen 10 (3296,5 s) und bei Reaktivierung 11 (3584,1 s).

Pausenintervall	ohne Tentoxin	Inhibierung	Reaktivierung
	[%]	[%]	[%]
0,17–1 s	9,8	11,7	24,8
1–10 s	4,0	37,1	3,6
10–300 s	30,0	25,1	1,8
Gesamt	43,8	73,9	30,2

Zusätzlich waren aber noch Pausen zu beobachten, welche bezüglich ihrer Länge zwischen kurz und lang anzusiedeln waren. Diese Pausen zwischen 1 und 10 Sekunden machten mit ca. 37 % einen erheblichen Anteil der Versuchszeit aus. Insgesamt ergab sich eine durchschnittliche Rotationsgeschwindigkeit von ca. 0,4 U/s.

Die Rotation des reaktivierten Komplexes zeigte wiederum ein komplett anderes Muster. Sehr auffällig war das fast vollständige Fehlen langer Pausen über 10 Sekunden (weniger als 2 % der Gesamtzeit). Die Rotation der einzelnen Partikel erschien im Vergleich zu den Versuchen ohne Toxin sehr homogen und gleichmäßig. Sie war aber von sehr vielen kurzen Pausen unterbrochen. Der reaktivierte Komplex verharrte hier ca. 25 % der Versuchszeit. Durch die kurzen Pausen verringerte sich die maximale Umdrehungsgeschwindigkeit und glich, im Gegensatz zu Experimenten ohne Toxin, der Durchschnittsgeschwindigkeit von ca. 2 U/s. Insgesamt verharrte der F₁-Komplex 43,8 % der Beobachtungszeit in Rotationspausen, wenn kein Tentoxin im Messpuffer enthalten war. In Gegenwart von 10 µM Toxin war der Prozentsatz der Zeit, in der der Komplex nicht rotierte mit 73,9 % stark erhöht, wohingegen der Wert für den reaktivierten Komplex mit insgesamt 30,2 % deutlich unter dem Wert ohne Toxin lag. Die Werte sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 aufgelistet.

In Abbildung 3.11 sind beispielhaft einige Ausschnitte von Rotationsverläufen aus Abbildung 3.10 mit einer höheren zeitlichen Auflösung dargestellt. In den Experimenten ohne Tentoxin ist die schnelle und nur von wenigen kurzen Pausen unterbrochene



Tab. 3.3: Zusammenfassung der Rotationsgeschwindigkeiten während der ATP-Hydrolyse des BP₁-Komplexes unter verschiedenen Tentoxin-Konzentrationen. Die hohe Standardabweichung bei den Versuchen ohne Tentoxin erklärt sich durch das heterogene Rotationsverhalten der Partikel zwischen schneller Rotation (4–5 U/s) und langen Rotationspausen.

	ohne Tentoxin	Inhibierung	Reaktivierung
Umdrehungen	7428	1321,2	7646,2
Umdrehungen/s	2,06	0,4	2,13
[%]	100 ± 51,7	19,6 ± 7,2	103,4 ± 20,4

Rotation der γ -Untereinheit deutlich zu sehen, wohingegen unter Tentoxin-Inhibierung (10 μ M TTX) die Rotation sehr viele Pausen aufweist, welche zudem länger andauern. Der reaktivierte Komplex (1 mM TTX) zeigt ein Muster, welches zwischen dem bei 0 und 10 μ M Tentoxin beobachteten Verhalten lag. Die Rotation wird sehr häufig von kurzen Pausen unterbrochen. Unter fast allen Bedingungen sind die Pausen durch Rotationen von dem Drittel einer Umdrehung oder eines Vielfachen davon getrennt, was bezogen auf den 360°-Vollkreis Teilschritte von 120° bedeutet. In einigen Experimenten unter inhibierenden Tentoxin-Konzentrationen werden jedoch abweichende bzw. stark schwankende Pausenpositionen beobachtet.

Die langen Pausen während der Rotation der γ -Untereinheit des F₁-Teilkomplexes sind auf die Inaktivierung durch ADP zurückzuführen. Dabei verharrt der Komplex in einer Position, welche von der schon beschriebenen 120°-Orientierung abweicht. Durch eine höhere zeitliche Auflösung und Verwendung von 40 nm großen Goldkolloidpartikeln, welche eine sehr geringe hydrodynamische Fracht darstellen, konnten die bis dahin bekannten 120°-Schritte [61] nochmals in Teilschritte von 90° und 30° unterteilt werden [62]. Dabei treibt die Bindung von einem Molekül ATP die Rotation um 90° voran, wohingegen die Drehung um weitere 30° durch die Produktfreisetzung geschieht. Durch Bestimmung der Orientierung der γ -Untereinheit während der langen, über 10 s dauernden Pausen konnte festgestellt werden, dass diese Pausen auf die Inaktivierung durch ADP zurückzuführen waren. In Abbildung 3.12 sind die Zeitverläufe einiger Partikel dargestellt, die in einer solch langen Pause verharrten. Die Orientierung der γ -Untereinheit wich hier in allen Fällen deutlich von den 120°-Schritten ab, wobei die Orientierung der γ -Untereinheit in Gegenwart von 10 μ M Tentoxin insgesamt unruhiger war.

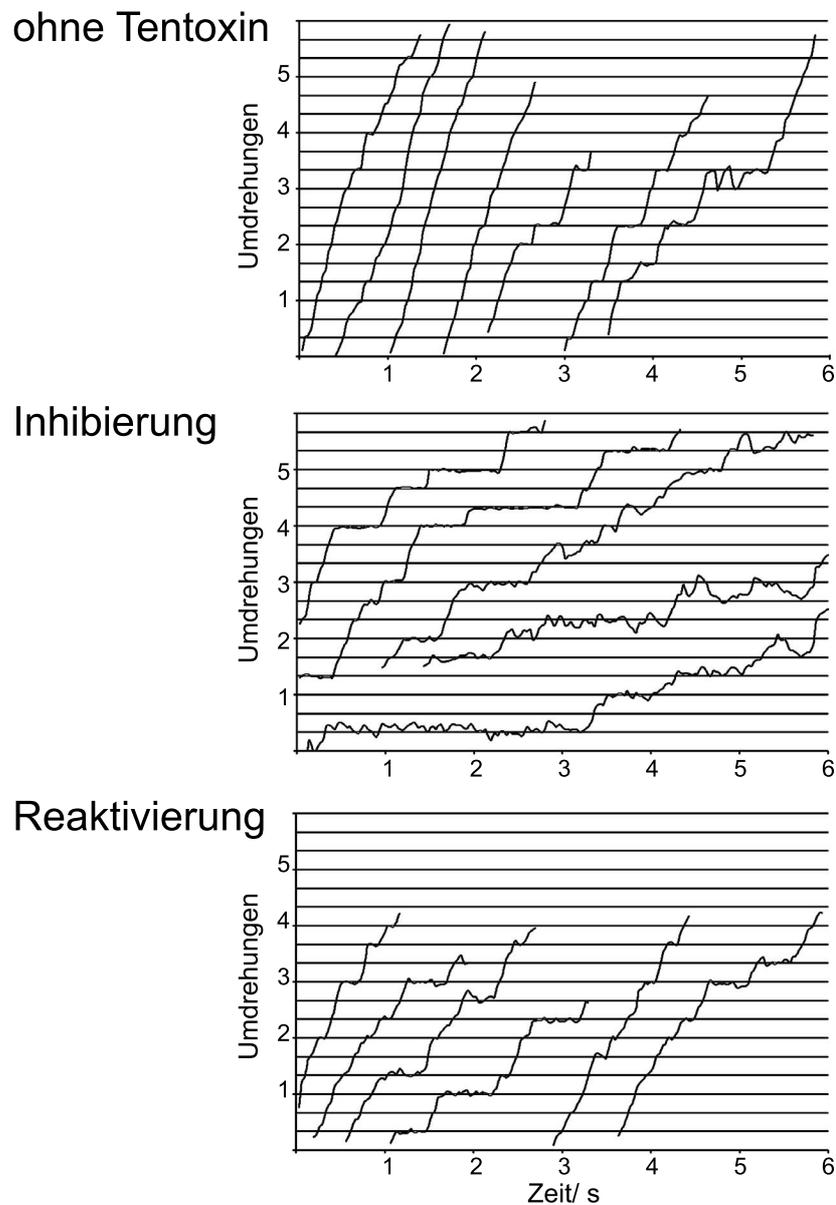


Abb. 3.11: Hohe zeitliche Auflösung der ATP-getriebenen Rotation der γ -Untereinheit ohne Tentoxin sowie unter inhibierenden und reaktivierenden Bedingungen. Exemplarisch sind kurze Abschnitte der in Abbildung 3.10 gezeigten Rotationen dargestellt. Durch die stark gespreizte Zeitachse sind kurze Unterbrechungen der Drehung detektierbar, welche besonders die Rotation unter Tentoxin-Einfluss (Inhibierung und Reaktivierung) bestimmen. Die Skalierung der Y-Achse ist so gewählt, dass jede Markierung ein Drittel einer ganzen Umdrehung repräsentiert, was bezogen auf eine Kreisbewegung Schritte von 120° bedeutet.

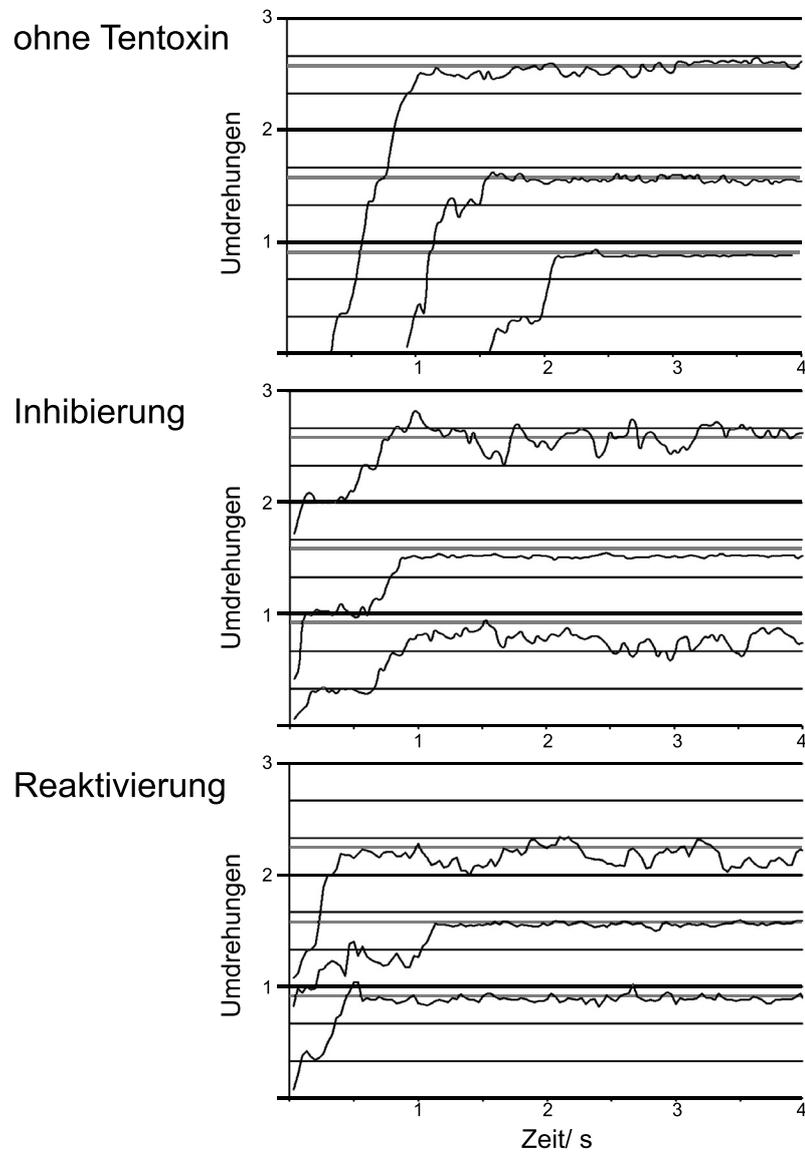


Abb. 3.12: Hohe zeitliche Auflösung der Orientierung der γ -Untereinheit kurz vor und während der langen Rotationspausen. Dargestellt sind beispielhafte Ausschnitte der in Abbildung 3.10 gezeigten Rotationsverläufe vor und während Rotationsstopps, welche länger als 10 Sekunden dauerten. Schwarze Linien der Y-Achsenmarkierung sind, auf den Vollkreis bezogen, 120° voneinander entfernt, graue Linien sind ca. 30° vor den schwarzen Linien angeordnet. Die Orientierungen der γ -Untereinheit während der Pausen lagen zwischen den 120° -Positionen und ließen sich auf Inaktivierung durch ADP zurückführen.



Die Untersuchung von Zeitverläufen liefert neben Erkenntnissen über Drehgeschwindigkeit und Rotation- bzw. Pausenmuster auch Informationen über die Kraft, welche die Rotationsbewegung antreibt. Durch Bestimmung der Winkelgeschwindigkeit und unter Berücksichtigung der Größe der gebundenen Filamente oder Kugeln ergibt sich nach folgender Formel das Drehmoment:

$$N = \omega \cdot \xi$$

wobei ω die maximale Winkelgeschwindigkeit in s^{-1} und ξ die hydrodynamische Fracht durch die angehängten Filamente oder Kugeln in N m s ist. Die maximale hydrodynamische Reibung ξ ist im Fall einer Doppelkugel durch

$$\xi = 2 \times 8\pi\eta a^3 + 6\pi\eta a^3 + 6\pi\eta a^3 = 76\pi\eta a^3$$

gegeben. Dabei ist a der Radius der Kugel und η die Viskosität des Mediums, welches für Wasser bei 23°C $0,93 \times 10^{-3} \text{ N s m}^{-2}$ beträgt [51].

Untersuchungen an F_1 -Komplexen des thermophilen *Bacillus PS3* ergaben Werte für N von ca. 44 pN nm [61]. In Abbildung 3.13 ist die Bestimmung der Winkelgeschwindigkeit von BP_1 dargestellt. Dabei wurden die Winkelgeschwindigkeiten von einzelnen Rotationsschritten ermittelt, um Einflüsse von kurzen Pausen zu vermeiden. Die zeitliche Auflösung betrug 33 ms. Die Versuche fanden in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ ATP und unter Verwendung von 350 nm Kugeln statt. Aus Experimenten ohne Tentoxin wurden insgesamt 6 Partikeln analysiert und hierbei 17 Einzelschritte untersucht. Bei $10 \mu\text{M}$ Tentoxin waren es 12 Schritte von 4 Partikeln und bei 1 mM 18 Schritte von 7 Partikeln. Die ermittelten Drehmomente in den Experimenten ohne Tentoxin ($43,5 \pm 6,7$ pN nm), unter inhibierenden ($39,8 \pm 6,3$ pN nm) und reaktivierenden ($46,9 \pm 5,7$ pN nm) Bedingungen wichen dabei nicht signifikant voneinander ab. Die Arbeit pro Schritt kann nach Gleichung

$$N_{120^\circ} = \frac{2}{3}\pi \cdot N_{\text{gesamt}}$$

berechnet werden und beträgt demnach ohne Tentoxin $91,1 \pm 14,0$ pN nm, mit $10 \mu\text{M}$ Tentoxin $83,4 \pm 13,2$ pN nm und bei 1 mM Tentoxin $98,2 \pm 11,9$ pN nm.

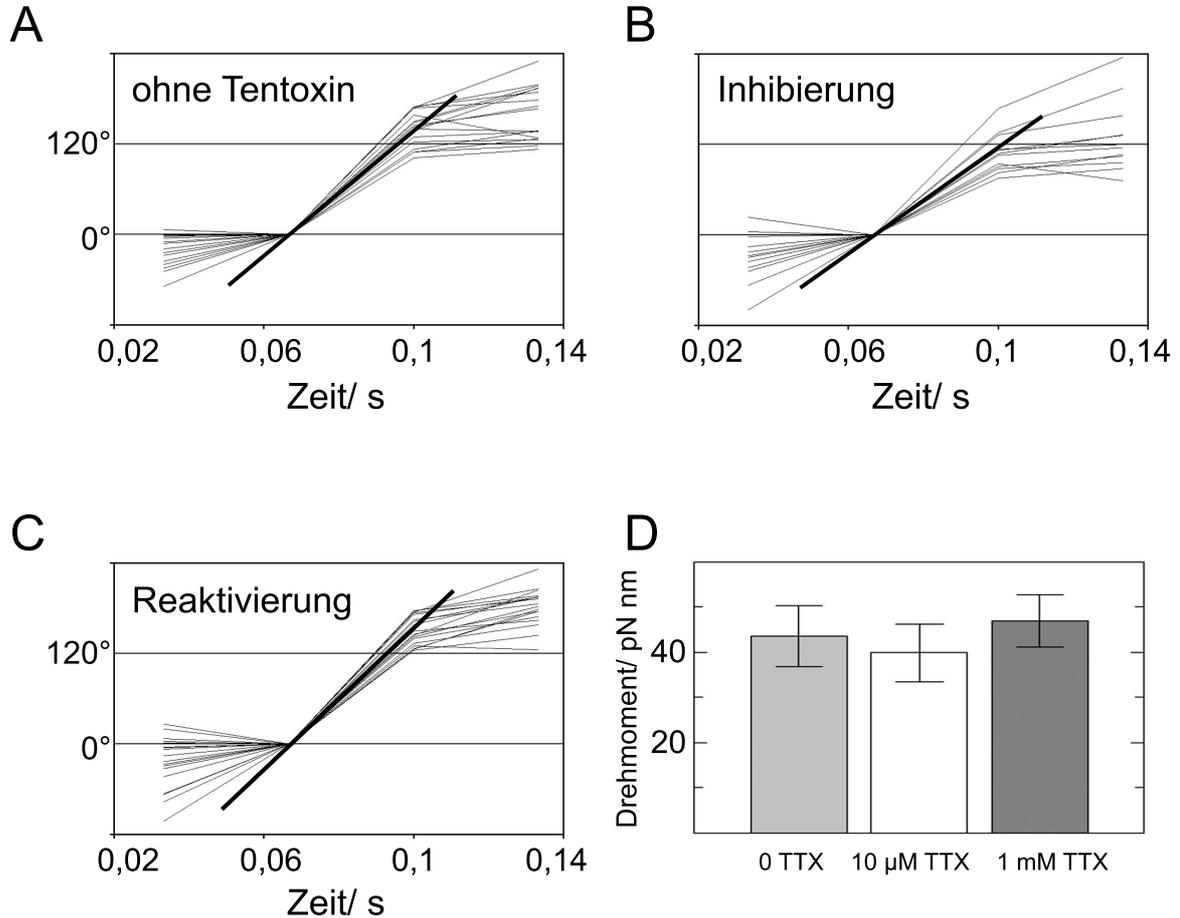


Abb. 3.13: Untersuchung des Einflusses von Tentoxin auf das Drehmoment. (A–C) Bestimmung der Winkelgeschwindigkeit einzelner Schritte während der Hydrolyse von 10 μM ATP ohne Zusatz von Tentoxin, sowie unter inhibierenden und reaktivierenden Tentoxinkonzentrationen. Insgesamt wurden 17 Schritte (0 TTX), 12 Schritte (10 μM TTX) und 18 Schritte (1 mM TTX) von je sechs, vier und sieben Partikeln übereinandergelegt. Die eingezeichnete Ausgleichsgerade repräsentiert den Durchschnitt der ermittelten Steigungen. In (D) ist das Ergebnis der Drehmomentbestimmung dargestellt. Nach der Formel $N = \omega \cdot \xi$ wurde das erzeugte Drehmoment für jeden Schritt bestimmt und der Durchschnitt berechnet. Die Drehmomentwerte weichen unter den inhibierenden und reaktivierenden Bedingungen ($39,8 \pm 6,3$ pN nm bzw. $46,9 \pm 5,7$ pN nm) nicht signifikant von dem Wert ohne Tentoxin ($43,5 \pm 6,7$ pN nm) ab.



3.4.3 Kinetische Analyse der Rotationspausen

Neben der Untersuchung der Zeitverläufe der ATP-getriebenen Rotation liefert eine detaillierte Analyse der Rotationspausen, deren Dauer und Häufigkeit, wichtige Erkenntnisse über katalytische Parameter. Durch Summierung von Pausen gleicher Länge und der Auftragung der jeweiligen Pausenhäufigkeit gegen die entsprechende Pausenlänge erhält man exponentielle Zusammenhänge, deren Ratenkonstanten kinetischen Zeitkonstanten zugeordnet werden können.

In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse einer solchen Auftragung dargestellt. Dazu wurden die beobachteten Pausenlängen aus den Untersuchungen, welche schon für die Bestimmung der Zeitverläufe benutzt wurden, in Intervallen von 200 ms gebündelt. Das entsprach dem Sechsfachen der zeitlichen Auflösung der CCD-Kamera. Diese Intervalle wurden über alle beobachteten Partikel summiert und gegen die Zeit aufgetragen.

In Experimenten ohne Tentoxin (Abb. 3.14 A) ergab sich ein exponentieller Abfall der Pausenlänge entsprechend der Gleichung: $C \times \exp(-k \cdot t)$, wobei k die Ratenkonstante und t die Pausenlänge sind. Für k ergab sich ein Wert von $8,09 \pm 0,15 \text{ s}^{-1}$, was einer Zeitkonstanten von $123,6 \pm 2,3 \text{ ms}$ entsprach. Ein ähnliches Ergebnis war bei dem reaktivierten Komplex (C) festzustellen. Hier konnte ebenfalls ein exponentieller Zusammenhang zwischen Pausenlänge und -häufigkeit beobachtet werden. Die ermittelte Ratenkonstante von $8,44 \pm 0,13 \text{ s}^{-1}$ entsprach einer Zeitkonstanten von $118,5 \pm 1,8 \text{ ms}$ und war vergleichbar mit der Konstante ohne Tentoxin. Ein Unterschied zwischen dem unbehandelten und dem reaktivierten Komplex zeigte sich aber in der Amplitude der Exponentialfunktion. Bei etwa gleicher Gesamtbeobachtungszeit der gemessenen Einzelmoleküle (3600 s ohne bzw. 3584,1 s mit 1 mM Tentoxin) waren unter reaktivierenden Konzentrationen an Tentoxin im Messpuffer deutlich mehr Pausen zu detektieren (1302 ohne Tentoxin bzw. 3266 bei 1 mM).

Das Ergebnis der Pausenanalyse des inhibierten Komplexes wich im Hinblick auf die Pausenverteilung hingegen stark ab. Der Abfall der Pausenlängen konnte nicht mit einer exponentiellen Funktion mit einer einzelnen Ratenkonstanten beschrieben werden. In Abbildung 3.14 B sieht man das zugehörige Pausenhistogramm. Die Kurven zeigen neben der einfachexponentiellen Funktion, die Summe zweier exponentieller Funktionen: $C_1 \times \exp(-k_1 \cdot t) + C_2 \times \exp(-k_2 \cdot t)$ mit $k_1 = 3,73 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$ und $k_2 = 0,47 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$. Hieraus ergaben sich die beiden Zeitkonstanten $268,1 \pm 8,6 \text{ ms}$ und $2,1 \pm 0,3 \text{ s}$. Die Gesamtzahl der beobachteten Pausen lag dagegen nur leicht über der Bedingung ohne

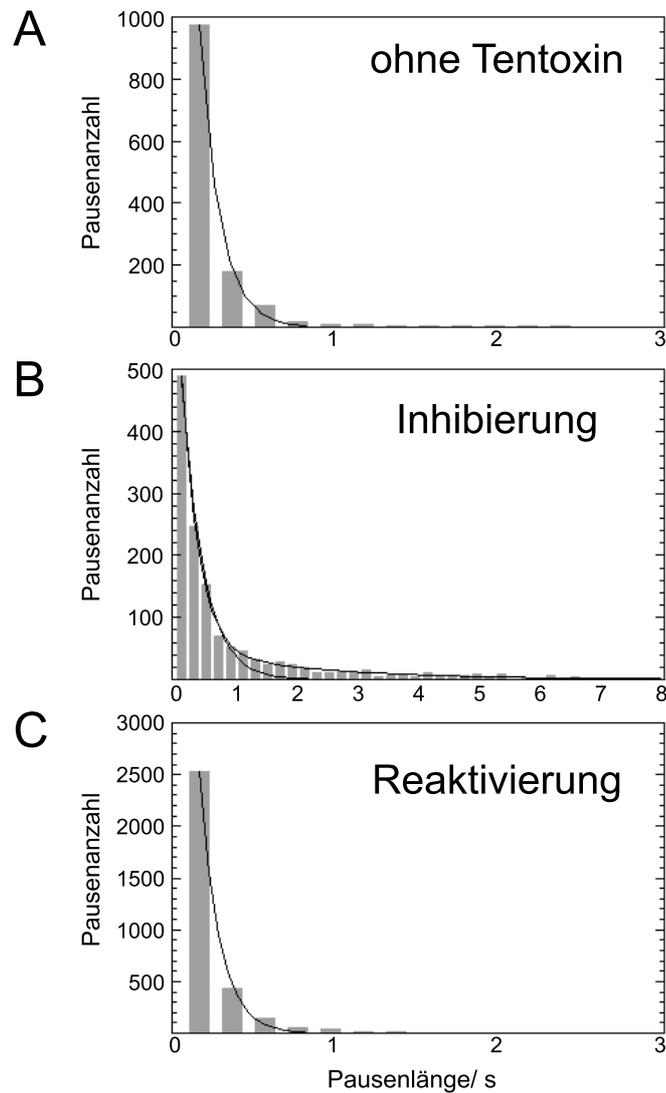


Abb. 3.14: Kinetische Analyse der Pausen ≤ 10 s. Pausen gleicher Länge über alle beobachteten Partikel der jeweiligen Reaktionsbedingung wurden summiert und in Pausenintervallen von 200 ms zusammengefasst. Die Histogramme zeigen die Häufigkeit der Pausenintervalle in Abhängigkeit der entsprechenden Pausenlängen. Die Linien in (A) und (C) repräsentieren exponentielle Funktionen $C \times \exp(-k \cdot t)$ mit Ratenkonstanten k und Pausenlängen t . Werte für k ohne Tentoxin $8,09 \pm 0,15 \text{ s}^{-1}$ und unter reaktivierten Bedingungen von $8,44 \pm 0,13 \text{ s}^{-1}$ entsprechen Zeitkonstanten von $123,6 \pm 2,3 \text{ ms}$ bzw. $118,5 \pm 1,8 \text{ ms}$. Bei Zusatz von $10 \mu\text{M}$ Tentoxin (B) folgt der Abfall der Pausenlängen der Summe zweier exponentieller Funktionen: $C_1 \times \exp(-k_1 \cdot t) + C_2 \times \exp(-k_2 \cdot t)$ mit $k_1 = 3,73 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$ und $k_2 = 0,47 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$, entsprechend der Zeitkonstanten $268,1 \pm 8,6 \text{ ms}$ und $2,1 \pm 0,3 \text{ s}$. Als Vergleich ist auch eine einfachexponentielle Funktion eingezeichnet.



Tab. 3.4: Zusammenfassung der kinetischen Pausenanalyse der kurzen Rotationspausen ≤ 10 s. Dabei wurden die Pausenereignisse zu Intervallen von 200 ms zusammengefasst und deren Häufigkeit gegen die Pausenlänge aufgetragen. Der Abfall der Intervallhäufigkeiten konnte durch einfach- bzw. doppeltexponentielle Funktionen beschrieben werden.

	ohne Tentoxin	Inhibierung	Reaktivierung
Pausen (≤ 10 s)	1302	1375	3266
Kinetik	einfach- exponentiell	doppelt- exponentiell	einfach- exponentiell
Ratenkonstante [s^{-1}]	$8,09 \pm 0,15$	$3,73 \pm 0,12$ $0,47 \pm 0,06$	$8,44 \pm 0,13$
Zeitkonstante [ms]	$123,6 \pm 2,3$	$268,1 \pm 8,6$ $2,1 \pm 0,3$ s	$118,5 \pm 1,8$

Tentoxin (1375 Pausen während insgesamt 3296,5 s). Alle Werte der Pausenanalysen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Normiert man die Pausenhäufigkeiten pro Komplex und bildet die Differenzen zwischen den Messreihen der unterschiedlichen Toxinbedingungen, kann man den Unterschied der Pausenverteilung besser erkennen (Abbildung 3.15). Aufgrund der in etwa gleichen Ratenkonstanten in Experimenten ohne Tentoxin und in Experimenten unter reaktivierenden Bedingungen ergab die Differenz in A erwartungsgemäß ebenfalls einen exponentiellen Zusammenhang mit einer vergleichbaren Zeitkonstante von $115,7 \pm 1,7$ ms. Betrachtet man die Differenz zwischen inhibiertem und nicht inhibiertem Komplex (B), so ist nur die Häufigkeit des ersten Pausenintervalls (166–366 ms) bei dem inhibierten Komplex geringer. Alle folgenden Intervalle kommen häufiger pro Komplex vor. Dieses Schema ist auch bei der Differenz zwischen Experimenten mit $10 \mu\text{M}$ und 1 mM Tentoxin zu erkennen. Die Rotation des inhibierten Komplexes zeichnet sich demnach durch häufige Pausen mittlerer Länge zwischen 1 und 10 s aus.

Im Folgenden wurden die Verteilungen der langen Pausen über 10 s untersucht. Diese Rotationspausen sind auf die Inaktivierung der Komplexe durch ADP zurückzuführen [90], deren Halbwertszeit an TF_1 mit ca. 56 s, berechnet wurde. Aufgrund der sehr viel geringeren Anzahl an Pausen, wurden diese in der vorliegenden Arbeit zu Intervallen von 40 s zusammengefasst. Die Häufigkeit der Intervalle wurde in Histogrammen gegen die jeweilige Pausenlänge aufgetragen (Abbildung 3.16).

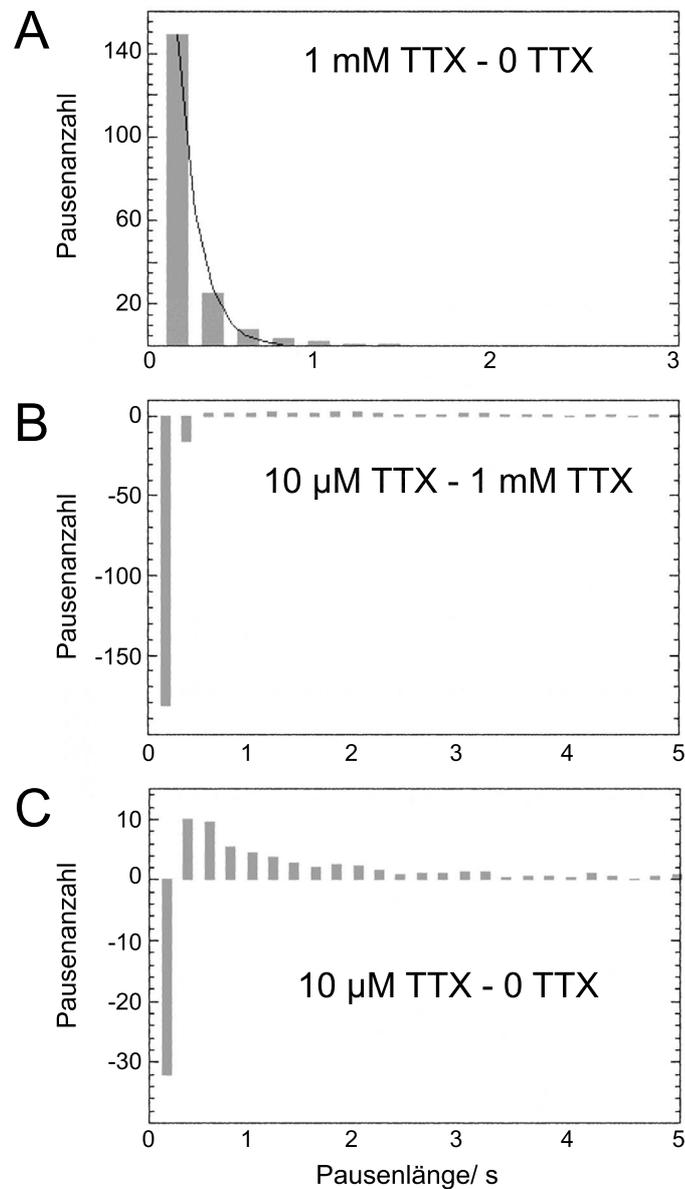


Abb. 3.15: Darstellung von Differenzhistogrammen der Pausenhäufigkeiten unter verschiedenen Tentoxin-Konzentrationen. Die Differenzen der Anzahlen an Pausenintervallen pro BP₁ wurden unter verschiedenen Tentoxin-Konzentrationen für jedes Pausenintervall berechnet. In (A) ist die Differenz der Pausenhäufigkeiten von reaktiviertem Komplex und Komplex ohne Tentoxin gezeigt, in (B) von inhibiertem und reaktiviertem Komplex und in (C) die Differenzen von inhibiertem Komplex und Komplex ohne Toxin.



Die ATP-Konzentration im Messpuffer betrug $10\ \mu\text{M}$ ATP und es wurden $350\ \text{nm}$ Kunststoffkugeln benutzt. Die Anzahl der beobachteten Partikel entsprach den der vorangegangenen Rotationsversuche: 12 ohne Tentoxin, 10 mit $10\ \mu\text{M}$ Toxin und 11 mit $1\ \text{mM}$ Tentoxin. Die Pausenverteilungen konnten mit Ausnahme der Messreihen mit $1\ \text{mM}$ TTX durch Exponentialfunktionen mit jeweils einer Ratenkonstanten beschrieben werden. In Abwesenheit von Tentoxin betrug diese $0,0235 \pm 0,0025\ \text{s}^{-1}$ (A) und unter Tentoxin-Inhibierung $0,0333 \pm 0,0026\ \text{s}^{-1}$ (B). Dies entsprach Zeitkonstanten von $42,6 \pm 4,5\ \text{s}$ bzw. $30,0 \pm 2,3\ \text{s}$. Aufgrund der wenigen langen Pausen unter reaktivierenden Bedingungen konnte keine Regressionskurve ermittelt werden.

Bei der Untersuchung von einzelnen Enzymkomplexen besteht die Gefahr durch eine subjektive Auswahl von Partikeln das Ergebnis zu beeinflussen. Deshalb sollten die Messwerte, welche in den *bulk*-Experimenten erhalten wurden, mit den Ergebnissen der Einzelmolekülmessungen verglichen werden. In Abbildung 3.17 sind deswegen die jeweiligen Umsatzraten ohne Tentoxin sowie unter inhibierenden und reaktivierenden Bedingungen für Einzelmolekül- (SME) und *bulk*-Experiment (Bulk) dargestellt. Unter allen Bedingungen betrug die ATP-Konzentration $10\ \mu\text{M}$. Bei der Annahme von drei hydrolysierten Molekülen ATP pro Umdrehung wurde die Umsatzrate der Einzelmolekülexperimente aus der Durchschnittsgeschwindigkeit der Rotation ermittelt und mit der Umsatzrate der *bulk*-Experimente aus der *steady-state*-Hydrolyserate nach ca. 1 h verglichen.

Das linke Schaubild stellt die absoluten Umsatzraten von ATP-Molekülen pro Komplex und Sekunde dar. In Rotationsexperimenten ohne Tentoxin betrug diese Rate $6,19 \pm 3,2\ \text{s}^{-1}$, unter inhibierenden Bedingungen $1,2 \pm 0,4\ \text{s}^{-1}$ und unter reaktivierten Bedingungen $6,4 \pm 1,3\ \text{s}^{-1}$. Die vergleichbaren Bulkergebnisse waren mit $2,6 \pm 0,4\ \text{s}^{-1}$, $0,6 \pm 0,1\ \text{s}^{-1}$ und $4,4 \pm 0,6\ \text{s}^{-1}$ niedriger. Zudem sind die Standardabweichungen, besonders im Versuch ohne Tentoxin, größer. Das rechte Histogramm stellt die relativen auf die Bedingung ohne Tentoxin normierten Umsatzraten dar. In guter Übereinstimmung mit den *bulk*-Experimenten erkennt man die Inhibierung durch das Toxin bei Einzel- ($19,6 \pm 7,2\ \%$) und *bulk*-Experiment ($22,7 \pm 5,6\ \%$). Nicht so deutlich stellte sich die Situation der Reaktivierung dar. Mit $103,4 \pm 20,4\ \%$ im Einzelmolekülexperiment war die Aktivitätssteigerung durch hohe Konzentrationen an Tentoxin sehr viel geringer als im *bulk*-Experiment mit $165,9 \pm 22,8\ \%$.

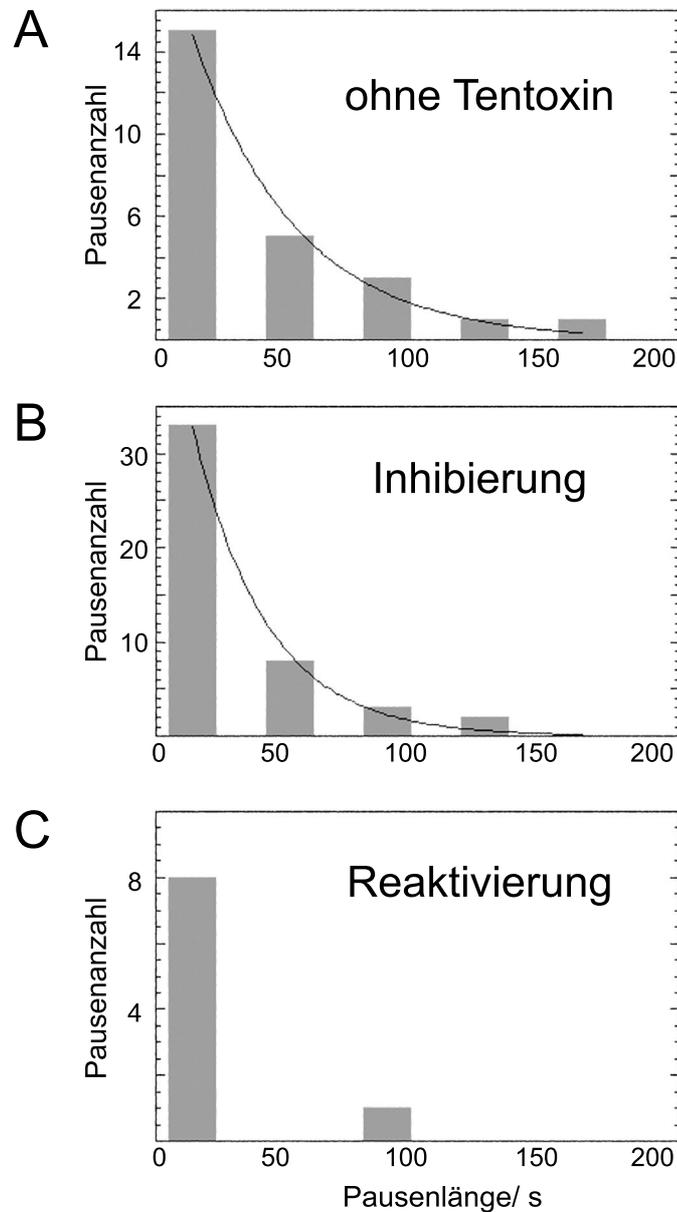


Abb. 3.16: Kinetische Analyse der Rotation. Histogrammdarstellung des Abfalls der Länge von Pausen ≥ 10 s. Unter allen Bedingungen wurden die langen Pausen über 10 s summiert, in Intervallen zu 40 s zusammengefasst und gegen die Pausenlänge aufgetragen. Der Hydrolysepuffer enthielt $10 \mu\text{M}$ ATP, der Kugeldurchmesser betrug 350 nm. In (A) und (B) sind Exponentialfunktionen mit Ratenkonstanten von $0,0235 \pm 0,0025 \text{ s}^{-1}$ bzw. $0,0333 \pm 0,0026 \text{ s}^{-1}$ eingezeichnet. Dies entspricht Zeitkonstanten von $42,6 \pm 4,5 \text{ s}$ und $30,0 \pm 2,3 \text{ s}$. Die Anzahl der Pausen lassen in (C) keine fundierten Berechnungen kinetischer Parameter zu.

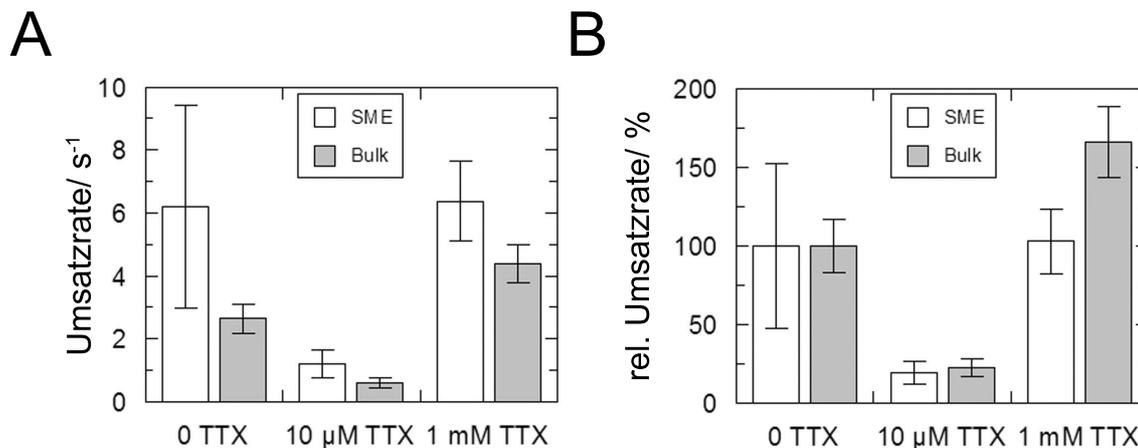


Abb. 3.17: Vergleich der Umsatzraten im *bulk*- und Rotationsexperiment. Absolute Raten wurden im *bulk*-Experiment durch die Bestimmung der *steady-state*-Hydrolyserate nach ca. 1 h bei 10 μM ATP bestimmt und als umgesetzte ATP-Moleküle pro Komplex und Sekunde angegeben. Die Versuche wurden bei 23°C durchgeführt und die Reaktion durch Zusatz von 0,2 μg biotinyliertem BP₁ gestartet. Die Umsatzraten der Einzelmolekülmessungen wurden durch Bestimmung der Durchschnittsgeschwindigkeit der Rotation (Umdrehungen pro Beobachtungszeit), unter der Annahme von drei umgesetzten ATP-Molekülen pro 360°-Drehung, erhalten. Die Versuche fanden ebenfalls bei 23°C und 10 μM ATP statt, es wurden 350 nm Kugeln für die Visualisierung der Rotation benutzt. Durchschnittliche Dauer eines Einzelmolekülexperimentes war 1 h, in der ca. drei bis vier Partikel jeweils fünf Minuten beobachtet wurden.

3.4.4 Analyse der Rotororientierung während der Rotationspausen

Während der ATP-Hydrolyse durchlaufen die drei katalytischen Nukleotidbindestellen der β -Untereinheit jeweils die Konformationen β_{DP} (fest), β_{TP} (locker) und β_E (offen). Durch Einsatz von submikromolaren Konzentrationen an ATP konnte diese dreizählige Achsensymmetrie auch bei Rotationsexperimenten nachgewiesen werden [61]. Dabei verharrte das Enzym statistisch verteilt in einer der drei ATP-Wartepositionen und rotierte diskontinuierlich in 120°-Schritten. Eine solche Darstellung der Orientierung der γ -Untereinheit des BP₁-Komplexes während der Hydrolyse von ATP ist in Abbildung 3.18 gezeigt. Jeder Punkt symbolisiert die Position des beweglichen Endes der Doppelkugel. In Experimenten ohne Tentoxin (A) waren die Positionen gleichmäßig auf einer Kreisbahn um das Rotationszentrum verteilt. Die erhöhte Dichte an Punkten in der linken unteren Ecke war auf eine lange Rotationspause zurückzuführen, in



der die γ -Untereinheit mehr oder weniger auf einer Stelle verharrte. Diese Pause konnte durch die Analyse der Winkelorientierung der γ -Untereinheit wie in Abbildung 3.12 auf eine ADP-Inaktivierung zurückgeführt werden und wurde in A' aus den Datensätzen gelöscht. In B sind die Orientierungen der γ -Untereinheit unter inhibierenden Konzentrationen von Tentoxin dargestellt. Deutlich zu sehen waren drei Stellen erhöhter Punktdichte, dessen Zentren ca. 120° voneinander entfernt lagen. Die Orientierungen, in denen sich die γ -Untereinheit häufiger aufhielt, waren aber über $30\text{--}45^\circ$ verteilt, so dass eine Unterteilung in Zwischenorientierungen erschwert wurde. B' zeigt analog zu A' die Pausenpositionen nach Entfernung einer langen Pause. Der reaktivierte Komplex in C zeigte eine Mischung zwischen A' und B. Klar erkennbar waren die drei 120° voneinander entfernten Bereiche auf der Kreisbahn, die nur etwas diffuser als unter inhibierenden Tentoxinkonzentrationen war. Die Orientierungen der Doppelkugel und damit der γ -Untereinheit während der ATP-Hydrolyse waren etwas ausgeglichener, jedoch nicht so homogen wie in A' ohne Tentoxin.

Da unter den beschriebenen Bedingungen von $10\ \mu\text{M}$ ATP und der Verwendung von $350\ \text{nm}$ Kugeln keine bevorzugten Orientierungen der γ -Untereinheit ohne Tentoxin zu detektieren war, wurden Experimente bei submikromolaren ATP-Konzentrationen mit $200\ \text{nm}$ Kugeln durchgeführt. Um die möglichen, bevorzugten Orientierungen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden sogenannte Pufferaustauschexperimente durchgeführt, in denen die Rotation und die Orientierung der γ -Untereinheit zuerst ohne Tentoxin $5\ \text{min}$ beobachtet wurden. Durch einen Pufferaustausch gegen Reaktionsspuffer mit $10\ \mu\text{M}$ Tentoxin und einer $30\ \text{minütigen}$ Inkubation wurden die Partikel nochmals $5\ \text{Minuten}$ beobachtet. Die jeweiligen Zeitverläufe sind in Abbildung 3.19 A dargestellt. Neben dem Kontrollexperiment (K) wurden insgesamt fünf Partikel beobachtet und der Einfluss von inhibierenden Tentoxin-Konzentrationen analysiert. Drei der beobachteten Partikel (I–III) zeigten eine stark beeinträchtigte Rotation, wobei Partikel III unter inhibierenden Bedingungen erst kurz vor Versuchsende weiterrotierte. Zwei Partikel zeigten bei $10\ \mu\text{M}$ Tentoxin gar keine Drehung, wobei Partikel V schon vor dem Pufferwechsel stoppte.

In Abbildung 3.19 B sind die zugehörigen Orientierungen der γ -Untereinheit während der Rotation gezeigt. Deutlich sind in den Experimenten ohne Tentoxin drei bevorzugte Orientierungen zu detektiert, welche ca. 120° voneinander entfernt lagen. Diese erst unter submikromolaren Substratkonzentrationen klar beobachtbaren Positionen werden im Folgenden als ATP-Wartepositionen bezeichnet. In einem Kontrollexperiment, in

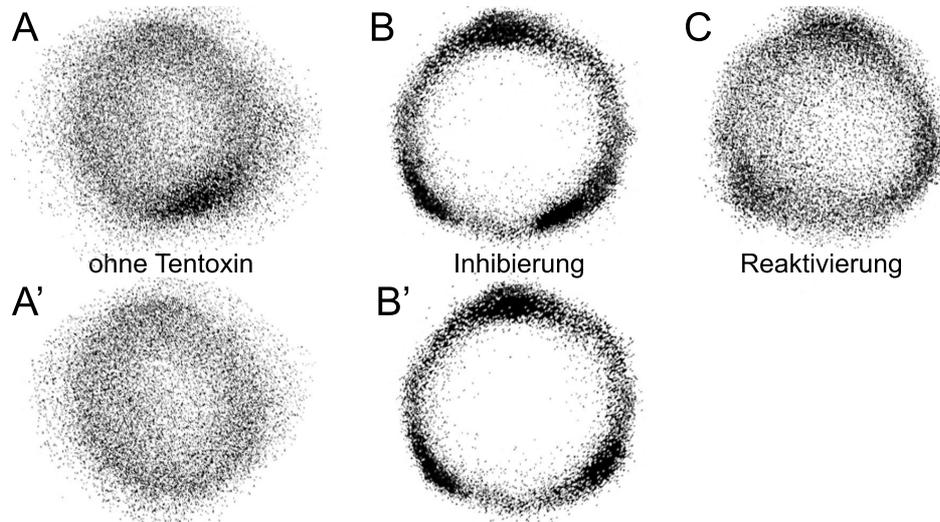


Abb. 3.18: Orientierung der γ -Untereinheit während der ATP-getriebenen Rotation. Die während der Rotationsexperimente durchgeführten Videoaufnahmen (30 Bilder pro Sekunde) wurden mit einer Analysesoftware (Crest Image) ausgewertet, bei der das Programm das Rotationszentrum sowie das äußere, bewegliche Ende des Doppelkugel erkannte und die Rotation in x- und y-Koordinaten des beweglichen Endes relativ zum Zentrum ($x = 0$; $y = 0$) pro Bild umsetzte. Jeder Punkt symbolisiert die Position des beweglichen Endes einer Kunststoffdoppelkugel um das Rotationszentrum herum. Die Drehrichtung verlief gegen den Uhrzeigersinn. Die Häufung der unteren Orientierung in (A) und (B) war auf das Vorhandensein einer langen ADP-Inaktivierungspause zurückzuführen, welche in (A') bzw. (B') aus den Rotationsdaten gelöscht wurde. Durch Zusatz von Tentoxin werden drei bevorzugte, 120° voneinander entfernte Orientierungen erkennbar, welche bei Inhibierung am stärksten ausgeprägt waren. Die Diagramme repräsentieren jeweils drei überlagerte Partikel, wobei Orientierungen erhöhter Punktdichte übereinander angeordnet wurden.

dem der Austauschpuffer kein Tentoxin enthielt, konnte keine Verschiebung oder Veränderung der drei ATP-Wartepositionen festgestellt werden (schwarze Punkte: Orientierungen vor dem Pufferwechsel; rote Punkte: Orientierungen nach dem Pufferwechsel). Diejenigen Partikel, die nach dem Pufferwechsel weiterrotierten (I; II und III), zeigten ebenfalls keine Veränderung in den Positionen der bevorzugten Orientierungen. Partikel III verbrachte fast die gesamte Beobachtungszeit in einer Position ca. 90° nach einer ATP-Warteposition, wohingegen die bevorzugten Positionen während der Rotation am Ende des Versuches wieder mit den ATP-Wartepositionen übereinstimmten. Die nach Tentoxin-Inhibierung nicht mehr rotierenden Partikel IV und V zeigten Veränderungen der bevorzugten Orientierungen um $10\text{--}30^\circ$ nach einer ATP-Warteposition.

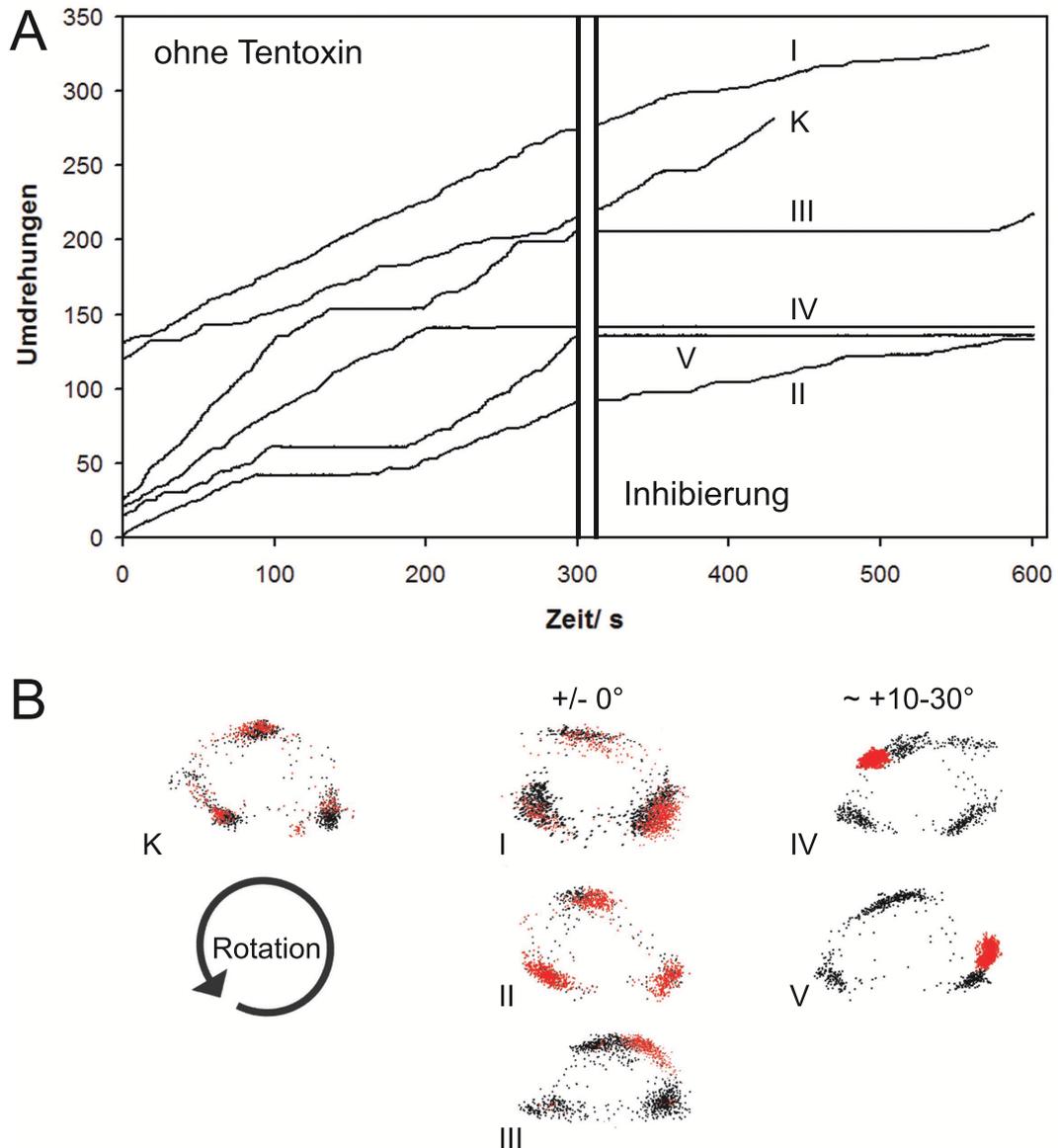


Abb. 3.19: Einfluss der Tentoxin-Inhibierung auf bevorzugte Orientierungen der γ -Untereinheit während der Hydrolyse von submikromolaren Mengen an ATP. (A) zeigt die Zeitverläufe der Rotationen. Zuerst wurden die Partikel 5 min beobachtet ($0,5 \mu\text{M}$ ATP, 200 nm Kunststoffkugeln). Nach anschließendem Pufferaustausch gegen Reaktionspuffer mit $10 \mu\text{M}$ Tentoxin und 30 minütiger Inkubation wurden die selben Partikel noch einmal für 5 min beobachtet. K ist ein Kontrollpartikel dessen ausgetauschter Reaktionspuffer kein Toxin enthält. (B) zeigt die zugehörigen Orientierungen der γ -Untereinheit. Die Rotationsrichtung während der Hydrolyse verlief gegen den Uhrzeigersinn. Schwarze Punkte repräsentieren die Position des beweglichen Endes der Kunststoffdoppelkugeln um das Rotationszentrum vor dem Pufferaustausch, rote Punkte die Position nach dem Pufferaustausch.



4 Diskussion

Die grundsätzliche Arbeitsweise der F_0F_1 -ATP-Synthase wurde zu großen Teilen durch die Strukturbestimmung des F_1 -Komplexes aus Rinderherzmitochondrien [22] und der direkten Beobachtung der Rotation des bakteriellen Enzyms [56] abgeleitet. Eine gestörte Regulation des Enzyms wird in verschiedenen Spezies mit schweren Krankheiten in Verbindung gebracht [122].

Tentoxin, ein pflanzenspezifisches Toxin, führt in sensitiven Pflanzen zu Chlorose und Störung des Wachstums [123, 124]. Durch Aufklärung der Struktur des inhibierten Komplexes [24] und biochemische Untersuchungen [99, 105, 106] wurden Modelle entwickelt, welche die inhibierenden und reaktivierenden Effekte von Tentoxin auf die chloroplastidäre ATP-Synthase beschreiben. Erste Rotationsexperimente zeigten, dass die Rotationsmuster des inhibierten und reaktivierten Enzyms Unterschiede aufweisen [109], wobei der in diesen Versuchen eingesetzte, bakterielle Komplex durch gerichtete Mutagenese nur bedingt sensitiv gegenüber Tentoxin war. Der katalytische F_1 -Teilkomplex aus *Thermosynechococcus elongatus*, ein wichtiger Modellorganismen in der Erforschung der Photosynthese [125, 126], ist ebenso wie das gut charakterisierte chloroplastidäre Enzym aus Spinat sensitiv gegenüber Tentoxin. Der cyanobakterielle Komplex lässt sich aber im Gegensatz hierzu heterolog in *Escherichia coli* exprimieren, was die detaillierte Untersuchung der Tentoxin-Effekte in Einzelmolekülexperimenten ermöglicht.

4.1 *bulk*-Experimente

4.1.1 Kinetische Parameter

Die Untersuchung der Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration folgte einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m -Wert von ca. 60 μM ATP und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 10 μmol ATP pro Minute und mg Enzym. Damit lag der ermittelte K_m zwischen entsprechenden Werten anderer pflanzlicher [127, 128], sowie bakterieller und mitochondrieller [129–131] F_1 -Komplexe. Gleiches war bei der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen [105].



4.1.2 Einfluss von Tentoxin

Die katalytische Aktivität des F_1 -Komplexes aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* wurde bei verschiedenen Tentoxin-Konzentrationen gemessen (Abschnitt 3.2.2) und zeigte die für F_1 -Komplexe Tentoxin-sensitiver Spezies beschriebene, Inhibierung bei niedrigen Tentoxin-Konzentrationen ($\leq 10 \mu\text{M}$) und eine Überaktivierung bei hohen Tentoxin-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$). Der Grad der Inhibierung und Reaktivierung stimmte dabei mit den ermittelten Werten des chloroplastidären Enzyms aus Spinat überein [99, 105]. Unter der Annahme, dass die Bindung eines Tentoxin-Moleküls die Aktivität des F_1 -Teilkomplexes inhibiert und die Bindung eines weiteren Moleküls die Aktivität reaktiviert, konnten zwei K_d -Werte berechnet werden. Mit $0,8 \mu\text{M}$ lag der erste K_d etwa 2–3 Größenordnungen über den Werten des Enzyms aus *Spinacia oleracea* [99, 100], wohingegen die zweiten K_d -Werte mit ca. $80 \mu\text{M}$ gut übereinstimmten. Grund für den großen Unterschied des ersten K_d -Wertes könnte der Alaninrest an Position 81 der β -Untereinheit aus Spinat sein (siehe Anhang 6.2), an dessen Stelle bei dem cyanobakteriellen Komplex ein Serin ist. Dieser Austausch schwächt zum einen den hydrophoben Kontakt mit der Methylgruppe von L-MeAla¹ des Inhibitormolekül und zum anderen ist die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem Serin 81 und dem kritischen Aspartatrest 83 möglich, was zu einer gestörten Wechselwirkung mit dem Inhibitor führt [24, 103]. Alle anderen an der Tentoxin-Bindung beteiligten Reste des BP_1 -Komplexes und des CF_1 -Komplexes aus *Spinacia oleracea* sind hingegen identisch (Anhang 6.1 und 6.2).

Alle folgenden Untersuchungen zur Tentoxin-Inaktivierung und Reaktivierung wurden exemplarisch bei $10 \mu\text{M}$ Tentoxin (maximale Inhibierung) und 1 mM (maximale Reaktivierung) durchgeführt und den Ergebnissen der Untersuchungen ohne Tentoxin gegenübergestellt. Wie in Abbildung 3.4 gezeigt, war während der ATP-Hydrolyse beim Komplex ohne Tentoxin eine schnelle Anfangsphase zu beobachten, welche in eine langsamere *steady-state*-Rate überging, was mit der Inaktivierung durch fest gebundenes ADP erklärt werden kann [90, 91, 120, 121]. Die ermittelte Rate dieser Inaktivierung (Abbildung 3.5 A) war mit $0,045 \text{ s}^{-1}$ etwas geringer als bei dem thermophilen *Bacillus PS3* ($0,054 \text{ s}^{-1}$ [90]) oder dem Enzym aus Spinat ($0,058 \text{ s}^{-1}$ [132]).

Der zeitliche Verlauf unter inhibierenden Bedingungen war mit einer konstanten Reaktionsgeschwindigkeit dagegen einphasig. Die Ausbildung der Inhibierung bei $10 \mu\text{M}$ TTX war schnell, da selbst ohne Vorinkubation (Tentoxin nur im Hydrolysepuffer) die



Inhibierung von Anfang der Hydrolysemessung an vollständig ausgeprägt war (nicht gezeigt). Dies passt zu der Rate der Tentoxin-Bindung, welche für das Spinatenzym mit $4,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt wurde [105].

Der reaktivierte Komplex zeigte wiederum einen zweiphasigen Hydrolyseverlauf, gekennzeichnet von einer geringen Aktivität kurz nach Versuchsbeginn und einer höheren *steady-state*-Aktivität. Mit einer Zeitkonstante von ca. 400 s war die Reaktivierung langsam und unabhängig von der Vorinkubationszeit mit Toxin (nicht gezeigt). Demgegenüber verringerte sich die Ratenkonstante und das Ausmaß der Reaktivierung bei niedrigen ATP-Konzentrationen (Abbildung 3.5 B; Abbildung 3.6 A). Der Hydrolyseverlauf könnte durch die langsame Bindung des zweiten Toxinmoleküls erklärt werden, da nach Modellvorstellungen bei dem F_1 -Komplex aus *Spinacia oleracea* die Bindung eines zweiten Toxinmoleküls ebenfalls von der Nukleotidbeladung des Komplexes abhängig sein soll [99]. Aufgrund der langsameren Reaktivierung bei niedrigen ATP-Konzentrationen wurde in Vorexperimenten überprüft, ob unter den Bedingungen der geplanten Rotationsexperimente, welche für 30–60 min bei einer ATP-Konzentration von 10 μM durchgeführt wurden, ebenfalls eine Reaktivierung beobachtet werden konnte (Abbildung 3.6 B). Ab 10–20 min nach Reaktionsstart war die im Vergleich zum Komplex ohne Toxin höhere Hydrolyserate beobachtbar und ermöglichte so die Untersuchung der inhibierenden und reaktivierenden Effekte von Tentoxin auf die Hydrolyseaktivität des F_1 -Komplexes auf molekularer Ebene. Diese Aktivitätssteigerung bei hohen Toxinkonzentrationen war auf eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit des reaktivierten Komplex zurückzuführen, wohingegen die *steady-state*-Aktivität in Messreihen ohne Tentoxin konstant bei $0,44 \pm 0,07 \mu\text{mol ATP}/\text{min}$ und mg Protein lag. Eine Stabilisierung des Komplexes durch Tentoxin, wie dies für den $\alpha_3\beta_3$ -Komplex beschrieben wurde [128] war demnach nicht für die relative Aktivitätssteigerung verantwortlich.

4.1.3 Modulatoren der Tentoxin-Wirkung

Enzyminhibitoren stören die Katalyse durch Verhindern oder Verlangsamen einzelner Reaktionsschritte. So zeigt der Tentoxin-inhibierte CF_1 -Komplex aus *Spinacia oleracea* eine geschlossene Konformation der Nukleotidbindestelle, welche die sequentielle Umwandlung der katalytischen Bindestellen beeinträchtigt [24]. Gleiches gilt für den mitochondrialen Enzym-Inhibitor-Komplex mit Aurovertin B, wobei der Inhibitor hier ein Schließen der Nukleotidbindungstasche verhindert [133].



Im Gegensatz zur Inhibierung der ATP-Hydrolyse durch Tentoxin sind aufgrund der fehlenden Strukturinformationen die molekularen Hintergründe der Reaktivierung noch ungeklärt. Rotationsexperimente mit einem Tentoxin-sensitiven TF_1 -Komplex lieferten Hinweise auf eine verringerte ADP-Inaktivierung bei hohen Toxinkonzentrationen [109].

Zur Aufklärung möglicher Ansatzpunkte der Tentoxin-Wirkung innerhalb des katalytischen Zyklus wurde die *steady-state*-Aktivität des BP_1 -Komplexes bestimmt, wobei die Ausprägung der Inhibierung und Reaktivierung sowohl von dem Substrat, als auch von Zusätzen im Hydrolysemedium abhing. In Abbildung 3.7 und in Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse dieser *bulk*-Experimente zusammengefasst.

Während der ATP-Hydrolyse ohne weitere Zusätze im Medium (A) konnte eine fast vollständige Inhibierung, mit ca. 10% Restaktivität, und eine deutliche Reaktivierung (ca. 180%) festgestellt werden. Damit stimmte der Grad der Inhibierung und Reaktivierung durch Tentoxin mit den ermittelten Werten des chloroplastidären Enzyms aus Spinat gut überein [99, 105] und zeigte sich deutlich ausgeprägter als in dem sensitiven TF_1 -Komplex [103, 109].

In vorangegangenen Experimenten (Abbildung 3.6) wurde die Inhibierung durch Tentoxin auch unter geringen Substratkonzentrationen festgestellt, so dass eine gestörte Substratbindung ein mögliches molekulares Ereignis der Inhibierung darstellt. So zeigten Untersuchungen unter *uni-site*-Bedingungen, bei denen die Produktfreisetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, keine inhibierende Wirkung von Tentoxin [107]. Dem widersprach die Beobachtung, dass sich der apparente K_m -Wert für ATP durch Tentoxin-Zusatz nicht änderte (nicht gezeigt). Die Inhibierung könnte deshalb besser mit einer Störung der sequenziellen Umwandlung der Nukleotidbindestellen während der Katalyse erklärt werden [24, 119], da der $\alpha_3\beta_3$ -Komplex insensitiv gegenüber Tentoxin ist [128, 134, 135] und auch hier die *uni-site*-Katalyse nicht betroffen wäre. Im Falle der hohen Tentoxin-Konzentration wird die eindeutige Zuordnung der Substratbindung als molekularer Wirkort der Reaktivierung dadurch erschwert, dass die Bindung des zweiten oder möglicherweise dritten Tentoxin-Moleküls selbst von der Nukleotidbeladung des Komplexes abhängig ist.

Ein weiteres molekulares Ereignis im Arbeitszyklus des F_1 -Komplexes ist die hydrolytische Spaltung von ATP zu ADP und Phosphat. Um den Einfluss von Tentoxin auf diesen Reaktionsschritt zu untersuchen, wurden Experimente mit dem sehr langsam hydrolysierbaren ATP-Thiol-Analogon ATP γ S durchgeführt (Abbildung 3.7B). Bei der Umsetzung dieses ATP-Analogons waren keine signifikanten Effekte von Tentoxin zu



detektieren. Inhibierung und Reaktivierung wirkten sich demnach nicht auf die nun geschwindigkeitsbestimmende Hydrolysereaktion von ATP γ S aus. Hieraus folgt, dass dieses molekulare Ereignis der Katalyse von Tentoxin nicht beeinflusst wird.

Nach der hydrolytischen Spaltung von ATP erfolgt gemäß dem *binding-change*-Mechanismus die Produktfreisetzung von ADP bzw. Phosphat durch erneute ATP-Bindung an eine andere Nukleotidbindestelle [46]. Während dieses Prozesses kann eine Inaktivierung des Komplexes erfolgen, welcher in der Literatur als ADP-Inaktivierung beschrieben wird [86, 90, 120, 121]. Aufgrund der schon erwähnten Verbindung zwischen Tentoxin-Reaktivierung und einer verminderten ADP-Inaktivierung wurde die *steady-state*-Rate in Gegenwart von verschiedenen Agenzien untersucht, welche diese Inaktivierung verstärken oder abschwächen.

Setzt man ADP oder Azid in der Aktivitätsbestimmung ein, wird die Konformationsänderung in einen ADP-inaktivierten Komplex forciert bzw. der inaktive Komplex stabilisiert [86, 90, 136–138]. Die *steady-state*-Aktivität des Enzyms wird dadurch erniedrigt, da statistisch gesehen mehr Enzyme ADP-inaktiviert sind. Bei Messungen der Enzymaktivität unter diesen Bedingungen in Gegenwart inhibierender und reaktivierender Tentoxin-Konzentrationen, wurde im Vergleich der relativen Umsatzraten zu Versuchen ohne Inhibitor eine verminderte Inhibierung und eine deutlich stärkere Reaktivierung durch Tentoxin festgestellt (Abb. 3.7 C und D). Das Ausmaß der Inhibierung fiel von ca. 90 % auf ca. 40–50 %, wobei der reaktivierende Effekt hoher Tentoxin-Konzentrationen von knapp 100 % auf ca. 200 % stieg (Tabelle 3.1). Die jeweiligen Änderungen sind bei Azid-Zusatz stärker erkennbar und auf eine Verminderung der ADP-Inaktivierung zurückzuführen. Der durch Tentoxin vermittelte Schutz vor Inaktivierung durch ADP war schon bei einer Toxinkonzentration von 10 μ M zu beobachten und schloss eine gesteigerte ADP-Inaktivierung als Tentoxin-Inhibierungsmechanismus aus. Eine ähnlich verminderte ADP-Inaktivierung wurde für eine F₁-Mutante aus dem thermophilen *Bacillus PS3* beschrieben, bei der ein Threonin gegen ein Serin an der Stelle 165 des *P-loops* der β -Untereinheit ausgetauscht wurde [129]. Der entsprechende Rest des mitochondrialen Komplexes ist an der Koordination des Magnesiumions in der Nukleotidbindetasche beteiligt [22]. Eine Aussage darüber, in wieweit die Bindung eines zweiten Tentoxin-Moleküls die Konformation der Nukleotidbindetasche verändert, ist jedoch aufgrund fehlender Strukturdaten des reaktivierten Komplexes nicht möglich.

Wurde die *steady-state*-Aktivität des F₁-Komplexes unter Zusatz von Agenzien gemessen, welche die ADP-Inaktivierung vermindern, war keine Reaktivierung durch



Tentoxin mehr zu detektieren. Die Tentoxin-Inhibierung blieb dagegen unverändert (Abb. 3.7 E und F). LDAO ist als Aktivator der ATP-Hydrolyse von F_1 -Komplexen bekannt, welcher die Freisetzung des inhibierenden MgADP von der katalytischen Bindestelle bewirkt [139]. Die beobachtete Aktivität unter reaktivierenden Bedingungen in Versuch E lag sogar unter der Reaktionsgeschwindigkeit des Toxin-inhibierten Komplexes. Der Zusatz von Phosphat im Hydrolysemedium wirkt sich ebenfalls in einer verminderten ADP-Inaktivierung aus [89] und kann mit der Umwandlung der ADP-inaktivierten Konformation in die ADP- P_i -Konformation, ein aktives Katalyseintermediat, erklärt werden [88, 140]. Analog zu Abbildung E war auch in Abbildung F keine Reaktivierung über die Ausgangsaktivität ohne Tentoxin zu beobachten, wohingegen die Toxininhibierung unverändert blieb.

Aus den Ergebnissen der *bulk*-Experimente kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass der Prozess der Reaktivierung durch Tentoxin eng mit einer verringerten Inaktivierung des Komplexes durch ADP verbunden ist, wohingegen die Tentoxin-Inhibierung ein anderes Katalyseereignis beeinflusst.

4.1.4 Nukleotidbestimmung

Die in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Aktivitätsmessungen legten den Schluss nahe, dass die Reaktivierung durch Tentoxin mit der ADP-Inaktivierung verknüpft war. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für den Besetzungsgrad der nicht katalytischen Bindestellen beschrieben, da F_1 -Komplexe ohne diese Bindestellen schnell und vollständig durch ADP inaktiviert wurden [83, 87, 88] bzw. die Bindung von Nukleotiden an die nicht katalytischen Stellen eine ATP-Hydrolyse erst ermöglichten [82, 141–143]. Um den Einfluss von Tentoxin auf den Besetzungsgrad der Nukleotidbindestellen zu untersuchen, wurde der Gehalt an Nukleotiden pro F_1 -Komplex unter inhibierenden und reaktivierenden Tentoxin-Konzentrationen während der *steady-state*-Phase bestimmt.

Abbildung 3.8 zeigt, dass der präparierte F_1 -Komplex ca. ein Molekül ATP und etwa drei ADP gebunden hatte, welche er auch nach Passieren einer PD10-Entsalzungssäule nicht verlor (nicht gezeigt). Damit lag der Wert etwas höher als die zwei bis drei Nukleotide des mitochondrialen [117, 144, 145] und chloroplastidären Enzyms [82, 146, 147], stimmte hingegen mit dem Nukleotidgehalt für den hitzeaktivierten CF_1 -Komplex aus Spinat überein [142]. Für die Bestimmung komplexgebundener Nukleotide während der *steady-state*-Phase der ATP-Hydrolyse wurde der Komplex an einer Ni-NTA-Matrix



immobilisiert. Durch zweimalige Waschung wurden nicht fest gebundene Nukleotide entfernt, so dass nur noch ca. 0,3 Moleküle ADP am Komplex verbleiben. Dies stimmt gut mit Werten des chloroplastidären Enzyms aus Spinat überein, welche nach mehrmaligen Passieren einer Entsalzungssäule in Gegenwart hoher Glycerinkonzentrationen ermittelt wurden [117, 148].

Wurden während der *steady-state*-Phase nicht gebundene Nukleotide nach dem beschriebenen Verfahren entfernt, blieben ca. 1,5–2 Moleküle ADP und etwa 0,1 Moleküle ATP pro BP_1 -Komplex gebunden. Enthielt das Hydrolysemedium Tentoxin, sank der Gehalt an fest gebundenen Nukleotiden auf ca. 0,3 Moleküle ADP und 0,1 Moleküle ATP, unabhängig ob inhibierende oder reaktivierende Konzentrationen des Toxins zugesetzt wurden. Tentoxin verminderte also die Bindung von Nukleotiden, was scheinbar im Widerspruch zu der Beobachtung steht, dass Tentoxin die AMP-PNP vermittelte Freisetzung von ADP verhindert [106]. Da AMP-PNP ein nicht hydrolysierbares ATP-Analogon ist, könnte die Diskrepanz darin begründet sein, dass die Hydrolyse des neu gebundenen Nukleotids (ATP in der vorliegenden Arbeit) die sequenzielle Umwandlung der Bindestellen weiterhin ermöglichte und so die Freisetzung des ADP-Moleküls stattfand. Angriffspunkt der Inhibierung wäre also die Umwandlung der katalytischen Bindestellen nach Bindung eines ATP-Moleküls an β_E , nicht aber die weiteren katalytischen Teilreaktionen.

Aufgrund des geringen Nukleotidgehalts pro F_1 -Komplex, veränderte die Bindung eines oder mehrerer Tentoxin-Moleküle entweder die Konformation der Bindestellen, so dass die Affinität der Nukleotide sank, oder Tentoxin stabilisierte Konformationsintermediate des *binding-change*-Mechanismus, welche eine Freisetzung von Nukleotiden begünstigten. Eine höhere Beladung mit festgebundenen Nukleotiden durch reaktivierende Toxinkonzentrationen konnte durch diese Versuche ausgeschlossen werden.

4.2 Rotationsexperimente

Die Beobachtung und Manipulation einzelner Enzymkomplexe während der katalytischen Umsetzung liefert detaillierte Erkenntnisse über den Arbeitsmechanismus der betreffenden Enzyme. So wurden in der Vergangenheit wichtige Fortschritte in der Aufklärung der DNA-Transkription, der Proteinfaltung oder der Motorproteine (lineare sowie rotierende) erzielt [149]. Im Falle der F_0F_1 -ATP-Synthase gegen Ende der 1990er Jahre bewiesen diese Experimente zuerst den von Boyer vorgeschlagenen Rotations-



mechanismus dieser molekularen Maschinen [56, 61] und ermöglichten später weitere, wichtige Erkenntnisse über Teilprozesse des katalytischen Prozesses, sowie der mechanochemischen Kopplung [62, 65, 66].

Neben Untersuchungen zu allgemeinen, enzymatischen Grundvorgängen während der Hydrolyse und Synthese von ATP, ist die Aufklärung der Hintergründe schwerer Erkrankungen durch einen gestörten Energietransfer in Mitochondrien ein vordringliches Ziel wissenschaftlicher Forschung. Einzelmolekülexperimente können hierbei wichtige Erkenntnisse liefern und wurden bereits zur Erforschung von Inhibitoren der bakteriellen F_0F_1 -ATP-Synthase durchgeführt [41, 44, 109].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Tentoxin, ein Energietransferinhibitor der pflanzlichen ATP-Synthase, auf die Katalysereaktion eines cyanobakteriellen F_1 -Komplexes in Einzelmolekülexperimenten untersucht. Dafür wurde der Komplex auf einem Objektträger immobilisiert und die Rotation der zentralen γ -Untereinheit unter verschiedenen Tentoxin-Konzentrationen analysiert.

4.2.1 Analyse der ATP-abhängigen Rotation

Der cyanobakterielle Komplex aus *Thermosynechococcus elongatus* zeigte ohne Zusatz von Tentoxin ein heterogenes Rotationsverhalten, wie es auch bei bakteriellen Komplexen beschrieben wird (Abbildung 3.10). Die schnelle Rotation wurde von langen Pausen (≥ 10 s) unterbrochen, welche auf die Inaktivierung durch ADP zurückzuführen waren [90]. Ca. 30 % der Beobachtungszeit verbrachte das Enzym in diesen Rotationspausen, wohingegen Werte von ca. 60 % für den bakteriellen Komplex beschrieben wurden. Da noch keine Messdaten von Rotationsexperimenten mit dem cyanobakteriellen F_1 -Komplex veröffentlicht wurden, könnte der Unterschied spezifisch für *Thermosynechococcus elongatus* sein, oder mit der längeren Beobachtungszeit in den Experimenten mit dem Komplex aus dem thermophilen *Bacillus PS3* zusammenhängen, was die Beobachtung längerer Pausen ermöglichte.

Die Rotation unter inhibierenden Konzentrationen an Tentoxin war dagegen stark beeinträchtigt und durch viele Pausen mittlerer Länge (1-10 s) unterbrochen. Der Anteil dieser Pausen betrug etwa 37 % der Beobachtungszeit, wohingegen in Abwesenheit von Tentoxin diese Pausen nur 4 % ausmachten. Der Anteil langer Pausen wurde dagegen nicht von der Tentoxin-Inhibierung verändert (25 %). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Ergebnissen des Tentoxin-sensitiven TF_1 . Hierbei wurde durch den Zusatz



von inhibierenden Konzentrationen eine Mischung an Komplexen beobachtet, welche entweder normal rotierten, oder deren Rotation komplett stoppte [109].

Unter reaktivierenden Bedingungen war die Rotation langsamer als ohne Toxin, sehr homogen und wurde nur von sehr kurzen Pausen (≤ 1 s) unterbrochen. Der Prozentsatz dieser kurzen Pausen an der Gesamtbeobachtungszeit lag mit ca. 25 % etwa 2,5 mal höher als bei 0 und 10 μ M Tentoxin. Markant aber war das fast vollständige Fehlen langer Pausen (ca. 2 % der Gesamtbeobachtungszeit).

Fasst man die Ergebnisse zusammen, verbrachte der F_1 -Komplex ohne Tentoxin knapp 45 % der Beobachtungszeit in Rotationspausen, der inhibierte und reaktivierte Komplex dagegen etwa 75 % bzw. ca. 30 % (Tabelle 3.2). Da die jeweiligen maximalen Rotationsgeschwindigkeiten bei 4–5 U/s (0 TTX), 2–3 U/s (10 μ M) und 2 U/s (1 mM) lagen, ergaben sich Durchschnittsgeschwindigkeiten von 2 U/s für den Komplex ohne Toxin, 0,4 U/s für den inhibierten und 2 U/s für den reaktivierten Komplex (Tab. 3.3). Basierend auf der Umsetzung von ATP pro Beobachtungszeit ergab sich demzufolge eine gute Übereinstimmung mit den *bulk*-Experimenten, wobei die Tentoxin-Inhibierung mit etwa 20 % Restaktivität in beiden Versuchsteilen gleich war (Abbildung 3.17). Die Aktivität des reaktivierten Enzyms im Einzelmolekülexperiment war dagegen ähnlich der Aktivität in Abwesenheit von Tentoxin. Die fehlende Überaktivierung im Vergleich zu den *bulk*-Experimenten war womöglich auf die unterschiedliche Gesamtzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiven Komplexe zurückzuführen. Reaktivierende Toxin-konzentrationen verminderten den Anteil der ADP-inaktivierten Enzyme, so dass eine größere Anzahl an aktiven Enzymen bei 1 mM Tentoxin für die Überaktivierung verantwortlich war, obwohl die aktiven Enzyme selbst keine höheren Umsatzraten aufwiesen. Das Ausmaß der Reaktivierung von 200–300 % lässt sich ausreichend mit der unterschiedlichen Gesamtzahl an aktiven Komplexen erklären, da in neueren Rotationsexperimenten der Anteil der zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiven Enzyme mit etwa 10 % angegeben wird [44, 150]. Eine verlässliche Abschätzung von aktiven Enzymkomplexen zu einer gegebenen Zeit könnte die vor kurzem beschriebene Verwendung von Reaktionsräumen im Femtolitermaßstab bringen, die eine Abschirmung einzelner Komplexe ermöglicht [65, 151]. Durch multiparallele Beobachtung oder gekoppelte, enzymatische Indikatorreaktionen, wäre die Anzahl aktiver Komplexe einer großen Population von Enzymen bestimmbar.

Wie beschrieben, erklärten die Einzelmolekülexperimente die Inhibierung und Reaktivierung durch Tentoxin über veränderte Rotationsmuster. Um Informationen über



die molekularen Hintergründe der beobachteten Pausenereignisse zu gewinnen, wurde die Rotation bei höherer zeitlicher Auflösung analysiert (Abbildungen 3.11 und 3.12). Der Komplex ohne Tentoxin zeigte wie schon beschrieben eine kontinuierliche Rotation, welche selten durch sehr kurze Pausen unterbrochen wurde (Abbildung 3.11). Diese Pausen waren immer $1/3$ oder ein Vielfaches von $1/3$ einer Umdrehung voneinander entfernt. Damit lagen die Pausenpositionen, bezogen auf die Orientierung der γ -Untereinheit 120° voneinander entfernt und könnten mit Teilprozessen des katalytischen Mechanismus erklärt werden, in denen der Komplex auf die Bindung von ATP wartet [61,62].

Unter inhibierenden Tentoxin-Konzentrationen war die Rotation deutlich beeinträchtigt und von vielen Pausen dominiert. Diese Pausen waren ebenfalls 120° voneinander separiert, wobei teilweise ein starkes Zittern während der Stopps beobachtet wurde. Die Rotation des reaktivierten Komplexes zeigte ebenfalls viele Pausen, dessen Längen der Rotation ohne Tentoxin glichen. Die Pausenpositionen waren wiederum 120° voneinander getrennt.

Alle untersuchten kurzen Pausen (≤ 10 s), mit oder ohne Tentoxin-Zusatz waren durch 120° -Schritte separiert. Da keine Zwischenpositionen während der Rotation beobachtet wurden, sind die Pausenereignisse innerhalb des katalytischen Zyklus zwischen ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse anzusiedeln. Dies wurde durch die Ergebnisse der Aktivitätsexperimente bestätigt, bei denen gezeigt werden konnte, dass die hydrolytische Spaltung von ATP nicht von Tentoxin beeinflusst wurde (Abbildung 3.7 B).

Im Gegensatz zu den Pausen ≤ 10 s, welche durch Rotationsschritte von 120° getrennt waren, nahm die γ -Untereinheit während der langen Pausen über 10 s Orientierungen zwischen diesen 120° -Schritten ein. In Abbildung 3.12 werden einige dieser Pausenereignisse gezeigt, in denen die γ -Untereinheit dabei ca. 90° von der letzten 120° -Orientierung entfernt pausierte. Diese Zwischenpositionen waren wahrscheinlich auf die Inaktivierung des F_1 -Komplexes durch ADP zurückzuführen [90]. Die Experimente zeigten, dass Tentoxin keinen Einfluss auf die Position der γ -Untereinheit während der langen Pausen hatte, wobei in einigen Pausen ein starkes Zittern unter inhibierenden Toxin Konzentrationen zu beobachten war.



4.2.2 Drehmoment

Der Arbeitsmechanismus der F-ATP-Synthase umfasst die Energieumwandlung in Form eines elektrochemischen Gradienten zuerst in mechanische Energie (Rotation) und anschließend in chemisch gebundene Energie (ATP). Diese Umwandlung erfolgt mit nahezu 100 % Effizienz und übertrifft die vom Menschen konstruierten Maschinen somit bei Weitem [50, 61, 65]. Bei der Hydrolyse von ATP durch den F_1 -Komplex wird die Energie, welche in der Säureanhydridbindung zwischen dem β - und dem γ -Phosphatrest gespeichert ist, in eine Drehbewegung umgewandelt. Als Maß der Energie einer Drehung wird das Drehmoment angegeben. Das Drehmoment N ergibt sich aus der Multiplikation der Winkelgeschwindigkeit ω und der hydrodynamischen Reibung ξ der an die γ -Untereinheit gekoppelten Kugeln oder Filamente. Werte für das Drehmoment von F-ATP-Synthasen werden mit 40–50 pN nm angegeben [59, 61].

Die Bestimmung der Winkelgeschwindigkeit während eines 120°-Schrittes und des daraus abgeleiteten Drehmoments ergaben für den BP_1 -Komplex ohne Tentoxin einen Wert von ca. 44 pN nm. Dies stimmte gut mit den Ergebnissen des F_1 -Subkomplexes aus anderen Spezies überein und unterstrich den hohen Konservierungsgrad des Arbeitsmechanismus. Durch Zusatz von Tentoxin war keine signifikante Veränderung des Drehmoments festzustellen (Abbildung 3.13).

4.2.3 Kinetische Analyse der Rotationspausen

Die grobe Quantifizierung der Pausen in Abschnitt 3.4.2 zeigte deutliche Unterschiede zwischen inhibierten, reaktivierten und dem, nicht mit Toxin behandelten, F_1 -Komplex. Zur weiteren Analyse der Pausenereignisse wurden diese in Pausenintervallen von 200 ms zusammengefasst und deren Häufigkeit gegen die Pausenzeiten aufgetragen (Abbildung 3.14). Bei dem Komplex ohne Tentoxin ergab sich so ein exponentieller Zusammenhang mit einer Zeitkonstanten von ca. 120 ms. Dies stimmte gut mit dem entsprechenden Wert aus den *bulk*-Experimenten überein ($k_{on}^{ATP} \times [ATP] = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10 \mu\text{M} = 10 \text{ s}^{-1} \approx 100 \text{ ms}$). Die kurzen Pausenereignisse waren demnach auf die Bindung von ATP zurückzuführen.

Der inhibierte BP_1 -Komplex zeigte dagegen ein deutlich anderes Verhalten, wobei der Zusammenhang zwischen den Pausenintervallen und ihren Häufigkeiten nicht mehr mit einem einfachexponentiellen Abfall beschrieben werden konnte. Es ergaben sich zwei Zeitkonstanten, von denen die erste mit ca. 270 ms doppelt so hoch wie die des



nicht inhibierten Komplexes war. Die zweite Zeitkonstante lag mit ca. 2 s knapp eine Größenordnung höher. Aus den in Abschnitt 4.2.1 genannten Gründen lag der Angriffspunkt von Tentoxin auf den F_1 -Komplex zwischen ATP-Bindung und -Hydrolyse, wobei Tentoxin hier wahrscheinlich die sequentielle Umwandlung der katalytischen Nucleotidbindestellen stört [24, 106].

Durch reaktivierende Konzentrationen des Toxins änderte sich die Kinetik der kurzen Pausen hingegen nicht. Auch bei 1 mM Tentoxin war ein einfachexponentieller Zusammenhang zwischen den verschiedenen Pausenlängen und ihren Häufigkeiten festzustellen. Die Zeitkonstante (ca. 120 ms) war vergleichbar mit der des Komplexes ohne Tentoxin, wobei aber etwa dreimal so viele kurze Pausenereignisse beobachtet wurden (Tabelle 3.4). Die Bindung des zweiten Inhibitormoleküls wirkte wahrscheinlich der Störung der sequenziellen Umwandlung entgegen, hob sie aber nicht vollständig auf, was mit den Ergebnissen der Einzelmolekülexperimente des Tentoxin-sensitiven, thermophilen Enzyms unter reaktivierenden Bedingungen übereinstimmte, in denen ebenfalls viele kurze Pausen beobachtet wurden [109].

Zum besseren Vergleich der Pausenkinetiken, wurde die beobachtete Anzahl jedes Pausenintervalls der verschiedenen Tentoxin-Bedingungen durch die jeweilige Anzahl der beobachteten Partikel geteilt. Durch Berechnung der Differenzen der normierten Pausenhäufigkeiten konnten dann Differenzhistogramme erstellt werden, welche die Unterschiede zwischen dem inhibierten, reaktivierten und dem nicht mit Toxin behandelten Komplex noch deutlicher darstellten (Abbildung 3.15). Im Vergleich des Komplexes ohne Tentoxin mit dem reaktivierten Komplex ergab sich durch die gleiche Zeitkonstante der Kinetik und der erheblich größeren Zahl an Pausen pro reaktivierten Komplex wiederum ein exponentieller Abfall mit vergleichbarer Zeitkonstante (ca. 115 ms). Eine Erklärung hierfür ist, dass durch Bindung des zweiten Tentoxin-Moleküls die Blockade des erstgebundenen Inhibitors teilweise aufhob und so die Kinetik beschleunigt wurde.

Abbildung 3.15 B und C zeigen die Differenzsignale zwischen inhibiertem Komplex und dem nicht inhibiertem (B) bzw. reaktiviertem (C) Komplex. Der inhibierte BP_1 -Komplex wies dabei weniger Pausen der kürzesten Kategorie (166 ms–366 ms bei B; 166 ms–566 ms bei C) auf, wobei die Anzahl längerer Pausen höher war. Der Grund für das geringere Auftreten ganz kurzer Pausen lag in der niedrigeren Zahl an Umdrehungen während der Beobachtungszeit, da hierdurch der Komplex statistisch gesehen seltener in diesen kurzen Pausen verharrte.

Die kinetische Analyse der Pausen über 10 Sekunden ergab keine großen Unterschiede



zwischen dem BP_1 -Komplex ohne Tentoxin, sowie unter inhibierenden Bedingungen (Abbildung 3.16). In beiden Fällen ergab sich ein einfachexponentieller Zusammenhang mit Zeitkonstanten von ca. 40 s (ohne Toxin) und 30 s (10 μ M TTX). Die Anzahl langer Pausen unter reaktivierenden Bedingungen war hingegen für eine kinetische Analyse zu gering. Die ermittelten Zeitkonstanten der langen Pausen stimmten gut mit dem für den thermophilen *Bacillus PS3* bestimmten Wert von ca. 30 s überein [90] und unterstrichen damit die Annahme, dass diese Pausen durch eine Inaktivierung der Komplexe mit ADP hervorgerufen wurde.

4.2.4 Analyse der Rotororientierung während der Rotationspausen

Für die Zuordnung von molekularen Ereignissen während der ATP-Hydrolyse durch den F_1 -Komplex und der damit verbundenen Rotation, ist die Untersuchung der Orientierung der γ -Untereinheit während dieser Drehung wichtig. Dabei hängt die Auflösung der schrittweisen Rotation von der zeitlichen Auflösung der verwendeten Kamera, der eingesetzten ATP-Konzentration sowie der Größe der angehängten hydrodynamischen Fracht (Filamente oder Kugeln) ab. Bei genügend kleinen Anhängen [62] oder bei Verwendung von langsam hydrolysierbaren ATP-Analoga [63] kann die Rotation weiter in Teilschritte (80–90° durch ATP-Bindung, 30–40° durch Produktfreisetzung) aufgelöst werden.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsanordnung mit 10 μ M ATP im Messpuffer, 350 nm Doppelkugeln und einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 30 Bilder pro Sekunde ermöglichte nicht immer eine exakte Auflösung der 120°-Schritte, da die Rotation ohne Tentoxin meist kontinuierlich war, so dass die Orientierungen der γ -Untereinheit während der Drehung gleichmäßig um das Rotationszentrum verteilt waren (Abbildung 3.18 A). Zudem waren lange Rotationspausen zu beobachten, welche bei höherer zeitlicher Auflösung der Rotation kurz vor dem Stopp auf eine Inaktivierung durch ADP zurückgeführt werden konnten (Abbildung 3.12). Eliminierung dieser langen Pausen aus den entsprechenden Datensätzen führte zu einer gleichmäßigen Verteilung der Orientierungen (Abbildung 3.18 A'). Durch den höheren Anteil an Pausen während der ATP-Hydrolyse zeigte der inhibierte Komplex (B) deutlich drei 120° voneinander separierte Orientierungen, welche als ATP-Warteposition bezeichnet wurden [61,63]. Wie auch in Abbildung A war eine zusätzliche Orientierung neben einer der drei ATP-Wartepositionen erkennbar, welche in B' aus den Datensätzen entfernt



wurde. Wie für den nicht inhibierten Komplex beschrieben, war diese Position auf eine längere Rotationspause zurückzuführen, welche durch die Inaktivierung mit ADP ausgelöst wurde. Dies bestätigte die Annahme, dass die Inhibierung durch Tentoxin katalytische Teilprozesse zwischen der Substratbindung und Substrathydrolyse beeinflusst, da die ATP-Wartepositionen deutlich vermehrt und abgegrenzt von der 90°-Zwischenposition der ADP-Inaktivierung erkennbar waren. Der reaktivierte Komplex (C) zeigte hingegen keine dieser zusätzlichen Positionen. Allein drei deutlich erkennbare, durch 120° voneinander getrennte Orientierungen traten aus der sonst homogenen Verteilung heraus. Damit nahm der reaktivierte Komplex im Falle der Winkelorientierung der γ -Untereinheit eine Stellung zwischen dem inhibierten und dem nicht mit Tentoxin inkubierten Komplex ein.

Die bisherigen Ergebnisse der Rotations- und *bulk*-Experimente zusammengenommen, lieferten starke Argumente dafür, dass die Tentoxin-Inhibierung den ersten Teilschritt der ATP-Hydrolyse zwischen Bindung und Hydrolyse (Drehung von 0° bis 90°) störte. Der zweite Teilschritt, die Produktfreisetzung (Rotation von 90° bis 120°) wurde dagegen nicht beeinflusst. Zur eindeutigen Bestimmung der Herkunft der beobachteten kurzen und mittleren Pausen während der Tentoxin-Inhibierung wurden Rotationsexperimente durchgeführt, in denen der Komplex zuerst ohne Tentoxin beobachtet wurde. Diese Versuche fanden bei submikromolaren ATP-Konzentrationen und kleinerer hydrodynamischer Fracht (200 nm Kunststoffkugeln) statt, so dass die ATP-Wartepositionen gut detektiert werden konnten. Nach Zusatz von Hydrolysepuffer mit inhibierenden Konzentrationen an Tentoxin wurde die Orientierung der γ -Untereinheit des selben Partikels weiter beobachtet. In einem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Hydrolysepuffers zu keiner Verschiebung der ATP-Wartepositionen führte (Abbildung 3.19 B). Insgesamt wurden fünf Enzymkomplexe beobachtet, von denen drei keine Änderung der ATP-Wartepositionen zeigte (I–III). Partikel I und II rotierten unter inhibierenden Tentoxin-Konzentrationen weiter und zeigten wie auch die inhibierten Komplexe bei 10 μ M ATP ein deutlich geändertes Rotations- und Pausenverhalten. Partikel III verharrte nach Austausch des Hydrolysepuffers fast die gesamte Beobachtungszeit in einer 90°-Position (ADP-inaktiviert), setzte die Rotation anschließend fort, wobei die Positionen der drei bevorzugten Orientierungen der γ -Untereinheit mit den Positionen vor dem Pufferwechsel übereinstimmten. Dies belegte die von den anderen Versuchen unterstützte Hypothese, dass durch Tentoxin-Inhibierung keine zusätzlichen Pausenpositionen erzeugt wurden. Die Inhibierung kann also folglich mit



gestörten Katalyseereignissen zwischen ATP-Bindung und -Hydrolyse erklärt werden.

Neben den drei beschriebenen Partikeln wurden in den Pufferaustauschexperimenten zwei Komplexe beobachtet, welche eine von den ATP-Wartepositionen verschiedene Orientierung der γ -Untereinheit zeigten. Beide Partikel (IV und V) verharrten die gesamte Beobachtungszeit nach der 30 minütigen Inkubationszeit in einer Position von ca. $10\text{--}30^\circ$ hinter einer ATP-Warteposition (in Drehrichtung, gegen den Uhrzeigersinn, gesehen). Aufgrund der geringen Anzahl an beobachteten Partikeln (Analysen mit Partikelanzahlen von $n \geq 5$ werden in der Literatur beschrieben [63, 152, 153]) ließ sich nicht zweifelsfrei bestimmen, ob diese neuen Pausenorientierungen charakteristisch für den inhibierten Komplex waren. Da das Ausmaß der Tentoxin-Inhibierung in den Rotationsversuchen aber gut mit den *bulk*-Experimenten übereinstimmte (Abbildung 3.17 B), war die Berücksichtigung der vollständig gestoppten Partikel zur Erklärung der Tentoxin-Inhibierung nicht nötig. Da die Positionen der γ -Untereinheit der Komplexe IV und V innerhalb des katalytischen Teilschrittes zwischen ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse lagen, was mit dem in der vorliegenden Arbeit postulierten Ansatzpunkt der Tentoxin-Inhibierung übereinstimmte, müssen weitere Pufferaustauschexperimente durchgeführt werden, um abzuklären, ob diese Positionen möglicherweise stabilisierte Zwischenstufen darstellen.

Aufgrund der ATP-abhängigen Bindung des zweiten Tentoxin-Moleküls konnten diese Pufferaustauschexperimente unter submikromolaren ATP-Konzentrationen nicht mit dem reaktivierten Komplex durchgeführt werden.

4.3 Modell der Tentoxin-Wirkung

Die bisherige Modellvorstellung der Inhibierung und Reaktivierung der F-ATPase durch Tentoxin beruhte auf kinetischen Untersuchungen und Bindungsstudien, welche durch die Aufklärung der Struktur des inhibierten Komplexes bestätigt wurden (Übersichtsartikel [119]). Hierbei führte die Bindung eines Inhibitormoleküls im N-terminalen Bereich der F_1 -Teilkomplex an der Kontaktfläche einer α - und einer β -Untereinheit zu einer Unterbrechung der Katalyse. Die sequenzielle Umwandlung der drei katalytischen Nukleotidbindestellen während der Nukleotidumsetzung schien dabei gestört zu werden. In ersten Rotationsexperimenten konnte ein Zusammenhang zwischen der reaktivierenden Wirkung hoher Tentoxin-Konzentrationen und einer verminderten Inaktivierung des Enzyms durch festgebundenes ADP aufgezeigt werden [109].



In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Kombination von kinetischen Messungen, Nukleotidbestimmungen während der ATP-Hydrolyse und durch detaillierte Rotationsanalysen der Einfluss von inhibierenden und reaktivierenden Tentoxin-Konzentrationen auf den F_1 -Komplex des sensitiven Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongatus* untersucht. Die ermittelten Ergebnisse konnten in Modellen der Inhibierung und Reaktivierung zusammengefasst werden.

4.3.1 Inhibierung

Durch Bindung eines Toxinmoleküls an den F_1 -Teilkomplex wird die sequenzielle Umwandlung der katalytischen Nukleotidbindestellen beeinträchtigt. Dabei ist die katalytische Bindestelle des α - β -Paares, welches auch den Inhibitor gebunden hat, betroffen (in Abbildung 4.20 mit einem Punkt versehen). Die Substratbindung wird durch Tentoxin nicht beeinflusst, da keine Veränderung des K_m -Wertes durch die Inhibierung beobachtet wurde (nicht gezeigt). Dies stimmt auch mit der Charakterisierung des Toxins als nicht kompetitiven Inhibitor [104, 154] überein.

Das eigentliche Hydrolyseereignis, die Spaltung von ATP in ADP und Phosphat, scheidet ebenfalls als Angriffspunkt der Inhibierung aus, da in Versuchen mit dem nur sehr langsam hydrolysierbaren ATP-Analogon ATP γ S keine Inhibierung mehr detektiert werden konnte.

In *bulk*-Experimenten (Abschnitt 3.2.3) zeigte sich, dass auch die ADP-Inaktivierung des F_1 -Komplexes von Tentoxin nicht verstärkt wurde und deshalb nicht die mechanistische Grundlage der Toxininhibierung sein kann. Dieses Ergebnis wurde durch die Rotationsexperimente bestätigt, in denen keine Zunahme der Pausen, welche aufgrund ihrer Kinetik (Abbildung 3.16) und der Winkelorientierung der γ -Untereinheit während des Rotationsstopps (Abbildung 3.12) auf eine ADP-Inaktivierung zurückgeführt werden konnten, beobachtet wurde (Abschnitt 3.4.2). Das Enzym verbrachte sogar etwas weniger Zeit in diesen langen Pausen (Tabelle 3.2) und die Halbwertszeit dieser Rotationsstopps verkürzte sich unter inhibierenden Tentoxin-Konzentrationen. Zudem schien die Beweglichkeit der γ -Untereinheit während der ADP-Inaktivierung höher, was durch ein stärkeres Zittern um die 90° -Position angezeigt wurde.

Konformelle Umwandlungen der katalytischen Nukleotidbindestellen, welche nach dem Hydrolyseereignis stattfinden, werden ebenfalls nicht von Tentoxin beeinträchtigt, da in den Rotationsexperimenten (Abbildung 3.19) keine solchen zusätzlichen Orien-



tierungen der γ -Untereinheit neben den drei ATP-Wartepositionen gefunden wurden. Zwei der fünf beobachteten Partikel stoppten hingegen nach Toxinzusatz die Rotation in einer Position von ca. $10\text{--}30^\circ$ nach einer ATP-Warteposition (in Hydrolyserichtung). Inwieweit diese Zwischenposition durch Tentoxin stabilisiert wird, müssen weitere Rotationsexperimente zeigen.

Zusammengefasst stört die Bindung eines Tentoxin-Moleküls die katalytische Sequenz direkt nach ATP-Bindung. In Abbildung 4.20 sind die möglichen Schritte dargestellt. Ausgehend von der Annahme, dass die Bindung eines Toxinmoleküls die katalytische Bindungstasche in einer geschlossenen Konformation hält [24], sind die beiden ersten Schritte in Reihe 1 und 2 nach ATP-Bindung ($C \rightarrow D'$ bzw. $D \rightarrow O$) betroffen. Hier ändert sich die Konformation des α - β -Paares, welches den Inhibitor gebunden hat, in eine offener Form bzw. erniedrigt sich die Affinität zum Nukleotid. Die Störung dieser beiden Prozesse des *binding-change*-Mechanismus passt zu der kinetischen Analyse der kurzen Rotationspausen, wo ebenfalls zwei verschiedene Pausenereignisse mit unterschiedlichen Zeitkonstanten beobachtet wurden. Entweder unterbricht Tentoxin die Sequenz durch sterische Gründe, da die konformelle Veränderung des Inhibitor-bindenden α - β -Paares energetisch ungünstig ist, oder durch eine gestörte Kooperativität zwischen den katalytischen Bindestellen. In beiden Fällen beeinflusst Tentoxin die Zeit zwischen ATP-Bindung und Drehung der γ -Untereinheit bzw. die damit einhergehende Affinitätserhöhung des neugebundenen Nukleotids ($T \rightarrow C$ in Abbildung 4.20). Dies passt auch zu dem in Abbildung 3.8 gezeigten, geringeren Nukleotidgehalt unter inhibierenden Bedingungen.

Die Schrittgeschwindigkeit selbst wird durch Tentoxin nicht beeinflusst, da bei der Bestimmung des Drehmoments keine Unterschiede zwischen dem nicht mit Toxin inkubierten und dem inhibierten Komplex festgestellt wurden (Abbildung 3.13).

4.3.2 Reaktivierung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reaktivierung sich aus zwei gegenläufig arbeitenden Prozessen zusammensetzt.

Bei dem hier vorgestellten Modell der Reaktivierung wird davon ausgegangen, dass durch Bindung eines zweiten Tentoxin-Moleküls an einem der beiden α - β -Paare, welches noch keinen Inhibitor gebunden hat, die beobachtete Aktivitätssteigerung vermittelt wird [103].

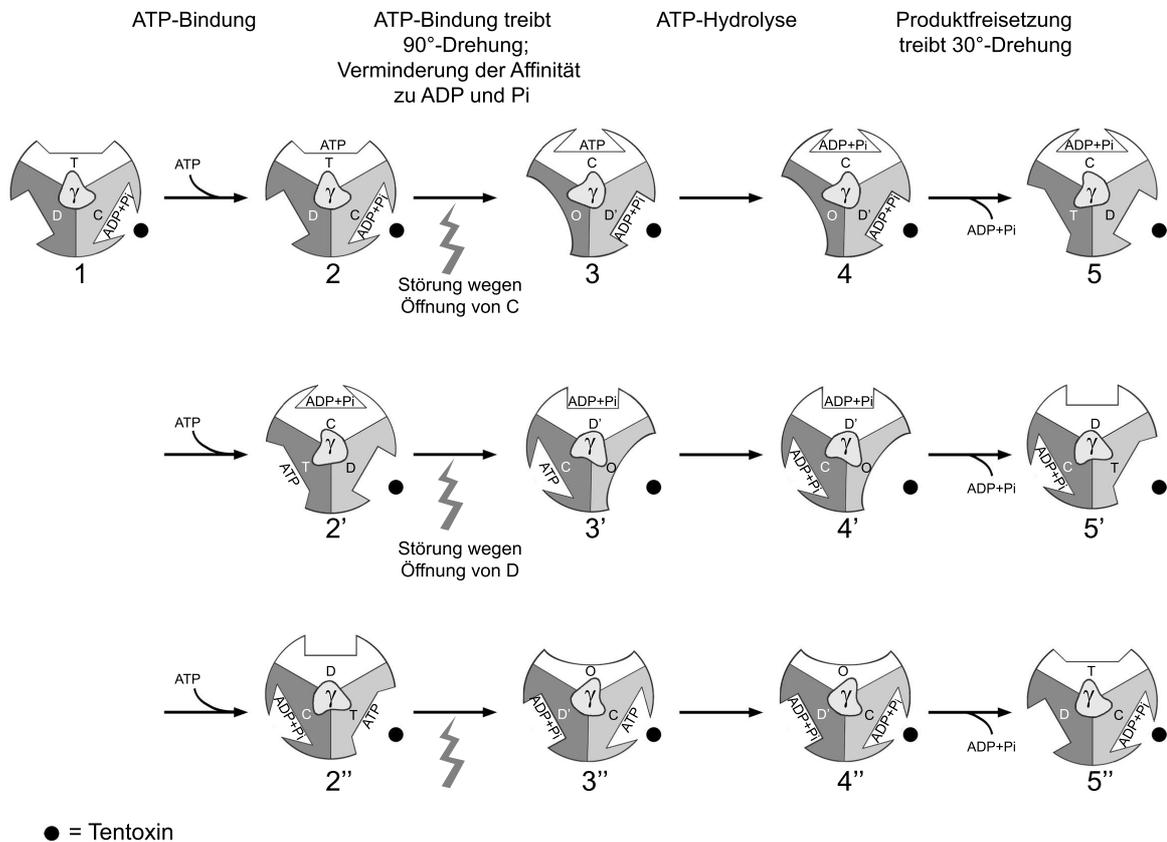


Abb. 4.20: Schematische Darstellung der von der Tentoxin-Inhibierung beeinflussten Teilprozesse während der ATP-Hydrolyse. Das Modell basiert auf einem von Milgrom und Cross vorgeschlagenen *bi-site*-Mechanismus der ATP-Hydrolyse [131] und zeigt die Umwandlungen der drei katalytischen Nukleotidbindestellen während einer vollständigen 360°-Drehung der γ -Untereinheit. Die Nukleotidbindestellen durchlaufen dabei folgende Konformationen: T (bindet bevorzugt ATP), C (hoch affine, katalytische Konformation in der die reversible und spontane Nukleotidumsetzung abläuft), D' (bindet ADP und Pi), D (bindet bevorzugt ADP) und O (offen). Der gebundene Inhibitor ist als Punkt an der entsprechenden Nukleotidbindestelle dargestellt, so dass die drei 120°-Schritte unterschieden werden können. Nach ATP-Bindung (1→2) inhibiert Tentoxin die Umwandlung der katalytischen Bindestellen (2→3 und 2'→3'), da der *binding-change*-Mechanismus eine Öffnung der Bindestelle bzw. eine Verringerung der Affinität zu den Nukleotiden vorschreibt (C→D' und D→O), was durch den gebundenen Inhibitor gestört wird. Diese Inhibierung erklärt die vielen kurzen bis mittleren Rotationspausen (≤ 10 s) des Komplexes bei 10 μ M Tentoxin.



Die Substratbindung als Angriffspunkt der Reaktivierung konnte nicht untersucht werden, da die mit der Bindung des zweiten Toxinmoleküls einhergehende Aktivitätssteigerung von der ATP-Konzentration abhängig war (Abbildung 3.6). Aufgrund der Überlegung, dass unter sättigenden ATP-Konzentrationen die Substratbindung nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [62], aber gerade unter diesen Bedingungen die stärkste Reaktivierung beobachtet wird, lässt sich jedoch dieser Prozess als molekularer Mechanismus der Tentoxin-Reaktivierung ausschließen.

Da bei Hydrolyse von ATP γ S keine Reaktivierung mehr zu detektieren war (Abbildung 3.7 B), scheidet auch die eigentliche Spaltung von ATP als Erklärung der erhöhten Aktivität aus. Das gleiche gilt für die Schrittgeschwindigkeit, was in der Drehmomentbestimmung (Abbildung 3.13) nachgewiesen werden konnte.

Die Quantifizierung der kurzen Rotationspausen belegte einen inhibierenden Einfluss hoher Tentoxin-Konzentrationen. Der reaktivierte Komplex zeigte erheblich mehr kurze Pausenereignisse ≤ 1 s verglichen mit dem Komplex ohne Tentoxin und verbrachte ca. 25 % der Beobachtungszeit in diesen Pausen (ca. 10 % ohne Toxin). Diese Pausen waren 120° voneinander getrennt (Abbildung 3.11), unterschieden sich in ihrer Orientierung der γ -Untereinheit von den langen Rotationsstopps und konnten deshalb als ATP-Wartepausen charakterisiert werden (Abbildung 3.12).

Die molekularen Hintergründe dieser Rotationsstopps können anhand eines Modells erklärt werden, welches auf dem schon beschriebenen Modell der Inhibierung und den darin getroffenen Annahmen basiert (Abbildung 4.21).

Durch den zweiten gebundenen Inhibitor sind die konformellen Umwandlungen direkt nach der ATP-Bindung nicht mehr so gestört wie bei der Inhibierung. Dies geschieht durch die Kopplung von Öffnung bzw. Erniedrigung der Nukleotidaffinität der einen Bindestelle (mit komplexiertem Inhibitor) mit einer Schließung bzw. Erhöhung der Nukleotidaffinität der anderen Bindestelle (mit komplexiertem Inhibitor). Die betreffende Umwandlung $C \rightarrow D'$ bei $2 \rightarrow 3$ und $2'' \rightarrow 3''$ wird dabei mit der Umwandlung $T \rightarrow C$ kompensiert. Bei Schritt $2' \rightarrow 3'$ dagegen ist keine Kompensation möglich, da gemäß dem Modell beide katalytischen Bindestellen, welche den Inhibitor gebunden haben, eine Öffnung oder Erniedrigung der Nukleotidaffinität vollziehen ($D \rightarrow O$ bzw. $C \rightarrow D'$). Da in der kinetischen Pausenanalyse jedoch nur eine Zeitkonstante ausreicht, die Häufigkeitsverteilung der kurzen Pausen zu beschreiben (Abbildung 3.14), müsste diese Umwandlung wie auch die anderen beiden 90° -Schritte mit der vergleichbarer Geschwindigkeit ablaufen. Der Grund könnte in der Annahme liegen, dass die Bindung

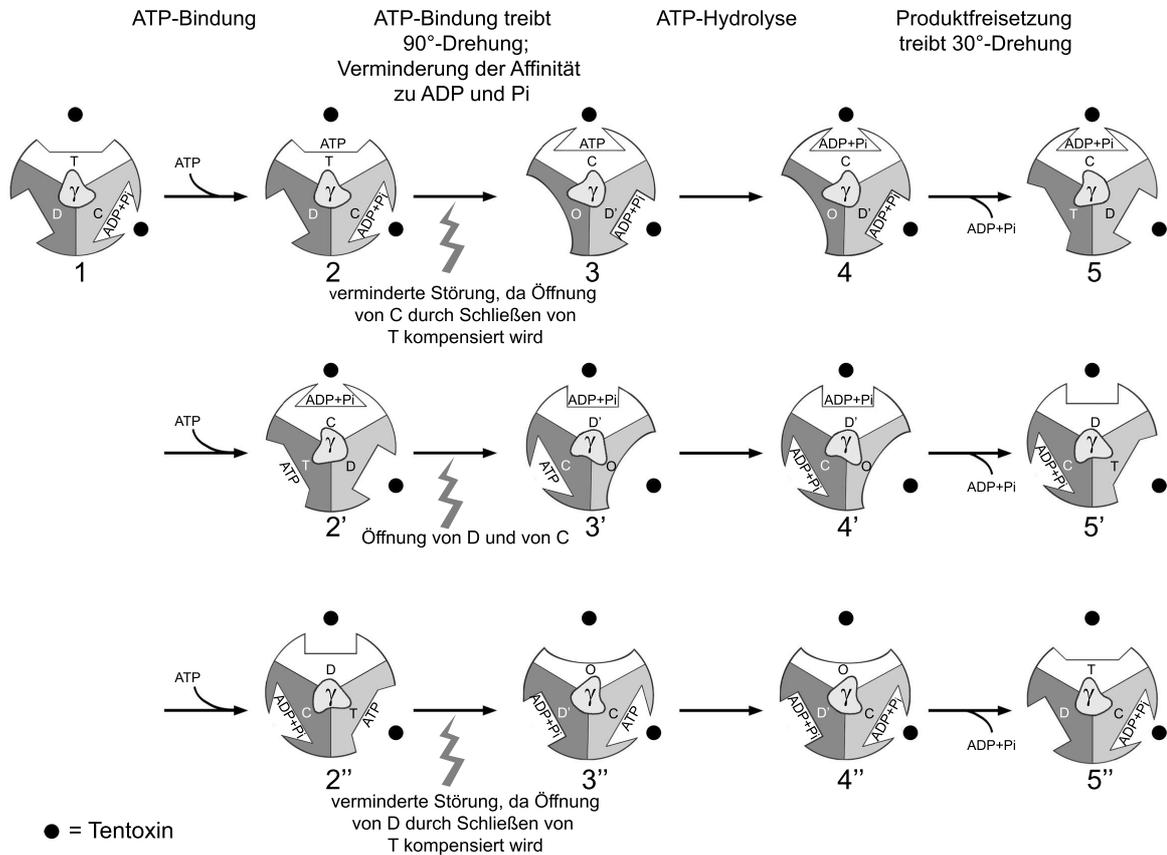


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der von hohen Tentoxin-Konzentrationen beeinflussten Teilprozesse während der ATP-Hydrolyse. Das Diagramm basiert auf dem in Abbildung 4.20 vorgestellten Inhibierungsmodell. Die gebundenen Inhibitoren sind als Punkte an den entsprechenden Nucleotidbindestellen dargestellt. Nach ATP-Bindung findet die Umwandlung der katalytischen Bindestellen statt, welche mit einer Drehung der γ -Untereinheit verbunden ist. Wie auch bei Bindung eines Moleküls Tentoxin, können drei, auf die Anordnung der gebundenen Inhibitormoleküle bezogene, verschiedene 90°-Schritte unterschieden werden. Dabei sind zwei 90°-Schritte ($2 \rightarrow 3$ und $2'' \rightarrow 3''$) nur mäßig bis gar nicht gehemmt, da die Öffnung der katalytischen Bindestelle eines α - β -Paares, welches den Inhibitor gebunden hat ($C \rightarrow D'$), mit dem Schließen der anderen Bindestelle mit komplexiertem Toxin verknüpft ist ($T \rightarrow C$). So wird die Störung kompensiert und die Umwandlung kann ungehindert ablaufen. Die sequenzielle Umwandlung in $2' \rightarrow 3'$ erfordert hingegen die simultante Öffnung bzw. Affinitätsniedrigung beider Nucleotidbindestellen, welche ein Tentoxin-Molekül gebunden haben.



eines zweiten Tentoxin-Moleküls für die Reaktivierung des Komplexes ausreicht. Die Zahl der gebundenen Toxinmoleküle während der Reaktivierung ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt und wird mit zwei [99] oder drei [100] angegeben. Im Falle der Bindung von drei Inhibitormolekülen wären die Schritte $2 \rightarrow 3$, $2' \rightarrow 3'$ und $2'' \rightarrow 3''$ äquivalent und somit nicht zu unterscheiden, was mit der kinetschen Analyse der Pausenlängen übereinstimmen würde.

Ein Ansatz zur Erklärung der Tentoxin-Reaktivierung wurde durch Kombination von *bulk*- und Rotationsexperimente aufgezeigt. Setzte man in Aktivitätsmessungen ADP oder Azid ein, Stoffe die die sogenannte ADP-Inaktivierung verstärken, konnte ein Anstieg der Reaktivierung detektiert werden. Bei LDAO und Phosphat, Zusätze welche der ADP-Inaktivierung entgegenwirken, sank der Reaktivierungsgrad dagegen deutlich (Abbildung 3.7). Zusammen mit der Beobachtung, dass reaktivierte Komplexe kaum Zeit in langen, auf ADP-Inaktivierung zurückzuführende, Pausen verbrachte (2% im Vergleich zu 30% ohne Tentoxin; Abbildung 3.10), scheint der reaktivierende Einfluss hoher Tentoxin-Konzentrationen eine stark verminderte ADP-Inaktivierung zu sein. Dies wird durch Ergebnisse des Tentoxin-sensitiven TF_1 -Komplexes bestätigt, in denen ebenfalls ein Fehlen von langen Rotationspausen für den reaktivierten Komplex beschrieben wurde [109].

Die Reaktivierung kann also in Teilprozesse zerlegt werden (Abbildung 4.22). Hohe Tentoxin-Konzentrationen hemmen die katalytische Sequenz nach ATP-Bindung, wobei die Hemmung schwächer als bei dem inhibierten Enzym ausgeprägt ist. Berechnet man die Pausenhäufigkeit pro Umdrehung, so liegt der Wert des F_1 -Komplexes ohne Toxin bei 0,18 Pausen/Umdrehung. Das inhibierte Enzym stoppt durchschnittlich 1,04 mal, der reaktivierte Komplex 0,45 mal pro Umdrehung. Eine echte Reaktivierung wird aber nur in Kombination mit der verminderten ADP-Inaktivierung beobachtet. Dies könnte auch der Grund für die schwache Reaktivierung der ATP-Synthese sein [155], da bei der Synthese keine ADP-Inaktivierung auftritt.

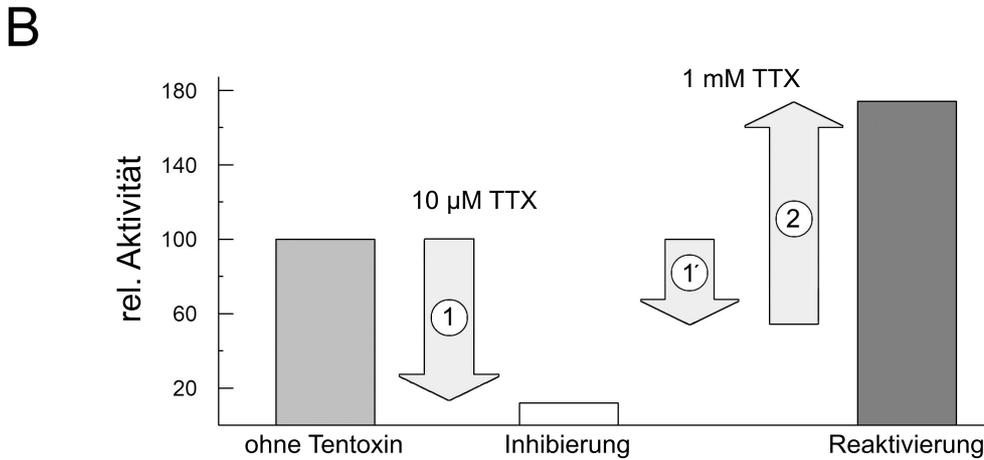
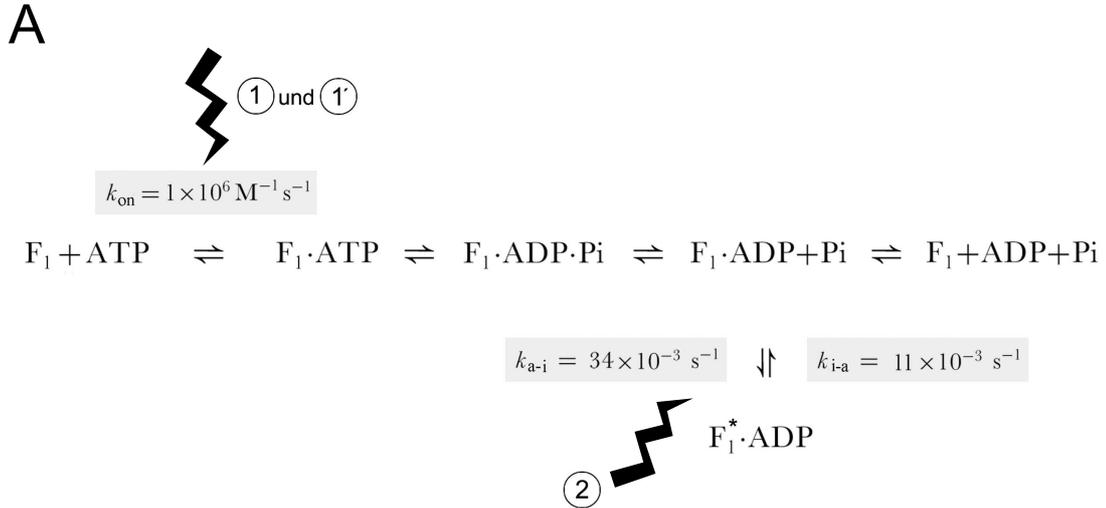


Abb. 4.22: Modell der inhibierenden und reaktivierenden Effekte von Tentoxin. In (A) ist die Reaktionssequenz der ATP-Hydrolyse dargestellt. Tentoxin beeinflusst die markierten Schritte. Tentoxin inhibiert den F_1 -Komplex durch Unterbrechung der Sequenz zwischen Bindung und Hydrolyse von ATP (1). Der reaktivierte Komplex zeigt ebenfalls eine Hemmung dieser Reaktion, welche aber geringer ist (1') und durch die verminderte Inaktivierung durch ADP überkompensiert wird (2). Der MgADP-inaktivierte Komplex ist mit einem Stern gekennzeichnet. Schaubild (B) zeigt die schematische Darstellung der Tentoxin-Effekte, die zu den verschiedenen Aktivitäten des inhibierten und reaktivierten Komplexes, führen.



5 Zusammenfassung

Die F_0F_1 -ATP-Synthase ist ein ubiquitäres Enzym des Energiestoffwechsels bei Bakterien, Pflanzen und Tieren. Dort stellt es unter aeroben Bedingungen den Hauptteil des zellulären ATP bereit. Durch biochemische Untersuchungen, die Aufklärung der Struktur, sowie der direkten Beobachtung der Rotation als Prinzip des Arbeitsmechanismus, konnten die grundlegenden Prozesse der katalytischen Umsetzung bestimmt werden. Die Regulation, vor allem des chloroplastidären Enzyms, ist hingegen komplex und mechanistisch wenig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der regulierende Einfluss von Tentoxin, einem pflanzenspezifischem Inhibitor auf den F_1 -Komplex des thermophilen Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongatus* untersucht.

Zunächst wurden grundlegende Katalyseparameter des noch nicht in der Literatur charakterisierten Enzyms bestimmt und die aus anderen Spezies beschriebene wildtypische Sensitivität gegenüber Tentoxin nachgewiesen. Das Toxin inhibiert dabei in nano- bis mikromolaren Konzentrationen die ATPase-Reaktion, wohingegen bei mikro- bis millimolaren Konzentrationen eine Überaktivierung beobachtet wird.

Durch Kombination von biochemischen Experimenten mit Einzelmoleküluntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der inhibierende Einfluss von niedrigen Tentoxin-Konzentrationen durch eine Störung des *binding-change*-Mechanismus verursacht wird. Der gebundene Inhibitor verhindert dabei die sequenzielle Umwandlung der katalytischen Nukleotidbindestellen direkt nach der Substratbindung. Dies führt zu einer stark herabgesetzten Rotationsgeschwindigkeit der zentralen Untereinheit γ . Die hydrolytische Spaltung von ATP ist, genauso wie die Produktfreisetzung, dagegen nicht betroffen.

Die Reaktivierung durch Tentoxin konnte zum ersten Mal in zwei Teilprozesse aufgelöst werden. Zum einen wird die Störung der katalytischen Sequenz, welche die Grundlage der Toxininhibierung darstellt, teilweise wieder aufgehoben. Die Rotationsgeschwindigkeit der zentralen γ -Untereinheit erhöht sich dadurch, erreicht aber nicht die ursprüngliche Umdrehungsgeschwindigkeit des Enzyms ohne Tentoxin. Zum anderen zeigt der reaktivierte F_1 -Komplex während der ATP-Hydrolyse praktisch keine Inaktivierung durch ADP. Diese, bei allen F-ATPasen konservierte Hemmung, führt zu einem völligen Stopp der Rotation. Durch hohe Konzentrationen an Tentoxin ist somit der Anteil aktiver Enzyme zu jedem Zeitpunkt deutlich erhöht.



Summary

F_0F_1 -ATP-synthases play a central role in the energy transduction pathways of bacteria, plants and animals. Under aerobic conditions they produce most of the cellular ATP. The basic enzymatic mechanism was elucidated by biochemical and spectroscopic experiments, as well as the direct observation of the rotational catalysis. However, the regulation, especially of the chloroplast enzyme, is complex and poorly understood.

The goal of this work was to investigate the regulatory effects of tentoxin, a plantspecific inhibitor of ATP-synthases, on the F_1 -complex of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*.

In the beginning basic catalytic parameters of this in the literature not yet characterised complex were determined and the sensitivity against tentoxin was demonstrated. Therefore tentoxin inhibits the ATP-hydrolysis reaction in the range from nano- to micromolar concentrations, whereas it overstimulates the enzymatic reaction from micro- to millimolar tentoxin concentrations.

In a combination of biochemical and single molecule experiments it was shown that the inhibitory effects of low tentoxin concentrations is due to an inhibition of the 'binding-change'-mechanism. Bound inhibitor affects the catalytic sequence directly after substrate binding. This leads to a strongly impaired rotation of the central γ -subunit. In contrast, the events of ATP-cleavage and product release are unharmed.

By using these experimental techniques, it could be demonstrated for the first time that the overstimulation by high tentoxin concentrations can be divided in two contrary processes. First, like in inhibition the catalytic sequence is disturbed, but to a lesser extent. Therefore the rotational speed accelerates again, but did not reach the level of untreated complexes. Second, reactivation by high tentoxin concentrations is coupled with a strongly reduced ADP-inactivation, a common inhibition process of F-ATPases. This inactivation normally leads to a complete stop of rotation and is abolished by high tentoxin concentrations. Recapitulating these results, the missing ADP-inactivation overcompensates the little inhibitory effect and leads to a overactivated F-ATPase at high tentoxin concentrations.



6 Sequenzvergleiche

Die Sequenzvergleiche der Primärstrukturen der Untereinheiten α , β , γ des BP₁-Komplexes von *Thermosynechococcus elongatus* (BP₁) und des chloroplastidären F₁-Komplex von *Spinacia oleracea* (CF₁) wurden mit dem Programm ClustalW 1.83 [156] durchgeführt.

```

BP1  MVSIRPDEISSIRQQIEQYEQSIKVDNVGTVLQVGDGIARVYGLDKVMASELVEFEDGT
CF1  MATIRADEISKIRERIEGYNREVKVVNTGTVLQVGDGIARIHGLDEVMA GELVEFEEGT

BP1  VGIALNLEE DNVGVVLMGDGLSIEEGSTVVRATGKI ASI PVGEAAI GRVVDALMRPI DGKKG
CF1  IGIALNLEES NNVGVVLMGDGLMQEGSSVKATGRI AQI PVSEAYLGRVI NALAKPI DGRG

BP1  EHTTQSRLI ESPAPGI VQRKSVCEPLQTGITAI DAMPI GRGQRELI I GDRQTGKTAVA
CF1  ETASESRLI ESPAPGI MSRRSVYEPLQTGLIAI DAMPVGRGQRELI I GDRQTGKTAVA

BP1  IDTILNQKGDVIVCVVAIGQKASSVAQVVNVLRE R GALDYTI VI AANASDPAALQYLAP
CF1  TDTILNQGGQNVIVCVVAIGQKASSVAQVV TNFQERGAMEYTI VVAETADS PATLQYLAP

BP1  YTGATVAEYFMYQGH TLVVYDDL SKQAQAYRQMS L LRRPPGREAYPGDVFYLHSRLLE
CF1  YTGAALAEYFMYRERHTLI IYDDL SKQAQAYRQMS L LRRPPGREAYPGDVFYLHSRLLE

BP1  RAAKLNDALGGGSM TALPVVETQAGDVSAYI PTNVI SITDGQIFLSSDLFNAGLRPAI NA
CF1  RAAKLSSLGEGSM TALPIVETQAGDVSAYI PTNVI SITDGQIFLSADLFNAGLRPAI NV

BP1  GIVSVRVGSAAQIKAMKQVAGLKLELAQFDELQAF AQFASDL DKATQNQL ARGQRLREI
CF1  GIVSVRVGSAAQIKAMKKVAGLKLELAQFAEL EAF AQFASDL DKATQNQL ARGQRLREL

BP1  LKQPQYSP I PVEYQVATI YAGTNGYLD D I PVEAVAKFVAGLRDYLR TNKPEYGEI I RTTQ
CF1  LKQPQSAPL TVEEQVMTI YTG TNGYLD SLELDQVRKYLVELRTYVKTNKPEFQEI I SSTK

BP1  KLDEKAEALLKEAI AEYKATFTA - - -
CF1  TFEAEAEALLKEAI QEQMERFLLQEQA

```

Abb. 6.1: Sequenzvergleich der α -Untereinheit



```

BP1 -----MVI SAERTNVGFI TQVI GPVVDI EFPSGKMPAI YNALRI QGKNAAGLDVA
CF1 MRI NPTTSDPGVSTLEKKNLGR I AQI I GPVLDVAFP PGKMPNI YNALI VKGRDTAGQPMN

BP1 VTCEVQQL LGDNRRVAVAMS STDGLV RGMVVDTGAPI SVPVGTATLGR I FNVLGE PVDE
CF1 VTCEVQQL LGNRRVAVAMS ATDGLT RGMVVI DTGAPLSVPVGGATLGR I FNVLGE PVDN

BP1 KGAVNATE TLPI HRPAPSFTQLETKP SVFETGI KVI DLLT PYRRGGKI GLFGGAGVGKTV
CF1 LGPVDTRTTSPI HRS APAFTQLDTKLSI FETGI KVV DLLAPYRRGGKI GLFGGAGVGKTV

BP1 IMMELI NNI ATQHGGVSVFAGVGERTREGNDLYNEM ESGVI DKDDPSKSKI ALVYGQMN
CF1 LIMELI NNI AKAHGGVSVFGVGERTREGNDLYMEMKESGVI NEQNI AESKVALVYGQMN

BP1 EPPGARMRVGLSGLTMAEYFRDVNKQDVLLFI DNI FRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQP
CF1 EPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVNEQDVLLFI DNI FRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQP

BP1 TLGTDV GALQERI TSTTEGSI TSI QAVYVPADDLTDPAATTF AHLDTT VLSRSLA AAKG
CF1 TLSTEMGSLQERI TSTKEGSI TSI QAVYVPADDLTDPAATTF AHLDTT VLSRGLA AAKG

BP1 IYPAVDPL GSTSNMLQPDI VGE EHYQTARAVQATLQRYKELQDI IAI LGLDELSEEDRLT
CF1 IYPAVDPL DSTSTMLQPRI VGE EHYEI AQRVKE TLQRYKELQDI IAI LGLDELSEEDRLT

BP1 VARARKI ERFLSQPFFVAEVFTGAPGKYVTLEETI KGFQM LSGELDDLPEQAFYLVGNI
CF1 VARARKI ERFLSQPFFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQLI LSGELDSLPEQAFYLVGNI

BP1 EEAKAKAEKLKA-----
CF1 DEATAKAMNLEMESKLLK

```

Abb. 6.2: Sequenzvergleich der β -Untereinheit

```

BP1 MANLKAIRDRIKTIKDTRKI TEAMRLVAAAKVRRAEQV MASRPFADRLAQVLYSLQTRL
CF1 MANLREL RDRI GSVKNTOKI TEAMKLVAAAKVRRAEAVVNGRPFSE TLVEVLYNMNEQL

BP1 RFEDVDLPLLAKRPVKTVALLVVTGDRGLCGGYNTNVI RRAKERLQELAEGLKYTLVI V
CF1 QTEDVDVPLTKI RTVKKVALMVVTGDRGLCGGFNNMLLKKAESRI AELKKLGVDYTIISI

BP1 GRKAAQYFORR- DYPIDAVYSGL EQIP SASEAGQIASELLSFLFSETVDRVELIYTKFVS
CF1 GKKGNTYFIRRP EIPVDRYFDG-TNLPTAKEAQAI ADDVFSLFVSEEVDKVEMLYTKFVS

BP1 LISKPVVQTLPLDPOG-----LETADDEIFRLTTRGSHLEVNREKVTSTLPALP
CF1 LVKSDPVIHTLLPLSPKGEICDINGKCVDAAEDEL FRLTTKEGKLTVERDMIKTETPAFS

BP1 SDMI FEQDPLQILDALLPLYLNNQLLRALQEAAASELAARMTAMNNASDNAQALI GTLTL
CF1 PILE FEQDPAQILDALLPLYLNSQLLRALQESLASELAARMTAMSNATDNANELKKTLSI

BP1 SYNKARQAAITQEI LEVVAGAEALR
CF1 NYNRARQAKITGEILEI VAGANACV

```

Abb. 6.3: Sequenzvergleich der γ -Untereinheit



Literatur

- [1] J. Weber, A. E. Senior, "ATP synthesis driven by proton transport in F_0F_1 -ATP synthase", *FEBS Lett.* **2003**, *545* (1), 61–70.
- [2] H. Seelert, A. Poetsch, N. A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg, D. J. Müller, "Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor", *Nature* **2000**, *405* (6785), 418–9.
- [3] D. Stock, A. G. Leslie, J. E. Walker, "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase", *Science* **1999**, *286* (5445), 1700–5.
- [4] J. Vonck, T. K. von Nidda, T. Meier, U. Matthey, D. J. Mills, W. Kühlbrandt, P. Dimroth, "Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na^+ -ATP synthase", *J. Mol. Biol.* **2002**, *321* (2), 307–16.
- [5] T. Meier, U. Matthey, C. von Ballmoos, J. Vonck, T. Krug von Nidda, W. Kühlbrandt, P. Dimroth, "Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases", *J. Mol. Biol.* **2003**, *325* (2), 389–97.
- [6] J. L. Rubinstein, J. E. Walker, R. Henderson, "Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy", *EMBO J.* **2003**, *22* (23), 6182–92.
- [7] T. Meier, J. Yu, T. Raschle, F. Henzen, P. Dimroth, D. J. Müller, "Structural evidence for a constant c_{11} ring stoichiometry in the sodium F-ATP synthase", *FEBS J.* **2005**, *272* (21), 5474–83.
- [8] P. C. Jones, R. H. Fillingame, "Genetic fusions of subunit c in the F_0 sector of H^+ -transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis", *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (45), 29701–5.
- [9] N. Mitome, T. Suzuki, S. Hayashi, M. Yoshida, "Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H^+ /ATP ratio and permissive elastic coupling", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (33), 12159–64.
- [10] M. E. Girvin, V. K. Rastogi, F. Abildgaard, J. L. Markley, R. H. Fillingame, "Solution structure of the transmembrane H^+ -transporting subunit c of the F_1F_0 ATP synthase", *Biochemistry* **1998**, *37* (25), 8817–24.



- [11] V. K. Rastogi, M. E. Girvin, “Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase”, *Nature* **1999**, *402* (6759), 263–8.
- [12] G. Groth, K. Schirwitz, “Rapid purification of membrane extrinsic F₁-domain of chloroplast ATP synthase in monodisperse form suitable for 3D-crystallization”, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *260* (1), 15–21.
- [13] B. Böttcher, L. Schwarz, P. Gräber, “Direct indication for the existence of a double stalk in CF₀F₁”, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281* (5), 757–62.
- [14] C. Mellwig, B. Böttcher, “A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts”, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (20), 18544–9.
- [15] O. Dmitriev, P. C. Jones, W. Jiang, R. H. Fillingame, “Structure of the membrane domain of subunit b of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase”, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (22), 15598–604.
- [16] S. D. Dunn, D. T. McLachlin, M. Revington, “The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase”, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1458* (2-3), 356–63.
- [17] P. A. Del Rizzo, Y. Bi, S. D. Dunn, B. H. Shilton, “The ‘second stalk’ of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain”, *Biochemistry* **2002**, *41* (21), 6875–84.
- [18] A. J. Rodgers, R. A. Capaldi, “The second stalk composed of the b- and δ -subunits connects F₀ to F₁ via an α -subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase”, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (45), 29406–10.
- [19] C. Motz, T. Hornung, M. Kersten, D. T. McLachlin, S. D. Dunn, J. G. Wise, P. D. Vogel, “The subunit b dimer of the F₀F₁-ATP synthase: interaction with F₁-ATPase as deduced by site-specific spin-labeling”, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (47), 49074–81.
- [20] R. H. Fillingame, P. C. Jones, W. Jiang, F. I. Valiyaveetil, O. Y. Dmitriev, “Subunit organization and structure in the F₀ sector of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase”, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1365* (1-2), 135.



- [21] R. L. Cross, "The number of functional catalytic sites on F₁-ATPases and the effects of quaternary structural asymmetry on their properties", *J. Bioenerg. Biomembr.* **1988**, *20* (4), 395–405.
- [22] J. P. Abrahams, A. G. Leslie, R. Lutter, J. E. Walker, "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria", *Nature* **1994**, *370* (6491), 621–8.
- [23] G. Groth, E. Pohl, "The structure of the chloroplast F₁-ATPase at 3.2 Å resolution", *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (2), 1345–52.
- [24] G. Groth, "Structure of spinach chloroplast F₁-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (6), 3464–8.
- [25] A. C. Hausrath, G. Gruber, B. W. Matthews, R. A. Capaldi, "Structural features of the γ -subunit of the *Escherichia coli* F₁-ATPase revealed by a 4.4 Å resolution map obtained by x-ray crystallography", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (24), 13697–702.
- [26] Y. Shirakihara, A. G. Leslie, J. P. Abrahams, J. E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kambara, K. Saika, Y. Kagawa, M. Yoshida, "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* **1997**, *5* (6), 825–36.
- [27] M. Dittrich, K. Schulten, "Zooming in on ATP hydrolysis in F₁", *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, *37* (6), 441–4.
- [28] C. Gibbons, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, "The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution", *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (11), 1055–61.
- [29] A. J. Rodgers, M. C. Wilce, "Structure of the γ - ϵ complex of ATP synthase", *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (11), 1051–4.
- [30] U. Uhlin, G. B. Cox, J. M. Guss, "Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*", *Structure* **1997**, *5* (9), 1219–30.



- [31] S. Wilkens, R. A. Capaldi, "ATP synthase's second stalk comes into focus", *Nature* **1998**, *393* (6680), 29.
- [32] J. A. Cruz, C. A. Radkowski, R. E. McCarty, "Functional consequences of deletions of the N-terminus of the ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase", *Plant Physiol.* **1997**, *113* (4), 1185–92.
- [33] X. B. Shi, J. M. Wei, Y. K. Shen, "Effects of sequential deletions of residues from the N- or C-terminus on the functions of ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase", *Biochemistry* **2001**, *40* (36), 10825–31.
- [34] S. P. Tsunoda, R. Aggeler, M. Yoshida, R. A. Capaldi, "Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F_oF_1 ATP synthase", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (3), 898–902.
- [35] T. Suzuki, T. Murakami, R. Iino, J. Suzuki, S. Ono, Y. Shirakihara, M. Yoshida, " F_oF_1 -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ϵ subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance", *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (47), 46840–6.
- [36] R. Iino, T. Murakami, S. Iizuka, Y. Kato-Yamada, T. Suzuki, M. Yoshida, "Real-time monitoring of conformational dynamics of the ϵ subunit in F_1 -ATPase", *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (48), 40130–4.
- [37] S. Wilkens, S. D. Dunn, J. Chandler, F. W. Dahlquist, R. A. Capaldi, "Solution structure of the N-terminal domain of the δ subunit of the *E. coli* ATP synthase", *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4* (3), 198–201.
- [38] V. Kane-Dickson, J. A. Silvester, I. M. Fearnley, A. G. Leslie, J. E. Walker, "On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase", *EMBO J.* **2006**, *25* (12), 2911–18.
- [39] R. H. Fillingame, C. M. Angevine, O. Y. Dmitriev, "Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase", *FEBS Lett.* **2003**, *555* (1), 29–34.



- [40] Z. Yinghao, W. Jun, C. Yuanbo, Y. Jiachang, F. Xiaohong, “Rotary torque produced by proton motive force in F_0F_1 motor”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331* (1), 370–4.
- [41] Y. Sambongi, Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada, M. Futai, “Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): direct observation”, *Science* **1999**, *286* (5445), 1722–4.
- [42] O. Pänke, K. Gumbiowski, W. Junge, S. Engelbrecht, “F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF_0EF_1 ”, *FEBS Lett.* **2000**, *472* (1), 34–8.
- [43] K. Nishio, A. Iwamoto-Kihara, A. Yamamoto, Y. Wada, M. Futai, “Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes: α or β subunit rotation relative to the c subunit ring”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (21), 13448–52.
- [44] H. Ueno, T. Suzuki, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, “ATP-driven stepwise rotation of F_0F_1 -ATP synthase”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (5), 1333–8.
- [45] C. Kayalar, J. Rosing, P. D. Boyer, “An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions”, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (8), 2486–91.
- [46] P. D. Boyer, “The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities”, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1140* (3), 215–50.
- [47] R. I. Menz, J. E. Walker, A. G. Leslie, “Structure of bovine mitochondrial F_1 -ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis”, *Cell* **2001**, *106* (3), 331–41.
- [48] K. Braig, R. I. Menz, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, “Structure of bovine mitochondrial F_1 -ATPase inhibited by Mg^{2+} ADP and aluminium fluoride”, *Structure. Fold. Des.* **2000**, *8* (6), 567–73.
- [49] R. Kagawa, M. G. Montgomery, K. Braig, A. G. Leslie, J. E. Walker, “The structure of bovine F_1 -ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride”, *EMBO J.* **2004**, *23* (14), 2734–44.



- [50] K. Kinosita Jr., R. Yasuda, H. Noji, K. Adachi, "A rotary molecular motor that can work at near 100 % efficiency", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2000**, *355* (1396), 473–89.
- [51] N. Sakaki, R. Shimo-Kon, K. Adachi, H. Itoh, S. Furuike, E. Muneyuki, M. Yoshida, K. Kinosita Jr., "One rotary mechanism for F₁-ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar", *Biophys. J.* **2005**, *88* (3), 2047–56.
- [52] D. Sabbert, S. Engelbrecht, W. Junge, "Intersubunit rotation in active F-ATPase", *Nature* **1996**, *381* (6583), 623–5.
- [53] T. M. Duncan, V. V. Bulygin, Y. Zhou, M. L. Hutcheon, R. L. Cross, "Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (24), 10964–8.
- [54] Y. Zhou, T. M. Duncan, V. V. Bulygin, M. L. Hutcheon, R. L. Cross, "ATP hydrolysis by membrane-bound *Escherichia coli* F_oF₁ causes rotation of the γ subunit relative to the β subunits", *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275* (1-2), 96–100.
- [55] R. Aggeler, I. Ogilvie, R. A. Capaldi, "Rotation of a γ - ϵ subunit domain in the *Escherichia coli* F_oF₁-ATP synthase complex. The γ - ϵ subunits are essentially randomly distributed relative to the $\alpha_3\beta_3\delta$ domain in the intact complex", *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (31), 19621–4.
- [56] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita Jr., "Direct observation of the rotation of F₁-ATPase", *Nature* **1997**, *386* (6622), 299–302.
- [57] K. Hasler, S. Engelbrecht, W. Junge, "Three-stepped rotation of subunits γ and ϵ in single molecules of F-ATPase as revealed by polarized, confocal fluorometry", *FEBS Lett.* **1998**, *426* (3), 301–4.
- [58] T. Hisabori, A. Kondoh, M. Yoshida, "The gamma subunit in chloroplast F₁-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner", *FEBS Lett.* **1999**, *463* (1-2), 35–8.
- [59] H. Omote, N. Sambonmatsu, K. Saito, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, T. Yanagida, Y. Wada, M. Futai, "The γ -subunit rotation and torque generation in



- F₁-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (14), 7780–4.
- [60] D. Spetzler, J. York, D. Daniel, R. Fromme, D. Lowry, W. Frasch, "Microsecond time scale rotation measurements of single F₁-ATPase molecules", *Biochemistry* **2006**, *45* (10), 3117–24.
- [61] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita Jr., M. Yoshida, "F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps", *Cell* **1998**, *93* (7), 1117–24.
- [62] R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita Jr., H. Itoh, "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase", *Nature* **2001**, *410* (6831), 898–904.
- [63] K. Shimabukuro, R. Yasuda, E. Muneyuki, K. Y. Hara, K. Kinosita Jr., M. Yoshida, "Catalysis and rotation of F₁ motor: cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40° substep rotation", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (25), 14731–6.
- [64] T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Muneyuki, M. Yoshida, K. Kinosita Jr., "Chemomechanical coupling in F₁-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation", *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11* (2), 142–8.
- [65] Y. Rondelez, G. Tresset, T. Nakashima, Y. Kato-Yamada, H. Fujita, S. Takeuchi, H. Noji, "Highly coupled ATP synthesis by F₁-ATPase single molecules", *Nature* **2005**, *433* (7027), 773–7.
- [66] H. Itoh, A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita, "Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase", *Nature* **2004**, *427* (6973), 465–8.
- [67] P. Mitchell, "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism", *Nature* **1961**, *191*, 144–8.
- [68] G. Groth, W. Junge, "ATP synthase: activating versus catalytic proton transfer", *FEBS Lett.* **1995**, *358* (2), 142–4.



- [69] S. Ponomarenko, I. Volfson, H. Strotmann, “Proton gradient-induced changes of the interaction between CF_o and CF_1 related to activation of the chloroplast ATP synthase”, *FEBS Lett.* **1999**, *443* (2), 136–8.
- [70] U. Junesche, P. Gräber, “Influence of the redox state and the activation of the chloroplast ATP synthase on proton-transport-coupled ATP synthesis/hydrolysis”, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *893* (1), 275–88.
- [71] J. Schumann, M. L. Richter, R. E. McCarty, “Partial proteolysis as a probe of the conformation of the γ subunit in activated soluble and membrane-bound chloroplast coupling factor 1”, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260* (21), 11817–23.
- [72] T. Hisabori, H. Ueoka-Nakanishi, H. Konno, F. Koyama, “Molecular evolution of the modulator of chloroplast ATP synthase: origin of the conformational change dependent regulation”, *FEBS Lett.* **2003**, *545* (1), 71–5.
- [73] M. Richter, “ γ - ϵ interactions regulate the chloroplast ATP synthase”, *Photosynthesis Research* **2004**, *79* (3), 319–29.
- [74] D. Bald, H. Noji, M. Yoshida, Y. Hirono-Hara, T. Hisabori, “Redox regulation of the rotation of F_1 -ATP synthase”, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (43), 39505–7.
- [75] H. Ueoka-Nakanishi, Y. Nakanishi, H. Konno, K. Motohashi, D. Bald, T. Hisabori, “Inverse regulation of rotation of F_1 -ATPase by the mutation at the regulatory region on the γ subunit of chloroplast ATP synthase”, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (16), 16272–7.
- [76] F. Yu, R. E. McCarty, “Detergent activation of the ATPase activity of chloroplast coupling factor 1”, *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *238* (1), 61–8.
- [77] M. L. Richter, W. J. Patrie, R. E. McCarty, “Preparation of the ϵ subunit and ϵ subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutively active forms”, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (12), 7371–3.
- [78] S. P. Tsunoda, A. J. Rodgers, R. Aggeler, M. C. Wilce, M. Yoshida, R. A. Capaldi, “Large conformational changes of the ϵ subunit in the bacterial F_oF_1 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (12), 6560–4.



- [79] I. Y. Drobinskaya, I. A. Kozlov, M. B. Murataliev, E. N. Vul'fon, "Tightly bound adenosine diphosphate, which inhibits the activity of mitochondrial F_1 -ATPase, is located at the catalytic site of the enzyme", *FEBS Lett.* **1985**, *182* (2), 419–24.
- [80] Y. M. Milgrom, P. D. Boyer, "The ADP that binds tightly to nucleotide-depleted mitochondrial F_1 -ATPase and inhibits catalysis is bound at a catalytic site", *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1020* (1), 43–8.
- [81] E. Muneyuki, M. Makino, H. Kamata, Y. Kagawa, M. Yoshida, H. Hirata, "Inhibitory effect of NaN_3 on the F_0F_1 ATPase of submitochondrial particles as related to nucleotide binding", *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1144* (1), 62–8.
- [82] Y. M. Milgrom, L. L. Ehler, P. D. Boyer, "ATP binding at noncatalytic sites of soluble chloroplast F_1 -ATPase is required for expression of the enzyme activity", *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (31), 18725–8.
- [83] T. Amano, T. Matsui, E. Muneyuki, H. Noji, K. Hara, M. Yoshida, T. Hisabori, " $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of F_1 -ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* can maintain steady-state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites", *Biochem. J.* **1999**, *343*, 135–8.
- [84] D. Bald, T. Amano, E. Muneyuki, B. Pitard, J. L. Rigaud, J. Kruij, T. Hisabori, M. Yoshida, M. Shibata, "ATP synthesis by F_0F_1 -ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition", *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (2), 865–70.
- [85] J. M. Jault, W. S. Allison, "Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F_1 -ATPase", *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (3), 1558–66.
- [86] J. M. Jault, T. Matsui, F. M. Jault, C. Kaibara, E. Muneyuki, M. Yoshida, Y. Kagawa, W. S. Allison, "The $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of the F_1 -ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* containing the α D261N substitution fails to dissociate inhibitory MgADP from a catalytic site when ATP binds to noncatalytic sites", *Biochemistry* **1995**, *34* (50), 16412–8.



- [87] T. Matsui, E. Muneyuki, M. Honda, W. S. Allison, C. Dou, M. Yoshida, "Catalytic activity of the $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of F_1 -ATPase without noncatalytic nucleotide binding site", *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (13), 8215–21.
- [88] D. Bald, E. Muneyuki, T. Amano, J. Kruip, T. Hisabori, M. Yoshida, "The noncatalytic site-deficient $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex and F_0F_1 -ATP synthase can continuously catalyse ATP hydrolysis when P_i is present", *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262* (2), 563.
- [89] N. Mitome, S. Ono, T. Suzuki, K. Shimabukuro, E. Muneyuki, M. Yoshida, "The presence of phosphate at a catalytic site suppresses the formation of the MgADP-inhibited form of F_1 -ATPase", *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269* (1), 53–60.
- [90] Y. Hirono-Hara, H. Noji, M. Nishiura, E. Muneyuki, K. Y. Hara, R. Yasuda, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, "Pause and rotation of F_1 -ATPase during catalysis", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (24), 13649–54.
- [91] Y. Hirono-Hara, K. Ishizuka, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, H. Noji, "Activation of pausing F_1 motor by external force", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (12), 4288–93.
- [92] R. E. McCarty, R. J. Guillory, E. Racker, "Dio-9, an inhibitor of coupled electron transport and phosphorylation in chloroplasts", *J. Biol. Chem.* **1965**, *240* (12), 4822–3.
- [93] E. G. Uribe, "Phloretin: an inhibitor of phosphate transfer and electron flow in spinach chloroplasts", *Biochemistry* **1970**, *9* (10), 2100–6.
- [94] E. Gross, N. Shavit, A. San Pietro, "Synthalin: an inhibitor of energy transfer in chloroplasts", *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *127* (1), 224–8.
- [95] C. J. Arntzen, "Inhibition of photophosphorylation by tentoxin, a cyclic tetrapeptide", *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *283* (3), 539–42.
- [96] J. A. Steele, T. F. Uchytel, R. D. Durbin, "The binding of tentoxin to a tryptic digest of chloroplast coupling factor 1", *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *459* (3), 347–50.



- [97] J. A. Steele, R. D. Durbin, T. F. Uchytil, D. H. Rich, "Tentoxin. An uncompetitive inhibitor of lettuce chloroplast coupling factor 1", *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *501* (1), 72–82.
- [98] J. A. Steele, T. F. Uchytil, R. D. Durbin, P. K. Bhatnagar, D. H. Rich, "The stimulation of coupling factor 1 ATPase by tentoxin and its analogs", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *84* (1), 215–18.
- [99] J. Santolini, F. Haraux, C. Sigalat, G. Moal, F. Andre, "Kinetic analysis of tentoxin binding to chloroplast F₁-ATPase. A model for the overactivation process", *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (2), 849–58.
- [100] M. Mochimaru, H. Sakurai, "Three kinds of binding site for tentoxin on isolated chloroplast coupling factor 1", *FEBS Lett.* **1997**, *419* (1), 23–6.
- [101] D. Hu, H. R. Fiedler, T. Golan, M. Edelman, H. Strotmann, N. Shavit, S. Leu, "Catalytic properties and sensitivity to tentoxin of *Chlamydomonas reinhardtii* ATP synthases changed in codon 83 of atpB by site-directed mutagenesis", *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (9), 5457–63.
- [102] W. C. Tucker, Z. Du, R. Hein, M. L. Richter, Z. Gromet-Elhanan, "Hybrid *Rhodospirillum rubrum* F₀F₁ ATP synthases containing spinach chloroplast F₁ β or α and β subunits reveal the essential role of the α subunit in ATP synthesis and tentoxin sensitivity", *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (2), 906–12.
- [103] G. Groth, T. Hisabori, H. Lill, D. Bald, "Substitution of a single amino acid switches the tentoxin-resistant thermophilic F₁-ATPase into a tentoxin-sensitive enzyme", *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (23), 20117–9.
- [104] C. Schnick, N. Körtgen, G. Groth, "Complete inhibition of the tentoxin-resistant F₁-ATPase from *Escherichia coli* by the phytopathogenic inhibitor tentoxin after substitution of critical residues in the α - and β -subunit", *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (52), 51003–7.
- [105] J. Santolini, C. Minoletti, J. M. Gomis, C. Sigalat, F. Andre, F. Haraux, "An insight into the mechanism of inhibition and reactivation of the F₁-ATPases by tentoxin", *Biochemistry* **2002**, *41* (19), 6008–18.



- [106] N. Hu, D. A. Mills, B. Huchzermeyer, M. L. Richter, "Inhibition by tentoxin of cooperativity among nucleotide binding sites on chloroplast coupling factor 1", *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (12), 8536–40.
- [107] P. Fromme, I. Dahse, P. Gräber, "Effect of Tentoxin on the activation and on the catalytic reaction of reconstituted H⁺-ATPase from Chloroplasts", *Z. Naturforsch.* **1992**, *47* (c), 239–44.
- [108] E. Pinet, F. Cavelier, J. Verducci, G. Girault, L. Dubart, F. Haraux, C. Sigalat, F. Andre, "Synthesis, structure, and properties of MeSer¹-tentoxin, a new cyclic tetrapeptide which interacts specifically with chloroplast F₁ H⁻ ATPase. Differentiation of inhibitory and stimulating effects", *Biochemistry* **1996**, *35* (39), 12804–11.
- [109] P. Pavlova, K. Shimabukuro, T. Hisabori, G. Groth, H. Lill, D. Bald, "Complete inhibition and partial re-activation of single F₁-ATPase molecules by tentoxin: new properties of the re-activated enzyme", *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (11), 9685–8.
- [110] A. K. Joshi, S. Ahmed, G. Ferro-Luzzi Ames, "Energy coupling in bacterial periplasmic transport systems. Studies in intact *Escherichia coli* cells", *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (4), 2126–33.
- [111] N. N. Nichols, C. S. Harwood, "PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*", *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (16), 5056–61.
- [112] T. Suzuki, H. Ueno, N. Mitome, J. Suzuki, M. Yoshida, "F_o of ATP synthase is a rotary proton channel. Obligatory coupling of proton translocation with rotation of c-subunit ring", *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (15), 13281–5.
- [113] D. Hanahan, J. Jessee, F. R. Bloom, "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria", *Methods Enzymol.* **1991**, *204*, 63–113.
- [114] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* **1970**, *227* (259), 680–5.



- [115] J. Heukeshoven, R. Dernick, “Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels”, *Electrophoresis* **1988**, *9* (1), 28–32.
- [116] H. H. Taussky, E. Shorr, “A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus”, *J. Biol. Chem.* **1953**, *202* (2), 675–85.
- [117] N. E. Garrett, H. S. Penefsky, “Interaction of adenine nucleotides with multiple binding sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase”, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (17), 6640–7.
- [118] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones, “Data for Biochemical Research”, *Oxford University Press* **1986**, *3rd* (1), 78.
- [119] G. Groth, “Chloroplast F₁-ATPase: Structure and regulation”, *Recent. Res. Devel. Biochem.* **2003**, *4*, 903–14.
- [120] M. Milgrom Ya, “An ATP dependence of mitochondrial F₁-ATPase inactivation by the natural inhibitor protein agrees with the alternating-site binding-change mechanism”, *FEBS Lett.* **1989**, *246* (1-2), 202–6.
- [121] V. V. Bulygin, A. D. Vinogradov, “Interaction of Mg²⁺ with F₀F₁ mitochondrial ATPase as related to its slow active/inactive transition”, *Biochem. J.* **1991**, *276* (1), 149–156.
- [122] J. R. Gledhill, J. E. Walker, “Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria”, *Biochem. J.* **2005**, *386* (3), 591–8.
- [123] R. D. Durbin, T. F. Uchytel, “Cytoplasmic inheritance of chloroplast coupling factor 1 subunits”, *Biochem. Genet.* **1977**, *15* (11-12), 1143–6.
- [124] N. Holland, Y. Evron, M. Jansen, M. Edelman, U. Pick, “Involvement of thylakoid overenergization in tentoxin-induced chlorosis in *Nicotiana spp*”, *Plant Physiol.* **1997**, *114* (3), 887–92.
- [125] P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, “Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution”, *Nature* **2001**, *411* (6840), 909–17.



- [126] N. Kamiya, J. R. Shen, “Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (1), 98–103.
- [127] S. Selman-Reimer, S. Merchant, B. R. Selman, “Isolation, purification, and characterization of coupling factor 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Biochemistry* **1981**, *20* (19), 5476–82.
- [128] M. Sokolov, Z. Gromet-Elhanan, “Spinach chloroplast coupling factor CF₁- $\alpha_3\beta_3$ core complex: structure, stability, and catalytic properties”, *Biochemistry* **1996**, *35* (4), 1242–8.
- [129] J. M. Jault, C. Dou, N. B. Grodsky, T. Matsui, M. Yoshida, W. S. Allison, “The $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of the F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* with the β T165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover”, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (46), 28818–24.
- [130] J. Weber, S. D. Dunn, A. E. Senior, “Effect of the ϵ -subunit on nucleotide binding to *Escherichia coli* F₁-ATPase catalytic sites”, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (27), 19124–8.
- [131] Y. M. Milgrom, R. L. Cross, “Rapid hydrolysis of ATP by mitochondrial F₁-ATPase correlates with the filling of the second of three catalytic sites”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (39), 13831–6.
- [132] K. R. Dunham, B. R. Selman, “Interactions of inorganic phosphate with spinach coupling factor 1. Effects on ATPase and ADP binding activities”, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256* (19), 10044–9.
- [133] M. J. Van Raaij, J. P. Abrahams, A. G. Leslie, J. E. Walker, “The structure of bovine F₁-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (14), 6913–7.
- [134] F. Gao, B. Lipscomb, I. Wu, M. L. Richter, “In vitro assembly of the core catalytic complex of the chloroplast ATP synthase”, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (17), 9763–9.



- [135] Z. Gromet-Elhanan, "Identification of subunits required for the catalytic activity of the F₁-ATPase", *J. Bioenerg. Biomembr.* **1992**, *24* (5), 447.
- [136] M. W. Bowler, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, "How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (23), 8646–9.
- [137] E. A. Vasilyeva, I. B. Minkov, A. F. Fitin, A. D. Vinogradov, "Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite", *Biochem. J.* **1982**, *202* (1), 15–23.
- [138] J. M. Zhou, Z. X. Xue, Z. Y. Du, T. Melese, P. D. Boyer, "Relationship of tightly bound ADP and ATP to control and catalysis by chloroplast ATP synthase", *Biochemistry* **1988**, *27* (14), 5129–35.
- [139] S. R. Paik, J. M. Jault, W. S. Allison, "Inhibition and inactivation of the F₁ adenosinetriphosphatase from *Bacillus PS3* by dequalinium and activation of the enzyme by lauryl dimethylamine oxide", *Biochemistry* **1994**, *33* (1), 126–33.
- [140] C. Dou, N. B. Grodsky, T. Matsui, M. Yoshida, W. S. Allison, "ADP-fluoroaluminate complexes are formed cooperatively at two catalytic sites of wild-type and mutant $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplexes of the F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3*", *Biochemistry* **1997**, *36* (12), 3719–27.
- [141] Y. M. Milgrom, L. L. Ehler, P. D. Boyer, "The characteristics and effect on catalysis of nucleotide binding to noncatalytic sites of chloroplast F₁-ATPase", *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (18), 11551–8.
- [142] M. B. Murataliev, P. D. Boyer, "The mechanism of stimulation of MgATPase activity of chloroplast F₁-ATPase by non-catalytic adenine-nucleotide binding. Acceleration of the ATP-dependent release of inhibitory ADP from a catalytic site", *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209* (2), 681–7.
- [143] D. J. Hyndman, Y. M. Milgrom, E. A. Bramhall, R. L. Cross, "Nucleotide-binding sites on *Escherichia coli* F₁-ATPase. Specificity of noncatalytic sites and inhibition at catalytic sites by MgADP", *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (46), 28871–7.



- [144] E. Muneyuki, T. Hisabori, W. S. Allison, J. M. Jault, T. Sasayama, M. Yoshida, "Catalytic cooperativity of beef heart mitochondrial F₁-ATPase revealed by using 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP as a substrate; an indication of mutually activating catalytic sites", *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1188* (1-2), 108–16.
- [145] D. A. Bullough, E. L. Brown, J. D. Saario, W. S. Allison, "On the location and function of the noncatalytic sites on the bovine heart mitochondrial F₁-ATPase", *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (28), 14053–60.
- [146] K. E. Hightower, R. E. McCarty, "Influence of nucleotides on the cold stability of chloroplast coupling factor 1", *Biochemistry* **1996**, *35* (31), 10051–7.
- [147] F. E. Possmayer, A. F. Hartog, J. A. Berden, P. Gräber, "Covalent modification of the catalytic sites of the H⁺-ATPase from chloroplasts and 2-nitreno-ADP. Modification of the catalytic site 1 (tight) and catalytic sites 1 and 2 together impairs both uni-site and multi-site catalysis of ATP synthesis and ATP hydrolysis", *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1459* (1), 202–17.
- [148] A. B. Shapiro, A. H. Huber, R. E. McCarty, "Four tight nucleotide binding sites of chloroplast coupling factor 1", *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (7), 4194–200.
- [149] A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, R. M. Simmons, "Single-molecule biomechanics with optical methods", *Science* **1999**, *283* (5408), 1689–95.
- [150] M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, H. Hosokawa, D. J. Cipriano, S. D. Dunn, Y. Wada, M. Futai, "Stochastic high-speed rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector: the ϵ subunit-sensitive rotation", *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (7), 4126–31.
- [151] Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, H. Noji, "Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology", *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (3), 361–5.
- [152] K. Y. Hara, H. Noji, D. Bald, R. Yasuda, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, "The role of the DELSEED motif of the β subunit in rotation of F₁-ATPase", *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (19), 14260–3.



-
- [153] M. Tanabe, K. Nishio, Y. Iko, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, M. Futai, "Rotation of a complex of the γ subunit and c ring of *Escherichia coli* ATP synthase. The rotor and stator are interchangeable", *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (18), 15269–74.
- [154] I. Dahse, S. Pezenec, G. Girault, G. Berger, F. Andre, B. Liebermann, "The interaction of tentoxin with CF₁ and CF₁- ϵ isolated from spinach chloroplast", *J. Plant. Physiol.* **1994**, *143* (6), 615–20.
- [155] C. Sigalat, B. Pitard, F. Haraux, "Proton coupling is preserved in membrane-bound chloroplast ATPase activated by high concentrations of tentoxin", *FEBS Lett.* **1995**, *368* (2), 253–6.
- [156] T. Lassmann, E. L. Sonnhammer, "Quality assessment of multiple alignment programs", *FEBS Lett.* **2002**, *529* (1), 126–30.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Georg Groth danke ich ganz herzlich für die engagierte Betreuung, den Freiraum, den er mir bei der Durchführung der Arbeit gab, sowie die vielen Anregungen und die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Jürgen Schumann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Toru Hisabori möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Rotationsexperimente danken und für die weitreichende Unterstützung vor, während und nach meinem Aufenthalt am Tokyo Institute of Technology.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tokyo Institute of Technology danke ich für die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft. Besonders erwähnen möchte ich dabei Hiroki Konno, der mir in allen Labor- und Alltagsbelangen zur Seite stand.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Pflanzen danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt dabei Antje, Claudia B., Claudia S., Jan, Maria, Nicole, Robert, Silke und Thomas.

Für die Durchsicht meiner Arbeit danke ich meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Groth sowie Dominik, ohne den diese Arbeit ein unformatierter Haufen Wörter wäre.

Besonders danken möchte ich nicht zuletzt meinen Eltern und Voltje, die mich unermüdlich unterstützt haben.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 02.10.2006