ESR-spektroskopische Untersuchungen der F_oF_1-ATP-Synthase aus *Escherichia coli*

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Christian Motz

Betreuer: Priv. Doz. Dr. Pia D. Vogel

Kaiserslautern 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. September 1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. H. Sitzmann
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. D. Vogel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Trommer

Die vorliegende Arbeit entstand von Oktober 1995 bis September 1999 im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie der Universität Kaiserslautern

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Pia D. Vogel für die Betreuung und den mir gewährten Freiraum bei der Gestaltung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Wolfgang E. Trommer und Herrn Dr. John G. Wise danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung dieses Themas.

Inhalt

1 Einleitung 6

1.1 Die F_oF_1-ATP-Synthase 7

1.2 ESR-Spektroskopie 17

2 Problemstellung 25

3 Ergebnisse und Diskussion 27

3.1 Untersuchungen der Bindungsstellen der F_1-ATPase 27

1.2 Untersuchungen an den isolierten Untereinheiten α, β und γ 40

1.3 Untersuchungen zum „Second Stalk“ der F_oF_1-ATP-Synthase 51

4 Zusammenfassung 67

5 Experimenteller Teil 69

5.1 Allgemeines 69

1.2 Enzymatische Arbeiten 71

1.3 Analytik 79

1.4 ESR-Spektroskopie 82

2 Literatur 84

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-phosphat
ANP	ADP und ATP
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CF_1	F_1-ATPase aus Chloroplasten
DTT	Dithiothreitol
EACA	ε-Aminocapronsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF_1	F_1-ATPase aus *Escherichia coli*
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
MF_1	F_1-ATPase aus Mitochondrien
PAB	p-Aminobenzamidin
PEG	Polyethylenglycol
P_i	Orthophosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP_i	Pyrophosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL-ATP	2',3'-O-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolin-3-carbonyl)-adenosin-5'-triphosphat
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
TF_1	F_1-ATPase aus dem thermophilen Bakterium PS3
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

1 Einleitung

Adenosin-5'-triphosphat (ATP) ist neben seiner Funktion als Baustein der Nukleinsäuren *der* Hauptüberträger der freien Energie in lebenden Organismen. ATP enthält zwei energiereiche Phosphorsäureanhydrid-Bindungen, bei deren Hydrolyse viel Energie frei wird (unter zellulären Bedingungen: $\Delta G° \approx 50\,\frac{kJ}{mol}$). Der ATP-ADP-Zyklus ist der zentrale Mechanismus des Energiehaushalts (Übersicht z.B. Stryer 1987).

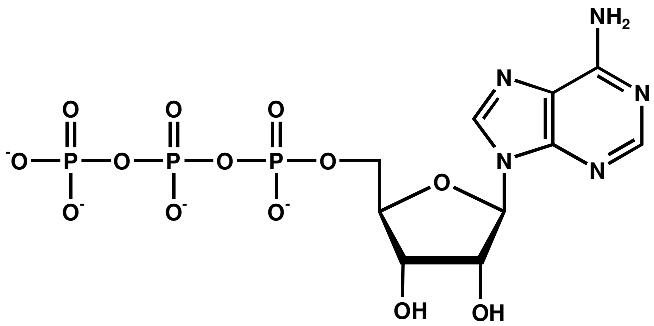


Abbildung 1: Adenosin-5'-triphosphat

Die Hydrolyse von ATP liefert die Energie für Bewegung, aktiven Molekültransport, Biosynthesen sowie für die Signalverstärkung. Neben der Reaktion von ATP zu ADP und P_i (Orthophosphatspaltung) ist noch die Reaktion von ATP zu AMP und PP_i (Pyrophosphatspaltung) von Bedeutung, bei der durch die anschließende Hydrolyse von PP_i zu zwei P_i weitere Energie ($\Delta G°=33{,}5\,\frac{kJ}{mol}$) gewonnen wird.

Die Bedeutung von ATP läßt sich erahnen, wenn man bedenkt, daß der Mensch unter Belastung bis zu 0,5 kg ATP in der Minute umsetzen kann. Dabei wird ein ATP-Molekül in der Regel innerhalb einer Minute nach seiner Bildung verbraucht. Da im Körper im zeitlichen Mittel jedoch nur etwa 55 g vorhanden sind (Lehninger 1982), folgt, daß das verbrauchte ATP ständig nachgebildet werden muß.

Der größte Teil des ATP wird durch den Abbau eines Protonengradienten über eine Membran erzeugt. Bei der oxidativen Phosphorylierung entsteht dieser Gradient z.B. an der inneren Mitochondrienmembran oder der Plasmamembran von Bakterien durch die Oxidation von Nährstoffmolekülen, bei der Photophosphorylierung an der Thylakoidmembran durch die Photosynthese. Das Enzym, das die Energie des Protonengradienten zur ATP-Synthese nutzt, ist die F_oF_1-ATP-Synthase (auch *protonenpumpende ATP-Synthase* genannt), die in allen Lebewesen in ähnlicher Form vorkommt.

1.1 Die F_oF_1-ATP-Synthase

Die F_oF_1-ATP-Synthase befindet sich an den Plasmamembranen von Bakterien, der inneren Mitochondrienmembran und den Thylakoidmembranen der Chloroplasten und katalysiert die Synthese von ATP aus ADP und P_i bei der oxidativen bzw. Photophosphorylierung. Die Energie hierzu liefert ein elektrochemischer Protonengradient, der durch Elektronentransportprozesse aufgebaut wird (chemiosmotische Hypothese nach P. Mitchell, Nobelpreis für Chemie 1978; Mitchell 1961, Review: Mitchell 1979).

Der ATP-Synthase-Komplex läßt sich in zwei funktionelle Einheiten unterteilen, F_o und F_1. F_o ist ein integraler Membranproteinkomplex, der den Protonenkanal bildet. F_1 hingegen ist ein wasserlöslicher Proteinkomplex, der die Nukleotidbindungsstellen trägt. Er läßt sich leicht von F_o abtrennen, verliert dann aber seine Fähigkeit zur netto ATP-Synthese, da die treibende Kraft aus dem Protonengradienten fehlt. Daher wird dieser Teil oft als F_1-ATPase bezeichnet. Die ATP-Synthase aus *Escherichia coli* (Abbildung 2), die häufig als Prototyp herangezogen wird, hat die Zusammensetzung $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ für die F_1 und $ab_2c_{9\text{-}12}$ für den F_o-Teil (Walker *et al.* 1984).

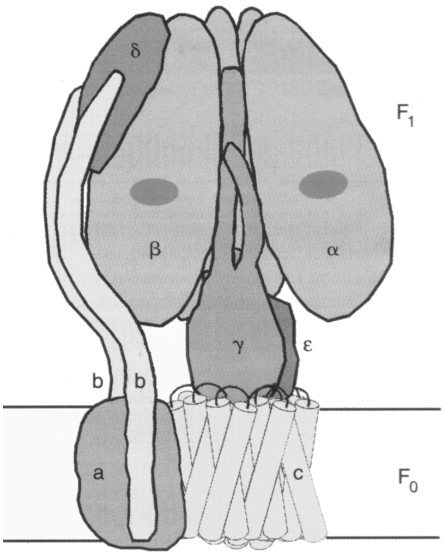


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der F_oF_1-ATP-Synthase aus *Escherichia coli* (Junge *et al.* 1997). Die vorderen α- und β-Untereinheiten sind nicht dargestellt.

Die F_1-ATPase arbeitet nach einem bemerkenswerten Mechanismus, dem 1973 von P. D. Boyer formulierten *Binding Change Mechanismus* (Boyer *et al.* 1973). 1994 konnten J. E. Walker und Mitarbeiter eine Kristallstruktur von der mitochondrialen F_1 (MF_1) erhalten (Abrahams *et al.* 1994), anhand derer dieser Mechanismus weitgehend unterstützt werden konnte. Für ihre großen Beiträge zur Erforschung der F_1-ATPase erhielten Boyer und Walker 1997 zur Hälfte den Nobelpreis für Chemie.

1.1.1 Überblick über Struktur und Mechanismus des F_1-Teils

Der F_1-Teil der ATP-Synthase trägt die insgesamt sechs Nukleotidbindungsstellen (Cross and Nalin 1982, Wise *et al.* 1983, Xue *et al.* 1987). Drei davon sind an der Katalyse beteiligt und werden folgerichtig als katalytische Bindungsstellen bezeichnet. Nukleotide, die an den anderen drei Bindungsstellen (diese werden als nichtkatalytische Bindungsstellen bezeichnet) gebunden sind, bleiben während des katalytischen Zyklus dort assoziiert und sind nicht direkt an der ATP-Synthese beteiligt. Ihre Funktion ist weitgehend unklar, man hat gefunden, daß Mutationen, die die Nukleotidbindung an den nichtkatalytischen Bindungsstellen der F_1 aus *E. coli* (EF_1) verhindern, keinen Einfluß auf die ATPase-katalysierte ATP-Hydrolyse oder das Zellwachstum haben (Weber *et al.* 1995).

Während die katalytischen Bindungsstellen neben ATP auch GTP und ITP binden können, wurde lange Zeit angenommen, daß die nichtkatalytischen Bindungsstellen spezifisch für ATP sind (Perlin *et al.* 1984, Weber *et al.* 1994b). Mittlerweile konnte jedoch nachgewiesen werden, daß auch die nichtkatalytischen Bindungsstellen in der Lage sind, in geringen Maßen GTP und ITP zu binden, nicht aber GDP (Weber *et al.* 1994a).

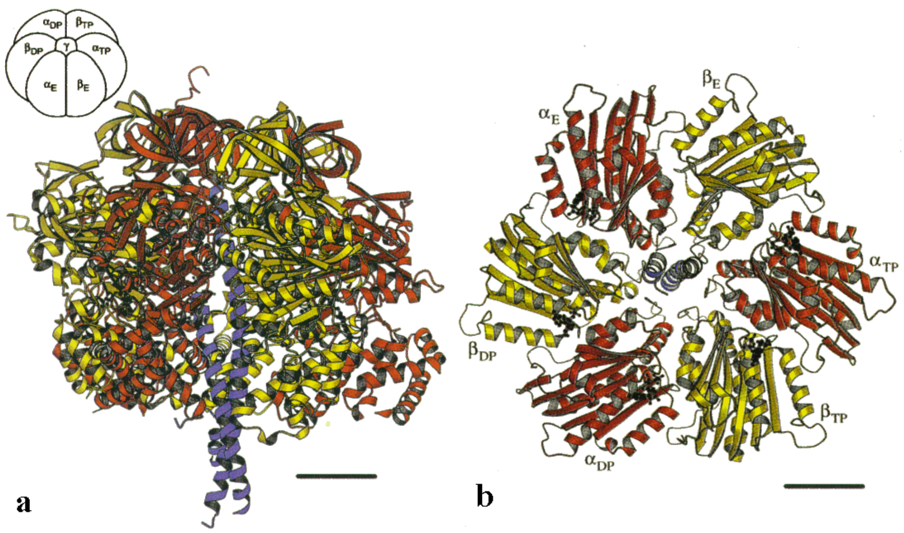


Abbildung 3: Kristallstrukturmodell der F_1-ATPase (Abrahams *et al.* 1994). a: Seitenansicht; b: Schnitt durch das Modell in der Ebene der Nukleotidbindungsstelle, Ansicht von unten. Die α-Untereinheiten sind blau, die β-Untereinheiten gelb und die γ-Untereinheit ist blau dargestellt. Der Balken entspricht einer Maßeinheit von 20 Å.

Die Arbeitsgruppen von Walker und Leslie haben 1994 eine Kristallstruktur mit 2,8 Å Auflösung von der mitochondrialen F_1 (MF_1) veröffentlicht (Abbildung 3, Abrahams *et al.* 1994). Anhand dieser Struktur konnte bestätigt werden, daß die drei α- und β-Untereinheiten alternierend in einem Ring von etwa 100 Å angeordnet sind, vergleichbar mit den Segmenten einer Orange. Die γ-Untereinheit bildet eine Coiled-Coil Struktur, die in etwa entlang der

Achse des $\alpha_3\beta_3$-Ringes liegt und aus diesem um ca. 30 Å herausragt. Für etwa die Hälfte der γ-Untereinheit sowie die δ- und ε-Untereinheiten konnte keine interpretierbare Elektronendichte ermittelt werden, wahrscheinlich aufgrund von Fehlordnungen im Kristall.

Um den F_1-Komplex in einer definierten Konformation zu fixieren, wurde die F_1 in Gegenwart von AMPPNP und ADP kristallisiert. Alle α-Untereinheiten binden AMPPNP, während eine β-Untereinheit (β_{TP}) AMPPNP, eine ADP (β_{DP}) und die dritte (β_E) kein Nukleotid bindet. Die Nukleotidbindungsstellen sind an den Interfaces der α- und β-Untereinheiten lokalisiert. Während die katalytischen Bindungsstellen sich zum größten Teil innerhalb der β-Untereinheiten liegen, befinden sich die nichtkatalytischen größtenteils auf α.

Die drei α-Untereinheiten haben sehr ähnliche Konformationen, ebenso die beiden Untereinheiten β_{TP} und β_{DP} (Abbildung 4a und b). β_E hingegen zeigt eine deutlich unterschiedliche Struktur (Abbildung 4c), die am ehesten als Rotation des unteren Teils der Nukleotidbindungsdomäne in der Größenordnung von etwa 30° beschrieben werden kann. Der C-Terminus ist im Vergleich zu den beiden anderen Strukturen von der Molekülachse weg bewegt worden. In Abbildung 4d wurde β_{TP} über β_E gelegt, um die Konformationsänderung zu verdeutlichen.

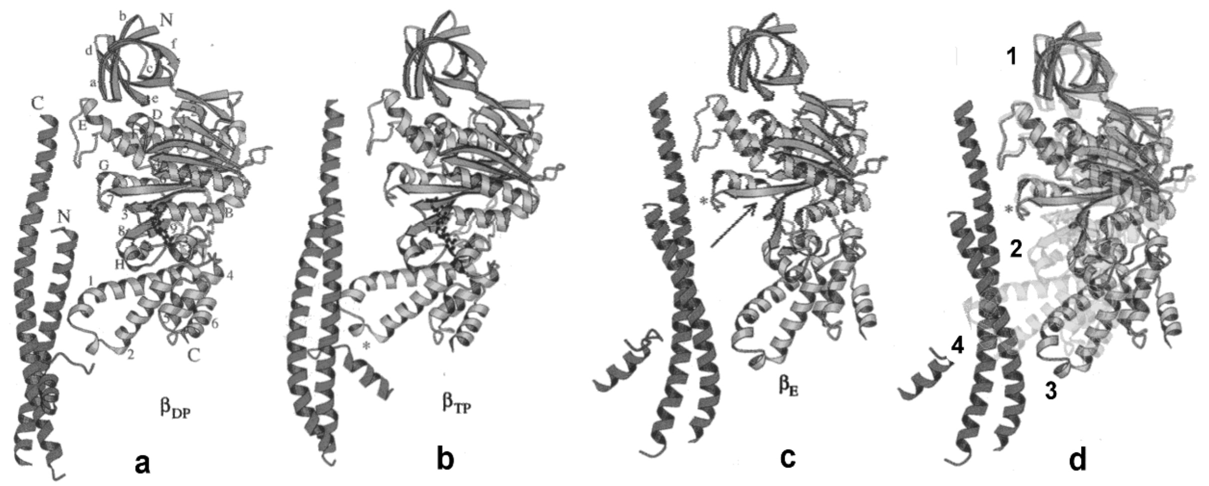


Abbildung 4: Die β-Untereinheiten und die γ-Untereinheit aus dem Strukturmodell von Abrahams *et al.* (1994) im Vergleich. In Bild d ist β_{TP} über β_E gelegt (s. Text).

Es liegt nahe, daß die Asymmetrie mit der exzentrischen Anordnung der γ-Untereinheit zur Molekülachse zusammenhängt. In Abbildung 4d wird erkennbar, daß die γ-Untereinheit β_E keinen Platz läßt, die gleiche Konformation wie die anderen β-Untereinheiten einzunehmen. Besonders deutlich ist das bei der Schleife an Position (3), die bei β_{TP} die Position (4) einnimmt und die γ-Untereinheit berühren würde. Betrachtet man die Nukleotidbindungsstelle (2), dann sieht man, daß sie bei β_E stark geöffnet wurde gegenüber β_{TP}. Der N-Terminale Bereich (1) dagegen zeigt fast keine Konformationsänderungen.

Von den isolierten Untereinheiten ε und dem N-Terminus von δ konnten mittlerweile ebenfalls Strukturen bestimmt werden (Wilkens *et al.* 1995, Wilkens *et al.* 1997). Während ε wahrscheinlich zwischen F_1 und F_o lokalisiert ist und einen Teil des „Stiels" bildet, nimmt man an, daß sich δ außerhalb des $\alpha_3\beta_3$ Rings befindet und zusammen mit der b-Untereinheit einen zweiten Stiel bildet, auf den später noch näher eingegangen werden soll.

Wie schon erwähnt schlug P. Boyer (Boyer *et al.* 1973) bereits 1973 einen Katalyse-Mechanismus für die F_1-ATPase vor, der auch heute noch in seinen Grundsätzen weitgehend anerkannt ist. Die Merkmale des sogenannten „Binding Change"-Mechanismus sind: 1. Die Energie des Protonengradienten dient nicht zur Bildung von ATP, sondern zu dessen Freisetzung aus der Bindungsstelle, in der ATP spontan und ohne Energiezufuhr gebildet wird. 2. Bindung von ADP und P_i, Bildung des ATP und dessen Freisetzung finden gleichzeitig an drei miteinander in Wechselwirkung stehenden katalytischen Bindungsstellen statt. Diese sind um 120° versetzt und wechseln periodisch zwischen drei verschiedenen Konformationen, in Abbildung 5 mit den Buchstaben O („open"), L („loose") und T („tight") symbolisiert. In einer Erweiterung dieses Modells wurde postuliert, daß die Konformationsänderungen der Bindungsstellen durch die Rotation einer asymmetrischen Gruppe von Untereinheiten, relativ zum Rest des Enzyms verursacht werden (Cross 1981).

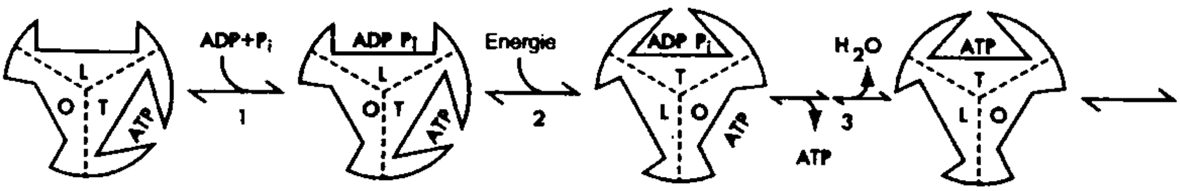


Abbildung 5: Der *Binding Change Mechanismus* (Boyer 1993)

Weber und Senior haben einen Tryptophan-Restes an verschiedene Positionen in die Nukleotidbindungsstellen eingeführt. Da durch gebundenes Nukleotid die Fluoreszenz des Tryptophans meßbar reduziert wird, konnte mit dieser Methode die Besetzung der katalytischen (Weber *et al.* 1993) und der nichtkatalytischen Bindungsstellen (Weber *et al.* 1994a) direkt nachgewiesen werden. Dabei konnte zwischen ATP und ADP unterschieden werden (Weber *et al.* 1996). Aufgrund dieser Erkenntnisse hat Senior einen leicht modifizierten Katalysemechanismus vorgeschlagen (Abbildung 6). Im Gegensatz zu Boyer, in dessen Modell Bindung und Freisetzung synchron stattfinden und somit im zeitlichen Mittel maximal zwei besetzte Bindungsstellen im Protein vorlegen, postuliert Senior maximale Hydrolysegeschwindigkeit nur bei jeweils drei besetzten Bindungsstellen.

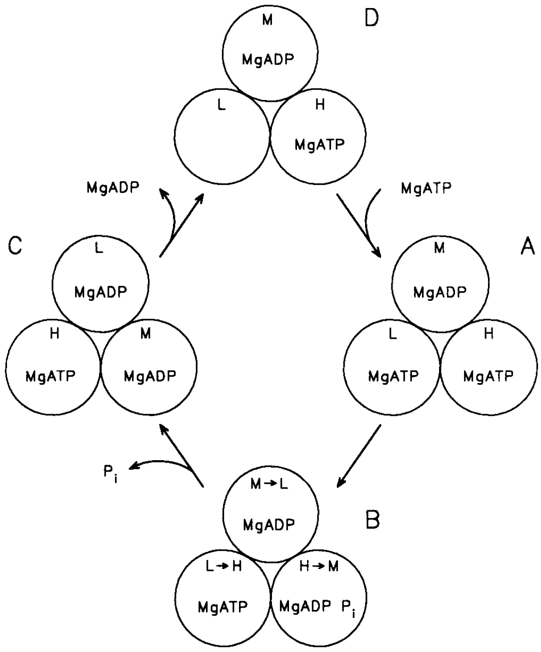


Abbildung 6: Katalytischer Zyklus der ATP-Hydrolyse nach Weber *et al.* 1996. Die Affinitäten der Bindungsstellen zu Nukleotiden wird mit den Buchstaben H, M und L (High, Intermediate, Low) bezeichnet. H, M und L entsprechen T, L und O im Boyer-Modell.

Während diese Kontroverse noch nicht geklärt ist, konnte jedoch mittlerweile durch drei verschiedene Experimente nachgewiesen werden, daß tatsächlich während der Katalyse eine Rotation verschiedener Untereinheiten gegeneinander stattfindet (Abbildung 7).

In der Arbeitsgruppe von R. Cross wurde zwischen zwei Cysteinen auf den γ- und β-Untereinheiten eine kovalente Verknüpfung (Crosslink) erzeugt, wodurch die ATP-Hydrolyse der F_1 blockiert wurde. Daraufhin wurde die F_1 dissoziiert und mit radioaktiv markierten β-Untereinheiten reassembliert. Die Disulfidbrücken wurden reduziert, nach ATP-Hydrolyse und anschließender Oxidation erhielt man radioaktive γ-β-Crosslinkprodukte, die nur entstehen konnten, wenn sich die γ-Untereinheit relativ zu ihrer vorherigen Position bewegt hatte (Duncan *et al.* 1995, Abbildung 7a). Indem Disulfidbrücken zwischen ε und β erzeugt wurden, konnte mit dem gleichen Versuchsprinzip auch die Rotation von ε relativ zu $\alpha_3\beta_3$ nachgewiesen werden (Bulygin *et al.* 1998).

In der Arbeitsgruppe von W. Junge wurde die γ-Untereinheit mit Eosin markiert, und der $\alpha_3\beta_3$-Hexamer fixiert. Mit Polarized Absorption Recovery after Photobleaching (PARAP) konnte bei ATP-Hydrolyse eine Rotationsbewegung von mindestens 280° nachgewiesen werden (Sabbert *et al.* 1996, Abbildung 7b). Mit einer ähnlichen Technik, der Polarized Cofocal Fluorimetry (POCOF), wurden drei verschiedene periodisch wechselnde Fluoreszenzzustände eines kovalent mit γ verknüpften Eosin-Moleküls gezeigt, was auf eine Rotation in drei diskreten Schritten schließen läßt (Hasler *et al.* 1998). Darüber hinaus konnte mit Eosin-markierten ε-Untereinheiten nachgewiesen werden, daß sich auch ε relativ zu $\alpha_3\beta_3$ bewegt.

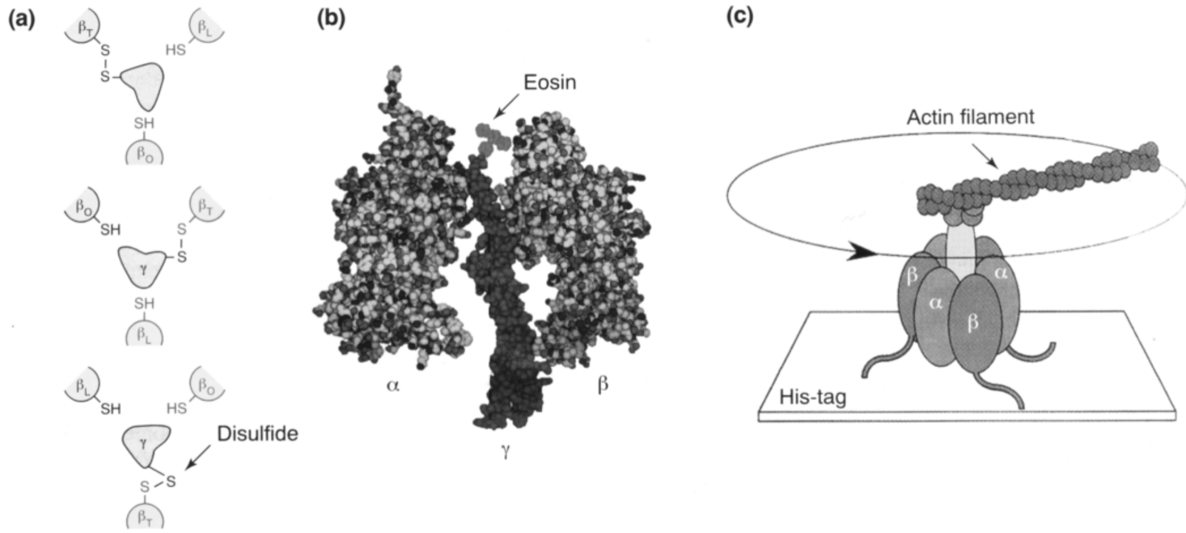


Abbildung 7: Experimente zum Nachweis der Rotation der γ-Untereinheit relativ zum $\alpha_3\beta_3$-Hexamer (Junge *et al.* 1997)

In der Arbeitsgruppe von M. Yoshida konnte die Rotation direkt beobachtet werden. Fluoreszenzmarkierte Actinfilamente wurden mit der γ-Untereinheit verknüpft und der $\alpha_3\beta_3$-Hexamer mit Hilfe von His-Tags an einer nickelbeschichteten Glasplatte fixiert. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte unter ATP-Hydrolysebedingungen eine Rotation des markierten Actinfilaments direkt beobachtet werden (Noji *et al.* 1997, Abbildung 7c). Das gleiche Experiment wurde auch mit Actinfilamenten, die mit der ε-Untereinheit verknüpft wurden, durchgeführt So konnte die Rotation von ε gegenüber $\alpha_3\beta_3$ ebenfalls direkt nachgewiesen werden (Kato-Yamada *et al.* 1998). Durch Herabsetzen der ATP-Konzentration konnte die Rotation so weit verlangsamt werden, daß drei diskrete Schritte um jeweils 120° direkt beobachtet werden konnten (Yasuda *et al.* 1998).

1.1.2 Zusammensetzung des F_o-Teils und Funktionsweise der Rotation

Die F_o-Einheit hat in *E. coli* die Zusammensetzung $ab_2c_{9\text{-}12}$. Untereinheit b ist mit dem kurzen hydrophoben N-Terminus in der Membran verankert und ragt mit dem hydrophilen C-Terminus ins Cytosol. Untereinheit a ist ein Membranprotein mit mindestens fünf Transmembranhelices und vermittelt im Zusammenspiel mit den c-Untereinheiten die Protonentranslokation.

Die c-Untereinheiten haben eine Haarnadel-Struktur bestehend aus zwei α-Helices, die durch einen kurzen polaren loop auf der Seite des Cytoplasmas verbunden sind (Girvin *et al.* 1998). Sie sind in mehreren Kopien (9-12) vorhanden, was viele Autoren veranlaßt hat, eine ringförmige Anordnung zu postulieren. Crosslink-Studien mit Doppel-Cys-Mutanten untermauern diese These (Jones und Fillingame 1998, Jones *et al.* 1998). Die Ergebnisse dieser Versuche legen darüber hinaus eine Stöchiometrie ab_2c_{12} nahe. Die c-Untereinheit trägt eine essentielle Aminosäure, Asp61 in *E. coli*, die etwa in der Mitte der Membran sitzt. Diese Aminosäure ist essentiell für die ATP-Synthese.

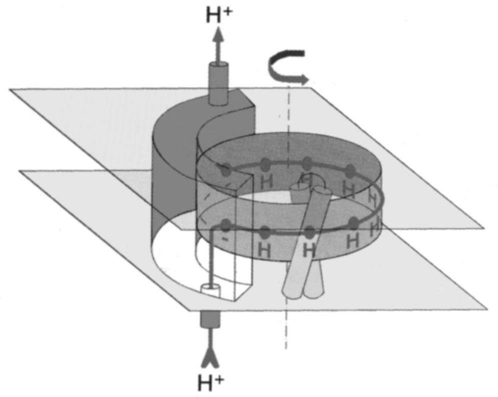


Abbildung 8: Modell des Antriebs der Rotation (Junge *et al.* 1997)

Abbildung 8 zeigt ein Modell, wie die Rotation angetrieben werden könnte, basierend auf drei Annahmen: 1. Aus elektrostatischen Gründen müssen die Carboxylgruppen der c-Untereinheiten, die sich in der Membran befinden, protoniert vorliegen, während die c-Untereinheiten die zu einer Proteinoberfläche (d.h. der a-Untereinheit) zeigen auch deprotoniert (d.h. geladen) sein können. 2. Es existiert eine bevorzugte Drehrichtung, die durch die Anordnung der Protonenkanäle gegeben ist. 3. Der Ring wird durch Brownsche Bewegung angetrieben. Da die Bewegung durch 1. und 2. eingeschränkt ist, folgt, daß sie in eine bestimmte Richtung gelenkt wird. Konkret heißt das, wenn eine negativ geladene c-Untereinheit den Rand von a erreicht, wird sie zurückgeworfen. Die Fluktuationen sind also nur auf ein kleines Segment beschränkt. Sobald die Untereinheit protoniert ist, kann sie in die Membran eindringen, und der Ring dreht ein Segment weiter. Die Richtung der Drehung wird durch die Richtung des pH-Gradienten, d.h. die Richtung des Protonenflusses bestimmt.

Die c-Untereinheiten koppeln über den polaren Loop im Cytosol an die F_1. Durch ausführliche Versuche mit Crosslinks zwischen Cysteinen auf verschiedenen Untereinheiten konnte ein Modell erstellt werden mit dem Stator $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$, gegen den sich der Rotor $\gamma\varepsilon c_{9\text{-}12}$ dreht (Ogilvie *et al.* 1997, Abbildung 9).

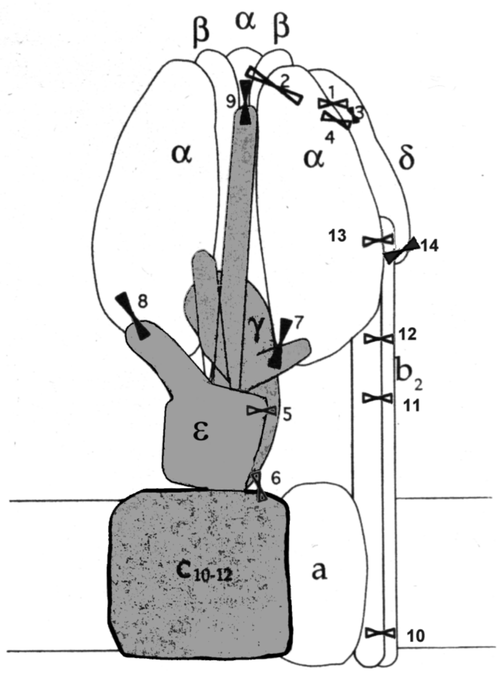


Abbildung 9: Modell der ATP-Synthase mit Crosslinks die die ATPase Aktivität blockieren (geschlossene Symbole), bzw. nicht blockieren (offene Symbole). Der Rotor ist grau, der Stator weiß (Ogilvie *et al.* 1997).

1.1.3 Der zweite Stiel (second stalk)

Bereits 1974 wurde erkannt, daß δ für die Bindung der F_1 an die F_o notwendig ist (Futai *et al.* 1974). Smith und Sternweis (1977) schlossen aus Gelfiltrationsexperimenten, daß die isolierte δ-Untereinheit eine langgestreckte Struktur besitzt. Da δC64 und δC140 Crosslinks miteinander bilden können (Ziegler *et al.* 1994), vermutete man eine Haarnadelstruktur (Hazard und Senior 1994). Neuere Untersuchungen, bei denen mittels NMR die Struktur des N-Terminus der isolierten δ-Untereinheit aufgeklärt werden konnte, zeigen jedoch eine kompakte Struktur aus sieben α-Helices für die Aminosäuren 1-134 des N-Terminus (Wilkens *et al.* 1997).

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die F_1 zwei „Stiele" besitzt: einen Stiel, der zentral in der F_1 sitzt, wahrscheinlich γε, und einen Stiel an der Seite, wahrscheinlich b und δ (Wilkens und Capaldi 1998a und b, Abbildung 10). Struktur und genaue Position dieser beiden Untereinheiten in der *E. coli* F_oF_1 sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

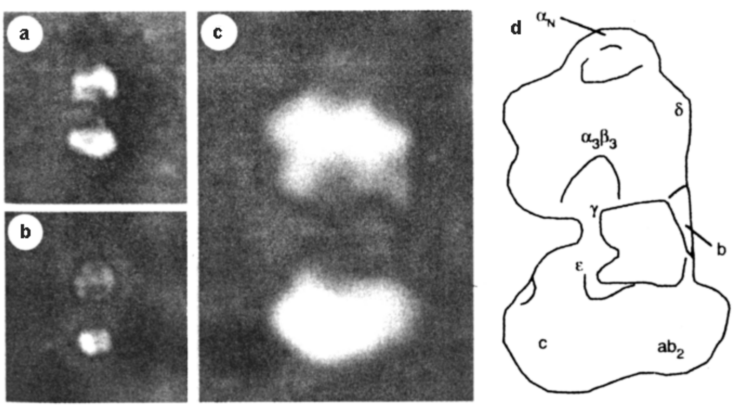


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der F_oF_1-ATP-Synthase. Das Schema d entspricht der Aufnahme c, a ist spiegelbildlich zu c, b um 60° gedreht (Wilkens und Capaldi 1998a)

Mit Fluoreszenz-Labeln konnte gezeigt werden, daß δ zumindest in der F_1 aus Chloroplasten (CF_1) auf der Außenseite der F_1 liegt und zwar auf dem αβ-Interface „oben", d. h. auf der membranabgewandten Seite (Engelbrecht *et al.* 1998). Um die Bindung der b-Untereinheit an die F_1 aufzuklären, wurden an verschiedenen Stellen der b-Untereinheit von *E. coli* F_o Cysteine eingeführt und versucht, diese mit Cysteinen der F_1 reagieren zu lassen. bS146C reagiert mit δC140 (Rodgers *et al.* 1997, Abbildung 9, Markierung 14), bL156C bildet ein Crosslink mit αC90 (Rodgers und Capaldi 1998, Abbildung 9, Markierung 13). δC140 wiederum kann mit bilen mit αC90 und αQ2C reagieren (Ogilvie *et al.* 1997, Abbildung 9, Markierungen 1 und 4). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, daß b über δ an die F_1 bindet und sich diese Bindungsregion, wie auch die δ-Untereinheit „oben", also membranabgewandt, an der F_1 befindet, so wie in Abbildung 2 dargestellt.

S. D. Dunn (1992) konnte durch Entfernen von 24 Aminosäuren am N-Terminus eine lösliche Form der b-Untereinheit (b_{sol}) erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß die Struktur von b_{sol} weitgehend der des hydrophilen Teils der b-Untereinheit entspricht, und b_{sol} somit als Modell für Untersuchungen der b-F_1-Wechselwirkungen dienen kann.

Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen EF_1, δ, und b_{sol} mittels NMR und nativer Gelelektrophorese zeigen, daß isolierte δ-Untereinheiten nur schwach an b binden, während die Wechselwirkung zwischen b und EF_1 stark ist. An der Bindung ist die C-terminale Region von δ beteiligt (δ1-134 bindet nicht an EF_1 und b). Die Untereinheit b liegt als Dimer vor und ist nur in dieser Form in der Lage an F_1 zu binden. Dimeres b ist zu 80% α-helical und stabil, momomeres b ist nur noch zu 58% α-helical und instabil (u.a. Dunn 1992, Dunn und Chandler 1998, Rodgers *et al.* 1997, Sorgen *et al.* 1998a)

Ausführliche Crosslink-Studien (McLachlin und Dunn 1997, Howitt *et al.* 1996, Rodgers und Capaldi 1998) mit gentechnisch eingeführten Cysteinen an den unterschiedlichsten Positionen zeigen, daß an vielen verschiedenen Positionen über die gesamte Länge des Dimers die beiden Monomere in engem Kontakt stehen. Die genaue Struktur von b ist weitgehend ungeklärt, jedoch lassen eine Vielzahl von unterschiedlichen Experimenten Spekulationen über die dreidimensionale Form der Untereinheit zu (Tabelle 1).

Reste	Vorgeschlagene Struktur / *Funktion*	Hinweise	Quelle
1 – 33	*Transmembranregion*	Hydrophobe Aminosäuren	Sequenz
4 – 11	α-Helices, 35° zueinander gekippt	Crosslinks an Pos. 2, 6, 10	Fillingame *et al.* 1998
33 – 79	Coiled Coil	Heptad Repeat Pattern	Cohen und Parry 1990
60 – 65	Side by Side α-Helices	Crosslinks zw. 60 und 65 bzw. 61 und 65	McLachlin und Dunn 1997
81 - 84	Loop	Anfälligkeit für Proteasen	Rodgers *et al.* 1997
124 - 132	*Dimerisierungsregion*, Side by Side α-Helices	Hydrophobe AS, Ersetzen der AS V124, A128, G131 durch polare AS verhindert Dimerisierung der b-UE	Howitt *et al.* 1996
124 – 139	Side by Side α-Helices	Crosslinks an Pos 124, 128, 132, 135 und 139	McLachlin und Dunn 1997
155-156	*δ-Bindungsregion*	L156C Crosslink mit δ, 155-156 essentiell für Bindung an δ	McLachlin *et al.* 1998, Takeyama *et al.* 1988

Tabelle 1: Vermutete Struktur und Funktion unterschiedlicher Bereiche von b

Nach neuesten Erkenntnissen sind Deletionen von weniger als 11 Aminosäuren im Bereich 50-65 ohne Auswirkung auf die Aktivität der F_oF_1-ATP-Synthase (Sorgen *et al.* 1998b). Während Crosslinks von b mit α, b mit b und δ mit α die ATPase-Aktivität nicht beeinträchtigen, entkoppelt ein Crosslink zwischen δC140 und bL156C die ATP-Synthese vom Protonentransport (Rodgers und Capaldi 1998). Das deutet darauf hin, daß der $b_2\delta$-Komplex im funktionellen Enzym flexibel sein muß. Möglicherweise wird auf diese Weise die 12-Schritt Rotation des c_{12}-Rings in die 3-Schritt Rotation der F_1 konvertiert (Junge *et al.* 1997).

1.2 ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie) ist eine spektroskopische Technik, bei der die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch eine paramagnetische Substanz in einem Magnetfeld gemessen wird (Übersicht siehe: Nordio 1976, Marsh 1981).

Obwohl es durchaus biologische Moleküle gibt, die paramagnetische Eigenschaften besitzen, ist das künstliche Einführen eines stabilen freien Radikals („Spin-Label") oftmals der Weg zur Untersuchung von Enzymen mittels ESR-Spektroskopie. Man greift hierbei üblicherweise auf das Nitroxidradikal zurück. Dieses erzeugt ein Spektrum aus drei Linien, welches abhängig von der Orientierung des Magnetfeldes zu den Molekülachsen ist. Durch diese Anisotropie ist die Spin-Label-Technik ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung von Biomolekülen geworden. Wie im folgenden gezeigt wird, kann man aus dem ESR-Spektrum Rückschlüsse auf die Beweglichkeit des Spin-Labels, die Polarität der Umgebung und den Abstand zweier Label ziehen.

1.2.1 Das magnetische Moment

Ein Atom oder Molekül hat paramagnetische Eigenschaften, wenn der Gesamtdrehimpuls **J** seiner Elektronen von 0 verschieden ist. **J** setzt sich zusammen aus dem Eigendrehimpuls **S** und dem Bahndrehimpuls **L**:

$$\mathbf{J} = \mathbf{S} + \mathbf{L} \tag{1}$$

Der Betrag des magnetischen Moments $|\mu_J| = \mu_J$ ist gegeben durch

$$\mu_J = g\mu_B|\mathbf{J}| \tag{2}$$

mit $\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e}$ (Bohr'sches Magneton) und dem Landé-Faktor g. Für organische Radikale gilt $\mathbf{L} = 0$ und somit $\mathbf{J} = \mathbf{S}$ und damit

$$\mu_J = \mu_S = g\mu_B|\mathbf{S}| \tag{3}$$

1.2.2 Zeeman Aufspaltung

In einem Magnetfeld kann die z-Komponente des Spins eines Elektrons nur bestimmte Werte annehmen:

$$S_z = \hbar|m_S| \tag{4}$$

mit $m_s = \pm½$

Die Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons im Magnetfeld B_0 ergeben sich aus $\mu=-g_e\mu_B m_s$ und $E=-\mu B_0$ zu

$$E_{m_s} = g_e\,\mu_B\,m_s\,B_0\,;\ m_s = \pm ½ \tag{5}$$

mit g_e=2,002319 (Landé-Faktor). Es ergeben sich also zwei Energieniveaus E_+ (m_s=+½) und E_- (m_s=-½), der Abstand zwischen ihnen beträgt:

$$\Delta E = E_+ - E_- = g_e \mu_B B_0 \tag{6}$$

Daraus ergibt sich die Resonanzbedingung

$$h\nu = g_e \mu_B B_0 \tag{7}$$

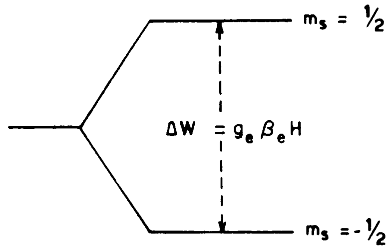


Abbildung 11: Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus mit m_s = ±½ im homogenen Magnetfeld B_0 (Nordio 1976)

1.2.3 Meßverfahren

In der Regel strahlt man elektromagnetische Wellen einer festen Frequenz (9-10 GHz; λ = 3 cm; X-Band des Mikrowellenbereiches) ein und variiert die magnetische Feldstärke in einem Bereich um 0,3 T. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, moduliert man das Magnetfeld mit einer Frequenz von in der Regel 100 kHz und einer Amplitude im Bereich von 10^{-4} T (maximal die Halbwertsbreite des Absorptionssignals). Die Aufzeichnung erfolgt daher als die 1. Ableitung der Absorption nach der Feldstärke B_0 (Abbildung 12).

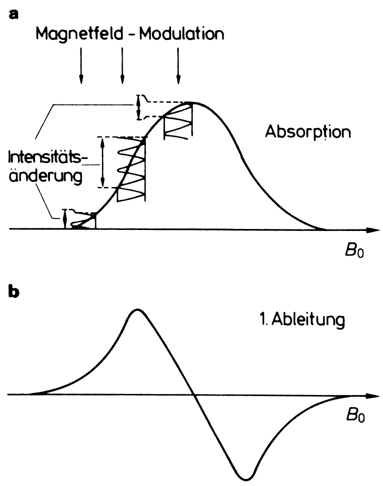


Abbildung 12: **a:** Magnetfeld-Modulation des ESR-Signals - **b:** erste Ableitung des Absorptionssignals (Galla 1988)

1.2.4 Relaxationsmechanismen

Bei Resonanz tritt sowohl Absorption als auch stimulierte Emission auf, die Intensität der beiden Prozesse ist proportional zu der jeweiligen Population der beiden Energieniveaus. Das Populationsverhältnis ist gegeben durch die Boltzmann-Verteilung

$$\frac{n_+}{n_-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \tag{8}$$

mit der Boltzmann-Konstante k und der Temperatur T. Bei Raumtemperatur ist ΔE nur wenig größer als kT, der untere Level ist also geringfügig höher besetzt, und die Absorption somit (meßbar) höher als die Emission. Durch die Absorption wird das Besetzungsverhältnis angeglichen. Dem wirken Relaxationsprozesse entgegen:

Durch Abgabe von Energie in thermischer Form an die Umgebung (das „Gitter") können Elektronen ohne Emission vom höheren in den niedrigeren Energielevel übergehen. Diese Art der Relaxation wird als *Spin-Gitter-* oder *longitudinale Relaxation T_1* bezeichnet:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_{eq}}{T_1} \tag{9}$$

T_1 ist dabei die Zeit, die das System benötigt, um auf 1/e der ursprünglichen Verteilung zurückzukehren. Dieser Prozeß verkürzt die Lebensdauer Δt der Zustände und vergrößert somit die Energieunschärfe, da nach Heisenberg gilt $\Delta W \geq h/\Delta t$. Das heißt, daß die Linienbreite in Frequenzeinheiten mindestens $1/T_1$ betragen muß.

In konzentrierten Lösungen wird die Linienbreite üblicherweise durch einen anderen Relaxationsmechanismus bestimmt, der *Spin-Spin-* oder *transversalen Relaxation T_2*. Bei diesem Prozeß tauschen benachbarte Moleküle ihren Spinzustand aus. Dabei wird das Besetzungsverhältnis der Energieniveaus nicht verändert, wohl aber die Lebensdauer eines Spinzustands.

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \tag{10}$$

Die Gleichungen (9) und (10) werden *phänomenologische Bloch-Gleichungen* genannt.

1.2.5 Hyperfeinstruktur

Die Hyperfeinstruktur wird durch eine Aufspaltung der Energieniveaus E_+ und E_- durch Wechselwirkung mit dem Magnetfeld, das von Atomkernen mit Spin ausgeht, verursacht. Bei dem Nitroxidradikal, dessen Betrachtung hier genügen soll, sind dies die Kerne ^{16}O und ^{14}N. Da ^{16}O einen Kernspin von I = 0 besitzt, muß hier nur der Kernspin I = 1 des ^{14}N-Isotops berücksichtigt werden. Das von diesem Isotop erzeugte Feld muß zu dem angelegten Feld addiert werden:

$$B_{\mathrm{lok}}=B_0+am_l \;\; ; \;\; m_l=+1,\ 0,\ -1 \tag{11}$$

wobei a als (Hyperfeinstruktur-) Kopplungskonstante bezeichnet wird. Da m_l hier drei Werte annehmen kann, erhält man ein Spektrum mit drei Linien (Abbildung 13).

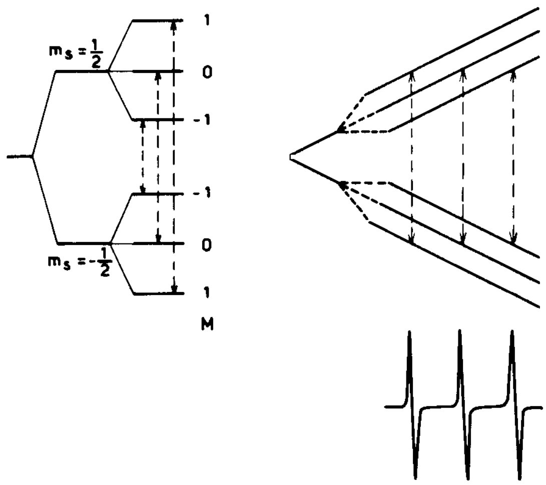


Abbildung 13: Hyperfein-Aufspaltung durch Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons (S=½) mit den magnetischen Momenten eines Kernspins (I=1). Das ESR-Signal besteht aus drei Linien (Nordio 1976)

1.2.6 Anisotropie

Der Hamilton-Operator für die magnetische Energie eines ungepaarten Elektrons mit dem Spin **S** ist gegeben durch

$$\hat{H} = \mu_B \mathbf{B} \cdot \underline{\underline{\mathbf{g}}} \cdot \mathbf{S} + \sum_k \mathbf{I}_k \cdot \underline{\underline{\mathbf{A}}}_k \cdot \mathbf{S} \tag{12}$$

mit $\underline{\underline{\mathbf{g}}}$ dem g-Tensor, k der Anzahl der Kerne, $\mathbf{I}_k$ dem Spin des Kerns k und $\underline{\underline{\mathbf{A}}}_k$ dem Hyperfeintensor des Kerns k. Für das Nitroxidradikal ist k = 1, **I** der Kernspin des ^{14}N und $\underline{\underline{\mathbf{A}}}$ der zugehörige Hyperfeintensor. Ferner können $\underline{\underline{\mathbf{g}}}$ und $\underline{\underline{\mathbf{A}}}$ in guter Näherung als diagonal angenommen werden. Somit gilt:

$$\hat{H} = \mu_B (g_{xx} B_x S_x + g_{yy} B_y S_y + g_{zz} B_z S_z) + A_{xx} I_x S_x + A_{yy} I_y S_y + A_{zz} I_z S_z \tag{13}$$

Im einfachsten Fall ist das Magnetfeld parallel zu einer Molekülachse orientiert. Für die z-Achse ergibt sich beispielsweise als Resonanzbedingung

$$h\nu = g_{zz} B_{m_l} + A_{zz} m_l \tag{14}$$

mit m_l = -1, 0, 1 der Quantenzahl des Kernspins des ^{14}N. Es gilt $A_{xx} \cong A_{yy} \ll A_{zz}$ während die g-Werte ungefähr gleich bleiben ($g_{xx} > g_{yy} > g_{zz}$), wie in Abbildung 14(a-c) dargestellt.

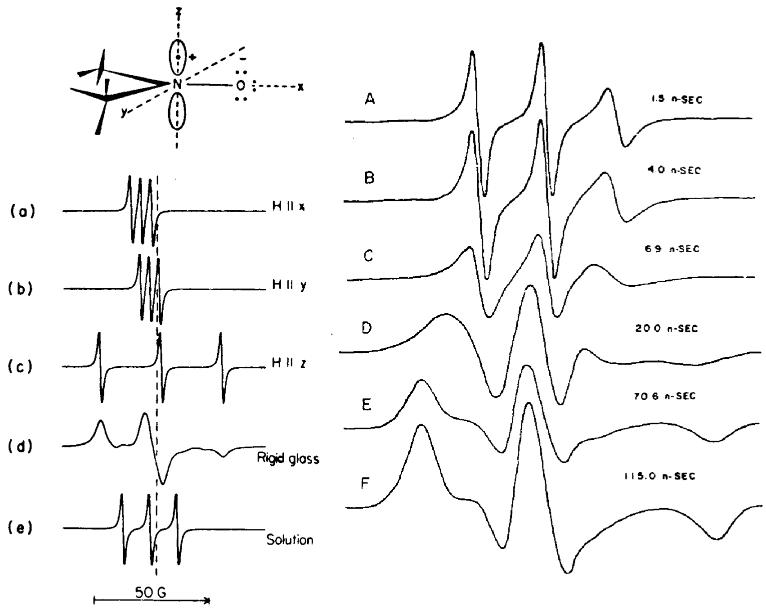


Abbildung 14: links: Simulierte ESR-Spektren (a)-(c): Magnetfeld parallel zu den Molekülachsen (d) Pulverspektrum (e) isotropes Spektrum (Marsh 1981) – rechts: Spektren von TEMPOL in Lösungen unterschiedlicher Viskosität (Hsia und Piette 1969)

Mit Proben, in denen die Moleküle eine zufällige Orientierung einnehmen, erhält man eine Superposition der Spektren aller Orientierungen, das sogenannte *Pulverspektrum* mit der maximalen Aufspaltung $2A_{zz}$ (Abbildung 14d).

Das andere Extrem ist das *isotrope Spektrum* (Abbildung 14e), das man mit Proben erhält, die sehr schnell in einer nicht viskosen Lösung rotieren. Bei dieser schnellen Bewegung (Rotationskorrelationszeit etwa 10^{-11}s) werden g- und A-Anisotropie gemittelt und man erhält

$$a_0 = \tfrac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \tag{15}$$

$$g_0 = \tfrac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \tag{16}$$

Das Spektrum besteht in diesem Fall aus drei scharfen Linien gleicher Höhe. Bei langsamer werdender Rotation erhält man zunächst unterschiedliche Verbreiterung der Linien, deren Positionen jedoch zunächst konstant bleiben, dann ändern sich auch die Positionen der Linien und deren Form, bis sich als Grenzspektrum das Pulverspektrum ergibt (Abbildung 14, rechte Seite von oben nach unten).

1.2.7 Rotationskorrelationszeit

Mit Rotationskorrelationszeit τ_R wird die Zeit bezeichnet, in der der Anteil 1/e der Moleküle, die um einen bestimmten Winkel aus ihrer Ausgangslage gedreht wurden wieder ihre Ausgangslage erreichen. Das heißt, je kleiner τ_R ist, um so schneller ist die Bewegung der Moleküle. Während das isotrope ESR-Signal, wie oben diskutiert, aus drei schmalen Linien gleicher Höhe besteht, nimmt mit steigendem τ_R zunächst die Höhe des Hochfeldsignals ab. Die unterschiedliche Verbreiterung der drei Linien (Abbildung 14 rechts A-C) bei relativ schneller Bewegung läßt sich erklären mit

$$\frac{1}{T_2(m)} = A + Bm + Cm^2 \tag{17}$$

mit $1/T_2(m)$ der Linienbreite der zur Quantenzahl m zugehörigen Linie. Dabei gehört m = -1, 0, 1 zur Hochfeld-, Mittelfeld- und Tieffeldlinie. Gleichung (17) läßt sich umformen zu

$$\frac{1}{T_2(m)}\left(\frac{T_2(0)}{T_2(\pm 1)} - 1\right) = C \pm B \tag{18}$$

mit (Stone *et al.* 1965):

$$B = \tfrac{8}{45}\frac{\mu_B}{\hbar}\left[A_{zz} - \tfrac{1}{2}\left(A_{xx} + A_{yy}\right)\right]\cdot\left[g_{zz} - \tfrac{1}{2}\left(g_{xx} + g_{yy}\right)\right]B_0 \cdot \tau_R \tag{19}$$

$$C = \tfrac{4}{72}\left[A_{zz} - \tfrac{1}{2}\left(A_{xx} + A_{yy}\right)\right]^2 \tau_R \tag{20}$$

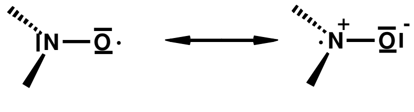
Setzt man für TEMPON in Wasser die Werte A_{xx} = 5,2 G, A_{yy} = 5,2 G, A_{zz} = 31,0 G und g_{xx} = 2,0104, g_{yy} = 2,0074, g_{zz} = 2,0026 (Griffith *et al.* 1965) ein, erhält man $C \simeq -B$. Setzt man die Werte in Gleichung (17) ein, so sieht man, daß nur die Hochfeldlinie, d.h. die Linie mit m = -1, nennenswert verbreitert wird. Löst man Gleichung (20) nach τ_R auf, so kann man die Rotationskorrelationszeit direkt aus dem Spektrum berechnen (Xü *et al.* 1983):

$$\tau_R = 0{,}6 \cdot 10^{-9} \cdot \Delta B_0\left(\sqrt{\tfrac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\tfrac{h_0}{h_{-1}}} - 2\right) \tag{21}$$

mit $\Delta B_0 = 1/T_2(0)$ der Linienbreite des Mittelfeldsignals, h_{+1}, h_0 und h_{-1} der Linienhöhe des Tief-, Mittel- bzw. Hochfeldsignals. In Gleichung (21) hat man sich zunutze gemacht, daß für Lorentzkurven gilt $T_2(0)/T_2(1) = \sqrt{h_0/h_1}$. Hierbei wurden Polaritätseffekte nicht berücksichtigt.

1.2.8 Polaritätseffekte

Bei Nitroxidradikalen hängt die Hyperfeinkopplungskonstante von der Elektronendichte am Stickstoff ab. In polarer Umgebung ist die geladene (im Bild rechts) Grenzstruktur begünstigt, in unpolarer Umgebung die ungeladene.

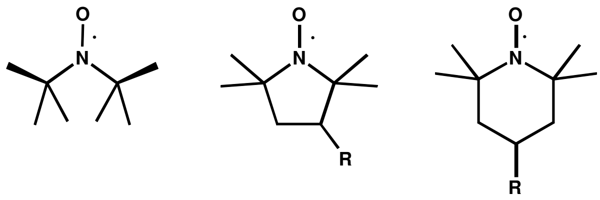


In polarer Umgebung ist dementsprechend die Spindichte am Stickstoff und damit die Hyperfeinkopplungskonstante größer als in unpolarer Umgebung. Die Unterschiede können dabei mehr als 10 % betragen. Auch der g-Faktor ist ein wenig verändert, das Spektrum ist also ein wenig verschoben.

1.2.9 Untersuchung von Biomolekülen mit Spin-Labeln

Um ESR-spektroskopische Messungen durchführen zu können, ist das Vorhandensein ungepaarter Elektronen mit ausreichender Lebensdauer notwendig. In der Natur kommen einige Verbindungen vor, die diese Voraussetzung erfüllen. So sind in vielen Enzymen paramagnetische Metallionen, wie Cu^{2+}, Fe^{3+} oder Mn^{2+}, vorhanden. Auch existieren einige Verbindungen, die relativ stabile Radikale bilden können, wie Flavine oder Chinone.

Viele Verbindungen besitzen jedoch keine ungepaarten Elektronen. Um hier ESR-spektroskopische Messungen vornehmen zu können, muß man Gruppen einführen, die diese Bedingung erfüllen, Radikale also. Solche Gruppen werden als „Spin-Label" bezeichnet. Diese müssen neben der Bedingung, über einen längeren Zeitraum stabil zu sein, auch das Kriterium erfüllen, daß sie nicht in den zu untersuchenden Reaktionsprozeß eingreifen. Als besonders günstig erwiesen sich hierbei die Nitroxidradikale, die sich von dem Di-tert-butylnitroxyl-Radikal (Abbildung 15a) ableiten. Hamilton und McConnell (1968) berichteten erstmals von der Verwendung von Nitroxiden als Reportergruppen.

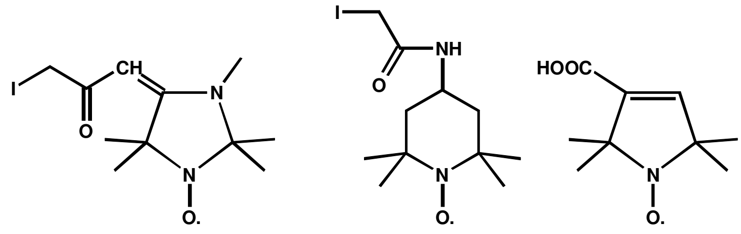


a **b** **c**

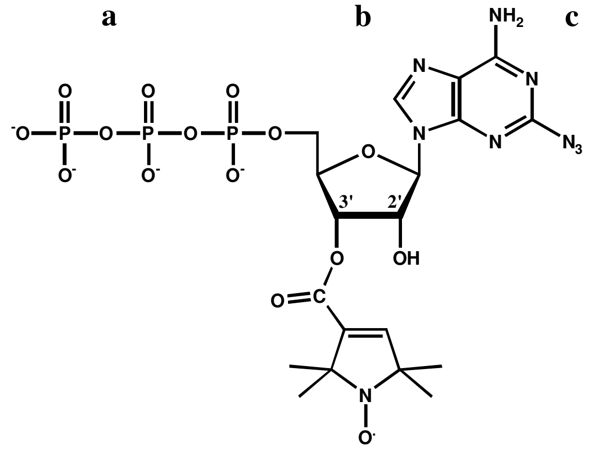
Abbildung 15: Einige Nitroxidradikale; über den Rest R, beispielsweise eine Amino- oder Carboxyl-Gruppe kann der Spin-Label an andere Moleküle gekoppelt werden.

Bei der Modifizierung des Enzyms selbst greift man in der Regel auf gruppenspezifische Reagenzien zurück (site-directed Spin-Labeling). Vor allem SH-gruppenspezifische Reagenzien (Abbildung 16a,b) wie Iodacetamid finden eine breite Anwendung, da Cystein einerseits eine eher seltene Aminosäure ist, andererseits durch gentechnische Modifikationen an beliebigen Positionen in Enzyme künstlich eingeführt werden kann. Dies macht systematische Untersuchungen von Proteinketten möglich. Die Arbeitsgruppe von W. Hubble beispielsweise hat an 18 verschiedenen Positionen eines Polypeptids von Bacteriorhodopsin Cysteine eingeführt und diese mit einem Spin-Label kovalent modifiziert. Auf diese Weise konnte eine Reihe von ESR-Spektren erhalten werden, anhand derer systematisch Aussagen über die Struktur der modifizierten Region dieses Peptids erhalten wurden (Altenbach *et al.* 1990). Auch andere Aminosäuren können gelabelt werden, so z.B. Carboxylgruppen durch Dicyclohexylcarbodiimid. Gruppenspezifische Reagenzien haben den Nachteil, daß sie auch mit Gruppen außerhalb des aktiven Zentrums reagieren können. Darüber hinaus können die Modifizierungen die Aktivität des Enzyms beeinträchtigen.

Wesentlich selektiver sind mit einem Spin-Label versehene natürliche Substrate des zu untersuchenden Enzyms. Solche Label werden in der Regel nichtkovalent an das Enzym gebunden. Dies stellt jedoch bei schwachen Bindungen ein Problem dar, da hier das Signal des enzymgebundenen Substrats von dem des nicht gebundenen überlagert wird (siehe z.B. Abbildung 20, Pfeile). Ein Beispiel für die Anwendung solcher Label ist die Untersuchung der F_1-ATPase mit spinmarkierten Nukleotiden (z.B. Vogel *et al.* 1992, Burgard *et al.* 1994, Lösel *et al.* 1996 und Lösel *et al.* 1997).



a **b** **c**



d

Abbildung 16: Einige gebräuchliche Spin-Label: a: Iodoxopropyliden-pentamethyl-imidazolidin (IOPI), b: IodacetamidTEMPO (IAAT), beide Spin-Label reagieren mit Cysteinen, c: 3-Carboxyl-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin als Reagenz, mit dem Substrate über Esterbindungen gelabelt werden können, d: 2-Azido-2',3'-SL-ATP als Beispiel für einen Photoaffinitätslabel

Eine Möglichkeit, die Vorteile von kovalenter Bindung mit denen der Affinitäts-Markierung zu verbinden, stellen die Photoaffinitäts-Spin-Label dar (z.B. Abbildung 16d). Bei solchen Molekülen wird ein Substrat-Molekül mit einem Spin-Label und einer photoreaktiven Gruppe verküpft. Solche Gruppen sind z. B. Diazirino- oder Azidoreste, bei deren Bestrahlung ein reaktives Carben bzw. Nitren entsteht. Der Vorteil solcher Gruppen ist, daß eine kovalente Verknüpfung erst durch Bestrahlung gleichsam „eingeschaltet" werden kann. Nach erfolgter Verknüpfung kann das ungebundene Substrat beispielsweise durch chromatographische Methoden abgetrennt werden (Beispiel: Vogel *et al.* 1992).

2 Problemstellung

Durch die Spin-Label-Technik ist die ESR-Spektroskopie ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung von Biomolekülen geworden. So können spinmarkierte Derivate von ATP genutzt werden, um die Struktur von Nukleotidbindungsstellen zu bestimmen. 2',3'-O-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-carbonyl)-adenosin-5'-triphosphat (2',3'-SL-ATP) und dessen Derivate wurden bereits in diesem Arbeitskreis genutzt (Vogel *et al.* 1992, Burgard *et al.* 1994, Lösel *et al.* 1996, Lösel *et al.* 1997, Motz 1995), um die F_1-ATPase aus verschiedenen Organismen zu untersuchen. Dabei wurden ESR-Spektren gemessen, die für alle gebundenen SL-ANP zwei Signale zeigten. Die Experimente lieferten Hinweise, daß SL-ANP in den katalytischen Bindungsstellen zwei Signale im Spektrum zeigt, während SL-ANP in den nichtkatalytischen Bindungsstellen zu einem einzigen Signal mit hoher Aufspaltung führt, ein Zeichen für eine starke Immobilisierung des Labels.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, warum SL-ANP in den katalytischen Bindungsstellen zwei Signale zeigt, und ob diese Signale bestimmten Typen dieser Bindungsstellen zugeordnet werden können.

Dazu sollte die F_1-ATPase nach Literaturvorschrift aus *Escherichia coli* (Wildtyp-Enzym: Stamm SWM1, Rao *et al.* 1988a) isoliert werden, und zusammen mit verschiedenen, an der Ribose unterschiedlich modifizierten, SL-ATP-Derivaten ESR-spektroskopisch untersucht werden. Um spezifisch die katalytischen Bindungsstellen untersuchen zu können, sollten die gleichen Experimente mit einer Mutante, die in den nichtkatalytischen Bindungsstellen keine Nukleotide bindet (αD261N/αR365W, Stamm CB6, Weber *et al.* 1995), durchgeführt werden und die Ergebnisse mit denen des Wildtyp-Enzyms verglichen werden.

Um einzelne Bindungsstellen gezielt zu untersuchen, sollten die isolierten Untereinheiten α und β in gleicher Weise wie die EF_1 mit den verschiedenen SL-ATP-Derivaten titriert werden. Versuche dieser Art wurden bereits von S. Burgard (1995) und A. Erbse (1996) mit isolierten Untereinheiten der F_1 aus dem thermophilen Bakterium PS3 (TF_1) durchgeführt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des sogenannten zweiten Stiels der F_oF_1-ATP-Synthase durch Site-Directed Spin-Labeling:

S. D. Dunn konnte durch Entfernen von 24 hydrophoben Aminosäuren des N-Terminus der b-Untereinheit von F_o eine lösliche Form dieser Untereinheit erhalten (Dunn 1992), die als Modell für Untersuchungen der b-F_1-Wechselwirkungen benutzt werden kann. Von einem ähnlichen Protein, dem b_{syn}, bei dem nur die ersten 23 Aminosäuren entfernt wurden, konnten in der Arbeitsgruppe von S. Dunn eine Reihe von Cystein-Mutanten erhalten werden

(McLachlin und Dunn 1997). Diese Mutanten sollten im Rahmen dieser Arbeit nach Literaturvorschrift isoliert, und mit SH-reaktiven Spin-Labeln markiert werden.

Um Informationen über die Struktur der b-Untereinheiten zu erhalten, sollten die ESR-Spektren der an unterschiedlichen Positionen markierten b_{syn}-Mutanten in Lösung aufgenommen werden. Darüber hinaus sollten ESR-Spektren von b_{syn} im Komplex mit EF_1 gemessen werden, um mögliche Strukturänderungen bei der Bindung an die F_1 sowie die Position der Bindungsregionen auf b zu bestimmen. ESR-Spektren von b_{syn} im Komplex mit F_1-δ (EF_1, bei der die δ-Untereinheit entfernt wurde) sollten Informationen über die Rolle der δ-Untereinheit bei der Bindung von b an die F_1 liefern.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen der Bindungsstellen der F_1-ATPase

3.1.1 Isolierung der F_1-ATPase aus *Escherichia coli*

Die Isolierung der F_1-ATPase wurde nach einer Vorschrift von Wise (1990) durchgeführt. Zur Exprimierung der Wildtyp F_1-ATPase wurde der Stamm SWM1 (unc^+/unc^+) (Rao *et al.* 1988a) verwendet, die Mutante αD261N/αR365W wurde in JP2pCB6 (Weber et al. 1995) exprimiert. Beide Stämme wurden freundlicherweise von A. Senior vom University of Rochester Medical Center, USA zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in 12 l Kulturmedium (GEAU Cm + 2,5% LB für SWM1, GEAU Amp für CB6 siehe Experimenteller Teil, S.72) in einem 14 l New Brunswick Microferm Fermenter wachsen gelassen. Zum animpfen wurden jeweils 2 l Über-Nacht-Kulturen im gleichen Medium verwendet. Das Wachstum wurde abgebrochen, nachdem die Wachstumskurve begonnen hatte, abzuflachen. Nach Abtrennen der Zellen vom Wachstumsmedium durch Zentrifugation, wurden die Zellen in sucrosehaltigem Puffer (STEM) resuspendiert und eingefroren. Mit den verwendeten Stämmen konnten in 10 l Kulturmedium 85 bis 95 g Zellen erhalten werden.

Die Zellen wurden in STEM-Puffer in einer French Press aufgeschlossen, da mit dieser Methode größtenteils Vesikel, bei denen die Zellinnenseite der Membranen außen liegt („Inside-Out-Vesikel") erhalten wird. Da die French Press hinsichtlich des Medienvolumens begrenzt war, wurde jeweils nur die Hälfte der Zellen weiter verarbeitet. Nach Abtrennung von größeren Partikeln und löslichen Proteinen wurde durch sukzessives Waschen der Membranen mit Puffern von hoher (50 mM TES) und niederer Ionenstärke (5 mM TES) ein Großteil der membrangebundenen Proteine entfernt. Der Zusatz von p-Aminobenzamidin (PAB) verhinderte hierbei, daß auch der F_1-Komplex von den Membranen gewaschen wurde (Downie *et al.* 1979). Die Zentrifugationszeiten wurden gegenüber der Originalvorschrift verlängert, um festere Pellets zu erhalten.

Um den F_1-Teil in Lösung zu bringen, wurde zweimal mit 5 mM TES-Puffer *ohne* PAB gewaschen. Nach Zugabe von $MgCl_2$ auf eine Endkonzentration von 50 mM trat in der Regel eine Trübung auf, Abbildung 18, Bahn 3 zeigt den Niederschlag dieser Fällung. Nach Zentrifugation konnte die F_1 aus dem Überstand durch Zugabe von Polyethylenglykol 6000 ausgefällt werden. Es zeigte sich, daß die Anwesenheit von ausreichend Mg^{2+} essentiell war, um eine vollständige Fällung zu erreichen.

Die gelblich-weißen Pellets der PEG-Fällung wurden in Säulen- und Lagerungspuffer resuspendiert und auf eine Anionentauschersäule (DEAE-Cellulose, Whatman DE-52) aufgetragen. Nach Anlegen eines linearen Gradienten von 400 ml 0-0,5 M Na_2SO_4 in Säulenpuffer eluierte das Protein in einem einzigen Peak, der durch Bestimmung von Proteingehalt und ATPase-Aktivität detektiert wurde (Abbildung 17).

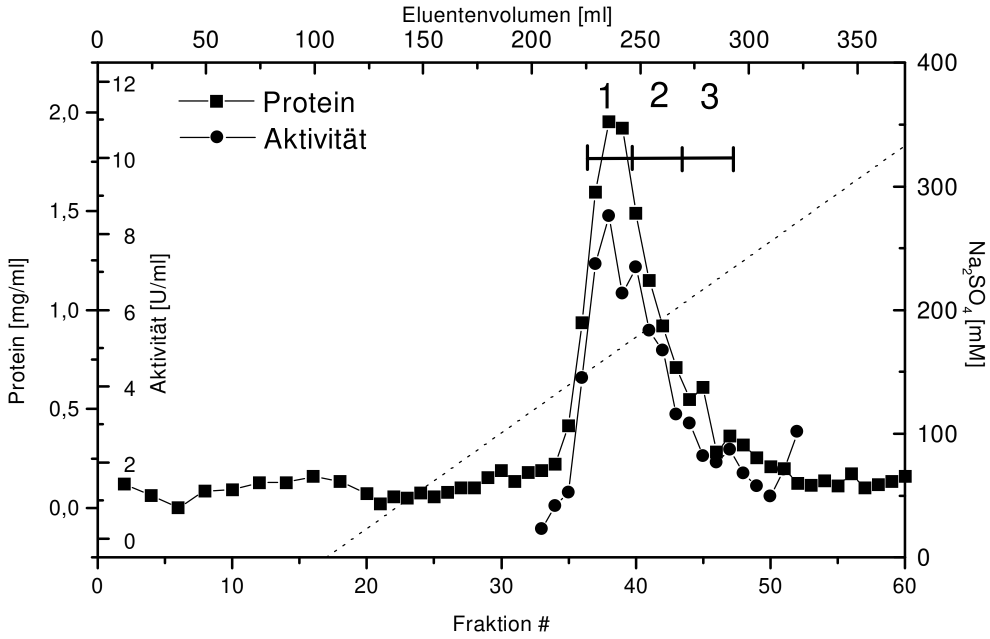


Abbildung 17: Reinigung der F1-ATPase über die DE-52 Säule

Mit steigender Na_2SO_4-Konzentration wurde die Qualität der ATPase schlechter (Verunreinigungen im SDS-Gel, geringere spezifische Aktivität). Aus diesem Grund wurde in drei Fraktionen aufgeteilt, als Grenzen wurde willkürlich die steigende Flanke mit Maximum (Fraktion 1), die abfallende Flanke (2) und der „Tail“ (3) getrennt gesammelt. Die spezifischen Aktivitäten der drei Fraktionen waren typischerweise um 30, 20 und 15 U/mg, im SDS-Gel in Abbildung 18 entsprechen die Bahnen 7, 8 und 9 den Fraktionen 1, 2 und 3.

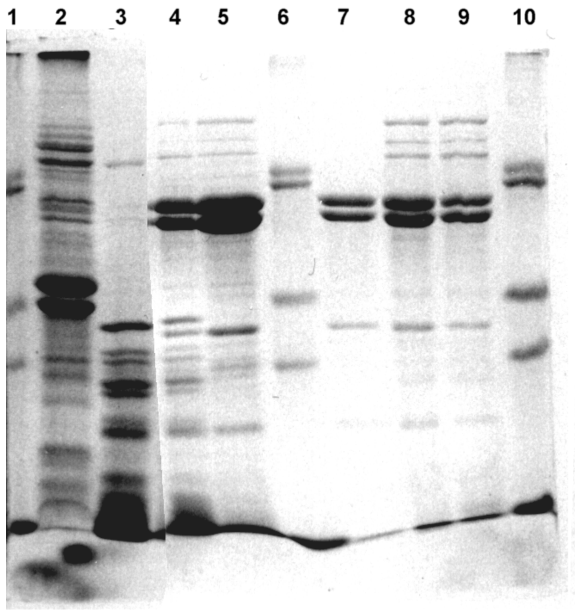


Abbildung 18: SDS-Gel einer Isolierung. Bahnen 1, 6, 10: Marker (BSA 68 kD, Pyruvat-Kinase 57 kD, LDH 36 kD, Chymotrypsinogen A 25 kD, Cytochrom C 12,5 kD); Bahn 2: Membranen nach Solubilisierung der F_1; Bahn 3: Präzipitat der Fällung mit Mg^{2+}; Bahn 4: solubilisierte F_1; Bahn 5: Präzipitat der Fällung mit PEG; Bahnen 7, 8, 9: Fraktionen der Säulenchromatographie.

Die Reinigung der EF_1 und ein Vergleich der verwendeten Stämme und Wachstumsmedien ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

	SWM1 in GEAU / 2,5%LB		**SWM1 in GEAU**		**CB6 in GEAU**	
Fraktion	Protein	Aktivität	Protein	Aktivität	Protein	Aktivität
Membranvesikel vor Solubilisierung	2100 mg	3,4 $\frac{U}{mg}$	1489 mg	3,8 $\frac{U}{mg}$	1619 mg	1,6 $\frac{U}{mg}$
F_1 nach Solubilisierung	651 mg	6,8 $\frac{U}{mg}$	319 mg	6,9 $\frac{U}{mg}$	282 mg	1,8 $\frac{U}{mg}$
F_1 nach PEG-Fällung	283 mg	10,6 $\frac{U}{mg}$	104 mg	11,7 $\frac{U}{mg}$	42 mg	5,2 $\frac{U}{mg}$
F_1 nach Chromatographie	146 mg	23,5 $\frac{U}{mg}$	52 mg	29,2 $\frac{U}{mg}$	22 mg	10,6 $\frac{U}{mg}$

Tabelle 2: Reinigung der F_1-ATPase und Einfluß von Stamm und Medium auf die Ausbeute (Mittelwerte aus 14, 6 bzw. 2 Isolierungen). Die Proteinmengen wurden auf 100 g Zellen hochgerechnet.

Die Mutante αD261N/αR365W wurde aus dem Stamm CB6 (JP2pCB6, Weber *et al.* 1995) wie oben beschrieben isoliert. Die Ausbeuten waren mit 10-20 mg aus 50 g Zellen deutlich geringer als beim Wildtyp-Enzym aus dem Stamm SWM1, auch die Aktivität betrug nur etwa 10 U/mg (Tabelle 2).

3.1.2 Nukleotidbefreiung und Bestimmung der intrinsischen Nukleotide

Die Anzahl der intrinsisch gebundenen Nukleotide in der EF_1 wurde mittels HPLC bestimmt. Dazu wurde die F_1-ATPase durch zweimalige Gelfiltration in Tris-Puffer (pH 8,0) überführt und durch fünfminütiges Kochen denaturiert. Das denaturierte Enzym wurde durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt, und eine definierte Menge der Lösung auf eine HPLC-Anionentauscher-Säule (SAX-Säule) gegeben. Durch eine vorher aufgenommene Eichgerade mit ATP und ADP konnte aus den Peakflächen der Nukleotidgehalt berechnet werden: Für das Wildtypenzym wurden 3,8 mol Nukleotid / mol Enzym gefunden, für die αD261N/αR365W-Mutante 0,8 mol / mol.

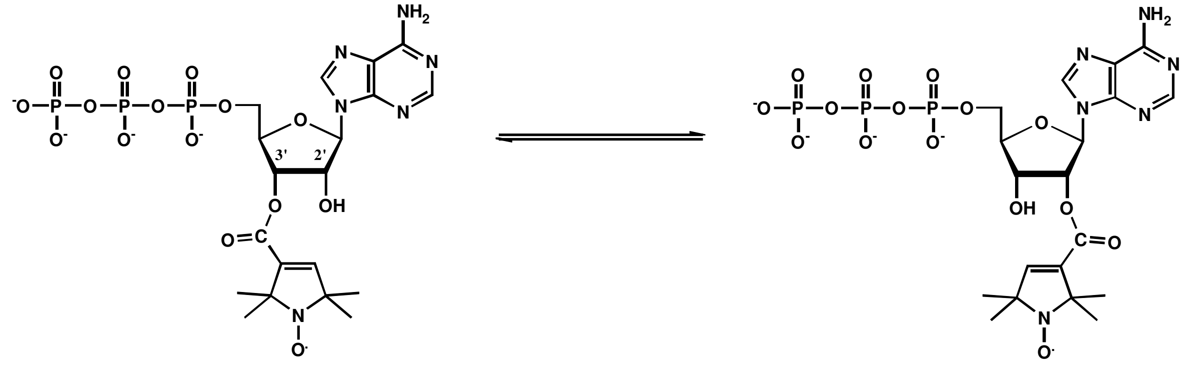
Aufgrund der Eigenschaft der nichtkatalytischen Bindungsstellen, Nukleotid nur schlecht auszutauschen, enthält isolierte EF_1 etwa 3-4 mol fest gebundene ATP bzw. ADP (Senior *et al.* 1992, Weber et al. 1994a). Senior *et al.* (1992) haben ein Verfahren beschrieben, mit der diese Nukleotide entfernt werden können. Diese Methode zur Nukleotidbefreiung fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung, jedoch wurde in Abwandlung der Literaturvorschrift nur einmal mit Ammoniumsulfat gefällt und als Säulenmaterial Sephadex G50 anstelle von G25 verwendet. Nach etwa 25-35 ml eluierte das Protein. Die nukleotidbefreiten Fraktionen wurden, wie von Garrett und Penefsky (1975) beschrieben, durch Bestimmen des Absorptionsverhältnisses $\varepsilon_{280}/\varepsilon_{260}$ detektiert. Beim Wildtyp wurden Fraktionen mit einem Verhältnis von >1,8 gesammelt, bei der Mutante, die durchweg ein Verhältnis von über 2,0 zeigte, die Fraktionen mit maximalem Verhältnis. Diese wurden in Centricon 30 eingeengt und konnten bei –80°C mindestens drei Tage ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Auch mit den nukleotidbefreiten Enzymen wurde der Nukleotidgehalt bestimmt. Das Wildtyp-Enzym enthielt 0,2 mol / mol, für die Mutante αD261N/αR365W wurde ein Nukleotidgehalt von < 0,1 mol / mol bestimmt.

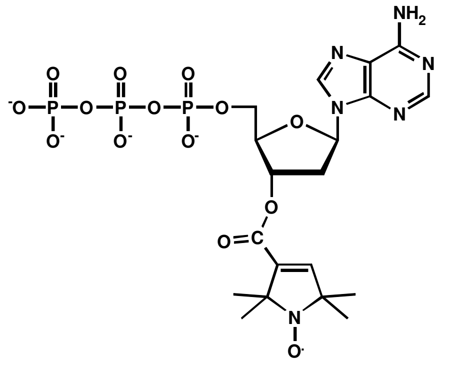
Um im folgenden die nukleotidbefreite F_1 von nicht nukleotidbefreiter zu unterscheiden, wird letztere als „native“ EF_1 bezeichnet.

3.1.3 ESR-spektroskopische Untersuchungen der F_1-ATPase mit Hilfe verschiedener ATP-Analoga

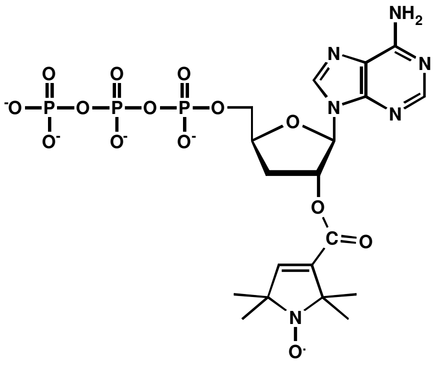
2',3'-O-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolin-3-carbonyl)-ATP (2',3'-SL-ATP) und dessen Derivate wurden bereits in diesem Arbeitskreis genutzt (Lösel *et al.* 1997, Motz 1995), um die F_1-ATPase aus *E. coli* zu untersuchen. Die ESR-Spektren von F_1-gebundenem 2-Azido-2',3'-SL-ATP und 2',3'-SL-ATP zeigen zwei Signale (vergleiche Abbildung 20a, Spektrum C).



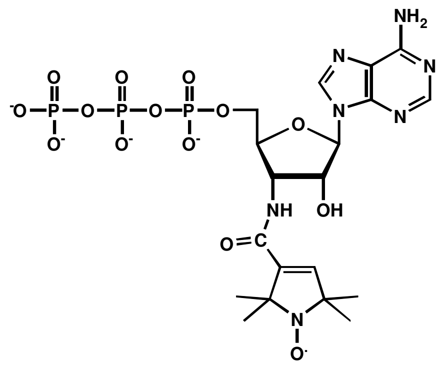
1a **1b**



2



3



4

Abbildung 19: Die verwendeten SL-ATP: (1) 2',3'-SL-ATP, (2) 2'-Desoxy-3'-SL-ATP, (3) 3'-Desoxy-2'-SL-ATP, (4) 3'-Aminodesoxy-N3'-SL-ATP

Mit früher durchgeführten Experimenten wurde versucht, die Herkunft der beiden spektralen Komponenten zu klären: Es wäre möglich, daß SL-ATP und SL-ADP unterschiedliche Signale im ESR-Spektrum zeigen. Da jedoch auch das nicht hydrolysierbare Analogon SL-AMPPNP zwei Signale zeigte, konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden (Lösel *et al.* 1997). Um zu testen, ob das 2'-3'-Gleichgewicht des Spin-Labels (Streckenbach *et al.* 1980, Abbildung 19, Verbindung 1a und b) Ursache für die unterschiedlichen spektralen Komponenten war, wurden die 2'- und 3'-Desoxy-Varianten des SL-ATP (Abbildung 19, Verbindungen 2 und 3) im Rahmen der Diplomarbeit des Autors synthetisiert und in Komplex mit der EF_1 vermessen. In allen Fällen zeigten sich Spektren mit zwei Signalen (Abbildung 20a, Spektren A und D). Somit konnte ausgeschlossen werden, daß das eine Signal vom Spin-Label in der 2'- und das andere von Label in der 3'-Position verursacht wird.

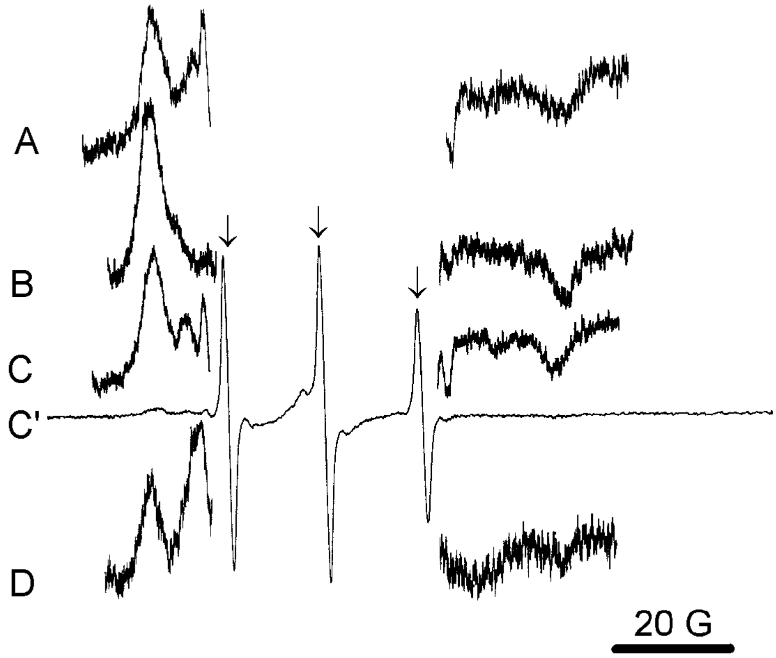


Abbildung 20a: Spektren von der Wildtyp-F_1-ATPase im Komplex mit
A: EF_1 / 2'-d-3'-SL-ATP 42 µM / 89 µM B: EF_1 / 3'-Ad-3'-SL-ATP 22 µM / 42 µM
C: EF_1 / 2',3'-SL-ATP 23 µM / 39 µM D: EF_1 / 3'-d-2'-SL-ATP 15 µM / 28 µM.

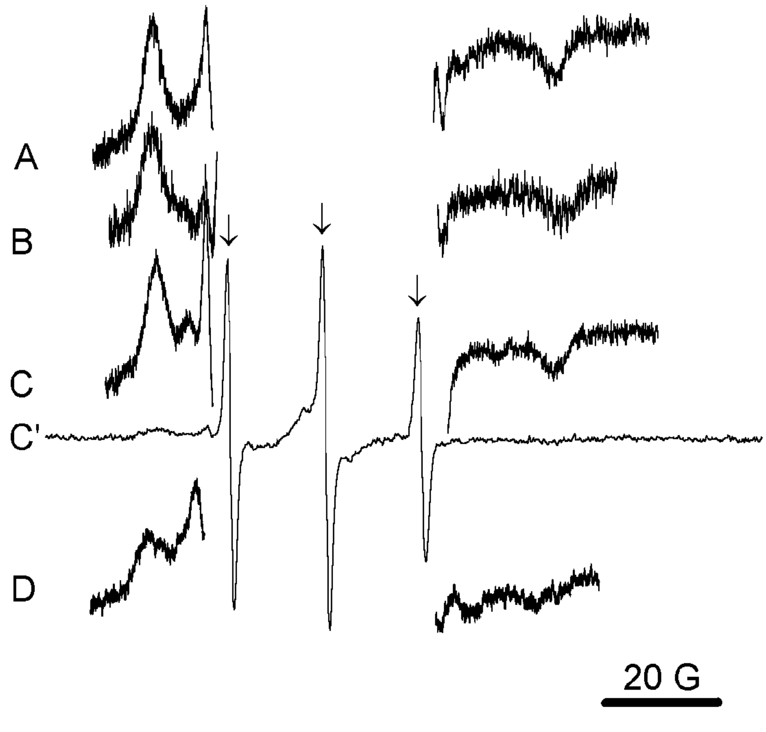


Abbildung 20b: Spektren von der αD261N/αR365W-Mutante in Komplex mit
A: EF_1 / 2'-d-3'-SL-ATP 33 µM / 58 µM B: EF_1 / 3'-Ad-3'-SL-ATP 18 µM / 35 µM
C: EF_1 / 2',3'-SL-ATP 22 µM / 49 µM D: EF_1 / 3'-d-2'-SL-ATP 17 µM / 32 µM

Da GDP in den nichtkatalytischen Bindungsstellen nicht bindet (Weber *et al.* 1994a), hat R. Lösel Verdrängungsexperimente mit GTP und GDP sowie Untersuchungen mit SL-GDP durchgeführt. Dadurch konnten Hinweise erhalten werden, daß SL-ATP in den nichtkatalytischen Bindungsstellen zu dem Signal mit hoher Aufspaltung führt, während SL-ATP in den katalytischen Bindungsstellen beide Signale im Spektrum zeigte.

Die Frage war nun, ob ein Signal von SL-ATP in der „tight“ und das andere in der „loose“ Bindungsstelle (Begriffe entsprechend dem „Binding-Change-Mechanismus“) verursacht wird, während die dritte Bindungsstelle unbesetzt bleibt, oder ob zwei Bindungsstellen zum äußeren Signal beitragen, während SL-Nukleotid in der offenen Bindungsstelle möglicherweise zu dem Signal mit der kleineren Aufspaltung führt. Zu diesem Zweck sollten spezifisch die katalytischen Bindungsstellen der EF_1 mit 2',3'-SL-ATP, 3'-Aminodesoxy-N3'-SL-ATP (3'-Ad-3'-SL-ATP), 2'-Desoxy-3'-SL-ATP bzw. 3'-Desoxy-2'-SL-ATP ESR-spektroskopisch untersucht werden, wobei neben der Spektrenform auch die Bindungsstöchiometrie ermittelt werden sollte.

Die in dieser Arbeit gezeigten Spektren und Bindungskurven des Wildtyp-Enzyms mit 2',3'-SL-ATP und 2'-Desoxy-3'-SL-ATP sowie die Spektren mit 3'-Desoxy-2'-SL-ATP wurden während der Diplomarbeit des Autors aufgenommen (Motz 1995).

	$2A_{zz}$-Werte	Peakhöhenverhältnis außen : innen
2',3'-SL-ATP	66G / 52G	6 : 1
2'-d-3'-SL-ATP	66G / 49 G	6 : 1
3'-Ad-3'-SL-ATP	67G / breit	Nicht bestimmbar
3'-d-2'-SL-ATP	66G / 45 G	3 : 1

Tabelle 3: $2A_{zz}$-Werte und Intensitätsverhältnis der beiden Signale des gebundenen SL-ATP

Die Inkubation von „nativer“ F_1 mit 2',3'-SL-ATP, 3'-Ad-3'-SL-ATP, 2'-Desoxy-3'-SL-ATP oder 3'-Desoxy-2'-SL-ATP führte zu ESR-Spektren bestehend aus zwei Signalen von enzymgebundenen Spin-Label-Nukleotiden (Abbildung 20a, die mit Pfeilen markierten scharfen Signale werden von nicht gebundenem SL-ATP verursacht), ein Hinweis auf eine unterschiedliche Mobilität bzw. eine unterschiedliche Polarität der Umgebung. Die $2A_{zz}$-Werte des äußeren Signals betragen 66-67 G für alle getesteten SL-ATP, während die $2A_{zz}$-Werte des inneren Signals von 51 G für 2',3'-SL-ATP über 49-48 G für 2'-d-3'-SL-ATP bis zu 46-45 G für 3'-d-2'-SL-ATP variieren (Tabelle 3). Das innere Signal für 3'-Ad-3'-SL-ATP ist nicht eindeutig zu bestimmen, es ist als schwache Schulter auf der innenseite des 67 G-Signals sichtbar. Die relativen Peakhöhen der beiden Signale variieren ebenfalls, wie in Tabelle 3 dargestellt.

Um die relativen Intensitäten der beiden Signale zu bestimmen, wurden die Peaks der Tieffeldsignale als Gaußkurven angepaßt (Abbildung 21 zeigt ein Beispiel) und die Doppelintegrale der berechneten einzelnen Peaks bestimmt.

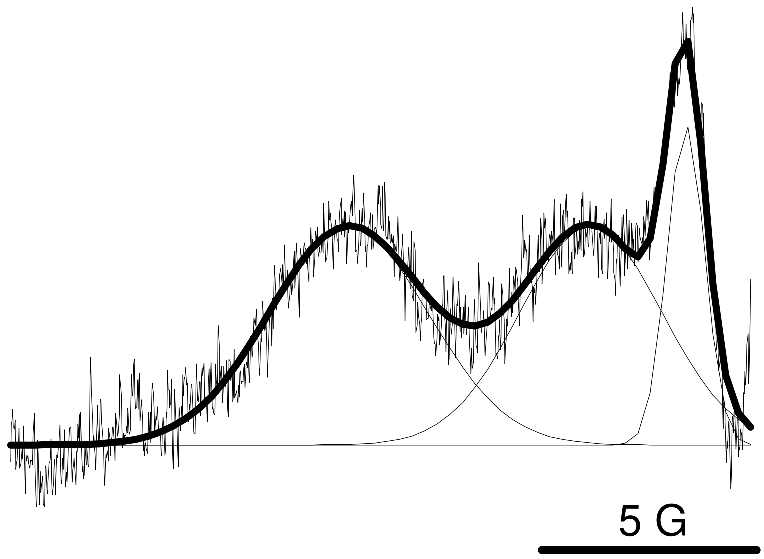


Abbildung 21: Tieffeldsignal von 2',3'-SL-ADP im Komplex mit EF_1 mit den angefitteten Signalen (dünne Linien) und dem resultierenden Spektrum (dicke Linie)

Es sollte nun geklärt werden, welcher Bindungsstelle die einzelnen Signale zugeordnet werden können. Da nicht klar war, ob das SL-ATP im „nativen“ Enzym ausschließlich die katalytischen Bindungsstellen besetzt, oder ob noch eine oder mehrere nichtkatalytische Bindungsstellen ebenfalls gelabelte Nukleotide binden, wurde eine Mutante eingesetzt, die nicht in der Lage war, Nukleotide in ihren nichtkatalytischen Bindungsstellen zu binden.

Weber *et al.* (1995) haben gezeigt, daß die Mutation von Aspartat 261 zu Asparagin die Bindung von Nukleotiden in den nichtkatalytischen Bindungsstellen bei Nukleotidkonzentrationen von unter 1 mM nahezu komplett verhindert (<0,2 mol/mol). Um spezifisch die katalytischen Bindungsstellen untersuchen zu können, wurde die Mutante αD261N/αR365W eingesetzt. Die Durchführung der für das Wildtypenzym beschriebenen Bindungsstudien mit dieser Mutante sollte die ESR-spektroskopische Untersuchung ausschließlich der katalytischen Bindungsstellen ermöglichen.

Die Mutante wurde wie die Wildtyp-F_1 mit den verschiedenen SL-ATP titriert. Weder die Spektren (Abbildung 20b), noch die Bindungskurven (Abbildung 22b) unterscheiden sich im wesentlichen von denen des Wildtyps.

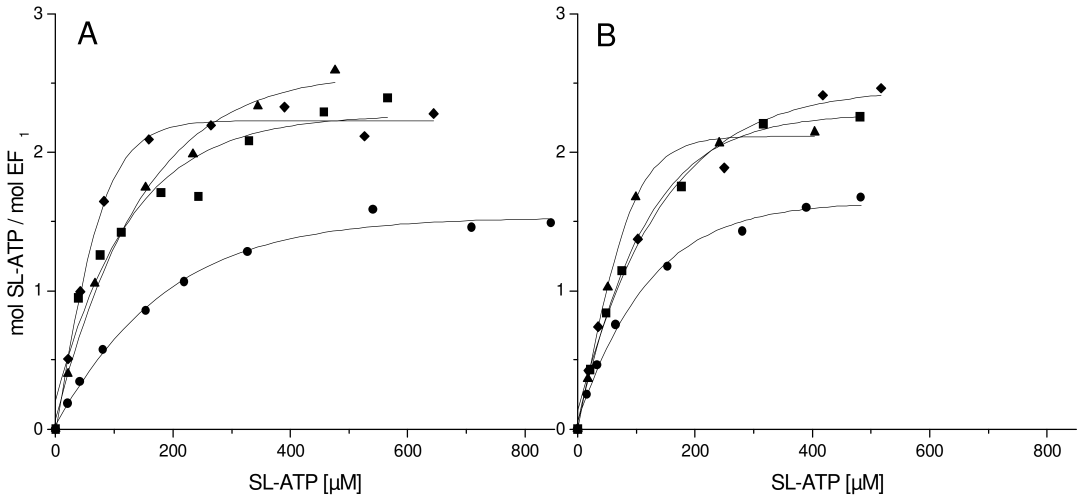


Abbildung 22: Titration von Wildtyp EF_1 (A) und der Mutante αD261N/αR361W (B) mit verschiedenen SL-ATP: Quadrate: 2',3'-SL-ATP – Kreise: 2'-d-3'-SL-ATP – Rauten: 3'-Ad-3'-SL-ATP – Dreiecke: 3'-d-2'-SL-ATP

	Wildtyp		αD261N/αR365W	
	Bindung	K_D [µM]	Bindung	K_D [µM]
2',3'-SL-ATP	2,3	19	2,2	22
2'-d-3'-SL-ATP	1,5	67	1,5	28
3'-Ad-3'-SL-ATP	2,2	11	2,4	47
3'-d-2'-SL-ATP	2,4	34	2,1	23

Tabelle 4: Anzahl der gebundenen SL-ATP und scheinbare K_D für Wildtyp-Enzym und αD261N/αR365W-Mutante

Die Titrationsexperimente mit der αD261N/αR365W-Mutante zeigten für keines der verwendeten SL-ATP Unterschiede zum Wildtyp-Enzym. Zur Kontrolle wurde auch nukleotidbefreite αD261N-Mutante mit 2',3'-SL-ATP vermessen (nicht gezeigt), diese verhält sich wie „native" F_1. Dies sind deutliche Hinweise darauf, daß bei Inkubation von „nativer" EF_1 mit SL-ATP ausschließlich die katalytischen Bindungsstellen betrachtet werden. Es scheint also wahrscheinlich, daß beim Wildtyp bereits alle drei nichtkatalytischen Bindungsstellen besetzt sind und auch keine Nukleotide austauschen.

In Tabelle 4 ist die Anzahl der gebundenen SL-ATP für Wildtyp und αD261N/αR365W-Mutante aufgelistet. Beide Enzyme binden im Mittel 2,3 mol 2',3'-SL-ATP, 3'-Ad-3'-SL-ATP bzw. 3'-d-2'-SL-ATP pro mol F_1. Wie bereits in der Diplomarbeit des Autors gezeigt wurde, konnte nukleotidbefreite Wildtyp-F_1 maximal 5,5 mol SL-ATP binden. Es werden also alle Bindungsstellen besetzt, eine davon jedoch nicht vollständig.

2'-d-3'-SL-ATP konnte nur 1,5 Bindungsstellen pro Enzym besetzen. Im ESR-Spektrum jedoch sind wie bei den anderen SL-ATP zwei Signale vorhanden, im gleichen Intensitätsverhältnis wie bei 2',3'-SL-ATP (Tabelle 3). Die Bindung scheint also bei allen Bindungsstellen im gleichen Maß geschwächt zu sein. Da 3'-Ad-3'-SL-ATP die gleich Stöchiometrie wie 2',3'-SL-ATP zeigte, ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht auf die Position des Spin-Labels, sondern eher auf das Fehlen der 2'-OH-Gruppe zurückzuführen, wie bereits von anderen Gruppen beobachtet: In ATP wird die anti-Konformation des Adenin-Ringes zur Ribose durch Wechselwirkung der 2'-OH-Gruppe mit dem N3 des Adenins stabilisiert (Ts'o 1974, Abbildung 23). Da diese Wechselwirkung im 2'-d-ATP fehlt, wird hier möglicherweise die syn-Konformation bevorzugt. Diese ist jedoch für die Bindung an die F_1 ungünstiger, wie Boos *et al.* (1976) für die CF_1 demonstrieren konnten.

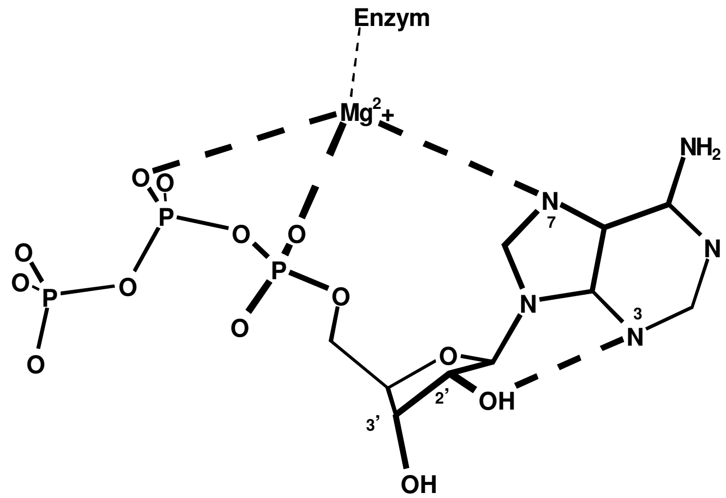


Abbildung 23: Struktur des ATP in der Konformation, die es in der Bindungsstelle β_{TP} annimmt. Der Adenin-Ring hat relativ zur Ribose die anti-Konformation angenommen. Die Wechselwirkung der 2'-OH-Gruppe mit N3 sowie des Mg^{2+} mit dem α und β Phosphat und N7 sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.

Die Frage war nun, ob das äußere Signal von SL-ATP in der „tight" (T) und der „loose" (L) Bindungsstelle und das innere Signal nur von SL-ATP in der offenen (O) Bindungsstelle verursacht wird, oder ob das äußere Signal nur der T- und das innere Signal der L-Bindungsstelle zugeordnet werden kann.

Wenn man die Kristallstruktur der F_1 betrachtet, kann man erkennen, daß die beiden β-Untereinheiten, die Nukleotid enthalten, und die α-Untereinheiten vergleichbare Strukturen haben, während die „leere" („offene") Bindungsstelle sich deutlich unterscheidet (Abschnitt 1.1.1, Abbildung 4). Diese Tatsache läßt es eher wahrscheinlich erscheinen, daß in den T- und L-Bindungsstellen gebundenes SL-ATP gleiche oder sehr ähnliche Signale ergibt, während SL-ATP in der O-Bindungsstelle ein unterschiedliches Signal verursacht. Auch die Intensitäten der

Signale lassen darauf schließen, daß das äußere Signal zu mehr als einer Bindungsstelle gehört. Das für 2',3'-SL-ATP bestimmte Verhältnis von 6 : 1 (s.o.) entspricht einer Besetzung von 2 : 0,3 Bindungsstellen.

3.1.3.1 Untersuchungen mit 2',3'-SL-ADP

Da die Dissoziationskonstanten von MgATP und MgADP für die katalytischen Bindungsstellen unterschiedlich sind (Weber *et al.* 1994a), kann die Titration von EF_1 mit 2',3'-SL-ADP weitere Hinweise liefern, welche Bindungsstellen die beiden Signale verursachen.

Titration von „nativer" EF_1 mit 2',3'-SL-ADP (Abbildung 24) ergibt eine maximale Bindung von 2,9 mol SL-ADP pro mol F_1 (die Asymptote wurde durch einen sigmoidalen Fit berechnet) und eine scheinbare Dissoziationskonstante von 90 µM.

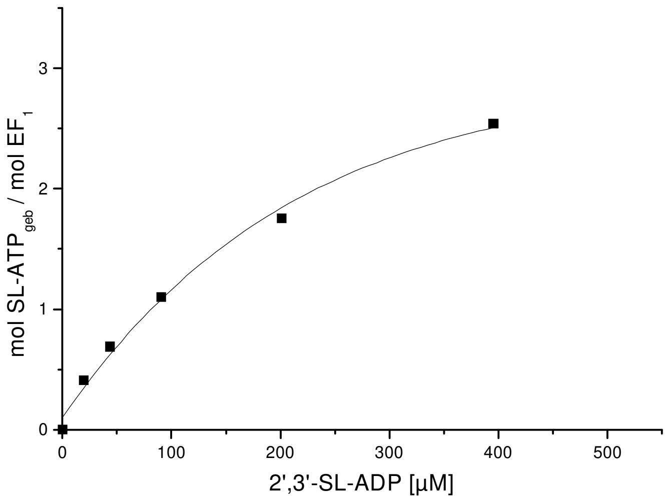


Abbildung 24: Titration von „nativer" EF_1 mit 2',3'-SL-ADP

Genau wie mit SL-ATP zeigen sich mit SL-ADP zwei Signale mit Aufspaltungen von 66 G und 52 G (Abbildung 25). Allerdings hat der Anteil des inneren Signals gegenüber dem äußeren zugenommen, das Intensitätsverhältnis wurde zu 2 : 1 bestimmt.

Weber *et al.* (1994a) bestimmten die Dissoziationskonstanten von MgATP für die katalytischen Bindungsstellen zu 0,0002 µM, 0,5 µM und 25 µM. Die dritte Bindungsstelle hat also eine deutlich geringere Affinität, als die anderen beiden, wodurch der deutlich geringere Anteil des ihr zugeschriebenen Signals erklärt werden könnte. Betrachtet man sich die Dissoziationskonstanten von MgADP (0,14 µM, 20 µM und 20 µM), kann man erklären, daß sich bei den Spektren von 2',3'-SL-ADP im Komplex mit EF_1 das Peakhöhenverhältnis der beiden Signale zugunsten des inneren Signals verändert, da die „loose" und die „open" Bindungsstelle gleiche Affinitäten haben.

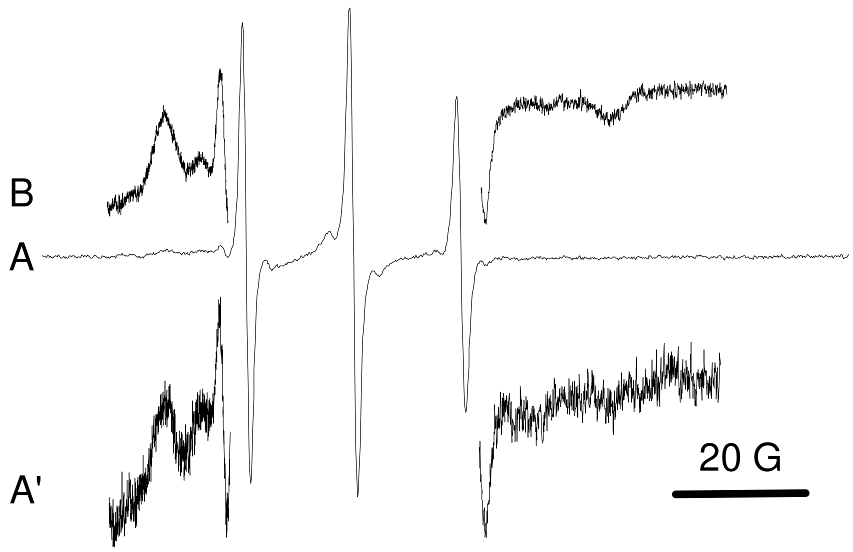


Abbildung 25: Spektren von „nativer“ F_1 mit A, A': 2',3'-SL-ADP (SL-ADP 19µM / F_1: 39 µM) und B: 2',3'-SL-ATP (SL-ATP 22µM / F_1: 49µM). A', B wurden gegenüber Spektrum A mit höherer Verstärkung und höherer Auflösung aufgenommen.

Dieses Ergebnis untermauert die These, daß das innere Signal der schwach affinen (O) Bindungsstelle zugeordnet werden kann, während das äußere Signal von SL-Nukleotiden in den T- und L-Bindungsstellen verursacht wird.

In dieser Arbeit wurden mit SL-ATP 2,3, mit SL-ADP sogar 3 besetzte katalytische Bindungsstellen gefunden. Während Weber *et al.* (1993) postulierten, daß die Besetzung aller drei Bindungsstellen Voraussetzung für das Erreichen einer maximalen Hydrolyserate ist,. wurde von anderen Arbeitsgruppen die Besetzung von nur zwei Bindungsstellen als Voraussetzung für maximale Hydrolyse genannt (Cross *et al.* 1982). Auch der klassische Binding-Change-Mechanismus wurde mit maximal zwei besetzten Bindungsstellen formuliert (Boyer 1993). Murataliev und Boyer (1994) schließen jedoch eine Besetzung der dritten Bindungsstelle mit Nukleotid nicht aus.

Das Intensitätsverhältnis von 6 : 1, das für 2',3'-SL-ATP und 2'-d-3'-SL-ATP gefunden wurde, spricht dafür, daß zwei Bindungsstellen zum äußeren und 0,3 – 0,4 Bindungsstellen zum inneren Signal gehören. Auch das Intensitätsverhältnis von 2 : 1, welches für SL-ADP gefunden wurde, paßt zu der Theorie, daß das 66 G-Signal zu zwei und das 52 G-Signal zur dritten Bindungsstelle gehört. Nukleotidbefreite F_1 im Komplex mit 2',3'-SL-ATP zeigt die beiden Signale im Intensitätsverhältnis von 9 : 1 bei einer Besetzung von 5,5 Bindungsstellen. Rechnerisch tragen also 5 Bindungsstellen zum äußeren und 0,5 zum inneren Signal bei. Das

Intensitätsverhältnis von 3 : 1, daß bei 3'-d-2'-SL-ATP (Gesamt 2,4 Bindungsstellen, d.h. 1,8 Bindungsstellen tragen zum äußeren Signal bei, 0,6 zum inneren) gefunden wurde, läßt sich nicht auf diese Weise interpretieren und erfordert weitere Informationen über die Nukleotidbindungsstellen.

3.2 Untersuchungen an den isolierten Untereinheiten α, β und γ

Um weitere Erkenntnisse über den Aufbau der Nukleotidbindungsstellen zu erhalten, sollten die isolierten Untereinheiten α und β, die Träger der Bindungsstellen, mit den Spin-Label-ATP-Derivaten untersucht werden. Isolierung und Rekombination der Untereinheiten erlauben neben der Untersuchung der isolierten Untereinheiten selbst auch die Modifizierung einer Untereinheit mit anschließender Rekombination zum aktiven Komplex. Versuche dieser Art wurden bereits von S. Burgard (1995) und A. Erbse (1996) mit isolierten Untereinheiten der F_1 aus dem thermophilen Bakterium PS3 (TF_1) durchgeführt.

Die F_1-ATPase aus *Escherichia coli* kann durch sukzessives Eingefrieren und Wiederauftauen in Gegenwart hoher Salzkonzentration inaktiviert werden („cold inactivation“). Vogel und Steinhart (1976) haben herausgefunden, daß diese Inaktivierung auf Dissoziation des Enzyms in dessen Untereinheiten beruht. Die Inaktivierung kann durch Dialyse des dissoziierten Enzyms gegen einen geeigneten Puffer wieder rückgängig gemacht werden. Verschiedene Testreihen ergaben, daß zur Rekombination die Anwesenheit von MgATP unbedingt erforderlich ist (Vogel und Steinhart 1976, Larson und Smith 1977). Weiter hat sich gezeigt, daß die Untereinheiten α, β und γ ausreichen, um volle ATPase-Aktivität zu erhalten (Futai 1977). Dunn und Futai (1980) haben ein effektives Verfahren zur Isolierung dieser drei Untereinheiten veröffentlicht, welches in dieser Arbeit Anwendung finden sollte.

3.2.1 Isolierung der Untereinheiten α, β und γ aus der F_1-ATPase

Etwa 25 mg EF_1 im Aufbewahrungspuffer wurden durch Fällen mit 65% Ammoniumsulfat in einen Puffer mit 1 M NaCl und 0,1 M $NaNO_3$ überführt und durch Schockgefrieren und langsames Auftauen in die Untereinheiten dissoziiert. Da das Enzymgemisch (insbesondere die γ-Untereinheit, s. Abbildung 27, Bahn 13, Pfeil) in diesem Stadium sehr anfällig für Protasen war, wurde, wie von Rao *et al.* (1987) beschrieben, der Proteasehemmer PMSF zugegeben, und die Verarbeitung durch Verzicht auf die in der Originalvorschrift beschriebene Dialyse vor dem Eingefrieren beschleunigt. Der Verzicht auf die Dialyse hatte, wie sich herausstellte, keinen negativen Einfluß auf die weitere Isolierung.

Die Untereinheiten wurden zunächst mit Hilfe einer Hydroxyapatitsäule (HTP-Säule) aufgetrennt: mit 300 ml 30 mM Phosphat in Puffer A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, DTT 0,1 mM, EDTA 0,1 mM) wurden zunächst die α- und β-Untereinheiten eluiert (Abbildung 26, Peak 0). Nach Spülen mit 50 ml Puffer wurde ein Gradient von 0 bis 150 mM Phosphat in 3 M Harnstoff angelegt. Dabei wurden weitere drei Proteinpeaks erhalten:

1. 5-25 mM P_i: α-, β- und ε-Untereinheiten (Abbildung 27, Bahn 5)
2. 30-60 mM P_i: δ-Untereinheit verunreinigt mit α und β (Bahn 6)
3. 70-90 mM P_i: γ-Untereinheit verunreinigt mit α und Zersetzungsprodukten von γ (Bahn 7)

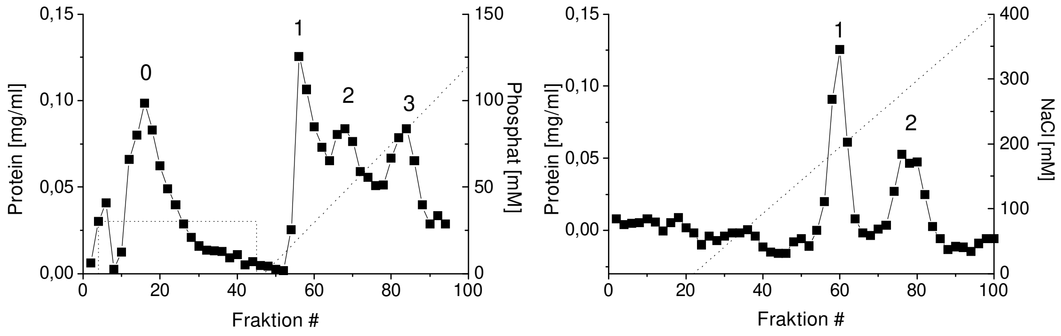


Abbildung 26: Linke Seite: HTP-Säule, Rechte Seite: DEAE-Sepharose CL-6B. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mittels Bradford-Test bestimmt.

Diese Fraktionen wurden sofort gegen Puffer A + 200 mM NaCl + 10% Glycerin dialysiert, da bei zu langem Lagern im harnstoffhaltigen Puffer irreversible Schäden auftreten (J. Wise, persönliche Mitteilung).

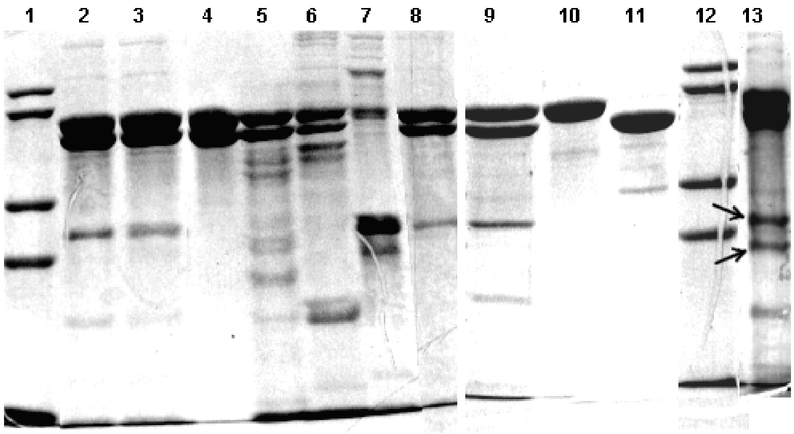


Abbildung 27: SDS-Gel der Isolierung der Untereinheiten: Bahn 1: Marker (BSA 68 kD, Pyruvat-Kinase 57 kD, LDH 36 kD, Chymotrypsinogen A 25 kD, Cytochrom C 12,5 kD); Bahn 2: EF_1; 3: dissoziierte Untereinheiten; Bahnen 4, 5, 6, 7: Fraktionen 0, 1, 2 und 3 der HTP-Säule; Bahnen 8, 9: EF_1; Bahnen 10, 11: Fraktionen 1 und 2 der Sepharose-Säule; Bahn 12: Marker; Bahn 13: Dissoziierte Untereinheiten nach Dialyse (s. Text)

Die Proteinlösung von Peak 0 (ca. 100-150 ml) wurde ohne weitere Behandlung auf eine Ionentauschersäule (DEAE Sepharose CL-6B) aufgetragen und ein Gradient von 0-400 mM NaCl in 400 ml Puffer A angelegt. Die α-Untereinheit eluierte als scharfe Bande bei

90-130 mM, β eluierte als breite Bande bei 200-250 mM (Abbildung 26, rechts). Alle Fraktionen wurden mit Amicon PM 10 Membranen und Centricon 10 bis zu einer Konzentration von etwa 5 mg/ml eingeengt und bei –80°C aufbewahrt. Es wurde über einen Zeitraum von mehreren Monaten keine Abnahme der Rekombinationsfähigkeit festgestellt.

Fraktion	Protein [mg]	Ausbeute	Untereinheiten
Start	30		F_1
Vor HTP	21,3	71%	αβγδε
0	9,5	38%	αβ
1	1,2		αβε
2	0,78		δ+αβ
3	0,32	13%	γ
α	2,3	18%	α
β	1,9	16%	β

Tabelle 5: Ausbeute der Isolierung (Mittelwert aus drei Isolierungen)

Die isolierten Untereinheiten wurden mittels Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 27). α und β konnten in hoher Reinheit erhalten werden (Bahn 10 und 11), während γ stets mit α und einem Zersetzungsprodukt verunreinigt war (Bahn 7). Fraktion 2 der HTP-Säule enthielt stets δ als Hauptbestandteil neben α, β und Verunreinigungen (Bahn 6).

3.2.2 Rekombinationsversuche

3.2.2.1 Methoden zur Rekombination

In bisherigen Veröffentlichungen (Dunn und Futai 1980, Rao *et al.* 1987) wurden die Untereinheiten durch eine mehrstündige Dialyse gegen einen Rekombinationspuffer (Succinat-Tris 50 mM pH 6,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Glycerin 10 %, ATP 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM) zum aktiven Komplex rekombiniert. Um einen schnelleren Assay für die Qualität der Untereinheiten, bzw. eine verlustarme Methode zur Rekombination zu finden, wurden verschiedene Methoden getestet. Für diese Tests wurden einige mg F_1 dissoziiert, diese Proteinlösung wurde aliquotisiert und die verschiedenen Rekombinationsversuche durchgeführt. Der Erfolg der Rekombination wurde durch Bestimmung der ATPase-Aktivität überprüft, eine Blindprobe mit unbehandelter Proteinlösung zeigte keine Aktivität (Abbildung 28 zur Zeit t=0).

1. Dialyse: die dissoziierte Enzymlösung wurde in Aliquote zu 80 µl aufgeteilt und gegen 1 l Rekombinationspuffer dialysiert. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden Proben entnommen und die Aktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Aktivität bereits nach 30 Minuten nahezu vollständig wiederhergestellt war (Abbildung 28, Kreise). Als Verlustquelle erwies sich die Tatsache, daß nicht das komplette Volumen der Lösung aus den Dialysekammern entnommen werden konnte.

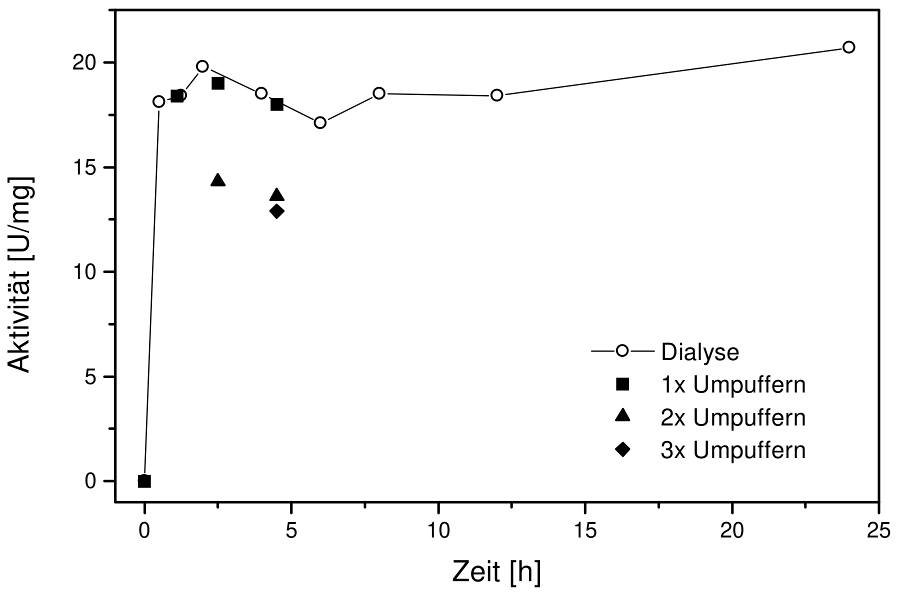


Abbildung 28: Rekombinations-Experimente im Vergleich: offene Symbole: Dialyse, geschlossene Symbole: Umpuffern durch Verdünnen und Einengen in Centricons

2. Umpuffern durch Verdünnen und Einengen in Centricons: etwa 50 µl der dissoziierten Enzymlösung wurden mit 2,5 ml Rekombinationspuffer verdünnt und in Centricon 10 wieder auf 50-100 µl eingeengt (60-90 min). Es zeigte sich, daß bereits nach einmaligem Umpuffern die maximale Aktivität erreicht wurde, Lagern der Enzymlösung bei Raumtemperatur konnte die Aktivität nicht weiter erhöhen (Abbildung 28, ausgefüllte Symbole).

Der Vergleich der beiden Methoden zeigt, daß die zweite Methode („Centricon-Methode“) wesentlich leichter in der Durchführung und auch deutlich sparsamer im Materialaufwand ist, ohne der Dialyse in Zeitaufwand oder Rekombinationsrate unterlegen zu sein. Aus diesem Grund wurde die Centricon-Methode bei allen Rekombinationsassays angewandt.

3.2.2.2 Nachweis der Rekombination durch native und zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Um die Rekombination der Untereinheiten mit einer weiteren Routinemethode zu überwachen und Aussagen über den Grad der Rekombination machen zu können, wurde eine Methode zur nativen (nicht denaturierenden) Polyacrylamidgelelektrophorese, die die F_1 nicht in ihre Untereinheiten auftrennt, gesucht.

Zur Elektrophorese von Membranproteinen hat Schägger (1991) eine Methode entwickelt, bei der als Detergenz der negativ geladene Farbstoff Serva Blau G, ein Coomassie-Farbstoff, eingesetzt wird („Blue-Native-Gele“). Versuche mit solchen Gelen zeigten, daß der F_1-Komplex andere Laufeigenschaften als die einzelnen Untereinheiten hat (Abbildung 29, links): Während das Holoenzym kaum wandert und eine scharfe Bande zeigt (Bahn 1), wandern α und β ca. über 1/3 des Trenngels in breiten Banden (Bahnen 2 und 3).

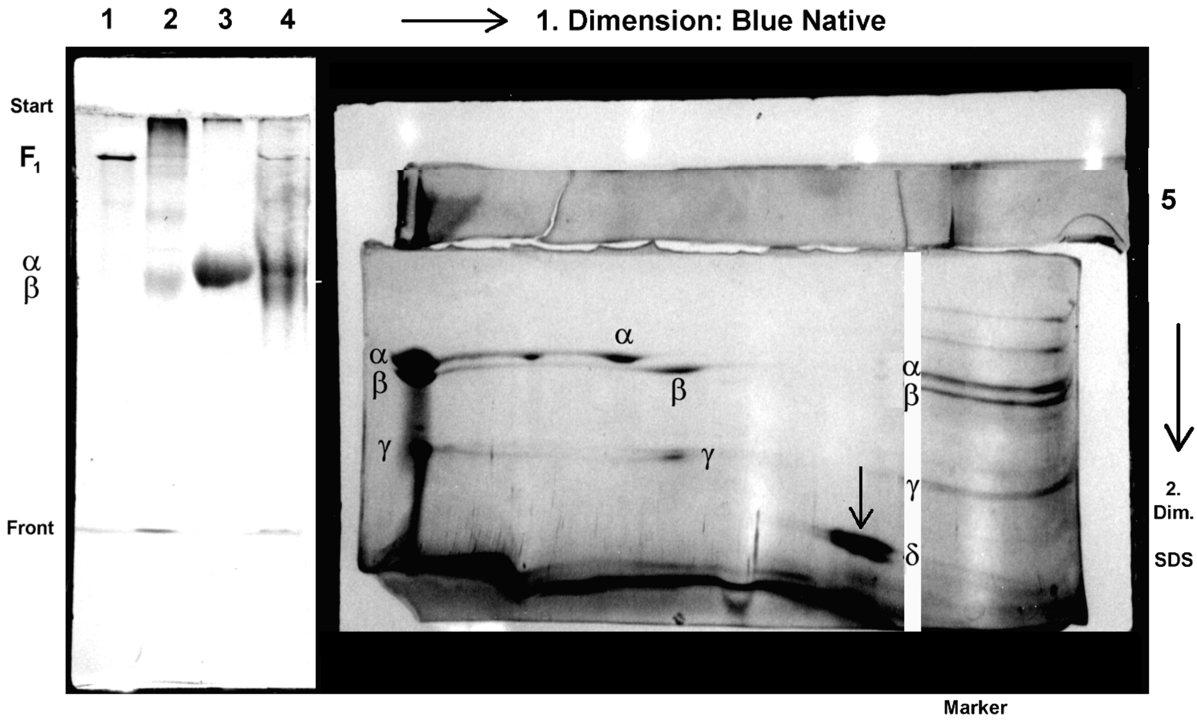


Abbildung 29: Links: Blue Native Gel: Bahn 1: F_1; Bahn 2: β ; Bahn 3: α; Bahn 4: dissoziierte F_1. Rechts: Bahn 5: F_1. Zweidimensionales Gel: 40 µg F_1. Für die SDS-PAGE wurde als Marker EF_1 neben den nativen Gelstreifen aufgetragen.

Um die Banden in diesen Gelen zu identifizieren, wurden einzelne Bahnen ausgeschnitten und um 90° gedreht auf ein normales SDS-Gel wie in Material und Methoden beschrieben aufgesetzt. Abbildung 29, rechte Hälfte zeigt ein solches Gel, bei dem für 40 µg EF_1 zunächst eine native Elektrophorese (1. Dimension) und dann eine SDS-PAGE (2. Dimension) durchgeführt wurde.

3.2.3 ESR-spektroskopische Untersuchung der isolierten Untereinheiten α und β

Mit den isolierten Untereinheiten α und β wurden Titrationen mit den verschiedenen SL-ATP Analoga ähnlich zu den Versuchen mit der EF_1 (Abschnitt 3.1.3) durchgeführt. Zur ESR-Messung wurde die Lösung der α-Untereinheit durch Gelzentrifugation in 50 mM Tris-HCL pH 8,0 überführt und die verschiedenen SL-ATP Lösungen zutitriert. Analog zu den Messungen an der F_1 wurde auch hier das SL-ATP : Mg^{2+}-Verhältnis bei 2,5 : 1 gehalten. Nach jedem Experiment wurde durch Rekombination mit der jeweils anderen Untereinheit und γ die Qualität der untersuchten Untereinheit getestet. Bei allen hier gezeigten Experimenten konnten die Untereinheiten zum aktiven Komplex rekombiniert werden.

3.2.3.1 α-Untereinheit

Die α-Untereinheit trägt größtenteils die nichtkatalytischen Bindungsstellen (Abrahams *et al.* 1994). Diese ergeben im Holoenzym für alle verwendeten SL-ATP nur ein Signal im ESR-Spektrum (Lösel *et al.* 1997).

Die isolierte α-Untereinheit aus *E. coli* konnte 0,8-0,9 mol der verwendeten SL-ATP pro mol Enzym binden, die gemessenen Dissoziationskonstanten lagen bei 15 µM. A. Erbse (1996) konnte für die TF_1 1,2 mol SL-ATP pro mol α binden. Andere Gruppen (Dunn und Futai 1980, Rao *et al.* 1988a) konnten durch Gleichgewichtsdialyse mit ^{3}H-markiertem ATP ebenfalls eine 1:1 Stöchiometrie nachweisen, allerdings mit einer höheren Affinität (K_D = 0,1 µM). Wahrscheinlich verschlechtert die Modifizierung der Ribose durch den Spin-Label die Affinität etwas.

	EF_1	α aus EF_1	α aus TF_1 (Erbse 1996)
2',3'-SL-ATP	66G / 52G	62 G / 48 G	61-62 G / 48-49 G
2'-d-3'-SL-ATP	66G / 49 G	42 G	47 G
3'-Ad-3'-SL-ATP	67G / breit	59 G	42 G
3'-d-2'-SL-ATP	66G / 45 G	47 G	43-44 G

Tabelle 6: $2A_{zz}$-Werte der angegebenen SL-ATP Analoga im Komplex mit entweder EF_1 oder den isolierten Untereinheiten aus *E. coli* bzw. dem thermophilen Bakterium PS3 im Vergleich

Das ESR-Spektrum der isolierten α-Untereinheit mit 2',3'-SL-ATP besteht aus zwei Komponenten (Abbildung 30C), deren Intensitätsverhältnis 1 : 1 beträgt (Berechnung wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben). 2'-Desoxy-3'-SL-ATP, 3'-Aminodesoxy-3'-SL-ATP oder 3'-Desoxy-2'-SL-ATP hingegen zeigen nur jeweils eine Komponente dieses Signals. Die beobachteten $2A_{zz}$-Werte unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Position des Spin-Labels (siehe Abbildung 30 A, B und D). In Tabelle 6 sind die $2A_{zz}$-Werte für die aus den Enzym-SL-ATP-Komplexen resultierenden Signale im Vergleich mit den Werten für α aus TF_1 (Erbse 1996) und dem Holoenzym EF_1 zusammengefaßt.

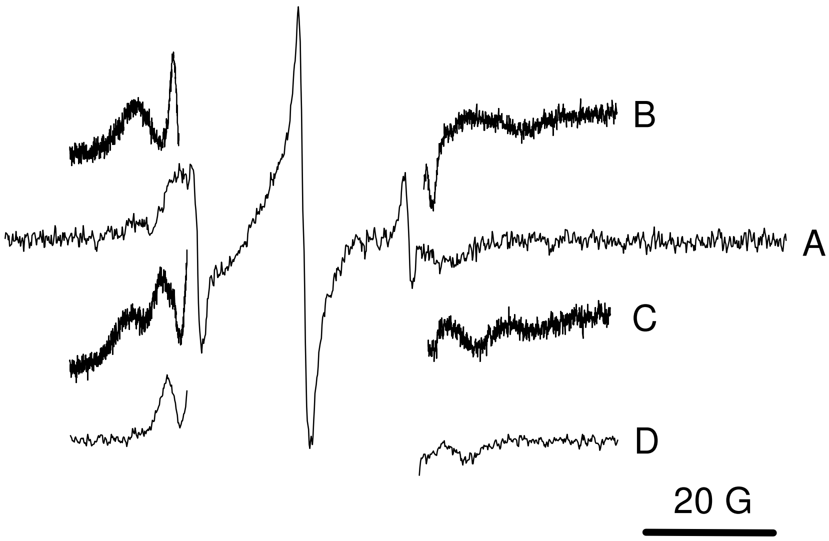


Abbildung 30: ESR-Spektren der verschiedenen SL-ATP Analoga im Komplex mit der α–Untereinheit.

A: 2'-d-3'-SL-ATP 25 µM / α 53µM B: 3'-Ad-3'-SL-ATP 32 µM / α 68µM

C: 2',3'-SL-ATP 31 µM / α 58µM D: 3'-d-2'-SL-ATP 13 µM/ α 61µM

Es fällt auf, daß im Gegensatz zum Holoenzym nur das 2',3'-SL-ATP zwei Signale zeigt, welche jedoch nicht als eine Überlagerung der Signale für die beiden Desoxy-Analoga angesehen werden können. Auffällig ist ebenfalls, daß das Spektrum des 3'-Ad-3'-SL-ATP im Vergleich zu 2'-d-3'-SL-ATP bzw. 3'-d-2'-SL-ATP eine relativ große Aufspaltung zeigt. Wahrscheinlich ist hier die Beweglichkeit des Spin-Labels durch die Natur der Amid-Bindung, mit der er an das ATP gebunden ist, eingeschränkt.

Basierend auf der Kristallstruktur der MF_1 (Abrahams *et al.* 1994) wurde ein Modell vom SL-ATP in der nichtkatalytischen Bindungsstelle erstellt (Abbildung 31). Mit dem Programm QUANTA® wurde die Spin-Label-Gruppe an das in der Originalstruktur vorhandene ATP modelliert und das SL-ATP minimisiert.

Betrachtet man die Lage des Spin-Label-Gruppe in dem Modell der isolierten α-Untereinheit, so erkennt man, daß die Hydroxylgruppen der Ribose und somit auch der (hier grün dargestellte) Spin-Label frei aus der (rot dargestellten) α-Untereinheit herausragen. Man könnte sich die Bindungsstelle der isolierten α-Untereinheit als eine offene Tasche, die dem

Spin-Label eine gewisse Bewegungsfreiheit läßt, vorstellen. Im Holoenzym wird diese „Tasche“ durch die Aminosäuren aus der β-Untereinheit, die an der nichtkatalytischen Bindungsstelle beteiligt sind, „verschlossen“ (in Abbildung 31 gelb dargestellt). Es ist wahrscheinlich, daß hierbei die Beweglichkeit des Spin-Labels so stark eingeschränkt wird, daß sich für alle SL-ATP die Signale für den stark immobilisierten Label mit $2A_{zz}$-Werten von 66-67 G ergeben. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, daß die isolierten Untereinheiten eine andere Konformation einnehmen als im Komplex, was ebenfalls zu einer größeren Bewegungsfreiheit des Spin-Labels in der isolierten Untereinheit zur Folge haben könnte.

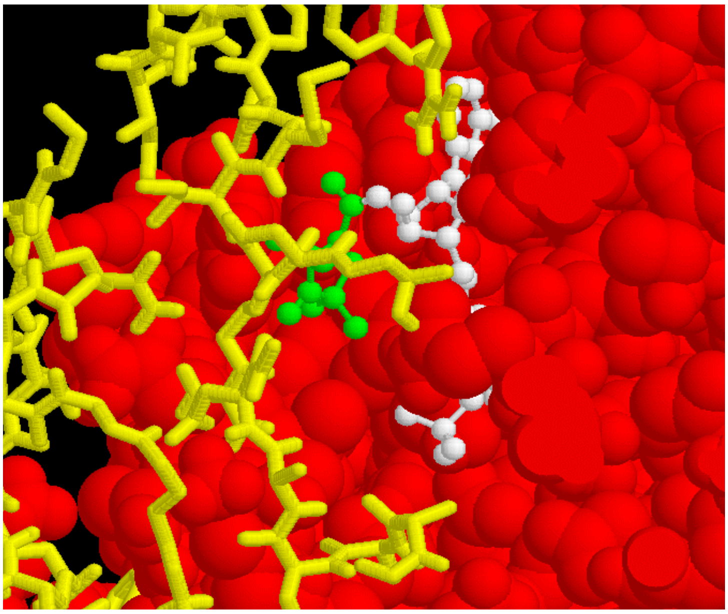


Abbildung 31: Modell des SL-ATP in der nichtkatalytischen Bindungsstelle. α ist rot, β gelb dargestellt. SL-ATP ist als „Ball & Stick“-Modell dargestellt, ATP weiß und die Spin-Label-Gruppe grün. Das Modell wurde mit QUANTA97® basierend auf der Kristallstruktur der MF_1 von Abrahams *et al.* 1994 erstellt. Die Abbildung wurde mit RasMol erstellt.

Dieser Effekt könnte vergleichbar sein mit dem Unterschied zwischen der offenen und den geschlossenen katalytischen Bindungsstellen. Auch hier sind in dem geringer aufgespaltenen Signal (das wahrscheinlich zur offenen Bindungsstelle gehört) Unterschiede zwischen den verschiedenen Modifizierungen des SL-ATPs erkennbar, während die geschlossenen Bindungsstellen keinen Unterschiede zeigen.

3.2.3.2 β-Untereinheit

Mit der β-Untereinheit konnte sowohl bei geringen als auch bei hohen Konzentrationen aller vier verschiedenen SL-ATP sowie nach Zugabe von 2 mM Mg^{2+} keine Bindung beobachtet werden. Das entspricht den Beobachtungen von Dunn und Futai (1980), die ebenfalls keine

Bindung beobachteten. Für TF_1 hingegen konnte A. Erbse (1996) mit SL-ATP eine schwache Bindung beobachten.

3.2.4 Rekombination des aktiven Komplexes $\alpha_3\beta_3\gamma$

Um Veränderungen der Konformation der α-Untereinheit während der Rekombination zum aktiven Komplex $\alpha_3\beta_3\gamma$ zu untersuchen, wurde die isolierte α-Untereinheit mit dem photoaktivierbaren ATP-Analogon 2-Azido-2',3'-SL-ATP inkubiert, belichtet und das ungebundene SL-ATP anschließend durch Gelzentrifugation entfernt. Diese Proteinlösung α(SL) wurde mit β und γ im stöchiometrischen Verhältnis (3:3:1) gemischt, wobei sich keine Änderung des ESR-Spektrums ergab. Erst nach Zugabe von MgATP zeigten sich Veränderungen in den Spektren (Abbildung 32), die auf eine Rekombination der Untereinheiten schließen lassen. Dies ist konform mit den Resultaten von Futai (1977), der ebenfalls zeigen konnte, daß MgATP für die Rekombination erforderlich ist.

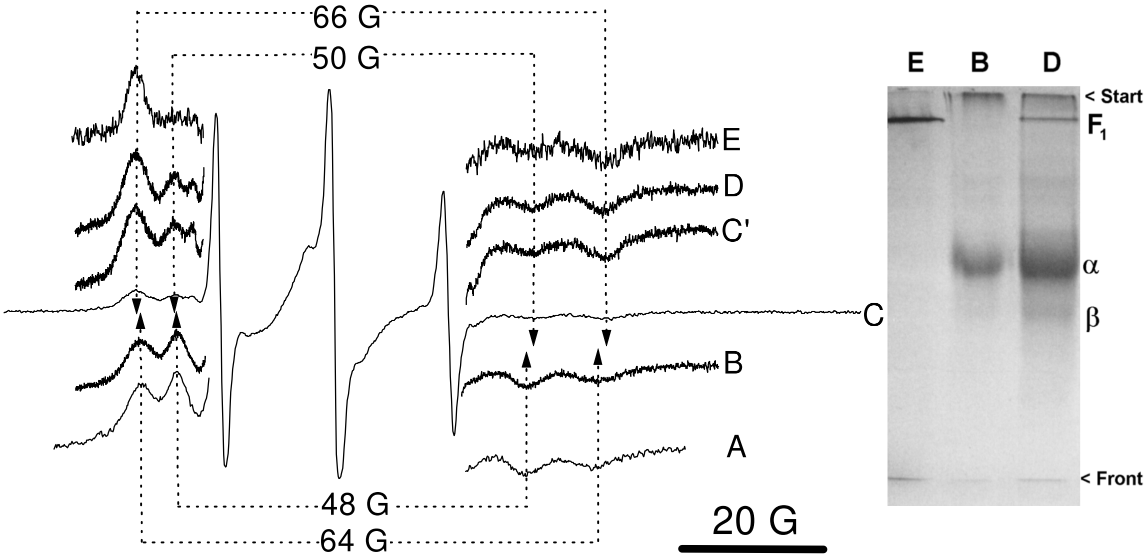


Abbildung 32: Rekombinationsassay: A: α(SL) nach Belichtung und Entfernung des ungebundenen Labels; B: α(SL)+β+γ (3:3:1); C, C': α(SL)+β+γ (3:3:1)+MgATP; D: α(SL)+β+γ nach Umpuffern in Rekombinationspuffer; E: EF_1 + 2-Azido-2',3'-SL-ATP (nicht kovalent). Blue-Native-Gel: Beschriftung wie die Spektren

Der Anteil des äußeren Signals nimmt gegenüber dem inneren zu, und die $2A_{zz}$-Werte werden größer, bis sie gleich denen im Holoenzym sind. Diese Veränderungen gehen schnell vonstatten, bereits nach 50 Minuten liegt das Spektrum C vor. Die Rekombination wurde zusätzlich durch ein Blue-Native-Gel verfolgt. Deutlich sichtbar ist, daß neben der Bande für den $\alpha_3\beta_3\gamma$-Komplex noch ein großer Anteil an freien Untereinheiten vorhanden ist (Abbildung 32, Bahn D)

Da, wie im Blue-Native-Gel sichtbar, selbst unter den Bedingungen wie in Abbildung 32 C freie Untereinheiten vorhanden waren, ist es klar, daß die beobachteten ESR-Spektren C und D überlagerte Spektren des rekombinierten Komplexes und der freien gelabelten α-Untereinheiten sein müssen. Der Versuch, die Untereinheiten durch Gelchromatographie vom rekombinierten Komplex zu trennen, scheiterte an den geringen Mengen.

3.2.5 Vergleich der isolierten Untereinheiten mit der F_1

Mit den durchgeführten ESR-spektroskopischen Untersuchungen konnten deutliche Unterschiede zwischen dem Komplex und den isolierten Untereinheiten im Bindungsverhalten von SL-ATP an die Bindungsstellen gefunden werden. Während zwei der katalytischen Bindungsstellen in der EF_1 eine hohe Affinität zu MgATP haben, wurde mit der isolierten β-Untereinheit keine Bindung gefunden. Die isolierten α-Untereiheiten konnten SL-ATP binden, aber im Gegensatz zu den nichtkatalytischen Bindungsstellen, bei denen mit verschiedenen SL-ATP nur ein stark aufgespaltenes ESR-Signal gefunden werden konnte, wurden hier Spektren gemessen, die bei den unterschiedlichen SL-ATP nicht nur stark variierten, sondern auch insgesamt Spektren mit (teilweise deutlich) geringeren Aufspaltungen zeigten.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3.1 bereits angesprochen wurde, ist es wahrscheinlich, daß die Konformationen der isolierten Untereinheiten sich von denen im Komplex unterscheiden, offensichtlich in der Art, daß die Spin-Label-Nukleotide eine größere „Bewegungsfreiheit“ haben als im Holoenzym, vergleichbar etwa mit der offenen katalytische Bindungsstelle. Benutzt man die Spektren von SL-ATP im Komplex mit der α-Untereinheit unter diesem Gesichtspunkt als Anhaltspunkt für die Interpretation der Spektren der EF_1, dann ließe sich das Verhalten des geringer aufgespaltenen Signals (kleinerer $2A_{zz}$-Wert) und der Intensitätsverhältnisse der Spektren von SL-ATP in der EF_1 neu interpretieren:

3'-Desoxy-2'-SL-ATP zeigt gebunden in der α-Untereinheit nur ein Signal. Ist das bei Bindung an die offene katalytische Bindungsstelle ebenso der Fall, würde das Intensitätsverhältnis von 3 : 1 (s. Abschnitt 3.1.3, Tabelle 3) das Besetzungsverhältnis der katalytischen Bindungsstellen wiedergeben. Bei insgesamt 2,3 besetzten Bindungsstellen entspräche das 1,7 besetzten „geschlossenen“ und 0,55 „offenen“ Bindungsstellen. Geht man von dieser Verteilung aus, ist bei 2',3'-SL-ATP die Intensität des inneren Signals gegenüber der des äußeren zu gering. Da 2',3'-SL-ATP in der α-Untereinheit jedoch zwei Signale zeigt, ist es möglich, daß SL-ATP in der offenen Bindungsstelle die Signalintensitäten auf inneres und äußeres Signal „verteilt“ und so eine falsche Besetzungsverteilung vorgetäuscht wird. 2'-d-3'-SL-ATP zeigt an α gebunden auch nur ein Signal, da dieses Analog jedoch insgesamt schwächer an die F_1 bindet, könnte man die geringe Intensität des inneren Signals dadurch erklären, daß im Vergleich zu den beiden geschlossenen Bindungsstellen weniger ATP in der offenen Bindungsstelle gebunden ist.

Man sollte aber nicht vergessen, daß die Vergleichbarkeit von isoliertem α und der offenen katalytischen Bindungsstelle rein spekulativ ist und daher nur als Anhaltspunkt und nicht als Modell für die Interpretation gesehen werden sollte.

3.3 Untersuchungen zum „Second Stalk“ der F_0F_1-ATP-Synthase

S. D. Dunn konnte durch Entfernen des N-terminalen hydrophoben Teils (1-24) der b-Untereinheit von F_o und durch Ersetzen desselben durch die kurze hydrophilere Aminosäuresequenz *MTMITNSH*VWPPL... (die nicht zu b gehörenden Aminosäuren sind *kursiv* geschrieben, die Sequenz der „normalen“ b-Untereinheit beginnt ab V25) eine lösliche Form der b-Untereinheit, kurz b_{sol} genannt, erhalten (Dunn 1992). Dieses Protein liegt als Dimer in Lösung vor, ist größtenteils α-helical und hemmt die Bindung von F_1 an die F_o. Es ist wahrscheinlich, daß die Struktur von b_{sol} weitgehend der des hydrophilen Teils der b-Untereinheit entspricht, und b_{sol} somit als Modell für Untersuchungen der b-F_1-Wechselwirkungen dienen kann.

Eine weitere Form von b, die bereits ab Y24 beginnt (Abbildung 33 zeigt die gesamte Sequenz) wird als b_{syn} bezeichnet (McLachlin und Dunn 1997). Von diesem Protein wurden in der Arbeitsgruppe von S. D. Dunn Mutanten hergestellt, bei denen an verschiedenen Stellen in der Aminosäuresequenz jeweils eine Aminosäure durch ein Cystein ersetzt wurde. Durch den Einsatz von SH-reaktiven Reagenzien war es möglich, an diesen Stellen jeweils einen Spin-Label einzuführen und mit diesem markierten Protein ESR-spektroskopische Untersuchungen durchzuführen.

M	*T*	*M*	*I*	*T*	*N*	*S*	*H*	Y	V	**W**	P	P	L	M	A	A	I	E	K	
								24						30						
R	Q	K	E	I	A	D	G	L	A	S	A	E	R	A	H	K	D	L	D	
				40										50						
L	A	K	A	S	**A**	**T**	D	Q	L	K	K	**A**	K	A	E	A	Q	V	I	
				60										70						
I	E	Q	A	N	K	R	R	**S**	Q	I	L	D	E	A	K	A	E	A	E	
				80										90						
Q	E	R	T	K	I	V	A	Q	A	Q	A	E	**I**	E	A	E	R	K	R	
				100										110						
A	R	E	E	L	R	K	Q	**V**	**A**	**I**	L	**A**	V	**A**	G	**A**	E	K	I	
				120										130						
I	E	**R**	**S**	V	D	E	A	A	N	**S**	D	I	V	D	**K**	L	V	A	**E**	L
				140										150						156

Abbildung 33: Sequenz von b_{syn} (McLachlin und Dunn 1997). Die Aminosäuren, die nicht zu b gehören sind kursiv, die Positionen der Cystein-Mutationen, die in dieser Arbeit betrachtet wurden sind fett gedruckt.

Untersuchungen dieser Art hat M. Kersten im Rahmen seiner Dissertation bereits für einige der Mutanten durchgeführt (Kersten 1999). Dabei wurden die ESR-Spektren von b_{syn} in Lösung sowie b_{syn} im Komplex mit F_1 untersucht. In dieser Arbeit sollten weitere Mutanten untersucht werden um weitere Informationen über die Struktur von b_{syn} und dessen F_1-Bindungsregionen zu erhalten. Weiterhin sollten Bindungsstudien der b-Mutanten an EF_1, bei der die δ-Untereinheit entfernt wurde (F_1-δ), in gleicher Weise durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob b auch ohne die δ-Untereinheit an die F_1 binden kann.

3.3.1 Isolierung und Spin-Markierung der bsyn-Mutanten

Die Mutanten T62C, A68C, I126C, D150C, K151C, E155C und 158C wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert. b_{syn} und die Mutanten W26C, R36C, A61C, S84C, A125C, S146C wurden von D. T. McLachlin, University of Western Ontario, London, Kanada, als Protein zur Verfügung gestellt, die Mutanten A130C und R138C wurden von M. Kersten, die Mutanten I109C, V124C, A128C, A132C und S139C von G. Kraft isoliert.

Die Mutanten W26C, R36C, A61C, A125C, I126C, A130C, R138C, S146C wurden im *E. coli* Stamm JM103 exprimiert, A68C in DH5α und alle anderen in JM109 wie unten beschrieben; die Plasmide wurden von S. D. Dunn, University of Western Ontario, London, Kanada, zur Verfügung gestellt.

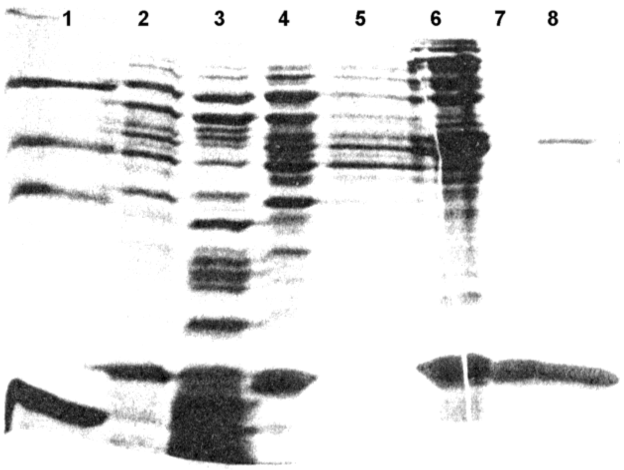


Abbildung 34: SDS-Gel einer b_{syn}-Isolierung. Bahn 1: Marker (BSA 68 kD, Ovalbumin 45 kD, LDH 36 kD, Cytochrom C 12,5 kD), Bahn 2: Lysat, Bahnen 3 und 4: Ultrazentrifugtion: Pellet und Überstand, Bahnen 5 und 6: $(NH_4)_2SO_4$-Fällung: Überstand und Präzipitat, Bahn 7: Enzym nach DEAE-Chromatographie, Bahn 8: b_{syn} „Wildtyp“ (von D. T. McLachlin zur Verfügung gestellt)

Die Isolierung der b-Mutanten wurde im wesentlichen nach McLachlin und Dunn (1997) durchgeführt, die verschiedenen Reinigungsstufen wurden durch Gelelektrophorese verfolgt (Abbildung 34). Die Zellen wurden durch Beschallen mit Ultraschall (zweimal 30 s) aufgeschlossen, Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation und Membranen wurden durch Ultrazentrifugation wie im Experimentellen Teil beschrieben abgetrennt. b_{syn} wurde anschließend durch Fällung mit 40% Ammoniumsulfat praktisch vollständig ausgefällt (Abbildung 34, Bahn 5: Überstand, Bahn 6: Präzipitat). Das wiederaufgelöste Pellet wurde nach Dialyse auf eine DEAE-Sepharose CL-6B Säule aufgetragen und ein NaCl-Gradient angelegt. Das Protein eluierte zwischen 40 und 80 mM NaCl. Da das auf diese Weise erhaltene Protein bereits sauber war (Bahn 7), wurde auf die in der Originalvorschrift beschriebene zweite Säule verzichtet. Nach Einengen mit einer Amicon PM 10-Membran wurde das Enzym bei –80°C eingefroren.

	DH5α/pDM40 bD150	JM109/pDM11 bT62C
Zellen [g]	5,3	4,0
Lysat [mg]	550	489
Überstand nach Ultrazentrifugation [mg]	199	109
Präzipitat der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung [mg]	3,8	68
Ausbeute [mg]	0	54

Tabelle 7: Isolierung der b_{syn}-Mutanten aus verschiedenen Stämmen aus jeweils 1 l Medium.

Der zunächst verwendete *E. coli* Stamm DH5α erwies sich als ungeeignet, da trotz Variation von Medium und Wachstumsbedingungen (Dauer, Schüttelgeschwindigkeit) kein b_{syn} isoliert werden konnte. Auf Empfehlung von S. D. Dunn wurden die Plasmide daraufhin in JM109 transformiert. Danach konnten sehr hohe Ausbeuten an b_{syn} erzielt werden (Tabelle 7).

Zum Labeln mit Iodacetamid-TEMPO (IAAT) wurde b_{syn} mittels Gelfiltration in HMK-Puffer (s. Experimenteller Teil) überführt, eine Stunde bei 4°C mit zehnfachem Überschuß an IAAT inkubiert und der überschüssige Spin-Label durch Gelfiltration entfernt. Das Protein wurde daraufhin auf etwa 60 µl aufkonzentriert (Centricon 10) und bei –80°C aufbewahrt.

3.3.2 Entfernen der δ-Untereinheit aus der F_1

Frühere Untersuchungen zeigten, daß die δ-Untereinheit maßgeblich an der Bindung der b-Untereinheit an die F_1 beteiligt ist (Rodgers *et al.* 1997). Ohne δ konnte bisher keine Bindung von b an die F_1 nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob mit ESR-Spektroskopie als Gleichgewichtsmethode möglicherweise Wechselwirkungen nachgewiesen werden können, sollten die spinmarkierten b-Untereinheiten auch zusammen mit EF_1 in Abwesenheit der δ-Untereinheit (F_1-δ) untersucht werden.

Die δ-Untereinheit wurde aus der EF_1 nach Smith *et al.* (1975) entfernt. Zwischen 2 und 10 mg EF_1 wurden mit 67% Ammoniumsulfat gefällt und in 100-150 µl Delta-Puffer (50 mM

Glycin-NaOH pH 9,4, 2 mM EDTA, 1 mM ATP und 10% Glycerin) aufgenommen. Die Proteinlösung wurde in Abwandlung der Literaturvorschrift auf eine Sephacryl S-300R (anstelle A-0.5 m Bio-Gel) Säule mit den Maßen 2,1 x 85 cm (Ausschlußvolumen 60 ml) aufgetragen. Die Elution wurde durch Absorption bei 277 nm verfolgt. Die Hauptfraktion eluierte nach 80 ml und enthielt stets F_1-δ in großer Reinheit (Abbildung 35). Die Proteinlösung wurde in Centricon 10 auf etwa 50 µl eingeengt, mit 2 ml ESR-Puffer verdünnt und erneut eingeengt. F_1-δ konnte in Ausbeuten von 25-35% bezogen auf die eingesetzte F_1 erhalten werden und hatte normale ATPase-Aktivität, die auch nach mehreren Monaten Lagern –80°C nicht abnahm. Im SDS-Gel wird erkennbar, daß neben der δ- auch die ε-Untereinheit zum Teil vom Enzym abgetrennt wird.

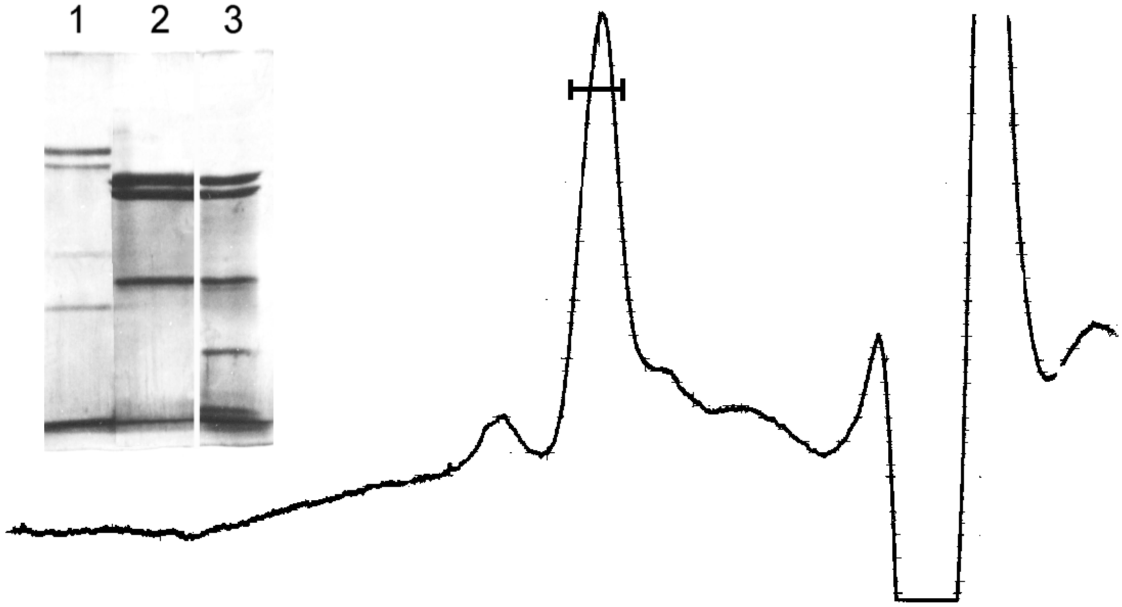


Abbildung 35: Elutionsdiagramm der Sephacryl S 300R-Säule und SDS-Gel: Bahn 1: Marker (BSA 68 kD, Pyruvat-Kinase 57 kD, LDH 36 kD, Chymotrypsinogen A 25 kD, Cytochrom C 12,5 kD); Bahn 2: F_1-δ; Bahn 3: EF_1

3.3.3 Untersuchung der Bindung von b an F_1 und F_1-δ mittels nativer zweidimensionaler Gelelektrophorese

Eine mögliche Bindung von b an die F_1 bzw. F_1-δ sollte mittels nativer Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die Blue-Native-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.2.2.2) erwies sich als ungeeignet, da die Untereinheiten δ (Abbildung 29, Pfeil) und b (nicht gezeigt) während der Elektrophorese von der F_1 abdissoziierten. Statt dessen fand eine Methode von Cox *et al.* (1978) Anwendung. Dabei sollte das kleine Protein b von den großen Proteinen F_1 bzw. F_1-δ und deren Komplexen mit b getrennt werden. Da sich F_1 und der F_1/b_2 Komplex auf diesem Gel nicht unterscheiden ließen (Abbildung 36, Bahn 1), wurde die zugehörige Proteinbande ausgeschnitten und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Für native Gele wurden 25 µg, für zweidimensionale Gele je 40 µg Protein aufgetragen. Abbildung 36, Bahn 4 zeigt ein Gel, bei dem F_1b_2 mit einem achtfachen Überschuß an freiem b_2 aufgetragen wurde. Man sieht, daß einerseits F_1 von freiem b getrennt, jedoch F_1-gebundenes b am Enzym gehalten wird. Die Bahnen 5 und 6 zeigen mit F_1+b_{A68C} (5) bzw. F_1+b_{A128C} (6) zwei Mutanten, deren ESR-Spektren nicht eindeutig die Bildung eine F_1-b_2 Komplexes zeigten (Abschnitt 3.3.4.2). In beiden Fällen ist im Zweidimensionalen Gel erkennbar, daß der Komplex gebildet wurde. Die Bindung von b an die F_1 geschieht also wahrscheinlich in einem Bereich von b, der keinen Einfluß auf die Mobilität des Spin-Labels an diesen Positionen hat. Gleiches gilt für Bahn 7: F_1-δ+b_{I126C}.

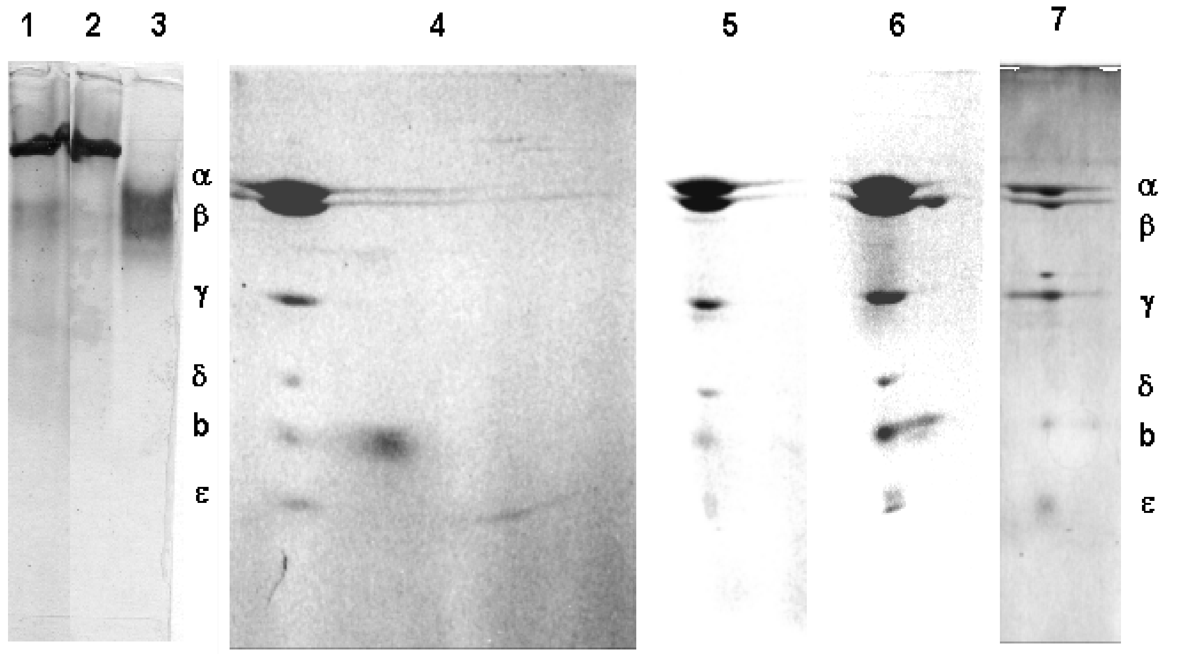


Abbildung 36: Zweidimensionale Gele zum Nachweis der Bindung von b_{syn} an die F_1: Bahnen 1 - 3: natives Gel von F_1+b, F_1 und b, Bahn 4: 2D-Gel von F_1+b_{I126C} (1:8), Bahn 5: F_1+b_{A68C}, Bahn 6: F_1+b_{A128C}, Bahn 7: F_1-δ+b_{I126C}

3.3.4 ESR-spektroskopische Untersuchung der spinmarkierten Mutanten von b_{syn}

ESR-spektroskopische Untersuchungen der an den unterschiedlichen Positionen markierten b_{syn}-Mutanten sollten Aussagen über die strukturellen Merkmale der b-Untereinheit ermöglichen. Darüber hinaus sollten mit Spektren der spinmarkierten b_{syn}-Mutanten im Komplex mit F_1 in An- und Abwesenheit der δ-Untereinheit und dem Vergleich mit den Spektren von freiem b_{syn} Aussagen über die Bindungsregionen zwischen F_1 und b bzw. über Strukturänderungen innerhalb der b-Untereinheit gemacht werden. Die aufgenommenen

Spektren von freiem b_{syn} und b_{syn} im Komplex mit F_1 bzw. F_1-δ sind in Abbildung 37 dargestellt.

Die Spektren von b_{syn} mit einem Spin-Label an der Position 61, sowie die F_1/b-Komplexe mit Radikalen an den Positionen 26, 36, 61 und 125 der b-Untereinheit wurden von Michael Kersten aufgenommen (Kersten 1999), ebenso F_1/b mit Spin-Label an Positionen 130 und 146, diese wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit reproduziert.

3.3.4.1 b_{syn} in Lösung

Um Informationen über die Struktur der b-Untereinheiten zu erhalten, sollten die ESR-Spektren von spinmarkiertem b_{syn} in Lösung aufgenommen werden. Die spinmarkierten b-Mutanten wurden in ESR-Puffer (50 mM TrisHCl, pH 7,5 + 10% Glycerin) + 300 mM KCl vermessen. Die Proteinkonzentration betrug dabei zwischen 30 und 40 µM (bezogen auf b_{syn} (dimer), M=30900 Da).

Wie in Abschnitt 1.2.7 beschrieben, stellt die Rotationskorrelationszeit τ_R ein Maß für die Beweglichkeit des Spin-Labels dar. Gleichung 22 gilt jedoch nur für Spin-Label, die von Wasser umgeben sind. Da jedoch nicht bekannt ist, ob und welche Teile der b-Untereinheit einen Kontakt zu weniger polaren Proteinoberflächen haben, besteht die Möglichkeit, daß die nach Gleichung 22 berechneten Rotationskorrelationszeiten τ_R nicht mit den wirklichen übereinstimmen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nicht die Rotationskorrelationszeit τ_R verwendet, sondern das Verhältnis der Peakhöhen des Hochfeldsignals zum Mittelfeldsignal (kurz H/M). Allgemein gilt: je größer das H/M-Verhältnis, um so kleiner sind die Rotationskorrelationszeiten, um so größer ist die Beweglichkeit. Darüber hinaus gilt, daß geringere Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisse auch als Zeichen für eine polarere Umgebung angesehen werden kann.

Alle gelabelten b-Mutanten weisen ESR-Signale mit einer Aufspaltung von 34 G auf, was der Aufspaltung von stark mobilem TEMPO in Wasser entspricht. Eine Ausnahme stellt die Mutante I109C dar, die neben der 34 G Komponente zusätzliche Komponenten bei 47-49 G bzw. 61-63 G aufweist. Auch die Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisse (Tabelle 8) sind in den meisten Positionen um 0,40±0,07 (zum Vergleich: TEMPO in wäßriger Lösung: 0,91). Ausnahmen sind die Positionen 109, 125 und 130, die geringere H/M-Verhältnisse zeigen (0,21 bei 109, ansonsten um 0,30). Dagegen liegen die H/M-Verhältnisse bei den an Position 26, 61, 150 bzw. 158 markierten Mutanten bei 0,50 bzw. 0,60 und weisen auf eine höhere Mobilität in diesen Bereichen hin. Radikale in benachbarten Positionen können deutliche Unterschiede aufweisen. Ein Beispiel sind die Mutanten mit Label an Position 61 (Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnis 0,49) und Position 62 (0,33), diese sind in einer Region, in der wahrscheinlich zwei parallele α-Helices (McLachlin und Dunn 1997) oder eine Coiled Coil-

Struktur vorliegen (Cohen und Parry 1990), und deshalb zwei in der Sequenz benachbarte Aminosäuren völlig unterschiedliche Umgebungen haben können.

Position	H:M-Verhältnis			Differenz H:M b mit	
	b	$(F_1\text{-}\delta)$b	F_1b	$(F_1\text{-}\delta)$b	F_1b
26	0,50	0,48	0,49	0,02	0,01
36	0,37	0,38	0,35	-0,01	0,02
61	0,49		0,41		0,08
62	0,33	0,30	0,23	0,03	0,10
68	0,44	0,39	0,39	0,05	0,05
84	0,41	0,42	0,25	-0,01	0,16
109	0,23	0,24	0,20	-0,01	0,03
124	0,33	0,33	0,32	0,00	0,01
125	0,32	0,33	0,18	-0,01	0,14
126	0,34	0,35	0,18	-0,01	0,16
128	0,40	0,38	0,38	0,02	0,02
130	0,32	0,33	0,19	-0,01	0,13
132	0,44	0,43	0,44	0,01	0,00
138	0,44	0,45	0,26	-0,01	0,18
139	0,40	0,34	0,21	0,06	0,19
146	0,44	0,40	0,26	0,04	0,18
150	0,48	0,46	0,25	0,02	0,23
151	0,44	0,43	0,29	0,01	0,15
155	0,39	0,38	0,20	0,01	0,19
158	0,61	0,54	0,40	0,07	0,21

Tabelle 8: Hochfeld : Mittelfeld-Verhältnisse der ESR-Spektren der b_{syn}-Mutanten in Lösung und in Komplex mit F_1 bzw. F_1-δ sowie die Differenzen der H:M-Verhältnisse der Spektren der Komplexe und b_{syn} in Lösung

Die insgesamt recht ähnlichen Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisse lassen darauf schließen, daß der b-Dimer über weite Teile eine vergleichbare Struktur besitzt.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Mutante I109C, die als einzige bereits im freien b neben dem mobilen (34 G) Signal zwei weitere (47-49 G und 61-63 G) Komponenten im ESR-Spektrum zeigt. Sie liegt in einer Region, in der Struktur und Funktion ungeklärt sind. Möglicherweise liegt hier eine etwas kompliziertere Tertiär- oder Supersekundärstruktur vor, bei der die Mobilität der Spin-Label durch andere Teile des Proteins eingeschränkt wird.

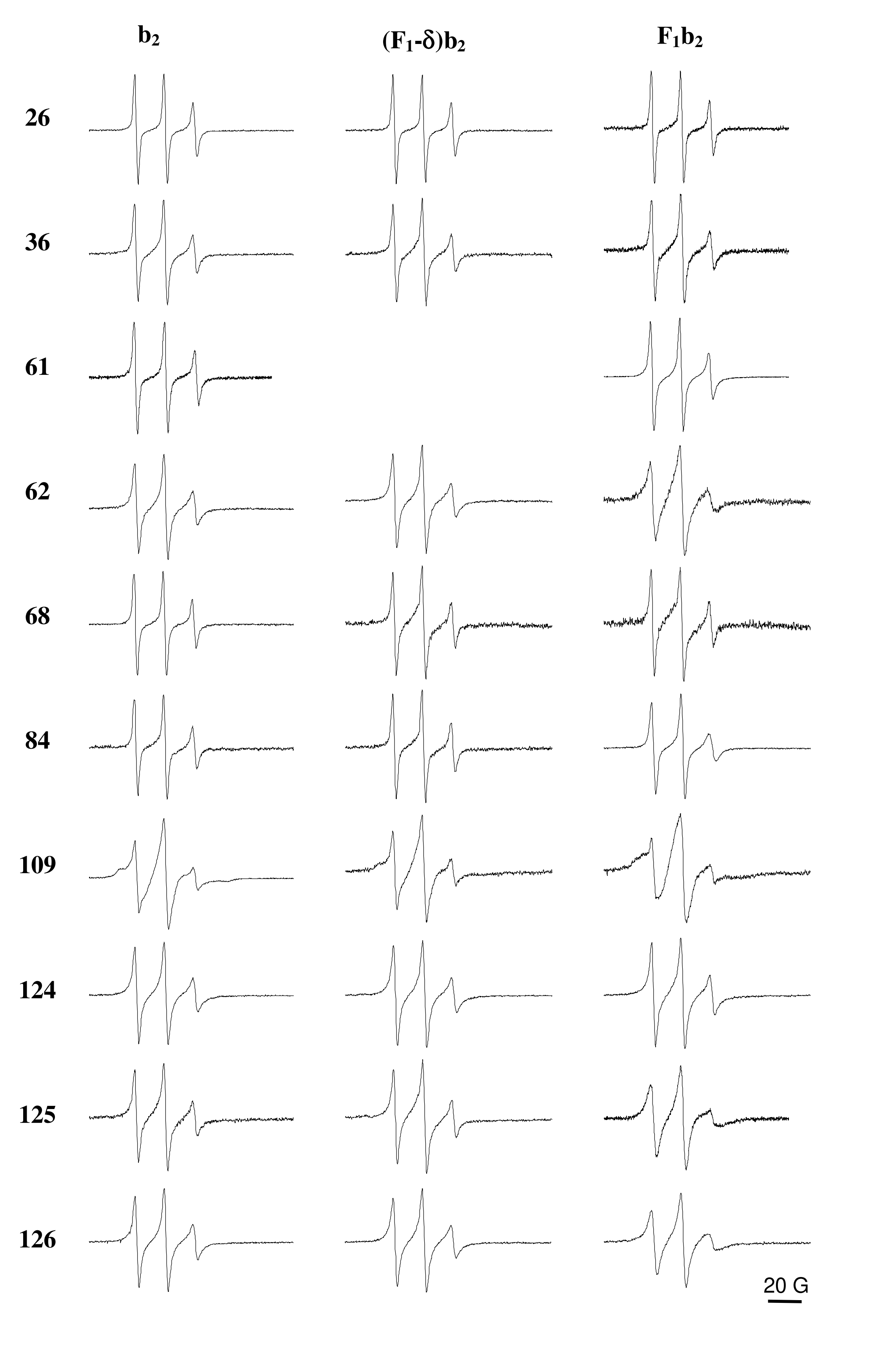


Abbildung 37a: ESR-Spektren der vermessenen b-Mutanten in Lösung und im Komplex mit EF_1-δ und EF_1

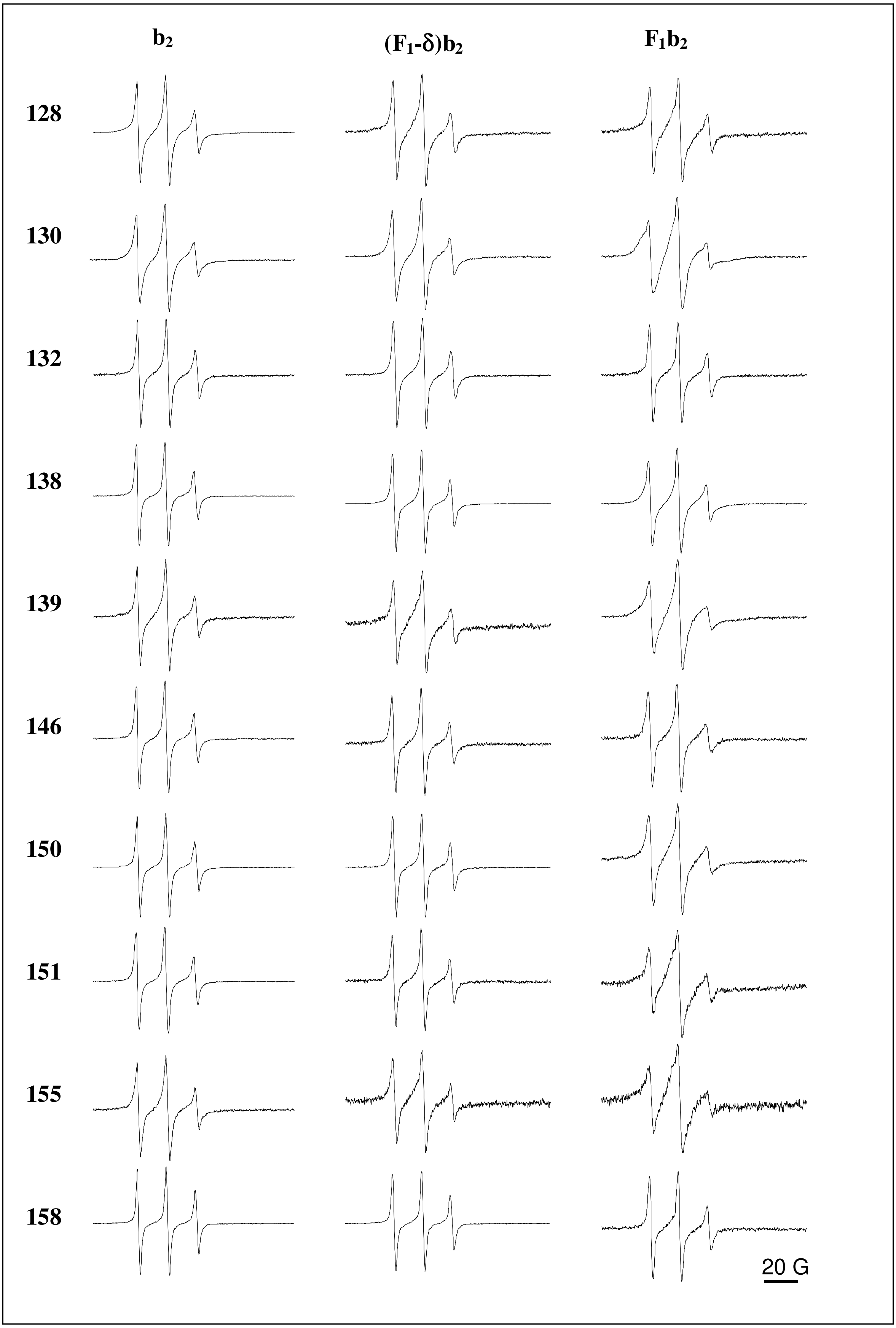


Abbildung 37b: ESR-Spektren der vermessenen b-Mutanten in Lösung und im Komplex mit EF_1-δ und EF_1

3.3.4.2 b in Komplex mit F_1 bzw. F_1-δ

Um Informationen über Strukturänderungen bei der Bindung von b_{syn} an F_1 zu gewinnen, wurden ESR-Spektren der Spinmarkierten b_{syn}-Mutanten im Komplex mit F_1 in An- und Abwesenheit der δ-Untereinheit aufgenommen. b_{syn} wurde mit F_1 (40-60 µM) in ESR-Puffer + 300 mM KCl gemischt. Die Spektren wurden sofort, nach mehreren Stunden und bei einigen Mutanten auch nach mehreren Monaten vermessen. Die Spektrenform zeigt auch nach mehreren Monaten Lagern der Lösung bei –80°C keine Änderung gegenüber dem sofort nach dem Mischen aufgenommenen. Offensichtlich bindet der b-Dimer schnell an die F_1 und bleibt dann gebunden.

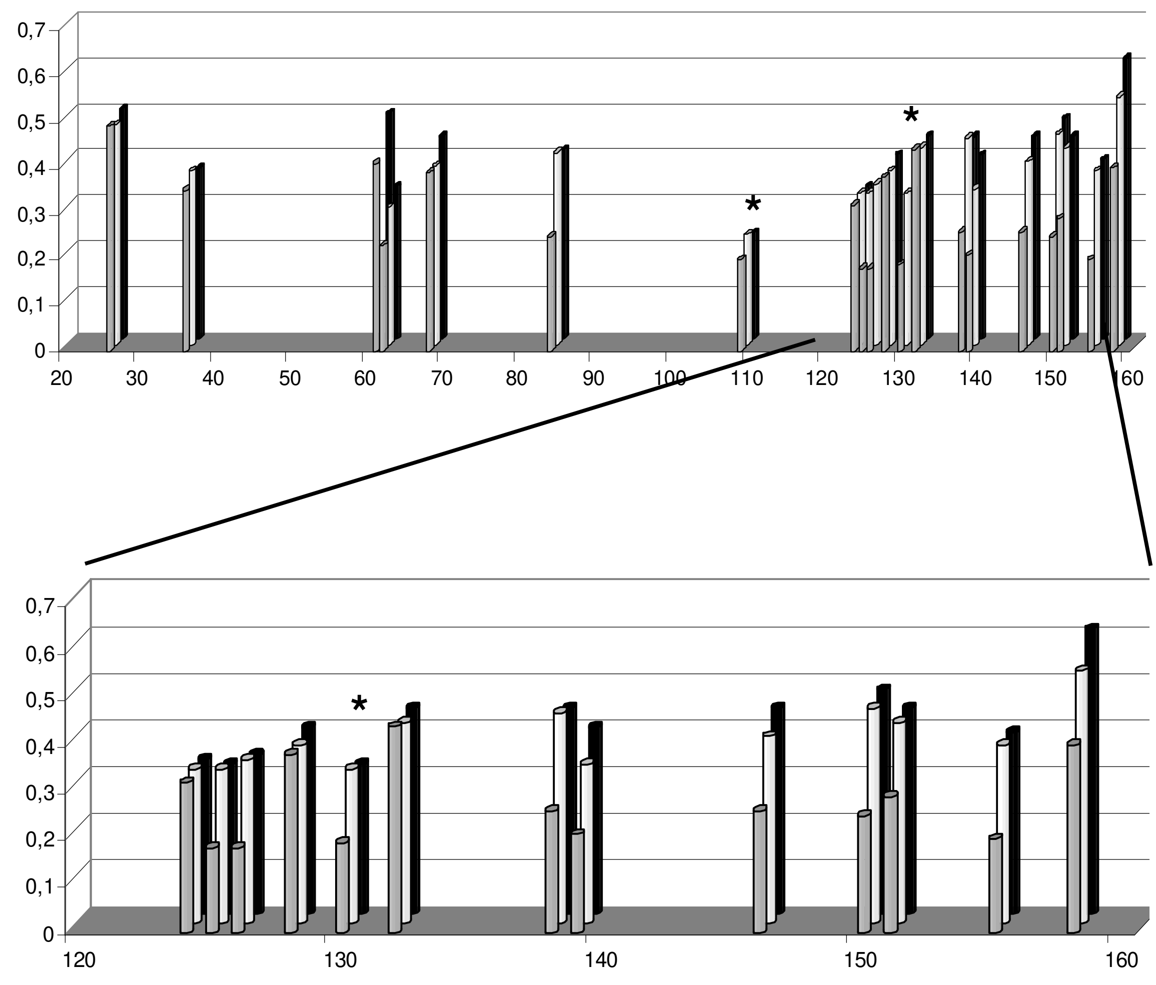


Abbildung 38: Graphische Darstellung des Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisses der ESR-Spektren der verschiedenen spinmarkierten Mutanten in Lösung, bzw. in Komplex mit F_1 und F_1-δ. Vordere Reihe (grau): F_1/b_{syn}, mittlere Reihe (weiß): F_1-δ/b_{syn}, hintere Reihe (schwarz): b_{syn}. Die Sterne (*) deuten das Vorhandensein von weiteren spektralen Komponenten an.

Um eine geeignete Konzentration von b_{syn} zu finden, bei der das ESR-Spektrum deutlich aufgenommen werden kann, andererseits aber keine freien b-Untereinheiten mehr vorliegen, wurden für die Mutanten bI126C und bS139C verschiedene Konzentrationen von b_{syn} zur F_1-Lösung zutitriert (Abbildung 38), entsprechend wurde mit b158C und F_1-δ verfahren.

Ein Vergleich der Spektren zeigte, daß ab einem zweifachen Überschuß von F_1 gegenüber dem b_{syn}-Dimer die Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisse der gemessenen Spektren gleich waren. Sie nahmen jedoch zu, sobald b_{syn} in höheren Konzentrationen zugegeben wurde.

Xiao und Penefsky (1994) haben gefunden, daß die EF_1 teilweise die δ-Untereinheit bei der Aufarbeitung verliert. Möglicherweise ist das teilweise Fehlen der δ-Untereinheit ein Grund für die Abweichung der Titrationskurve von den theoretisch ermittelten. Die Tatsache, daß bei F_1-δ die H:M-Verhältnisse erst bei einem Verhältnis b (dimer) : F_1 von mehr als 1:1 ansteigen, untermauert diese Erklärung.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle Spektren der F_1-b_2-Komplexe mit einem mindestens zweifachen Überschuß an F_1 aufgenommen.

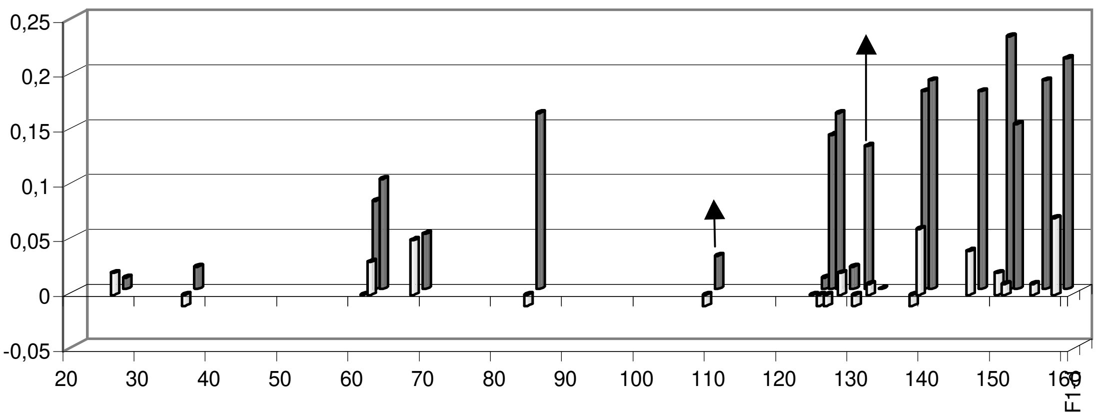


Abbildung 39: Differenz der Hochfeld/Mittelfeld-Verhältnisse von b_{syn} mit F_1 bzw. F_1-δ und freiem b_{syn} (bei den Positionen 109 und 130 wird nur die mobile Komponente betrachtet, die Pfeile deuten das Vorhandensein von zusätzlichen spektralen Komponenten, die Hinweise auf starke Immobilisierung sind, an).

Bei fast allen Mutanten zeigt sich im Komplex mit F_1 eine stärkere Immobilisierung als bei den freien b-Mutanten. Insgesamt sieht man eine Tendenz dahingehend, daß in Richtung C-Terminus der Unterschied der Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisse zunimmt (Abbildung 39), was die Vermutung nahelegt, daß die Bindung von b an die F_1 in Richtung des C-Terminus stärkeren Einfluß auf die Struktur hat. Das ist konform mit den Ergebnissen von anderen

Gruppen, die am C-Terminus von b die Hauptkontaktstelle für die Bindung an die F_1 sehen (Beckers *et al.* 1992, McLachlin *et al.* 1998, Takeyama *et al.* 1988).

Bei der Mutante, die an der Position 109 gelabelt wurde, sieht man nur wenig Änderungen am mobilen Signal, jedoch eine deutliche Zunahme der Signalkomponenten bei 61 G und 47-49 G (Abbildung 37 und Abbildung 40). Bei der Mutante an Position 130 wird eine zweite, immobilere Signalkomponente bei 50 G sichtbar. Auf diese Mutante wird weiter unten näher eingegangen.

Um bei den Spektren, die aus zwei oder mehr Komponenten bestehen, die stärker aufgespaltenen Signalkomponenten deutlich sichtbar zu machen, wurde jeweils ein Spektrum, das nur eine (mobile) Komponente zeigte von diesen Spektren subtrahiert. Die zu subtrahierenden Spektren wurden so ausgewählt, daß das Differenzspektrum möglichst nur noch die immobilen Komponenten zeigt. In Abbildung 40 sind diese Differenzspektren gezeigt. Von den Spektren von b109 bzw. F_1/b109 wurde das Spektrum von b62 abgezogen, vom Spektrum von F_1/b130 wurde das von F_1/b138 subtrahiert.

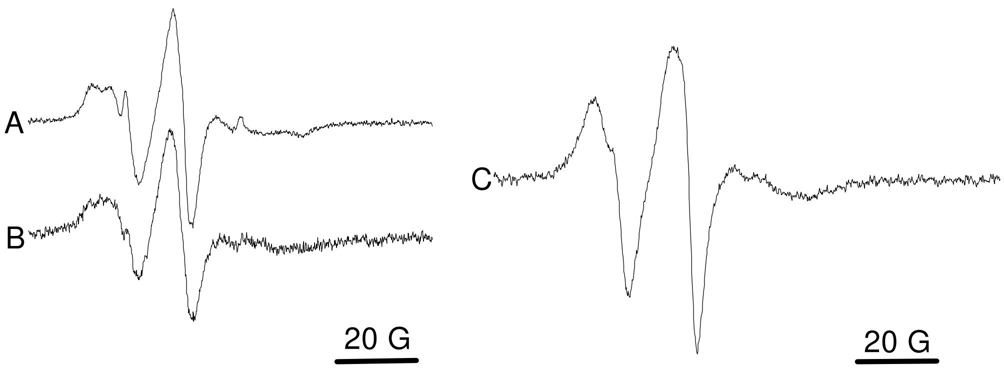


Abbildung 40: Differenzspektren der höher aufgespaltenen Anteile der ESR-Spektren von A: b109, B: F_1/b109 und C: F_1/b130. Bildung der Differenzspektren wie im Text beschrieben.

Ebenfalls eine starke Änderung findet man an Position 84. Diese ist jedoch weit von der postulierten F_1-Bindungsregion entfernt, in einem Bereich, in dem eine nicht helicale Struktur postuliert ist (Rodgers *et al.* 1997, Rodgers und Capaldi 1998). Sorgen *et al.* (1998b) und Rodgers und Capaldi (1998) haben angenommen, daß eine flexible b-Untereinheit wichtig ist für die Funktion der ATP-Synthase. Es ist denkbar, daß der Bereich um die Position 84 eine Region ist, die flexible Eigenschaften besitzt. Möglicherweise wird die Struktur deshalb bei der

Bindung an die F_1 hier verändert, obwohl sich die eigentlichen Bindungsregionen an anderen Stellen der b-Untereinheit befinden.

Obwohl zweidimensionale Gele (Abbildung 36, Bahn 7) belegen, daß b auch an die F_1-δ bindet, zeigen fast alle Mutanten Spektren, die denen der entsprechenden freien b_{syn}-Mutante entsprechen. Ausnahmen zeigen lediglich die an den Positionen 68, 139 und 158 markierten Proteine, die etwas geringere Hochfeld / Mittelfeld-Verhältnisse als das freie Protein, und somit eine nachweisbare Veränderung im ESR-Spektrum bedingt durch (F_1-δ)-b-Wechselwirkungen aufweisen. Es ist somit wahrscheinlich, daß die b-Untereinheit außer über δ noch weitere Kontakte mit der EF_1 hat, der Hauptkontakt findet jedoch wahrscheinlich über die δ-Untereinheit statt. Die Tatsache, daß man gerade an den Positionen 125, 126 und 130, an denen starke Änderungen der H/M-Verhältnisse bei Bindung von b_{syn} an die F_1 detektierbar sind, keine Änderungen bei Bindung an F_1-δ findet, deutet darauf hin, daß sich die Kontaktstellen für die Bindung an δ an anderen Stellen befinden, wie die Kontaktstellen für Bindung an α oder β. Darüber hinaus spricht dieses Ergebnis gegen die Möglichkeit, daß es sich bei den gemessenen Änderungen um Artefakte handelt, die durch nicht vollständig entfernte δ-Untereinheiten verursacht werden.

3.3.4.3 Die helicale Region von 124 bis 139

Im Bereich von 124 bis 139 ist das Vorliegen zweier paralleler α-Helices vermutet (Howitt *et al.* 1996, McLachlin und Dunn 1997). Die Aminosäurepositionen lassen sich grob in zwei Klassen einteilen: Aminosäuren, die in Richtung der anderen Helix zeigen (die „innen“ liegen), und solche, die „außen“ liegen. Bei den gelabelten Mutanten sind das innen 124, 128, 132 und 139, und außen 125, 126, 130 und 138 (Abbildung 41).

Interessanterweise zeigen die Mutanten im Komplex mit F_1 mit dem Spin-Label in den Positionen 124, 128 und 132 keine Änderung der ESR-Signale gegenüber freiem b_{syn}. Eine naheliegende Erklärung wäre zunächst, daß die Untereinheiten nicht dimerisieren können, wenn sich der Spin-Label an diesen Positionen befindet. Howitt *et al.* (1996) haben gezeigt, daß durch Ersetzen der unpolaren Aminosäuren an den Positionen 124, 128 und 131 durch Aspartat die Dimerisierung verhindert wird. Da nur die dimere Form an F_1 bindet (Sorgen *et al.* 1998a), würden die Monomere nicht binden. Abstandsmessungen mittels ESR-Spektroskopie zeigen jedoch, daß die Spin-Label gerade in diesen Positionen sehr geringe Abstände voneinander haben (G. Kraft, persönliche Mitteilung), somit also die dimere Form vorliegen muß. 2D-Gelelektrophorese (Abbildung 36, Bahn 6) zeigt ebenfalls, daß diese b-Mutanten an die F_1 binden. Daraus folgt, daß trotz nachgewiesener Bindung keine Änderung der ESR-Spektren an diesen Positionen stattfindet. Es ist denkbar, daß in diesem Bereich eine rigide Struktur an der Kontaktstelle zweier paralleler α-Helices (Howitt *et al.* 1996, McLachlin und Dunn 1997) vorliegt, die bei Bindung an die F_1 keine detektierbare Veränderung mitmacht. Da sich jedoch die Abstände der Spin-Label bei der Bindung an die F_1 ändern (G. Kraft, persönliche Mitteilung), ist es wahrscheinlich, daß sich die Helices zwar insgesamt bewegen, ohne daß sich die direkte Umgebung des Spin-Labels verändert. Im Gegensatz dazu zeigt die an Position 139 gelabelte Mutante eine sehr deutliche Veränderung des Spektrums bei Bindung. Möglicherweise ist die Struktur an dieser Stelle nicht mehr so stabil, wie das bei den anderen Mutanten der Fall ist. Da die Position 139 bereits zwei volle Umdrehungen der Helix vom hydrophoben Bereich entfernt ist, ist diese Erklärung naheliegend.

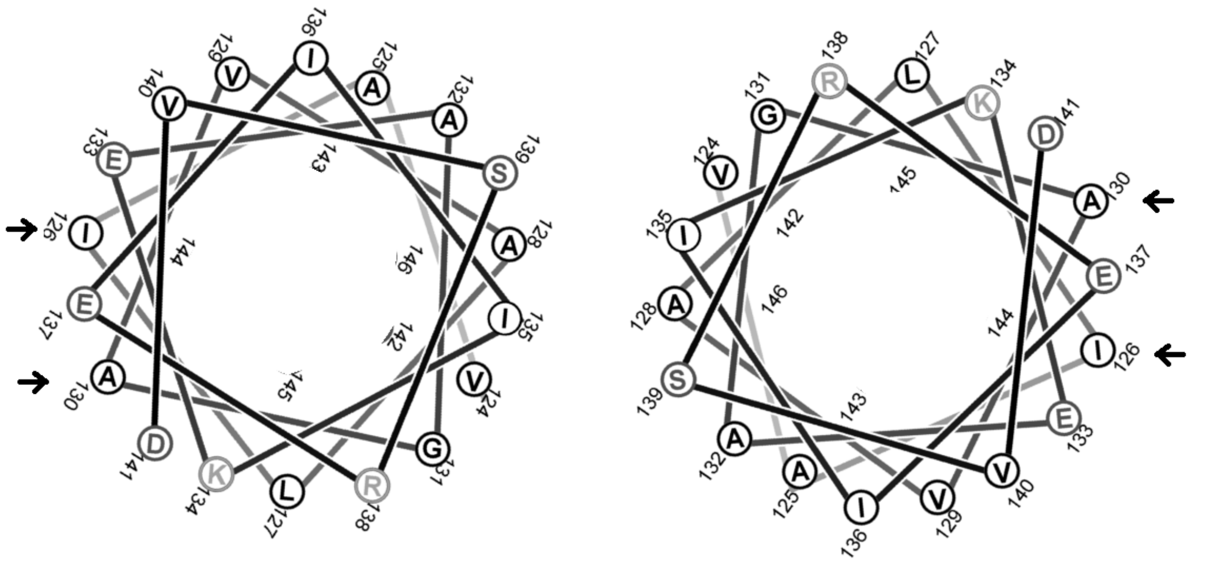


Abbildung 41: *Helical Wheel* Darstellung des Bereichs 124-139 als *Side by Side* Helices. Die relative Anordnung der Helices zueinander ist rein spekulativ und wurde so gewählt, daß die Aminosäuren, deren Cys-Mutanten Disulfidbrücken bilden können, zueinander orientiert sind.

Von den „äußeren“ Aminosäuren fällt die an Position 130 gelabelte Mutante am meisten auf. Betrachtet man das Spektrum von F_1 im Komplex mit bA130C, dann fällt auf, daß es aus einer mobilen (34 G) und einer immobilen Komponente (49-50 G) besteht. Da die immobile Komponente im Spektrum des Komplexes $(F_1\text{-}\delta)b_2$ nicht sichtbar ist, wird die Immobilisierung offensichtlich durch einen direkten Kontakt mit δ verursacht. I126 hingegen zeigt kein „Zweikomponenten-Spektrum“, obwohl die Position auf der gleichen Seite der Helix wie A130 liegen sollte (Abbildung 41, Pfeile), allerdings eine Windung weiter in Richtung N-Terminus. Offensichtlich ist diese Aminosäure weit genug von der Kontaktstelle entfernt, um ein deutlich anderes Verhalten zu zeigen.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß zumindest in einigen Teilbereichen des b-Dimers nur eine der beiden b-Untereinheiten einen direkten Kontakt mit δ hat, während die andere von der Bindung an F_1 mehr oder minder unbeeinflußt bleibt. Auf diese Weise ließe sich die freie Komponente des Spektrums von F_1/bA130C deuten. Es ist wahrscheinlich, daß auch an anderen Positionen (zumindest F_1/bI126C) die beiden Spin-Label des Dimers zwei verschiedene Konformationen besitzen, da die resultierenden Spektren hier jedoch eine ähnliche Aufspaltung besitzen, ist möglicherweise nur ein einziges Spektrum erkennbar.

3.3.4.4 Die Rolle der δ-Untereinheiten

Gibt man zu den $(F_1$-δ)(bA130C)$_2$-Lösungen freie δ-Untereinheiten (Fraktion 2 der Untereinheiten-Isolierung, Abschnitt 3.2.1) zu, so erhält man sofort gleichen Spektren die identisch sind mit denen der F_1-b_2-Komplexe (Abbildung 42 zeigt die Spektren für den Versuch mit b). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit den Mutanten 62, 109 und 150 erzielt (Stichproben über die gesamte Länge, bei denen die Unterschiede zwischen F_1/b_2 und F_1-δ/b_2 sehr deutlich sind).

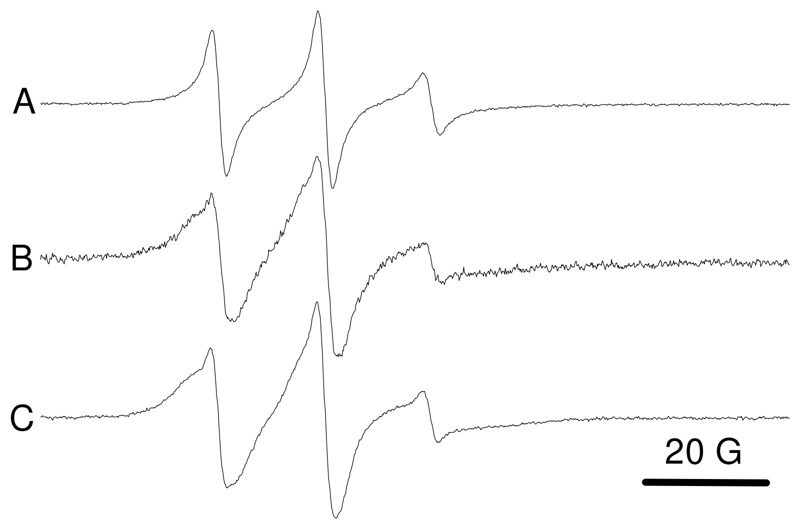


Abbildung 42: Nachträgliche Zugabe von δ zum F_1-δ/b_2-Komplex: A: F_1-δ/bA130C; B: F_1-δ/bA130C nach Zugabe von δ; C: F_1/bA130C

δ kann also auch nachträglich eingebaut werden und mit den anderen Untereinheiten zum vollständigen F_1-Komplex rekombinieren. Möglicherweise bindet der b-Dimer so an der F_1, daß δ nachträglich eingebaut werden kann. Wahrscheinlich wäre auch ein Gleichgewicht wie folgt:

$$F_1\text{-}\delta\ b_2 \rightleftharpoons F_1\text{-}\delta + b_2 \quad (1)$$

$$F_1\text{-}\delta + \delta \rightleftharpoons F_1 \quad (2)$$

$$F_1 + b_2 \rightleftharpoons (F_1)b_2 \quad (3)$$

Würde Gleichgewicht (2) stark auf der rechten Seite liegen, würde auf diese Weise Gleichgewicht (1) durch Entfernen von F_1-δ ebenfalls auf die rechte Seite verschoben werden, so daß letztendlich der $(F_1)b_2$-Komplex in der Bilanz bevorzugt wäre.

Um zu überprüfen, ob die Untereinheit b auch mit freier Untereinheit δ assoziiert, wurden b126, b130 und b139 (gewählt, da bei diesen Mutanten die Spektren von b_2 und F_1b_2 deutliche Unterschiede zeigten) mit freiem δ gemischt. Die resultierenden ESR-Spektren zeigen jedoch keine Änderung gegenüber denen von freiem b, so daß darauf zu schließen ist, daß entweder kein b_2δ-Komplex entsteht, oder der Kontakt mit freiem δ anders ist als der mit δ in der F_1 und im ESR-Spektrum unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden kann.

4 Zusammenfassung

In früheren Experimenten in diesem Arbeitskreis (Lösel *et al.* 1997, Motz 1995) wurden Hinweise gefunden, daß in den katalytischen Bindungsstellen der EF_1 gebundenes SL-ATP zu ESR-Spektren mit zwei Signalen führt. In der hier vorliegeden Arbeit sollten spezifisch die katalytischen Bindungsstellen mit verschiedenen SL-ATP Derivaten untersucht werden. Neben Wildtyp-EF_1 wurde dazu eine Mutante, die in den nichtkatalytischen Bindungsstellen keine Nukleotide bindet (αD261N/αR365W, Weber *et al.* 1995), verwendet.

Titrationsexperimente zeigten, daß sowohl die Bindungskurven als auch die Spektren aller verwendeten SL-ATP-Derivate für den Wildtyp und die αD261N/αR365W-Mutante identisch sind. Das heißt, daß bei der Untersuchung von nicht nukleotidbefreiter („nativer") EF_1 mit SL-ATP nur die katalytischen Bindungsstellen betrachtet werden.

„Native" (d.h. nicht nukleotidbefreite) Wildtyp-F_1 und die αD261N/αR365W-Mutante binden beide im Mittel 2,3 mol 2',3'-SL-ATP pro mol F_1, 2'-Desoxy-3'-SL-ATP dagegen konnte nur 1,5 Bindungsstellen pro Enzym besetzen, was wahrscheinlich auf das Fehlen der 2'-OH-Gruppe zurückzuführen ist. Im Komplex mit „nativer" F_1 zeigt 2',3'-SL-ADP zwei Signale mit den gleichen Aufspaltungen wie 2',3'-SL-ATP, der Anteil des Signals mit der geringeren Aufspaltung hat jedoch gegenüber dem äußeren zugenommen. Mit 2',3'-SL-ADP lassen sich maximal 2,9 Bindungsstellen der „nativen" F_1 besetzen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß zwei der drei katalytischen Bindungsstellen zum äußeren Signal beitragen, während die dritte das innere Signal hervorruft. Während diese von SL-ADP vollständig besetzt werden kann, bindet SL-ATP unter den hier vorliegenden Bedingungen nur teilweise an diese Bindungsstelle.

Mit den Untereinheiten α und β wurden Titrationen mit den verschiedenen SL-ATP-Analoga in gleicher Weise wie die Versuche mit der EF_1 durchgeführt. Die α-Untereinheit konnte 0,8-0,9 mol der verwendeten SL-ATP pro mol Enzym binden. Mit der β-Untereinheit wurde keine Bindung beobachtet.

Das ESR-Spektrum der isolierten α-Untereinheit in Komplex mit 2',3'-SL-ATP besteht aus zwei Komponenten. Die SL-ATP-Derivate, bei denen der Spin-Label entweder an der 2'- oder 3'-Position fixiert ist, zeigen in Komplex mit α jedoch nur eine Signalkomponente. Die beobachteten $2A_{zz}$-Werte unterscheiden sich stark in Abhängigkeit von der Position des Spin-Labels. Da alle SL-ATP in den nichtkatalytischen Bindungsstellen im Holoenzym nur ein einziges, stark immobilisiertes Signal zeigen, ist es wahrscheinlich, daß sich bei der Rekombination die Struktur der Bindungsstelle drastisch ändert.

Um die Bindung der F_1 an den F_o-Teil und die Struktur des aus den b- und δ-Untereinheiten gebildeten zweiten Stiels zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten der wasserlöslichen

Form der b-Untereinheit (b_{syn}) mit IodacetamidTEMPO markiert. Das System F_1/b_{syn} wurde mit den an unterschiedlichen Positionen markierten b_{syn}-Mutanten ESR-spektroskopisch untersucht. Dabei wurden Spektren von freiem b_{syn} sowie b_{syn} im Komplex mit F_1 und F_1-δ aufgenommen.

Alle gelabelten b-Mutanten weisen ähnliche ESR-Spektren von stark mobilen Spin-Labeln auf, an einzelnen Positionen weicht das Peakhöhenverhältnis Hochfeldpeak : Mittelfeldpeak jedoch relativ stark vom Mittelwert von etwa 0,40 ab. In der Sequenz direkt benachbarte Mutationen können dabei deutliche Unterschiede aufweisen. Die deutlichste Ausnahme stellt die Mutante I109C dar, die zwei zusätzliche Komponenten mit höherer Aufspaltung aufweist. Die ähnlichen Werte lassen darauf schließen, daß der b-Dimer über weite Teile eine vergleichbare Struktur besitzt.

Die Bindung von b_{syn} an die F_1 und an F_1-δ konnte mittels nativer Gelelektrophorese nach Cox *et al.* (1978) bei allen vermessenen b_{syn}-Mutanten nachgewiesen werden.

Fast alle Mutanten zeigen im Komplex mit F_1 eine stärkere Immobilisierung als die freien b-Mutanten. Tendenziell nimmt in Richtung des C-Terminus die Differenz der Hochfeld : Mittelfeld-Verhältnisse der Spektren von b und F_1/b zu, was die Vermutung nahelegt, daß die Bindung von b an die F_1 in Richtung des C-Terminus stärkeren Einfluß auf die Struktur hat. Tatsächlich haben auch andere Gruppen postuliert, daß im Bereich des C-Terminus die Bindung an die F_1 stattfindet (McLachlin *et al.* 1998, Takeyama *et al.* 1988).

Eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung und Bindung an die F_1 spielt der Bereich 124-139, in dem das Vorliegen zweier paralleler α-Helices angenommen wird (Howitt *et al.* 1996, McLachlin und Dunn 1997). Im Bereich von 124-132 scheint eine stabile Sekundärstruktur vorzuliegen. Hier ändert sich die Umgebung des Spin-Label bei der Bindung an die F_1 nicht wesentlich, wohl aber die Abstände der Spin-Label zueinander (G. Kraft, persönliche Mitteilung). Position 139 hingegen gehört nicht mehr zu diesem Bereich. In der gleichen Region, aber an der Außenseite der postulierten parallelen Helices befindet sich A130. Das Spektrum von F_1 im Komplex mit der gelabelten Mutante bA130C besteht aus einer mobilen und einer immobilen Komponente, letztere wird wahrscheinlich durch einen direkten Kontakt mit δ verursacht. Es ist anzunehmen, daß nur eine der beiden b-Untereinheiten einen starken Kontakt mit δ hat.

Mit zweidimensionaler Elektrophorese und mittels ESR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß b_{syn} auch in Abwesenheit der δ-Untereinheit an die F_1 bindet. Zwar zeigen fast alle Mutanten zusammen mit F_1-δ Spektren, die denen des freien Proteins entsprechen, an einzelnen Positionen an verschiedenen Stellen der Sequenz zeigen sich jedoch eindeutige Ausnahmen. Somit scheint es wahrscheinlich, daß die b-Untereinheit außer über δ noch weitere Kontakte mit der EF_1 hat.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

5.1.1 Verwendete Chemikalien

Acrylamidlösung Rotipuran	Roth
Agar-Agar	Merck
L-Arginin-HCl	Serva
ATP	Boehringer Mannheim
Bacto-Trypton	Difco Laboratories
CDI	Janssen
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie Brillant Blue G250	Serva
DE-52	Whatman
2'-Desoxy-ATP	Sigma
3'-Desoxy-ATP	Sigma
Desoxyribonuclease	Sigma
2,3-Dihydrobenzoesäure	Sigma
DTT	Boehringer Mannheim
EACA	Sigma
EDTA	Serva
EGTA	Serva
Glycin	Serva
Hefeextrakt	Gibco
PAB	Fluka
PEG 6000	Serva
PMSF	Sigma
SDS	Serva
Sephadex DEAE A25	Pharmacia
Sephadex G50	Pharmacia
SL-Säure	Kodak
TES	Serva
Thiamin-HCl	Sigma
Tris	Boehringer Mannheim
Uracil	Sigma

Die verwendeten SL-ATP Analoga wurden vom Autor im Rahmen seiner Diplomarbeit synthetisiert mit Ausnahme von 2-Azido-2',3'-SL-ATP und 3'-Aminodesoxy-3'-SL-ATP, welche von Jürgen Nett synthetisiert wurden. IodacetamidTEMPO wurde von Michael Kersten synthetisiert.

5.1.2 UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden an einem DU 640-Spektrometer der Firma Beckman aufgenommen. Die Messungen der Absorption bzw. der optischen Dichte im sichtbaren Bereich wurden mit Spektrometern vom Typ DU 8 bzw. DU 640 der Firma Beckman durchgeführt.

Zur Konzentrationsbestimmung von ATP und SL-ATP wurde ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon(259)=15300\ M^{-1}cm^{-1}$ angenommen.

Bei den säulenchromatographischen Trennungen wurde die Elution mit einem UV-Detektor vom Typ Uvicord S2 der Firma LKB Pharmacia bei einer Wellenlänge von 277 nm verfolgt.

5.1.3 Zentrifugen

Kühlzentrifuge:	Beckman J2-21 mit den Rotoren Beckman JA-10, JA-14, JA-20
Ultrazentrifugen:	Kontron TGA-50, Rotor: Kontron TFT 50.38
	Beckman Optima LE 80K, Rotor: Beckman Ti 70
Tischzentrifugen:	Hettrich Universal
	Eppendorf 5415 C

5.1.4 Molecular Modelling

Die Berechnungen am Kristallstrukturmodell der mitochondrialen F_1-ATPase wurden mit Hilfe des Programmes QUANTA97® der Firma Molecular Simulations Inc., San Diego, USA erstellt. Die berechneten Strukturen wurden von dem Programm RasMol, (R. Sayle, Glaxo Research and Development, Greenford, U.K.) bildlich dargestellt.

5.2 Enzymatische Arbeiten

5.2.1 *E. coli*-Stämme und Wachstumsbedingungen

Stämme und Medien

Protein	Stamm	Plasmid	Medium
F_1 (Wildtyp)	SWM1		GEAU 2,5%LB Cm
F_1 αD261N/α R365W	CB6		GEAU Amp
bT62C	JM109	pDM15	LB Amp
bA68C	DH5α	pDM11	LB Amp
bI126C	JM103	pDM33	LB Amp
bD150C	JM109	pDM40	LB Amp
bK151C	JM109	pDM41	LB Amp
bE155C	JM109	pDM42	LB Amp
b158C	JM109	pSD120	LB Amp

Minimalmedium + Uracil (MinUra)

K_2HPO_4	10.46 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5.52 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.98 g
Uracil	0.022 g

H_2O ad 1 l, pH 7,0 stellt sich ein

LB-Medium

Bacto-Trypton	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
NaCl	10.0 g

H_2O ad 1 l und pH 7,5 einstellen

ArgEntThi

2,3-Dihydroxybenzoesäure	0,617 g
L-Arginin-HCl	16,86 g
Thiamin-HCl	0,0675 g

pH 7,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

Trace Elements (TE)

$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.403 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0169 g
H_3BO_4	0,0291 g
$CaSO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,012 g
$CaCl_2 \cdot H_2O$	0,0368 g
$FeCl_3$	0,029 g

H_2O ad 100 ml

1M $MgSO_4$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24.6 g

H_2O ad 100 ml, Autoklavieren

27% Glucose

Glucose	270 g

H_2O ad 1l, Autoklavieren

Cm 15mg/ml (Chloramphenicol)

Chloramphenicol	0.75 g
EtOH 90 %	50 ml

Ampicillin 50mg/ml

Ampicillin	2,5 g

H_2O ad 50 ml, sterilfiltrieren

GEAU

Minimalmedium+ Uracil	1 ml
27% Glucose	20 µl
1M $MgSO_4$	1 µl
ArgEntThi	1 µl
TE	1 µl
Chloramphenicol	1 µl

Wachstumsbedingungen

Die Zellen wurden auf Agar-Platten mit den oben angegebenen Medien und Antibiotika ausgestrichen (Verdünnungsaufstrich). Mit je einer einzelnen Kolonie von diesen Platten wurden zwei 20 ml Flüssigkulturen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben beimpft und 16-24 Std. bei 300 rpm und 37°C geschüttelt. Mit einer dieser Kulturen wurden je zwei 500 ml-Flüssigkulturen in einem 2 l Erlenmeyerkolben beimpft und bei 250 rpm und 37°C geschüttelt.

Sollte mit diesen Kulturen der Fermenter beimpft werden, wurden 12 Std. geschüttlet, andernfalls wie bei der Beschreibung der jeweiligen Isolierung angegeben.

5.2.2 Isolierung der F_1-ATPase: Aufzucht der *E. coli* und Ernte der Zellen

Fermenter-Medium GEAU 2.5% LB (Ansatz für 10 l):

K_2HPO_4	104,6 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	55,2 g
$(NH_4)_2SO_4$	19,8 g
Uracil	0,44 g
Bacto-Trypton*	2,5 g
Hefeextrakt*	1,25 g
H_2O ad 10 l	
27% Glucose	400 ml
1M $MgSO_4$	10 ml
ArgEntThi	20 ml
TE	10 ml
Antibiotikum	10 ml

*Zusätze für 2,5% LB, entfallen bei GEAU

STEM

TES	100 mM	2,292 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	20 mM	0,4066 g
EGTA	0.25 mM	0,0095 g
Sucrose	250 mM	8,55 g
EACA	40 mM	0,5 g
PAB	6 mM	0,1 g

pH 7,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

Die F_1-ATPase wurde aus den Stämmen SWM1 (Wildtyp, Rao *et al.* 1988) und CB6 (αD261N-Mutante, Weber *et al.* 1995) exprimiert. Der Stamm SWM1 wurde in GEAU 2,5% LB + Chloramphenicol, der Stamm CB6 in GEAU + Ampicillin wachsen gelassen. Die Bakterien wurden in 12 l-Kulturen in einem New Brunswick Microferm Fermenter gezüchtet. Nach Beimpfen mit 2 l Startkulturen wurde mehrere Stunden bei 37°C mit 400 rpm gerührt und mit 7 psi (0,5 kg/cm^2=0,49 bar) belüftet. Zur Kontrolle des Wachstums wurde halbstündlich die optische Dichte bei 595 nm (OD_{595}) gemessen. Bevor das Wachstum in die stationäre Phase überging, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 11000 x g, 8000 rpm, JA10-Rotor) vom geerntet. Die Zellen wurden mit 100 ml STEM-Puffer gewaschen, 10 min bei 11000 x g zentrifugiert und in 1 ml STEM pro g Zellen resuspendiert. Bei –80°C konnten die Zellen so mehrere Tage gelagert werden.

5.2.3 Präparation der F_oF_1

TEM + PAB

TES	100 mM	2,292 g
$MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$	20 mM	0,4066 g
EGTA	0.25 mM	0,0095 g
EACA	40 mM	0,5 g
PAB	6 mM	0,1 g

pH 7,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

TES 50 + PAB

TES	50 mM	1,146 g
Glycerin	5% (v/v)	5 ml
DTT	0.5 mM	0,0077 g
EDTA	1 mM	0,0372 g
EACA	40 mM	0,5 g
PAB	6 mM	0,1 g

pH 7,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

TES 5 + PAB

TES	5 mM	0,1146 g
Glycerin	5% (v/v)	5 ml
DTT	0.5 mM	0,0077 g
EDTA	1 mM	0,0372 g
EACA	40 mM	0,5 g
PAB	6 mM	0,1 g

pH 7,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zu der Suspension von etwa 50 g Zellen in 50 ml STEM wurden 2-3 mg DNAse und 250 µl 0,2 M PMSF in Isopropanol zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin in einer gekühlten French-Pressure-Cell der Firma Aminco zweimal einem Druck von 300 kp/cm^2 (294 bar) ausgesetzt. Die so erhaltene Suspension wurde durch Zentrifugation (20 min bei 27000 x g, 15000 rpm, JA20) von unzerstörten Zellen und größeren Zellfragmenten befreit. Der trübe gelbliche Überstand wurde mit mindestens der gleichen Menge TEM-Puffer versetzt und 90 min bei 265000 x g (60000 rpm, Ti 70 Rotor) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde erst in TES 50+PAB und dann in TES 5+PAB-Puffer resuspendiert und 90 min bzw. 60 min bei 265000 x g zentrifugiert. Das klare braune Pellet kann entweder als festes Pellet oder als Suspension in TES 5+PAB mehrere Wochen bei –80°C aufbewahrt werden.

5.2.4 Isolierung der F_1-ATPase

TES 5 - PAB

TES	5 mM	0,1146 g
Glycerin	5% (v/v)	5 ml
DTT	0.5 mM	0,0077 g
EDTA	1 mM	0,0372 g
EACA	40 mM	0,5 g

pH 7,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

Säulen- und Lagerungspuffer

Tris	50 mM	6,055 g
EDTA	2 mM	0,7446 g
$ATPNa_2 \cdot 3\ H_2O$	1 mM	0,605 g
DTT	1 mM	0,1542 g
EACA	4 mM	0,5 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 ml

pH 7,4 mit HCl, H_2O ad 1000 ml

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Pellet mit den F_oF_1 enthaltenden Membranvesikeln wurde in TES 5-PAB resuspendiert und 120 min bei 265000 x g (60000 rpm, Ti 70) zentrifugiert. Das gebildete Pellet wurde danach wieder in TES 5-PAB resuspendiert und erneut zentrifugiert; die Überstände wurden vereinigt und der Niederschlag verworfen. 150 ml Überstand wurden mit 7,5 ml 1 M TES-Puffer, 0,3 ml 0,5 M DTT und 7,5 ml 1 M $MgSO_4$ versetzt und 20 min bei 26000 x g (13000 rpm, JA-14) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 42 ml 50% PEG 6000 zugegeben, 10 min auf Eiswasser gerührt und anschließend 30 min bei 26000 x g (13000 rpm, JA-14) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag wurde gründlich abtropfen gelassen (über Nacht), dann in 40 - 60 ml Säulenpuffer gelöst. Die Lösung wurde 20 min bei 26000 x g (13000 rpm, JA-14) zentrifugiert und auf eine Säule (Whatman DE-52; 12x3 cm) aufgetragen. Nach Spülen mit ca. 50 - 100 ml Säulenpuffer wurde ein Gradient aus 400 ml Säulenpuffer 0 - 0,5 M Na_2SO_4 angelegt und das Eluat in Fraktionen zu je ca. 6 ml gesammelt. Die F_1-enthaltenen Fraktionen wurden mittels Bestimmung von Proteingehalt und ATPase-Aktivität bestimmt. Aufeinanderfolgende Fraktionen mit vergleichbarer spezifischer Aktivität wurden vereinigt und mit einer Amicon YM 30 Membran auf etwa 5 ml eingeengt. Die F_1 konnte bei –80°C mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

5.2.5 Befreiung der F_1-ATPase von gebundenen Nukleotiden

Glycerinpuffer

Tris	100 mM	12,1 g
EDTA	4 mM	1,49 g
Glycerin	50% (v/v)	500 ml

pH 7,4 mit HCl, H_2O ad 1000 ml

5 mg F_1 in Säulen- und Lagerungspuffer wurden durch Zugabe des doppelten Volumens gesättigter Ammoniumsulfatlösung über Nacht auf Eiswasser gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 27000 x g (15000 rpm, JA-20) wurde das Pellet in 100-200 µl Glycerinpuffer aufgenommen, in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 rpm zentrifugiert und auf eine Säule mit Sephadex G50 fine (100 x 0,9 cm) aufgetragen. Es wurde mit Glycerinpuffer bei einer Flußrate von $\leq$1ml/h eluiert und in Fraktionen zu 400 µl gesammelt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden durch die Absorption bei 276 nm detektiert. Das Absorptionsverhältnis 280 nm / 260 nm wurde für jede dieser Fraktionen bestimmt; Fraktionen mit einem Verhälnis $\geq$1,8 wurden in Centricon 30 eingeengt und konnten bei -70°C mindestens eine Woche aufbewahrt werden.

5.2.6 Isolierung der α, β und γ-Untereinheiten

Dissoziationspuffer

Tris	50 mM	0,605 g
Bernsteinsäure	50 mM	0,59 g
NaCl	1 M	5,8 g
$NaNO_3$	250 mM	2,125 g
DTT	1 mM	0,015 g
EDTA	1 mM	0,0372 g
PMSF	1 mM	0,0174 g

pH 6,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

Puffer A:

Tris-HCl	50 mM	6,05 g
EDTA	0,1 mM	0,037 g
DTT	0,1 mM	0,015 g

pH 8,0 mit HCl, H_2O ad 1000 ml

20–40 mg EF_1 wurden mit 67% Ammoniumsulfatlösung gefällt und in 2-3 ml Dissoziationspuffer pro 10 mg F_1 aufgenommen. Die Enzymlösung wurde schockgefroren und nach mindestens eintägiger Lagerung bei -80°C über Nacht in Eiswasser aufgetaut.

1 g HTP pro 3-5 mg F_1 wurden in 50 ml Puffer A aufgeschlämmt, *genau* 10 min stehen gelassen und in eine Säule von ca. 1,5 cm Durchmesser gegossen. Die Enzymlösung wurde mit dem gleichen Volumen an Puffer A verdünnt und aufgetragen. Nach Spülen mit 30-50 ml Puffer A wurde mit 300 ml 30 mM P_i in Puffer A, pH 8,0 eluiert. Der Protein-Peak bei etwa 10-80 ml enthielt die α und β Untereinheiten. Anschließend wurde mit 30-50 ml Puffer A gespült. Mit einem Gradienten aus je 200 ml Puffer A + 3 M Harnstoff und 200 ml Puffer A + 3 M Harnstoff + 150 mM P_i wurden die kleinen Untereinheiten eluiert. Peak 1 bei 5-25 mM P_i enthielt ε verunreinigt mit α und β, Peak 2 (30-60 mM) enthielt α und δ, Peak 3 (70-90 mM) enthielt γ. Fraktionen 2 und 3 wurden sofort über Nacht gegen 2 l Puffer A + 200 mM NaCl + 10 % Glycerin dialysiert, in Amicon PM 10 und Centricon 10 auf ca. 100 µl eingeengt und bei -80°C eingefroren

Die $\alpha\beta$-Fraktion wurde auf eine DEAE-Sepharose CL-6B Säule (2,0x20 cm) aufgetragen. Nach Spülen mit 30-50 ml Puffer A wurden mit einem Gradienten aus 250 ml Puffer A / 250 ml Puffer A + 400 mM NaCl zwei gut getrennte Peaks erhalten: Ein scharfer Peak bei 90-130 mM enthielt α, ein breiter bei 200-250 mM β. Beide Fraktionen wurden in Amicon PM 10 und Centricon 10 eingeengt, in Portionen zu je 0,3-0,4 mg aliquotisiert und bei -80°C aufbewahrt.

5.2.7 Rekombination der isolierten Untereinheiten

Reko-Puffer

Succinat-Tris	50 mM	0,605 g
Bernsteinsäure	50 mM	0,59 g
DTT	1 mM	0,015 g
EDTA	1 mM	0,0372 g
Glycerin	10 %	10 ml
$ATPNa_2 \cdot 3H_2O$	2 mM	0,121 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2 mM	0,0406 g

pH 6,0 mit NaOH, H_2O ad 100 ml

Ein stöchiometrisches Gemisch aus den isolierten Untereinheiten wurde gemischt und in Reko-Puffer umgepuffert. Dazu wurde das Gemisch in 100 µl fassenden Kammern, die einseitig durch einen Dialyseschlauch verschlossen wurden gegen 1 l Reko-Puffer dialysiert. Alternativ wurde das Gemisch mit 2,5 ml Reko-Puffer verdünnt und anschließend mit Centricon 10 wieder eingeengt.

5.2.8 Isolierung von b_{syn}

TMg8

Tris	50mM	0,602g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10mM	0,203g

pH 8,0 mit HCl, H_2O ad 100ml

TED

Tris	50mM	24,2g
EDTA	1mM	1,488g
DTT	1mM	0,616g

pH 8,0 mit HCl, H_2O ad 4 l

Die Zellen (DH5α bzw. JM109, 20 ml-Kulturen) wurden in 2 l-Erlenmeyerkolben mit je 500 ml LB-Medium bei 37°C mit 250 rpm geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde 1 mM IPTG zugegeben und die Zellen 3-4 Std. weiter wachsen gelassen. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 11000 x g, 8000 rpm, JA10-Rotor) vom Wachstumsmedium getrennt, mit TMg8-Puffer gewaschen, im 7-10fachen Naßgewicht TMg8 resuspendiert und bei –80°C eingefroren.

Alle folgenden Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Zugabe von 100-200µl PMSF wurden die Zellen in der vorgekühlten French Press zweimal einem Druck von 300 kp/cm^2 ausgesetzt oder zweimal 30 s bei maximaler Leistung mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation (20 min bei 27000 x g, 15000 rpm, JA20) entfernt, der Überstand in der Ultrazentrifuge 120 min bei 95000 x g (36000 rpm, Ti70-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 40% Ammoniumsulfat gefällt, in 8 ml TED aufgenommen und über Nacht gegen 1 l TED dialysiert.

Die Proteinlösung wurde auf eine DEAE-Sepharose CL-6B Säule (2,2 x 9cm) auftragen, mit etwa 50 ml TED gespült und mit einem Gradienten aus 300 ml TED 0-250 mM NaCl eluiert. Der Proteinpeak wurde mit einer Amicon PM 10 Membran auf ca. 3 ml eingeengt und bei -80°C in Aliquoten eingefroren.

5.2.9 Site-specific Spin Labeling von b_{syn}

HMK-Puffer

Hepes	10 mM	4,77 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mM	2,47 g
KCl	300 mM	44,76 g

H_2O ad 2 l, pH 7,0 mit NaOH

1-4 mg b_{syn} in maximal 3 ml TED wurden mittels einer Sephadex G25 Säule (1,4x16 cm) in HMK-Puffer überführt. Der durch UV-Absorption bei 277 nm detektierte Proteinpeak wurde mit Centricon 10 auf etwa 3 ml eingeengt und dann mit dem zehnfachen Überschuß

IodacetamidTEMPO (200 mM in Acetonitril) 30-60 min bei 4°C inkubiert. Das überschüssige Spin-Label Reagenz wurde mit der gleichen Säule abgetrennt und das gelabelte b_{syn} mit Centricon 10 maximal eingeengt (etwa 60 – 100 µl) und bei –80°C aufbewahrt.

5.2.10 Entfernen der δ-Untereinheit

Delta-Puffer

Glycin	50 mM	3,75 g
EDTA	2 mM	0,744 g
$ATPNa_2 \cdot 3H_2O$	1 mM	0,605 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 ml

H_2O ad 1 l, pH 9,4 mit NaOH

Zwischen 2 und 10 mg EF_1 wurden mit 67% Ammoniumsulfat gefällt und in 100-150 µl Delta-Puffer aufgenommen. Die Proteinlösung wurde auf eine Sephacryl S-300R Säule (1,5 x 95 cm) aufgetragen und mit δ-Puffer eluiert. Die Proteinfraktion kam nach 80 ml und wurde durch UV-Absorption bei 277 nm detektiert, der Hauptpeak enthielt F_1-δ, welche in Centricon 30 auf etwa 60 µl eingeengt wurde.

5.3 Analytik

5.3.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Lösungen wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Proteinfraktionen, die Membranen enthielten, wurden nach Lowry (Petersen 1977) bestimmt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

5.3.2 Bestimmung der ATPase-Aktivität

ATPase-Cocktail

Tris-HCl	50 mM	0,606 g
$ATPNa_2 \cdot 3H_2O$	10 mM	0,6052 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	4 mM	0,080 g

pH 8,5 mit HCl, H_2O ad 100 ml

Die ATPase-Aktivität wurde durch Messung des freigesetzten anorganischen Phosphats bei 30°C bestimmt. Als Blank wurde eine Protein-Probe mit 500 µl 10% SDS denaturiert und mit 500 µl ATPase-Cocktail versetzt. Eine weitere Probe gleicher Größe wurde mit 500 µl ATPase-Cocktail versetzt und bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach einer bestimmten Zeit durch Zugabe von 500 µl 10% SDS-Lösung abgestoppt. Probengröße und Inkubationszeit wurden so gewählt, daß bei der Reaktion etwa 200-300 nmol Phosphat gebildet wurden. Die Phosphatmenge in Probe und Blank wurde nach Taussky und Shorr (1953) bestimmt; die Differenz zwischen Probe und Blank entspricht der bei der Hydrolyse freigesetzten Phosphatmenge. Die Aktivität wurde in Units U angegeben; dabei entspricht 1 U einer Phosphatmenge von 1 µmol/Minute. Die spezifische Aktivität wird in U/mg angegeben und entspricht der Aktivität von 1 mg des untersuchten Enzyms.

5.3.3 Bestimmung der intrinsisch gebundenen Nukleotide der F_1-ATPase

Etwa 200 µg F_1 in TrisHCl pH 8,0 wurden durch fünfminütiges Kochen denaturiert. Das denaturierte Enzym wurde durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 rpm abgetrennt und der Überstand mit einer HPLC (HPLC: Beckman Gold 526-1365, Säule: Whatman Partisil 10 SAX, 4,6x250 mm) bei einer Flußrate von 1 ml/min mit 0,8 M Phosphatpuffer aufgetrennt. Die Nukleotide wurden bei 259 nm detektiert, der Nukleotidgehalt wurde aus den Peakflächen durch Vergleich mit Eichkurven von ATP und ADP bestimmt.

5.3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

5.3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) mit folgenden Modifikationen durchgeführt: In Abwandlung der Literaturvorschrift wurde eine Elektrophoresekammer von 7,5 x 8 x 0,2 cm verwendet und die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 16 mA durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in Methanol/Eisessig/Wasser (5:1:4) fixiert, über Nacht in 0.25% Coomassie Brillantblau R250 in Methanol/Eisessig/Wasser (5:1:4) gefärbt und schließlich 1-2 Tage in Methanol/Eisessig/Wasser (5:1:4) entfärbt.

5.3.4.2 Blue Native Gelelektrophorese (Schägger 1991)

Kathodenpuffer

Tricin	50 mM	0,896 g
Bistris	15 mM	0,314 g
Serva Blue G	0,02 %	0,02 g

pH 7,0 stellt sich ein, H_2O ad 100 ml

Anodenpuffer

Bistris	50 mM	1,05 g

pH 7,0 mit HCl, H_2O ad 100 ml

Gel Puffer (3x)

EACA	1,5 M	19,7 g
Bistris	150 mM	3,14 g

pH 7,0 mit HCl, H_2O ad 100 ml

Trenngel

	10 %	15 %	20 %
Acrylamid (30%)	5 ml	7,5 ml	10 ml
H_2O	5 ml	2,5 ml	-
Gel-Puffer	5 ml	5 ml	5 ml

Sammelgel (4 %)

Acrylamid (30%)	0,8 ml
H_2O	3,2 ml
Gel-Puffer	2 ml

Polymerisationsbedingungen und Größe der Gelkammer wurden wie bei der SDS-Gelelektrophorese gewählt, es wurden Proben von 25-30 µg aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 8 mA durchgeführt.

5.3.4.3 Native Gelelektrophorese nach Cox *et al.* (1978)

3x Gelpuffer

Tris	1,14 M	13,8 g
$MgSO_4$	6 mM	0,15 g

pH 8,8 mit HCl, H_2O ad 100 ml

Elektrophorese-Puffer

Tris	5 mM	0,12 g
Glycin	38,5 mM	0,58 g
$MgSO_4$	2 mM	0,1 g

pH 8,6 stellt sich ein, H_2O ad 200 ml

Gel

Acrylamid	4 ml
H_2O	6 ml
3x Gelpuffer	5 ml

Polymerisationsbedingungen und Größe der Gelkammer wurden wie bei der SDS-Gelelektrophorese gewählt, es wurden Proben von 25-30 µg aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA durchgeführt.

5.3.4.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die erste Dimension wurde eine nicht denaturierende Elektrophorese durchgeführt. Das Gel kann nach dem Lauf bis zur Verwendung eingefroren werden. Für die zweite Dimension wurden 5 cm Trenngel und 1,5 cm Sammelgel gegossen. Aus dem nativen Gel wurde die gewünschte Bahn ausgeschnitten, dieser Gelstreifen wurde etwa 0,5 cm über das Sammelgel gelegt, dann wurde der Gelstreifen mit heißer Agarose (1% in Sammelgelpuffer+Wasser 1:5) aufgeklebt. Nach dem Erkalten der Agarose wurde Elektrophoresepuffer eingefüllt und das Gel mit 100-200 µl Probenpuffer überschichtet. Die SDS-Gelelektrophorese wurde dann nach Vorschrift (5.3.4.1) durchgeführt.

5.4 ESR-Spektroskopie

5.4.1 Allgemein

Die ESR-Messungen wurden auf einem Bruker ESP-300 E X-Band-Spektrometer durchgeführt. Die Mikrowellenleistung betrug 6,3 mW, moduliert wurde mit einer Frequenz von 100 kHz und einer Amplitude von 0,8 G. Alle Spektren wurden mit einer Breite von 120 G aufgenommen. Die Messungen wurden in einer Cavity TE_{102} in Quarz-Flachzellen bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,6 GHz in einem Meßbereich von 3365 G – 3485 G oder in einer dielektrischen Cavity Bruker TE_{001} (ER 4118) in Quarzkapillaren bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,7 GHz in einem Meßbereich von 3405 G – 3525 G vermessen. Die Signalverstärkung, Zeitkonstante und Aufnahmegeschwindigkeit wurden den Erfordernissen entsprechend gewählt. Falls nötig wurden die Tief- und Hochfeldbereiche bei höherer Signalverstärkung aufgenommen.

5.4.2 Titrationen und Messungen am Holoenzym und den isolierten Untereinheiten α und β

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0 durchgeführt. Das Enzym wurde mittels Gelzentrifugation nach Penefsky (1977) in diesen Puffer überführt und in der Küvette vorgelegt. Die SL-ATP-Analoga wurden als Lösung von SL-ATP und Mg^{2+} (2,5 : 1) in Wasser zutitriert. Die Konzentation des gebundenen SL-ATP wurde als Differenz von Gesamtkonzentration und freiem Anteil berechnet. Letzterer wurde durch Vergleich der Peakhöhe des Hochfeldsignals des freien Anteils mit einer zuvor ermittelten Standardkurve bestimmt.

5.4.3 Messungen an b_{syn} in An- und Abwesenheit von F_1

ESR-Puffer

Tris	50 mM	0,606 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2 mM	0,04 g
Glycerin	10 % (v/v)	10 ml

H_2O ad 100 ml, pH 7,5 mit HCl

Zur Messung von b_{syn} in Abwesenheit von F_1 wurde die b_{syn}-Lösung in HMK-Puffer in ESR-Puffer verdünnt und 3 M KCl zugegeben, so daß die Konzentration von b_{syn} 30-50 µM und die Konzentration von KCl 300 mM betrug. Zur Messung von b_{syn} im Komplex mit F_1 bzw. F_1-δ wurde b_{syn} in HMK-Puffer mit F_1 bzw. F_1-δ in ESR-Puffer und KCl gemischt, so daß die Konzentration von b_{syn} 10-30 µM, die von F_1 30-50 µM (mindestens die zweifache Konzentration von b_{syn}) und die Konzentration von KCl 300 mM betrug.

Alle Spektren wurden in Quarzkapillaren in der dielektrischen Cavity TE_{001} (ER 4118) aufgenommen mit einer Signalverstärkung von $1{,}0 \times 10^6$. Es wurden 10 Scans bei einer Auflösung von 1024 Punkten und einer Zeitkonstante von 164 ms aufgenommen.

5.4.4 Photolabeling

Ein Aliquot α wurde mittels Gelzentrifugation nach Penefsky (1977) in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 2 mM $MgCl_2$ überführt, mit 2'-Azido-2',3'-SL-ATP gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Es wurde dreimal je eine Minute bei 254 nm bestrahlt. Anschließend wurde ungebundenes SL-ATP durch Gelzentrifugation entfernt und das Enzym vermessen.

6 Literatur

Abrahams, J. P.; Leslie, A. G. W.; Lutter, R.; Walker, J. E. (1994) *Nature* **370** 621-8

Beckers, G., Berzborn, R. J., Strotmann, H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1101** 97-104

Boos, K. S., Lüstorff, J., Schlimme, E., Hesse, H., Strotmann, H. (1976) *FEBS Lett.* **71** 124-9

Boyer, P. D. (1993) *Biochem. Biophys. Acta* **1140** 215-50

Boyer, P. D., Cross. R. L., Momsen, W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70** 2837-9

Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72** 248-254

Bulygin, V. V., Duncan, T. M., Cross, R. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 31765-9

Burgard, S. (1995) *Dissertation, Universität Kaiserslautern*

Burgard, S., Nett, J. H., Sauer, H. E., Kagawa, Y., Schäfer, H. J., Wise, J. G., Vogel, P. D., Trommer, W. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** 17815-9

Cohen, C., Parry, D. A. D. (1990) *Proteins Struct. Funct. Genet.* **7** 1-15

Cox, G. B., Downie, J. A., Fayle, D. R. H., Gibson, F., Radik, J. (1978) *J. Bacteriol.* **133** 287-92

Cross, R. L. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50** 681-714

Cross, R. L., Nalin, C. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257** 2874-81

Cross, R. L., Grubmeyer, C., Penefsky, H. S. (1982) *J. Biol. Chem* **257** 12101-5

Downie, J. A., Senior, A. E., Cox, G. B., Gibson, F. (1979) *J. Bacteriol.* **138** 87-91

Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L., Cross, R. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** 10964-8

Dunn, S. D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** 7630-6

Dunn, S. D., Chandler, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 8646-51

Dunn, S. D., Futai, M. (1980) *J. Biol. Chem.* **255** 113-8

Engelbrecht, S., Giakas, E., Marx, O., Lill, H. (1998) *Eur. J. Biochem.* **252** 277-83

Erbse, A. (1996) *Dissertation, Universität Kaiserslautern*

Fillingame, R. H., Jones, P. C., Jiang, W., Valiyaveetil, Dmitriev, O. Y. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1365** 135-42

Futai, M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **79** 1231-7

Futai, M., Sternweis, P. C., Heppel, L. A. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71** 2725-9

Galla, H.-J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988*

Garrett, N. E., Penefsky, H. S. (1975) *J. Biol. Chem.* **250** 6640-7

Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L., Fillingame, R. H. (1998) *Biochemistry* **37** 8817-24

Griffith, O. H., Cornell, D. W., McConnell, H. M. (1965) *J. Chem. Phys.* **43** 2909-10

Hamilton C.L., McConnell, H. M. (1968) in Rich, A., Davidson, N. (eds) *Structural Chemistry and Molecular Biology, Freeman, San Francisco* S. 115

Hasler, K., Engelbrecht, S., Junge, W. (1998) *FEBS Lett.* **426** 301-4

Hazard, A. L., Senior, A. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** 418-26

Howitt, S. M., Rodgers, A. J. W., Jeffrey, P. D., Cox, G. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** 7038-42

Hsia, J. C., Piette, L. H. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **129** 296-307

Jones, P. C., Fillingame, R. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 29701-5

Jones, P. C., Jiang, W., Fillingame, R. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 17178-85

Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22** 420-3

Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 19375-7

Kersten, M. (1999) *Dissertation, Universität Kaiserslautern*

Kironde, F. A. S., Cross, R. L., *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 12544-9

Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227** 680-685

Larson , R. J., Smith, J. B. (1977) *Biochemistry* **16** 4266-70

Lehninger, A. L. (1982) *Bioenergetik 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982*

Lösel, R. M., Erbse, A. H., Nett, J. H., Wise, J. G., Girault, G., Vogel, P. D. (1996) *Spectrochim. Acta, Part A* **52** 73-83

Lösel, R. M., Wise, J. G., Vogel, P. D. (1997) *Biochemistry* **36** 1188-93

Marsh, D. (1981) in: Grell, E. (ed) *Membrane Spectroscopy, Springer, Berlin 1981*

McLachlin, D. T., Dunn, S. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 21233-9

McLachlin, D. T., Bestard, J. A., Dunn, S. D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 15162-8

Mitchell, P. (1961) *Nature* **191** 144-8

Mitchell, P. (1979) *Science* **206** 1148-59

Murataliev, M. B., Boyer, P. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** 15431-9

Motz, C, (1995) *Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern*

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita,. K., Jr. (1997) *Nature* **386** 299-302

Nordio, P. L. (1976) in: Berliner, L. J. (ed) *Spin Labelling - Theory and Applications , Academic Press, New York, 1976*

Ogilvie, I., Aggeler, R., Capaldi, R. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 16652-6

Penefsky, H. S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252** 2891-9

Perlin, D. S., Latchney, L. R., Wise, J. G., Senior, A. E. (1984) *Biochemistry* **23** 4998-5003

Peterson, G. L. (1977) *Anal. Biochem.* **83** 346-56

Rao, R., Perlin, D. S., Senior, A. E. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **255** 309-15

Rao, R., Al-Shawi, M. K., Senior, A. E. (1988a) *J. Biol. Chem.* **263** 5569-73

Rao, R., Pagan, J., Senior, A. E. (1988b) *J. Biol. Chem.* **263** 15957-63

Rodgers, A. J. W., Capaldi, R. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 29406-10

Rodgers, A. J. W., Capaldi, R. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 29406-10

Rodgers, A. J. W., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M. B., Howitt, S. M., Capaldi, R. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 31058-64

Sabbert, D., Engelbrecht, S., Junge, W. (1996) *Nature* **381** 623-5

Schägger, H., *Anal. Biochem.* **199** (1991) 223-31

Smith, J. B., Sternweis, P. C. (1977) *Biochemistry* **16** 307-11

Smith, J. B., Sternweis, P. C., Heppel, L. A., *J. Supramol. Struct.* **3** (1975) 248-55

Senior, A. E., Al-Shawi, M. K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** 21471-8

Senior, A. E., Lee, R. S.-F., Al-Shawi, M. K., Weber, J. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **297** 340-4

Sorgen, P. L., Bubb, M. R., McCormick, K. A., Edison, A. S., Cain, B. D. (1998a) *Biochemistry* **37** 923-32

Sorgen, P. L., Caviston, T. L., Perry, R.C., Cain, B. D. (1998b) *J. Biol. Chem.* **273** 27873-8

Stone, T. J., Buckman, T., Nordio, P. L., McConnel, H. M. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54** 1010-7

Streckenbach, B., Schwarz, D., Repke, K. R. H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **601** 34-46

Stryer, L. (1987) *Biochemie, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig 1987*

Takeyama, M., Noumi, T., Maeda, M., Futai, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263** 16106-12

Taussky, H. H; Shorr, E. (1953) *J. Biol. Chem.* **202** 675-85

Ts'o, P. O. P. (1976) in: *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry Vol. 1, Academic Press, New York* 453-517

Vogel, G., Steinhart, R. (1976) *Biochemistry* **15** 208-16

Vogel, P. D., Nett, J. H., Sauer, H. E., Schmadel, K., Cross, R. L., Trommer, W. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** 11982-6

Walker, J. E., Saraste, M., Gay, N. J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **768** 164-200

Weber, J., Wilke-Mounts, S., Lee, R. S.-F., Grell, E., Senior, A. E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** 20126-33

Weber, J., Wilke-Mounts, S., Grell, E., Senior, A. E. (1994a) *J. Biol. Chem.* **269** 11261-8

Weber, J., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E. (1994b) *J. Biol. Chem.* **269** 20462-7

Weber, J., Bowman, C., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** 21045-9

Weber, J., Bowman, C., Senior, A. E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** 18711-8

Wilkens, S., Capaldi, R. A. (1998a) *Nature* **393** 29

Wilkens, S., Capaldi, R. A. (1998b) *Biochim. Biophys. Acta.* **1365** 93-97

Wilkens, S., Dahlquist, F. W., McIntosh, L. P., Donaldson, L. W., Capaldi, R. A. (1995) *Nature Struct. Biol.* **2** 961-7

Wilkens, S., Dunn, S. D., Chandler, J., Dahlquist, F. W., Capaldi, R. A. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4** 198-201

Wise, J. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265** 10403-9

Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, I. R., Cox, D. N., Senior, A. E. (1983) *Biochem. J.* **215** 343-50

Xiao, R., Penefsky, H. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** 19232-7

Xü, Y. H., Gietzen, K., Galla, H.-J. (1983) *Int. J. Biol. Macromol.* **5** 154-8

Xue, Z., Zouh, J.-M., Melese, T., Cross, R. L., Boyer, P. D. (1987) *Biochemistry* **26** 3749-53

Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M. (1998) *Cell* **93** 1117-24

Ziegler, M., Xiao, R., Penefsky, H. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** 4233-9

Dank

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere

Prof. Alan E. Senior, University of Rochester Medical Center, Rochester/NY, USA für die Bereitstellung der Glycerinkulturen der *E. coli*-Stämme SWM1 und CB6.

Prof. Stan D. Dunn und Derek T. McLachlin, University of Western Ontario, London/Ontario, Kanada, für die Bereitstellung von Glycerinkulturen und Plasmiden der b_{syn}-Mutanten.

Derek T. McLachlin, Michael Kersten und Gerhard Kraft für die Isolierung verschiedener b_{syn}-Mutanten.

Den Herren Markus Jehl, Pierre Buffet und Daniel Breuninger für ihre Mitarbeit im Rahmen der Forschungspraktika.

Dem Arbeitskreis Mikrobiologie für die Bereitstellung der French Press.

Den Herren Michael Kersten, Gerhard Kraft, Christopher Winicker, Thomas Schanding, Matthias Tremmel, Jean Pierre Knapp und Matthias Schneider für Unterstützung und die Diskussionen über den arabisch-israelischen Konflikt.

Allen Mitgliedern und Ex-Mitgliedern des Arbeitskreises für die Unterstützung und Unterhaltung.

Allen anderen, die mich in irgendeiner Weise unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums.

Lebenslauf

Name	Christian Motz
Geburtsdatum	06.03.1970
Geburtsort	Kaiserslautern
Wohnort	Leipziger Str. 104
	67663 Kaiserslautern
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulausbildung	1976-1980 Grundschule Bännjerrück, Kaiserslautern
	1980-1989 staatl. Hohenstaufen Gymnasium, Kaiserslautern
Schulabschluß	Allgemeine Hochschulreife 18. Mai 1989
Wehrdienst	1989-1990
Studium	1990-1995 Chemie (Diplom), Universität Kaiserslautern
	12. Oktober 1992 Vordiplom (Chemie)
	1995 Diplomarbeit: Untersuchungen der F_1-ATPase aus *Escherichia coli* mit Hilfe der ESR-Spektroskopie
	28. September 1995 Diplom (Chemie)
	1995-1999 Promotionsstudium Chemie, Universität Kaiserslautern
	Thema der Dissertation: ESR-spektroskopische Untersuchungen der F_oF_1 ATP Synthase aus *Escherichia coli*
	24. September 1999 Wissenschaftliche Aussprache