

**Identifizierung und Charakterisierung eines V_o - F_o -
Hybridmotors in der Na^+ - F_1F_o -ATP-Synthase aus
*Acetobacterium woodii***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Michael Fritz
aus Hachborn
Frankfurt 2009

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz
1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2004 bis Dezember 2007 im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main im Arbeitskreis von Prof. Dr. V. Müller durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. ATP – Die zentrale Energiewährung der Zelle	1
1.2. ATP-Synthasen – Rotationsmaschinen der Natur.....	4
1.3. F-Typ ATP Synthasen.....	5
1.3.1. Größe der F-Typ ATP-Synthasen	7
1.3.2. Struktur der F-Typ ATP-Synthasen.....	8
1.4. Die V-Typ ATPasen	12
1.5. Die A-Typ ATP-Synthasen der Archäen	14
1.6. Die Evolution der ATP-Synthasen.....	17
1.7. Die ATP-Synthase aus <i>Acetobacterium woodii</i>	21
1.7.1. Das Operon der F ₁ F ₀ -Synthase aus <i>A. woodii</i>	23
1.8. Fragestellung der Arbeit	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	27
2.2. Medien.....	27
2.3. Anzucht von <i>A. woodii</i>	28
2.4. Kultivierung in Serum- und in 1-l-Druckflaschen	29
2.4.1. Kultivierung in 20-l -Steilbrustflaschen.....	29
2.5. Bestimmung der optischen Dichte	30
2.6. Reinheitskontrollen	30
2.7. Herstellung von gewaschenen Membranen aus <i>A. woodii</i>	30
2.8. Enzymaktivitätsmessungen	31
2.8.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität	31
2.8.2. Aktivitätsmessung unter Na ⁺ -freien Bedingungen.....	32
2.9. Charakterisierung der Na ⁺ -F ₁ F ₀ -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	32
2.9.1. Bestimmung der optimalen Katalysertemperatur	32
2.9.2. Bestimmung des optimalen pH Wertes für die Katalyse.....	32
2.10. Hemmstoffexperimente.....	33
2.11. Bestimmung der Na ⁺ -Konzentration.....	33
2.12. Rekonstitution der gereinigten Na ⁺ -F ₁ F ₀ -ATP-Synthase	34
2.12.1. Darstellung von Proteoliposomen	34
2.12.2. Überprüfung der Liposomen auf Impermeabilität durch Na ⁺ -Ionen.....	35
2.12.3. Messung der ATP-Synthase-Aktivität	36
2.12.4. Erzeugung eines elektrochemischen Na ⁺ -Potentials ($\Delta \mu_{\text{Na}^+}$).....	38

2.12.5.	Erzeugung des Na^+ -Potentials ($\Delta p\text{Na}$).....	39
2.12.6.	Erzeugung eines elektrochemischen Potentials ($\Delta\Psi$).....	39
2.13.	Proteinbestimmung an ganzen Zellen	40
2.14.	Proteinbestimmung nach LOWRY	40
2.15.	Proteinbestimmung nach BIURETH.....	41
2.16.	Konzentrierung und Dialyse von Proteinlösungen	41
2.17.	Polyethylenglykol-Fällungen.....	41
2.18.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophores	41
2.19.	Native-Gradienten-Page	42
2.19.1.	Elution von Proteinen aus Gelen.....	42
2.20.	Immunologische Analysen durch Western-Blot.....	42
2.20.1.	Aufreinigung von IgGs	43
2.21.	Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	43
2.21.1.	Solubilisierung des Enzyms aus der Cytoplasmamembran.....	44
2.21.2.	Gelfiltration	44
2.21.3.	Dichtegradientenzentrifugation.....	44
2.21.4.	Anionenaustauschchromatographie.....	45
2.22.	Isolierung des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -Synthase aus <i>A. woodii</i>	45
2.22.1.	Isolierung aus der gereinigten Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase	46
2.22.2.	Isolierung aus dem Solubilisat.....	46
2.23.	Erzeugung von Proteinkristallen.....	47
2.23.1.	Erzeugung von 2D-Proteinkristallen.....	47
2.24.	Erzeugung von 3D-Proteinkristallen.....	49
2.25.	MALDI-TOF-MS	53
2.26.	LILBID-TOF-MS	54
2.27.	Chemikalien und Gase	55
3.	ERGEBNISSE	56
3.1.	Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	56
3.1.1.	Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	57
3.1.2.	Solubilisierung	58
3.1.3.	Gelfiltration	61
3.1.4.	Dichtegradientenzentrifugation.....	64
3.1.5.	Zusammenfassung	65
3.2.	Untereinheitenzusammensetzung Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	66
3.3.	Biochemische Charakterisierung Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	69
3.3.1.	Bestimmung des Substratspektrums	70
3.3.2.	Bestimmung des optimalen pH Wertes für die ATP-Hydrolyse	71

3.3.3.	Bestimmung der optimalen Katalysetemperatur	72
3.3.4.	Natriumionenabhängigkeit der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	73
3.4.	Rekonstitutionierung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i> in Proteoliposomen	80
3.4.1.	Messung von ATP-Synthase	83
3.5.	Der c-Ring der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	87
3.5.1.	Isolierung des c-Ringes	88
3.5.2.	Stabilität des c-Ringes	90
3.5.3.	Analyse der Untereinheitenstöchiometrie des c-Ringes	91
3.5.4.	2D Proteinkristallisation des c-Ringes aus <i>A. woodii</i>	93
3.5.5.	Untersuchung der 2D-Kristalle des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase durch Elektronenmikroskopie	97
3.5.6.	Bestimmung der Masse und Untereinheitenzusammensetzung des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i> durch LILBID-TOF-MS.....	100
3.5.7.	Untersuchungen zur möglichen Variation der Untereinheiten-stöchiometrie des c-Ringes	104
3.6.	3D Kristallisation des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i> ..	106
3.6.1.	Ergebnisse der Kristallisation	107
4.	DISKUSSION	113
4.1.	Na^+ -Energetik in <i>A. woodii</i>	113
4.2.	Die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	114
4.3.	Evolution der c-Untereinheiten	116
4.4.	Die Ionenbindestellen der c-Untereinheiten	120
4.5.	Modellvorstellungen zur Funktion der F_0 -Untereinheit	130
4.6.	Ausblick	137
5.	LITERATURVERZEICHNIS	139
6.	ANHANG	161
7.	DANKSAGUNG	164

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
BICIN	N,N-Bis-2-Hydroxyethyl-Glycin
bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio-1-propansulfat
DCCD	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
deion.	deionisiert
DES	Diethylstilbestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
LILBID	„laser-induced liquid bead ion desorption“
MALDI-TOF-MS	„matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry“
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
N-	Amino-
NMR	Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pi	anorganisches Phosphat

PMSF	Phenylmethansulfonyl-fluorid
psi	„pounds per square-inch“
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N-Tris-(hydroxymethyl-)-methyl-2-aminomethan-sulfonsäure
Tricin	N-[Tris-(hydroxyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„Unit“
UE	Untereinheit
Upm/Rpm	Umdrehung pro Minute
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1. ATP – Die zentrale Energiewährung der Zelle

Adenosintriphosphat, kurz ATP, ist die zentrale Energiewährung in allen Zellen. Die zentrale Rolle der Substanz im Energiestoffwechsel wurde erstmals 1939 beschrieben (Kalckar, 1939; Lipmann, 1941, 1948, 1949). ATP ist ein Nukleotid und setzt sich aus drei Bestandteilen zusammen: der Base Adenin, dem Zucker Ribose und einer Kette von drei Phosphorylgruppen. Jede endotherme Reaktion benötigt Energie und die Form, in der diese Energie in Zellen gespeichert und transportiert wird, ist ATP. Die Energie wird dabei in der Bindung der Phosphorylgruppen gespeichert. Die Phosphorylgruppen sind über Phosphoanhydrid-Bindungen miteinander verbunden. Bei der hydrolytischen Spaltung (Abb. 1) dieser Bindungen wird Energie freigesetzt, da sich zum einen die negativen Ladungen der Triphosphateinheiten des ATP gegenseitig abstoßen und zum anderen das Hydrolyseprodukt Orthophosphat (P_i) besser hydratisiert und resonanzstabilisiert ist als die entsprechende γ -Phosphorylgruppe im ATP. Dabei werden unter Standardbedingungen jeweils etwa 32,3 kJ/Mol (Spaltung einer Bindung) oder 64,6 kJ/Mol (Spaltung beider Bindungen) an Energie frei. Unter den in Zellen vorherrschenden Bedingungen erhöht sich dieser Energiebetrag sogar auf etwa 50 kJ/Mol (Neumüller, 1979)

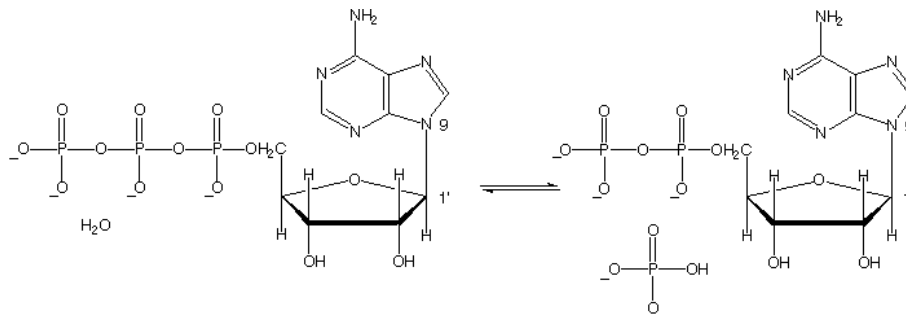


Abb. 1: Strukturformel von ATP und der Reaktion zu ADP und $P_{(i)}$. Die Spaltung der Bindung liefert unter physiologischen Bedingungen einen Energiebetrag von ca. 50 kJ/Mol.

ATP dient als zentrale Energiewährung auch zur Übertragung und Überführung verschiedener Energieformen. Es bedient so unterschiedliche Reaktionen wie die Synthese von anderen Biomolekülen (chemische Energie), Bewegungen

(mechanische Energie) oder auch den Transport von Stoffen (osmotische oder elektrochemische Energie). ATP ist nicht im eigentlichen Sinne eine Speicherform für Energie, denn der ATP-Umsatz in lebenden Zellen ist sehr hoch (Cross, 1981).

Ein normaler Mensch setzt pro Tag etwa sein eigenes Körpergewicht an ATP um, ein Marathonläufer bei seinem Lauf ca. 200 kg, der Körper verfügt jedoch nur über ca. 35 g ATP (Neumüller, 1979). Selbst eine Bakterienzelle setzt pro Sekunde 2,5 Millionen ATP-Moleküle um, die Synthese von ATP kann auf drei Wegen erfolgen, entweder durch Substratkettenphosphorylierung, durch ionengradientengetriebene Phosphorylierung oder durch Decarboxylierung (Dimroth, 1997 #3384).

Bei der Substratkettenphosphorylierung wird ATP gewonnen, indem eine Phosphorylgruppe im Verlauf von Stoffwechselfvorgängen, beispielsweise der Oxidation im Verlauf der Glykolyse, auf ein Zwischenprodukt des Reaktionsweges und von dort auf ADP übertragen wird. Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab (Abb. 2):

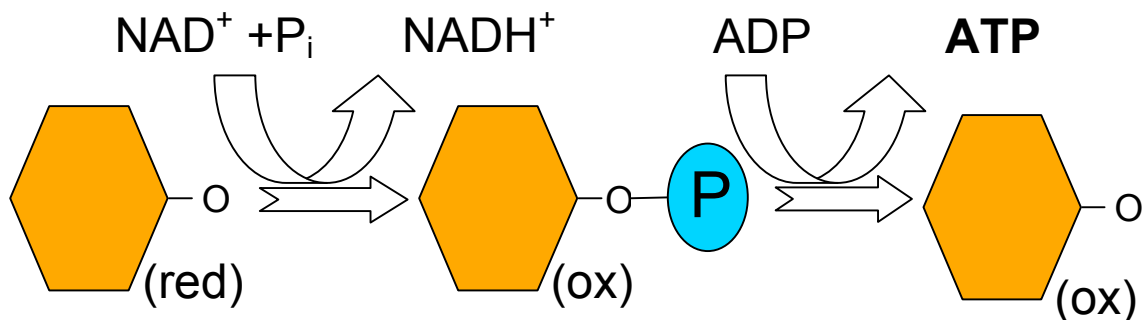


Abb. 2: Schema der Substratkettenphosphorylierung. Auf eine Verbindung, z.B. Hexose, wird eine Phosphatgruppe übertragen, dabei wird die Verbindung oxidiert. Von dieser jetzt oxidierten Verbindung wird die Phosphatgruppe auf ADP übertragen. Es wird eine oxidierte Verbindung und ein ATP erhalten

Die zweite Möglichkeit zur ATP-Gewinnung in Zellen ist die Nutzung eines elektrochemischen Ionengradienten an einer Membran durch eine ATP-Synthase (Abb. 3) (Mitchell, 1961 #3228).

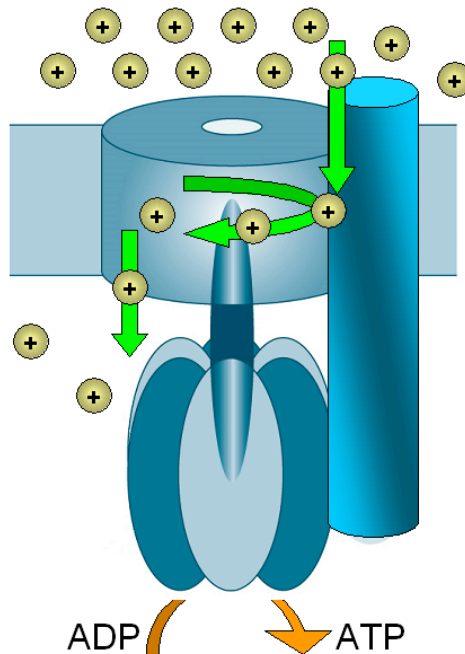


Abb. 3: Schematische Darstellung einer ATP-Synthase. Die Turbine wird durch den Ionenfluss am elektrochemischen Gradienten der Membran angetrieben

er Ionengradient treibt eine Turbine an (F_0 Domäne des Enzyms) (Aris *et al.*, 1985; Dimroth *et al.*, 1998) und die Turbine treibt einen Generator an (F_1 Domäne des Enzyms) (Cross, 1981). Der Generator setzt dabei die mechanische Energie der Rotation in eine chemische Energie um und katalysiert so die Reaktion von $ADP + P_i$ zu ATP (Abb. 3). Die Energie, die zur Erzeugung eines ATP benötigt wird, bezeichnet man als Phosphorylierungspotential (ΔG_p) und beträgt etwa 50-70 KJ/mol (Cross und Duncan, 1996). Wie viele Ionen durch die Turbine strömen müssen, um ein ATP zu erzeugen, hängt unmittelbar vom Membranpotential (also dem elektrochemischen Gradienten über der Membran) ab. Bei einem physiologischen Membranpotential von -180 mV und einem ΔG_p von 50-70 KJ/mol werden etwa 3-4 Ionen benötigt, um ein ATP zu synthetisieren

(Mukohata *et al.*, 1986). Diese thermodynamische Beziehung wird durch Gleichung (1.) beschrieben.

$$\Delta G_p = -n * F * \Delta \mu H^+ \quad (\text{Gl.1})$$

n = translozierte Ionen; F = Faraday-Konstante; ΔG_p = 50-70 KJ/mol;
 $\Delta \mu^{(+)}$ = -180 mV

Die ATP-Synthase kann aber auch rückwärts laufen und unter Verbrauch von Energie (ATP) Ionen gegen einen Gradienten über die Membran pumpen.

1.2. ATP-Synthasen – Rotationsmaschinen der Natur

ATP-Synthasen sind Rotationsmaschinen, die mechanische Energie in chemische Energie umwandeln können. Die Kraft, die bei der ATP-Hydrolyse erzeugt wird, ist so stark, dass das Enzym ein Filament drehen kann, welches eine so große Länge besitzt, dass es mit einem Mikroskop beobachtet werden kann. In vivo erreicht das Enzym Drehzahlen von mehr als 2000 Umdrehungen pro Sekunde (von Ballmoos *et al.*, 2008a).

Die ATP-Synthasen weisen als essentielle Enzyme eine hohe Konserviertheit in ihrer Struktur (Abb. 4) auf. Allen gemein ist ein hydrophiler, hexagonaler Kopfteil mit den katalytischen Untereinheiten sowie ein membrangebundener Teil mit den für die Ionentranslokation zuständigen Untereinheiten. Beide Teile werden durch zwei bzw. drei Stiele miteinander verbunden (Abrahams *et al.*, 1994; Boekema und Bottcher, 1992; Capaldi *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993; Lingl *et al.*, 2003; Vonck *et al.*, 2009).

Derzeit werden drei Klassen (A-Typ, V-Typ und F-Typ) (Cross und Müller, 2004; Grüber *et al.*, 2001b) unterschieden, welche aber einen gemeinsamen Ursprung besitzen (Gogarten und Taiz, 1992; Nelson und Taiz, 1989). Zu den am besten untersuchten zählen die F-ATP-Synthasen, die in den inneren

Mitochondrienmembranen, den Thylakoidmembranen von Chloroplasten und in Zellmembranen von Bakterien vorkommen. Weiterhin sind A-ATP-Synthasen (Grüber *et al.*, 2001a) aus Archäen und V-ATPasen (Forgac, 1992 #1568; Forgac, 2007 #5326), die in den Membranen von Vakuolen, Lysosomen, Endosomen und synaptischen Vesikeln vorkommen, bekannt. Die meisten der bislang bekannten Enzyme des V-Typs besitzen unter physiologischen Bedingungen lediglich die Fähigkeit, unter ATP-Hydrolyse einen Protonentransport zu katalysieren. Eine ATP-Synthese-Funktion für V-ATPasen konnte erstmals für die damals als V-Typ klassifizierte (neuere Erkenntnisse zeigen, dass es sich um ein Enzym des A-Typs handelt) H⁺-ATPase aus *Thermus thermophilus* durch einen artifiziellen, starken Ionengradienten nachgewiesen werden (Yokoyama *et al.*, 2000). Allen gemeinsam ist eine ähnliche Grundstruktur. Sie bestehen aus einem in der Membran verankerten Teil und einem cytoplasmatischen Kopfteil. Beide Teile sind durch Stiele miteinander verbunden (Boekema *et al.*, 1999; Coskun *et al.*, 2004; Karrasch und Walker, 1999). Die Membrandomäne transloziert Ionen durch die Membran (Fillingame, 1992; Schneider und Altendorf, 1987) und die cytoplasmatische Domäne katalysiert die ATP-Synthese bzw. Hydrolyse (Cross, 1981; Forgac, 2000).

1.3. Die F-Typ-ATP-Synthasen

F-Typ-ATP-Synthasen sind der am besten untersuchte Typ der ATP-Synthasen (Girvin *et al.*, 1998; Senior *et al.*, 2002; Senior *et al.*, 1995). Sie sind in der Cytoplasmamembran von Bakterien, der inneren Mitochondrienmembran und der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert. Die bakteriellen F-Typ-ATP-Synthasen stellen mit wenigstens acht verschiedenen Untereinheiten die einfachste Klasse der ATP-Synthasen dar (Walker und Gay, 1983). Die Untereinheiten sind in zwei Domänen organisiert, in der cytoplasmatischen F₁-Domäne finden sich die Untereinheiten $\alpha_3:\beta_3:\gamma:\delta:\epsilon$ und in der membranständigen F₀-Domäne die Untereinheiten $a:b_2:c_{10-15}$ (Junge *et al.*, 2009).

Die F_1F_0 -ATP-Synthasen aus Mitochondrien weisen eine leicht abgewandelte Struktur auf. Die Untereinheiten δ und ε bilden zusammen eine der bakteriellen ε -Untereinheit vergleichbare Funktionseinheit und der periphere Stiel besteht statt aus δ und b_2 aus dem sog. OSCP, F_6 und b (Walker *et al.*, 1995) (Abb.4).

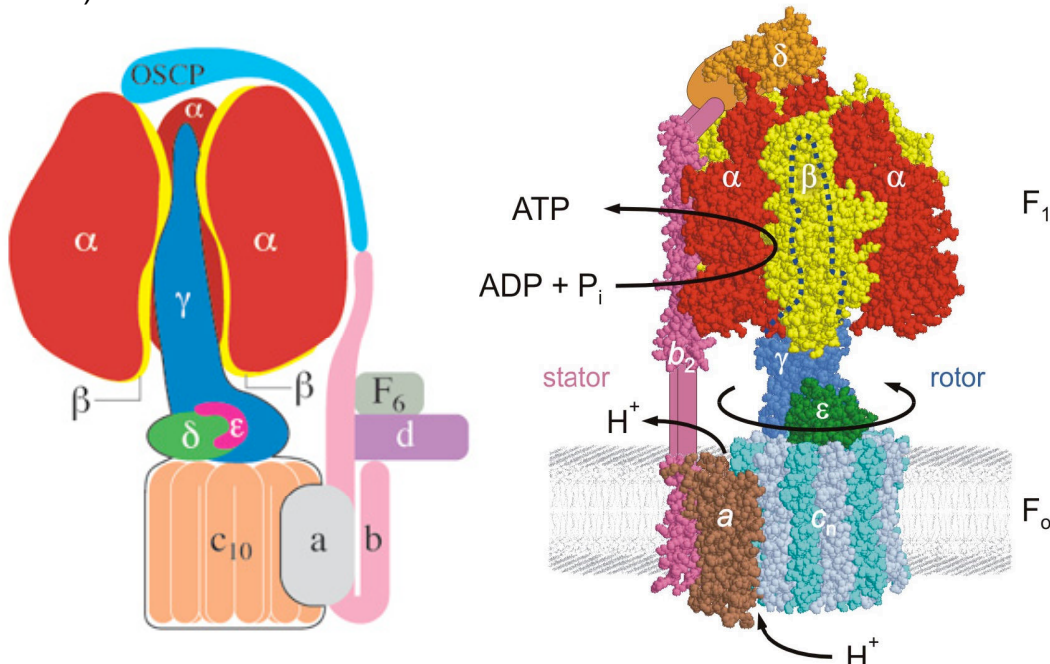


Abb. 4: Modelle der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus Mitochondrien (links) und Bakterien (rechts) nach Walker (Walker *et al.*, 1995). Rechts: Modell einer bakteriellen F-Typ-ATP-Synthase nach Weber (Weber und Senior, 2000), für Erklärungen siehe Text.

Von allen Untereinheiten, außer von der Untereinheit a , existieren mittlerweile hochauflösende NMR- oder Kristallstrukturen.

Bei der durch ATP-Hydrolyse getriebenen Reaktion führt die Spaltung von ATP zu einer Konformationsänderung in der β -Untereinheit der F_1 -Domäne, diese wiederum treibt die γ -Untereinheit in eine 120° Rotation im Uhrzeigersinn. Durch die alternierende Anordnung von drei α - und drei β -Untereinheiten wird die γ -Untereinheit in vollständige Rotation versetzt. Die γ -Untereinheit überträgt ihre Kraft auf den membranständigen c -Ring, welcher wie eine Turbine die Ionen (H^+ oder Na^+) über die Membran pumpt (Capaldi und

Aggeler, 2002). Bei den Ionen handelt es sich im Allgemeinen um Protonen, im Fall der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus den Bakterien *Propionigenium modestum*, *Ilyobacter tartaricus*, *Clostridium paradoxum* und *Acetobacterium woodii* um Natrium-Ionen (Ferguson *et al.*, 2006; Heise *et al.*, 1991; Laubinger und Dimroth, 1988; Neumann *et al.*, 1998).

Die Rotation der γ -Untereinheit im F_1 -Teil des Enzyms wurde erstmals 1997 experimentell visualisiert (Noji *et al.*, 1997), dazu wurden der mit einem fluoreszenzmarkierten Aktinfilament an der γ -Untereinheit gekoppelte F_1 -Teil auf einer Trägerplatte fixiert und die Rotation fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Unter ATP-Hydrolysebedingungen konnte fluoreszenzmikroskopisch direkt eine Drehung des Filaments gegen den Uhrzeigersinn beobachtet werden (Noji *et al.*, 1997). Eine Verknüpfung mit der ε -Untereinheit lieferte identische Daten und zeigte eine Verknüpfung von γ und ε (Diez *et al.*, 2004; Kato-Yamada *et al.*, 1998). Das ergänzende Experiment für protonengradientgetriebene Rotation wurde 2004 durchgeführt (Diez *et al.*, 2004). Hier wurde an in Liposomen rekonstituierten F-Typ-ATP-Synthasen aus *E. coli* durch FRET (fluorescence resonance energy transfer) eine Rotation im Uhrzeigersinn während der ATP-Synthese gemessen.

1.3.1. Größe der F-Typ-ATP-Synthasen

Die Gesamthöhe des F_1F_0 -Komplexes beträgt etwa 190 Å, wobei der F_1 -Teil ca. 83 Å, der F_0 -Teil 58 Å und der im durch die Untereinheit γ gebildete Verbindungsstiel zwischen F_1 und F_0 ca. 50 Å (Stock *et al.*, 1999) misst. Der größte Durchmesser des F_1 -Komplex-Enzyms horizontal zur Membranebene beträgt ca. 90-114 Å (Abrahams *et al.*, 1994; Böttcher *et al.*, 1995). Die Durchmesser des durch die c -Untereinheiten gebildeten Ringes, der auch als c -Ring bezeichnet wird, ist äußerst variabel. Je nach Anzahl der c -Untereinheiten im Ring variiert dieser von 50-80 Å (Fritz *et al.*, 2008; Matthies *et al.*, 2009; Meier

et al., 2005a; Pogoryelov *et al.*, 2005; Seelert *et al.*, 2003). Die Höhe des Ringes beträgt ca. 73 Å.

1.3.2. Struktur der F-Typ-ATP-Synthasen

Die ersten wichtigen Erkenntnisse über die Struktur der F-Typ-ATP-Synthasen wurden vor allem durch Arbeiten mit der mitochondrialen F-Typ-ATP-Synthase aus Rinderherzen gewonnen (Abrahams *et al.*, 1996; Abrahams *et al.*, 1994; Gibbons *et al.*, 2000; Menz *et al.*, 2001; Orriss *et al.*, 1996). Im Jahr 1994 gelang eine hochauflösende Struktur (2,8 Å) von bovinem F₁ (Abrahams *et al.*, 1994). Die ersten Strukturen von bakteriellen F₁-Domänen (Hausrath *et al.*, 1999) brachten nur eine Auflösung von 4,4 Å, erst mit der Kristallisation einer F₁-Domäne aus *E. coli* ($\alpha_3\beta_3\gamma$) mit verkürztem γ wurde eine hohe Auflösung von 2,1 Å erreicht (Gibbons *et al.*, 2000; Rodgers und Wilce, 2000). Strukturen aus Spinatchloroplasten (Groth und Pohl, 2001) und aus dem thermophilen Bakterium *PS3* (Shirakihara *et al.*, 1997) sowie aus *Bacillus TA2* (Stocker *et al.*, 2007) lieferten ebenfalls wichtige Informationen für die Struktur der F₁-Domäne.

Der F₁-Komplex besteht aus drei α - sowie drei β -Untereinheiten, die abwechselnd angeordnet einen hexagonalen Ring bilden. Die Sekundärstrukturen der α - und β -Untereinheit sind sich dabei sehr ähnlich, *E. coli* α und β sind zu ca. 35 % homolog und zu ca. 20 % identisch (Walker *et al.*, 1984a). Beide Untereinheiten bestehen aus einer sechssträngigen β -Faltblattstruktur am N-Terminus, einer zentralen Domäne, welche die Nukleotidbindestelle enthält, und einem aus sieben (Untereinheit α) oder sechs (Untereinheit β) α -Helices aufgebauten C-Terminus (Abrahams *et al.*, 1994).

Die Bindung der Nukletide erfolgt zwischen den Kontaktflächen der α - und β -Untereinheiten. Die drei katalytisch aktiven Bindungsstellen befinden sich dabei in der β -Untereinheit. Aus dem Zentrum des Ringes aus $\alpha_3\beta_3$ ragt die γ -Untereinheit, bestehend aus zwei antiparallelen und leicht umeinander

gewundenen α -Helices. Der C-Terminus ist etwas länger als der N-Terminus und enthält mehrere hoch konservierte, lipophile Aminosäuren (Iwamoto *et al.*, 1991; Iwamoto *et al.*, 1994; Miki *et al.*, 1994a; Miki *et al.*, 1994b). Diese interagieren mit ebenfalls lipophilen Aminosäuren in der α - und β -Untereinheit. Am anderen Ende interagiert die γ -Untereinheit mit der ε -Untereinheit und bildet mit ihr den so genannten „zentralen Verbindungsstiel“ zwischen der cytoplasmatischen F_1 - und der membranständigen F_0 -Domäne des Enzyms (Wilkins und Capaldi, 1992; Wilkins und Capaldi, 1998a, b). Die Struktur der ε -Untereinheit war anfangs umstritten, da die räumliche Ausrichtung des C-Terminus in verschiedenen Arbeiten stark voneinander abwichen (Gibbons *et al.*, 2000; Rodgers und Wilce, 2000; Tsunoda *et al.*, 2000). Eine Erklärung für dieses Phänomen stellte die Theorie einer regulativen Funktion der ε -Untereinheit bereit (Tsunoda *et al.*, 2001). Die ε -Untereinheit könnte durch Konformationsänderung als eine Art Sperre wirken und so die Rotation des Enzyms und die ungewollte Hydrolyse von ATP verhindern.

Außen wird die F_1 -Domäne durch die δ -Untereinheit stabilisiert. Diese besteht an ihrem N-Terminus aus sechs ineinandergewundenen α -Helices (Wilkins *et al.*, 1997). Über den C-Terminus sind keine strukturellen Daten verfügbar. Ihre Funktion ist die Verbindung des oberen Teiles des $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes mit der b_2 -Untereinheit (Wilkins *et al.*, 1997). Die Untereinheiten δ und b_2 bilden den peripheren Stiel.

Die Untereinheit b_2 gehört zur membranständigen F_0 -Domäne des Enzyms, welche außerdem die Untereinheiten a und c_{10-15} enthält. Die Untereinheit b besitzt am N-Terminus einen stark hydrophoben Bereich, der die Untereinheit in der Membran verankert. Der N-Terminus hingegen ist hydrophil und ragt bis zur δ -Untereinheit herauf (Rodgers und Capaldi, 1998). Dabei ist die Struktur der als Homodimer vorliegenden b_2 -Untereinheiten überwiegend α -helical (Del Rizzo *et al.*, 2002; Dmitriev *et al.*, 1999). Die b_2 Untereinheit ist an ihrem N-Terminus mit der a -Untereinheit verknüpft. Über die Struktur der

Untereinheit *a* ist wenig bekannt. Die Sekundärstruktur der Untereinheit *a* aus *E. coli* zeigt ein stark hydrophobes, 271 Aminosäuren großes Membranprotein. Die Untereinheit besitzt möglicherweise fünf transmembrane Bereiche, die durch zwei periplasmatische, extramembrane Schleifen und zwei cytoplasmatische, extramembrane Schleifen miteinander verbunden sind. Nach den Modellen von Valiyaveetil und Fillingame (1997) sowie von Altendorf (2000) befindet sich der N-Terminus von Untereinheit *a* auf der periplasmatischen Seite der Membran und der C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite (Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Es wird angenommen, dass die Untereinheiten *a* und *c* gemeinsam an der Protonentranslokation beteiligt sind (Deckers-Hebestreit und Altendorf, 1996; Valiyaveetil und Fillingame, 1997; Vik und Ishmukhametov, 2005). Die *c*-Untereinheit ist mit etwa 80 Aminosäuren die kleinste Untereinheit des Enzymkomplexes mit einer Kopienzahl von 10-15, jedoch auch die zahlenmäßig häufigste. Die Untereinheit wird aus zwei α -helikalen transmembranen Domänen gebildet (Abb. 5).

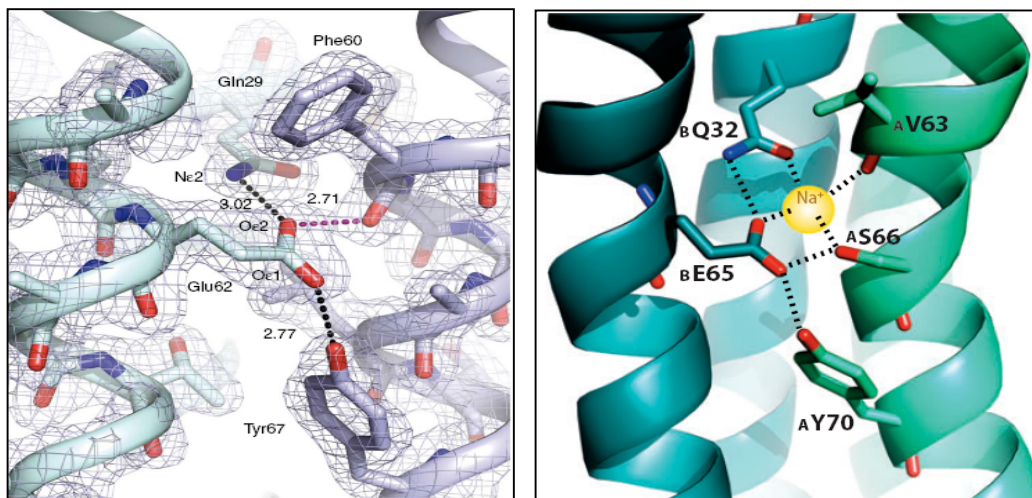


Abb. 5 Vergleich der Ionenbindemotive der F_1F_0 -ATP-Synthasen. Die Na^+ -Bindestelle aus *I. tartaricus* (rechts) (Meier *et al.*, 2005a), die H^+ -Koordination der F-Typ-ATP-Synthase aus der *S. platensis* (Pogoryelov *et al.*, 2009) (links). Die Koordination findet bei *I. tartaricus* und *S. platensis* zwischen zwei 8-kDa-*c*-Untereinheiten (A&B) statt.

Die Helices sind durch eine polare Schleife verbunden, die mit den Untereinheiten γ und ϵ interagiert (Hermolin *et al.*, 1999; Watts und Capaldi,

1997; Watts *et al.*, 1995). Die beiden verbundenen Helices durchspannen die Membran in einer haarnadelähnlichen Struktur, in deren Mitte eine polare Tasche integriert ist, welche die Ionenkoordination ermöglicht (Abb 5). Essentiell für die Ionenkoordination sind dabei stets die geladenen Aminosäuren Glutamat (Glu, E) oder Aspartat (Asp, D). Diese befinden sich etwa in der Mitte der Membran, bei *I. tartaricus* handelt es sich um E65.

Die Kopienzahl der *c*-Untereinheiten ist abhängig von der Spezies. Das Enzym aus *Spirulina platensis* enthält einen Ring aus 15 *c*-Untereinheiten (Pogoryelov *et al.*, 2005), die ATP-Synthase aus Spinatchloroplasten enthält einen Ring aus 14 *c*-Untereinheiten (Seelert *et al.*, 2003), die natriumtransportierende F_1F_0 -ATP-Synthase aus dem Bakterium *Ilyobacter tartaricus* 11 *c*-Untereinheiten (Vonck *et al.*, 2002) und die mitochondriale ATP-Synthase aus Hefezellen sowie die bakterielle F_1F_0 -ATP-Synthase aus *E. coli* jeweils 10 *c*-Untereinheiten (Jiang *et al.*, 2001; Stock *et al.*, 1999). Dies hat gravierende Auswirkungen auf die Energetik der F-Typ-ATP-Synthasen (Müller *et al.*, 2005a; Müller *et al.*, 2005b), da die Zahl der *c*-Untereinheiten der Menge an Ionen entspricht, die bei einer 360°-Rotation des Enzyms über die Membran transloziert werden (Capaldi und Aggeler, 2002; Fillingame *et al.*, 2002; Xing *et al.*, 2004). Die (pseudo-)dreifache Symmetrie im F_1 -Teil aller ATP-Synthasen führt daher zu einem Verhältnis der transportierten Ladungen pro ATP, welches der Anzahl der Ionenbindestellen im *c*-Ring geteilt durch 3 entspricht, denn es werden pro vollständiger Rotation des Ringes bzw. der γ -Untereinheit im Kopfteil des Enzyms 3 Moleküle ATP gebildet. Die Variation bei der Anzahl der Untereinheiten im *c*-Ring führt also auch zu einer Variation des Ionen/ATP-Verhältnisses von 3,3 bei *E. coli* bis hin zu 5 bei *S. platensis*. Die Ursachen hierfür könnten in der Anpassung der jeweiligen Spezies an verschiedene Umweltbedingungen liegen. Ein kleines Ionen/ATP-Verhältnis kann für Mitochondrien oder aerobe Bakterien von Vorteil sein, um ein möglichst hohes $\Delta\mu H^+$ bzw. $\Delta\Psi$ zu erzeugen. Größere *c*-Ringe hingegen könnten eine geeignete Lösung für die ATP-Synthase auch bei geringerem oder schwankendem $\Delta\Psi$ sein.

Eine Variation des Ringdurchmessers wurde erstmals für den *c*-Ring aus *E. coli* beschrieben (Schemidt *et al.*, 1998). Spätere Untersuchungen zur Stöchiometrie des *c*-Rings aus *E. coli* konnten diese Untersuchungen allerdings nicht bestätigen (Ballhausen *et al.*, 2009; Krebstakies *et al.*, 2008). Auch die bekannten hochaufgelösten Strukturen von *c*-Ringen sowohl aus F- als auch aus V-Typ-ATPasen (Meier *et al.*, 2005a; Murata *et al.*, 2005; Pogoryelov *et al.*, 2009) deuten darauf hin, dass die Geometrie der *c*-Untereinheiten die Ringgeometrie vorgibt (Junge *et al.*, 2009; von Ballmoos *et al.*, 2008b).

1.4. Die V-Typ-ATPasen

Im Gegensatz zu den F-Typ-ATP-Synthasen sind die V-Typ-ATPasen als reine Ionenpumpen in eukaryotischen Endo- bzw. Plasmamembranen lokalisiert (Nelson, 1992; Nelson und Klionsky, 1996; Wieczorek, 1992; Wieczorek *et al.*, 1999). Sie sind unter physiologischen Bedingungen nicht zur ATP-Synthese fähig. Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau einer V-Typ-ATPase.

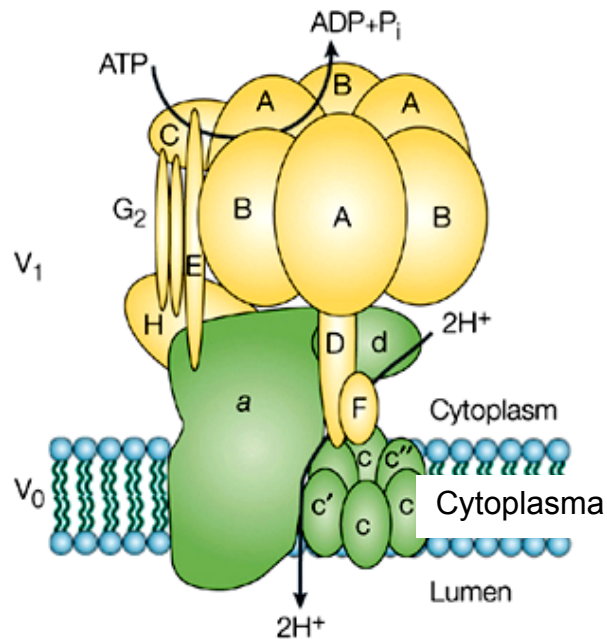


Abb.6, Schematische Darstellung einer V-Typ ATPase. (Nishi und Forgac, 2002), für Erläuterungen siehe Text.

V-Typ-ATPasen bestehen aus 14 Untereinheiten: A₃, B₃, C, D, E, F, G_x, H_x, a, d, e, c, c' und c'' (vgl. Abb. 8). Die Struktur mit einem hexagonalen Kopfteil aus

A_3B_3 ist dem F- und A-Typ vergleichbar. Die Stielstrukturen werden aus den Untereinheiten C, D, E, F, G und H gebildet. Die eigentliche Verbindung des Kopfteils mit dem Membranteil wird von der Untereinheit D hergestellt (Armbrüster *et al.*, 2004; Grüber, 2005). Der Membranteil setzt sich aus den Untereinheiten *a*, *d*, *c*, *c'* und *c''* zusammen. Die *a*-Untereinheit stellt dabei eine Fusion der bakteriellen *a*- und b_2 -Untereinheiten (Forgac, 1999; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001) dar. Der Rotorring wird von den Untereinheiten *c*, *c'* und *c''* gebildet (Wang *et al.*, 2007). Die Untereinheiten *c* und *c'* ähneln einer verdoppelten *c*-Untereinheit der F-Typ-ATP-Synthasen (Hirata *et al.*, 1997; Hirata *et al.*, 1990; Mandel *et al.*, 1988). Jedoch besitzen diese nicht zwei, sondern nur eine konservierte Ionenbindestelle. Die Untereinheit *c''* hat fünf transmembrane Helices mit nur einer Ionenbindestelle in der dritten Helix.

Alle Untereinheiten sind auch in dem Ring zu finden (Hirata *et al.*, 1997), wobei das Verhältnis aus je einer Kopie *c'* und *c''* zu vier Kopien der Untereinheit *c* bestimmt wurde (Wang *et al.*, 2007). Das Verhältnis von Ionen zu ATP ist damit auf 2 determiniert. Unter Berücksichtigung des physiologischen Membranpotentials von ca. 180 mV (Butsch und Bachofen, 1984; Rottenberg, 1979) ist damit keine ATP-Synthese mehr möglich. Ein artifizielles Potential von ausreichender Größe kann dieses Enzym jedoch auch zur ATP-Synthese zwingen (Futai *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2000). Hierbei wurden Potentiale angelegt, die mit etwa 400 mV mehr als die doppelte Größe des *in vivo* anzutreffenden Membranpotentials aufweisen. Dieser Versuch zeigte aber, dass nicht das Fehlen von Ionenbindestellen, sondern allein die Summe der translozierbaren Ionen pro Rotation und das Membranpotential für die Fähigkeit eines Enzyms verantwortlich zeichnen.

Die Regulation der ATP-Hydrolyse ist bei diesen Enzymen besonders wichtig und um eine möglichst effiziente Inaktivierung zu erreichen, kann der V_1 -Teil vom V_0 -Teil reversibel dissoziieren (Wieczorek *et al.*, 2000). Dieser Vorgang ist abhängig vom AMP/ADP-zu-ATP-Verhältnis innerhalb der Zelle (Qi und

Forgac, 2007). Da der Ionenkanal der V_O -Domäne im dissoziierten Zustand nicht mehr zur Ionentranslokation imstande ist, kann das Membranpotenzial aufrechterhalten werden.

Die meisten V-Typ-ATPasen verwenden Protonen als Kopplungsign, allerdings sind auch Na^+ verwendende Enzyme aus *Clostridium fervidus* (Höner zu Bentrup *et al.*, 1997; Kakinuma und Igarashi, 1994; Kakinuma *et al.*, 1999; Speelmans *et al.*, 1994) als V_1V_O -ATPasen klassifiziert worden. In Abbildung 7 ist die Struktur der Na-Bindetasche im c-Ring der Na^+ - V_1V_O -ATPase von *E. hirae* zu sehen. Die Ionenkoordination findet zwischen den Helices 3&4 der ersten und den Helices 1&2 der folgenden 16-kDa-c-Untereinheit statt (Murata *et al.*, 2005).

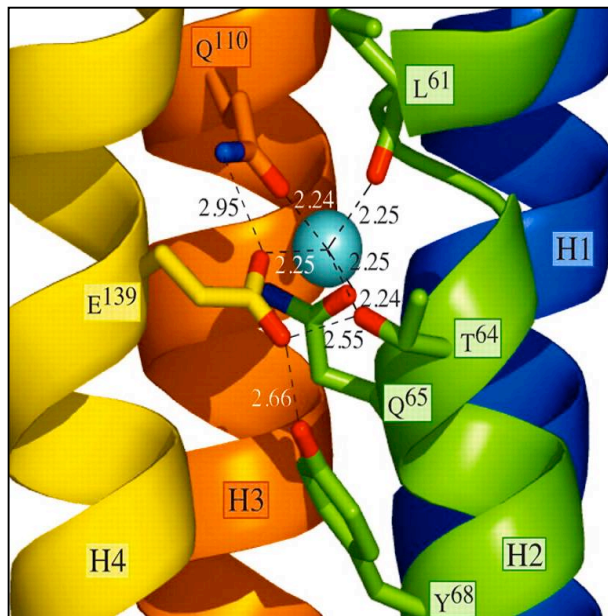


Abb. 7: Die Ionenkoordination zwischen zwei c-Untereinheiten in der V_1V_O -ATP-Synthase aus *E. hirae* (Murata *et al.*, 2005).

1.5. Die A-Typ-ATP-Synthasen der Archäen

Genau wie die *Archea* als Reich zwischen den *Bacteria* und *Eucarya* stehen, stellen auch die A-Typ-ATP-Synthasen ein Bindeglied zwischen den F- und V-Typ-ATP-Synthasen dar (Cross und Müller, 2004). Strukturell ähneln sie eher

den V-Typ-ATPasen (Abb. 8), sind aber zur Synthese von ATP fähig (Ihara *et al.*, 1992; Yokoyama *et al.*, 1998).

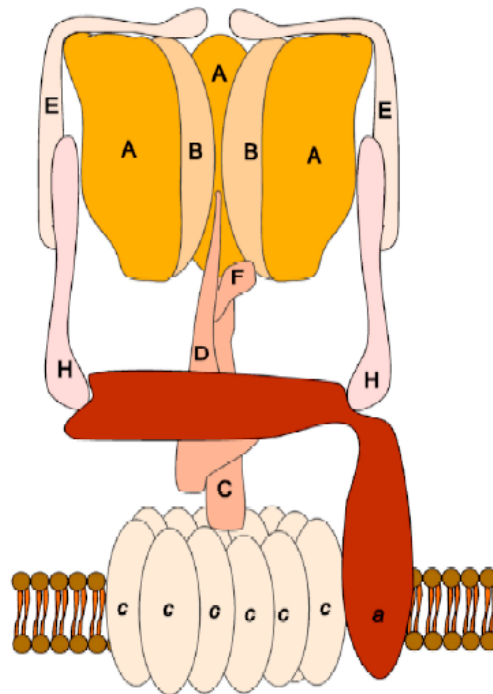


Abb. 8: Modell der Untereinheitenzusammensetzung für archäelle ATP-Synthasen. Modell der A_1A_0 -ATP-Synthase mit 2 Heterodimeren H und E. Untereinheit a macht einen 90°-Knick. Untereinheit a verläuft von der Membrandomäne bis zum Verankerungspunkt am A_1 -Teil (Vonck *et al.*, 2009)

Über die Struktur der einzelnen Untereinheiten ist wenig bekannt. Das erste archäelle ATP-Synthase-Operon wurde aus *M. mazei* Gö1 kloniert und sequenziert. Es beinhaltet 10 Gene (5'-Ende *atpH*, *atpI*, *atpK*, *atpE*, *atpC*, *atpF*, *atpA*, *atpB*, *atpD* und *atpG*) (Ruppert *et al.*, 1998; Wilms *et al.*, 1996). Ähnliche Operone wurden in weiteren *Archea* gefunden. Diese bestehen in der Regel aus 9-10 Genen. Die erste archäelle ATP-Synthase wurde aus dem hyperthermophilen, methanogenen *Methanococcus jannaschii* gereinigt (Lingl *et al.*, 2003). Das gereinigte Enzym enthielt alle aus dem Operon abgeleiteten Untereinheiten: H, a, c, E, C, F, A, B und D. Die ATP-Synthasen aus Archäen enthalten neun verschiedene Untereinheiten, genetische und strukturelle Analysen weisen jedoch auf eine nähere Verwandtschaft der Enzyme zu den

V_1V_0 -ATPasen als zu den F_1F_0 -ATP-Synthasen hin (Grüber *et al.*, 2001a; Lewalter und Müller, 2006; Wilms *et al.*, 1996).

Anhand von Untersuchungen der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *M. mazei* (Lemker *et al.*, 2001) wurde gezeigt, dass das Enzym aus den beiden hydrophoben, membranständigen Untereinheiten *a* und *c* sowie den hydrophilen Untereinheiten A, B, C, D, E, F und H zusammengesetzt ist. Die Untereinheiten A und B bilden alternierend den Kopfteil des Enzyms (Lemker *et al.*, 2001) und sind jeweils in dreifacher Kopienzahl vorhanden. Die Untereinheit A ist die katalytische Untereinheit, deren Struktur gelöst wurde (Lokanath *et al.*, 2005). Die ersten Daten zur Struktur des A_1A_0 -Komplexes wurden durch elektronenmikroskopische 2D-Aufnahmen des gereinigten Komplexes aus *M. jannaschii* gewonnen (Lingl *et al.*, 2003). Dabei wurde eine kragenartige Struktur zwischen dem A_1 - und A_0 -Teil des Komplexes beobachtet. Eine Zuordnung der Untereinheiten in die Struktur war allerdings nicht möglich. Durch heterologe Produktion des A_1 -Teils aus *M. mazei* Gö1 konnten die Untereinheiten F und C dem A_1 -Teil zugeordnet werden (Lemker *et al.*, 2002). Die Untereinheit D zeigt Sequenzhomologie zu der γ -Untereinheit aus F-Typ-ATP-Synthasen (Grüber *et al.*, 2001b), darüber hinaus konnte eine Lokalisation in der Mitte des Komplexes (Grüber *et al.*, 2001a) nachgewiesen werden. Für die Untereinheiten E, H und *a* wird eine Beteiligung am Aufbau der Statoren angenommen. Aufgrund Homologien in der Sekundärstruktur der Untereinheit *a* der A_1A_0 -ATP-Synthasen zur *a*-Untereinheit der V_1V_0 -ATPasen wurde eine Lage als peripherer Außenstiel mit der Verbindung zur Membrandomäne postuliert. Die Untereinheit *a* variiert in ihrer Masse zwischen 72 und 76 kDa (Müller *et al.*, 1999) und stellt die Untereinheit mit der größten molekularen Masse im Komplex dar. Auch der für die Ionentranslokation essentielle Arginin-Rest (vgl. Arg735 aus *S. cerevisiae*) konnte in Untereinheit *a* von *M. mazei* Gö1 (Arg557) identifiziert werden. Die Untereinheiten E und H könnten demnach den zweiten peripheren Stiel zwischen A_1 - und A_0 -Teil bilden. Die kragenartige Struktur wird vermutlich von der *a*-Untereinheit gebildet (Vonck, 2009 #5180).

Bemerkenswert ist die Diversität der *c*-Untereinheiten. Der Rotorring im A_0 -Teil des Enzyms wird bei den meisten Archäen aus *c*-Untereinheiten mit einer Masse von 8 kDa gebildet (Ihara *et al.*, 1997; Inatomi *et al.*, 1989; Steinert *et al.*, 1997; Wilms *et al.*, 1996). Bei *Methanobacterium thermautotrophicus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanopyrus kandleri*, *Thermococcus kodakarensis*, *Pyrococcus furiosus* und *Archaeoglobus fulgidus* wurden aber ungewöhnliche Gene der *c*-Untereinheiten gefunden. Es zeigte sich, dass vermutlich durch Genfusion entstandene, verdoppelte *c*-Untereinheiten mit zwei Ionenbindestellen (Fricke *et al.*, 2006; Ruppert *et al.*, 1999) ebenso vorkommen wie V-typische, verdoppelte *c*-Untereinheiten mit nur noch einer Ionenbindestelle (Robb *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden bis dahin unbekannte, triplizierte *c*-Untereinheiten mit nur noch zwei Ionenbindestellen (Edgell und Doolittle, 1997) und verdreizehnfache *c*-Untereinheiten gefunden (Slesarev *et al.*, 2002). Als Kopplungssionen für die A_1A_0 -ATP-Synthase kommen sowohl H^+ als auch Na^+ in Betracht. Die Verwendung von Na^+ als Kopplungssion für eine A_1A_0 -ATP-Synthase konnte erstmals 2007 für das Enzym aus *P. furiosus* gezeigt werden (Pisa *et al.*, 2007).

1.6. Die Evolution der ATP-Synthasen

Alle drei bekannten Klassen von ATPasen bzw. Synthasen gehen auf ein gemeinsames Ursprungsenzym zurück, welches vermutlich als Protonenpumpe der Ansäuerung des Zellinneren entgegenwirkte. Von diesem Enzym ausgehend erfolgte die Differenzierung in V-, A- und F-Typ-ATP-Synthasen (Cross und Müller, 2004; Cross und Taiz, 1990; Hilario und Gogarten, 1993; Hilario und Gogarten, 1998; Kibak *et al.*, 1992; Nelson und Taiz, 1989). Um aus einer effektiven Protonenpumpe eine Turbine zu machen, mit der ATP synthetisiert werden konnte, mussten zuerst die Protonen zu ATP-Stoichiometrie geändert werden. Hierzu differenzierten sich aus der A- bzw. β -Untereinheit zunächst durch Genduplikation zwei katalytische Untereinheiten, von denen dann eine ihre katalytische Aktivität verlor (Abb. 9). Dadurch verdoppelte sich auch die H^+ zu ATP-Stoichiometrie.

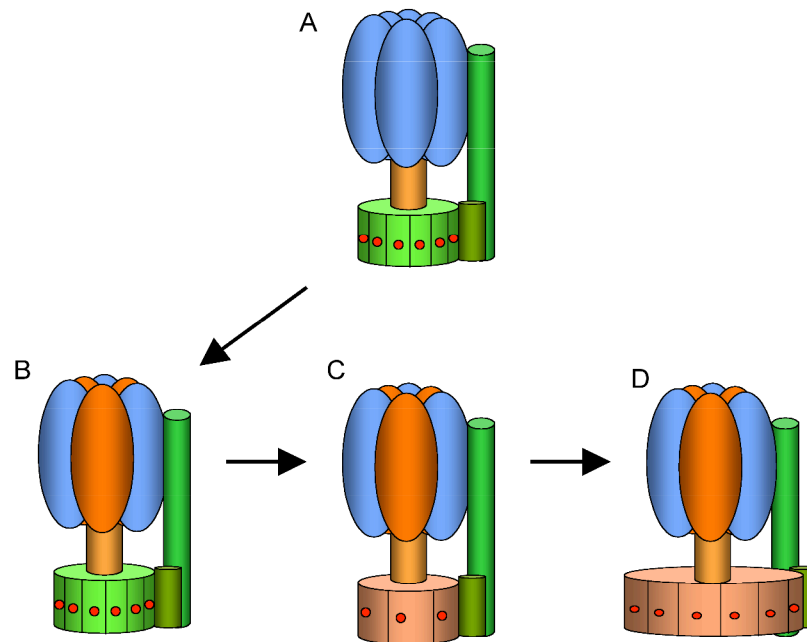


Abb 9: Schematische Darstellung der Evolution der ATP-Synthasen. Von einem gemeinsamen Vorläuferenzym (A) mit sechs identischen, katalytischen Untereinheiten im Kopfteil, welches nur als Ionenpumpe fungierte, über eine ATP-Synthase mit zwei verschiedenen Untereinheiten (von denen nur eine katalytisch ist) im Kopfteil (B) wieder zu einer ATPase mit halbiertem c-Ring (C) und schließlich zu einem Enzym mit vergrößertem c-Ring, welches wieder zur ATP-Synthase fähig ist, verändert (Cross und Müller, 2004).

Diese hexagonale Struktur aus je 3-mal zwei Untereinheiten $\alpha_3\beta_3$ (F-Typ) bzw. A_3B_3 (V- und A-Typ) ist bis jetzt unverändert und charakteristisch für die ATP-Synthasen. Gleichzeitig fand bei diesem Evolutionsschritt auch eine Differenzierung von den F- zu den V- und A-Typ-Enzymen statt. Während bei den F-Typ-ATP-Synthasen die nichtkatalytische α -Untereinheit eine Vergrößerung erfuhr, war bei der katalytischen A-Untereinheit der V- und A-Typ Enzyme eine Größenzunahme zu beobachten (Cross und Taiz, 1990; Müller und Grüber, 2003). Folgt man der Endosymbiontentheorie, so wäre eine Rückumwandlung der entstandenen ATP-Synthase zurück in eine reine Pumpe durch die Übernahme der ATP-Synthase-Kompetenz durch den Endosymbionten

(Mitochondrium) möglich (Gogarten *et al.*, 1989). Dazu wäre wieder eine Änderung der Protonen zu ATP-Stoichiometrie von Vorteil. Diesmal veränderte sich aber nicht der hexagonale Kopfteil, sondern es fand eine Verringerung der Ionentranslokationsstellen im membranständigen Ring statt. Dies wurde durch eine Genduplikation, verbunden mit einer anschließenden Fusion der Gene für die *c*-Untereinheit und dem Verlust einer Ionenbindestelle, erreicht. Diese V-Typ-*c*-Untereinheiten haben bei 4 transmembranen Helices nur eine Ionenbindestelle zwischen Helix 2 und Helix 4. Während jedoch die V-Typ-ATPasen nicht mehr zur ATP-Synthese fähig sind, können einige A-Typ-Enzyme trotz der fehlenden Ionenbindestellen diese Reaktion katalysieren. Notwendig hierfür wäre eine Vergrößerung des *c*-Ringes auf mindestens 9 Untereinheiten bzw. 18 transmembrane Hairpins. In der Tat finden sich in Arbeiten von Pisa (Pisa *et al.*, 2007) starke Hinweise auf einen Ring dieser Größe. Es ist anzunehmen, dass die Variation der Ionenbindestellen im *c*-Ring auch eine evolutionäre Anpassung an das jeweilige Habitat des Organismus darstellt. So ist im Bereich der F_1F_0 -ATP-Synthasen eine Optimierung auf ein niedriges Ionen-zu-ATP-Verhältnis zu erkennen, wohingegen V_1V_0 -ATPasen auf die Erfordernisse einer effizienten Protonenpumpe hin optimiert scheinen (Abb. 10). Bei A_1A_0 -ATP-Synthasen aus Archäen liegt eine besonders große Diversität der *c*-Ringe vor, möglicherweise um eine Anpassung an sowohl chemiosmotische als auch fermentative Metabolismen unter extremen Bedingungen zu ermöglichen. Die Selektion sorgte dann dafür, dass sich an dem Standort nur das jeweils optimal angepasste Individuum durchsetzen konnte. Diese Evolution muss nahe am Ursprung der Differenzierung der verschiedenen ATP-Synthase-Typen erfolgt sein (Müller, 2004; Müller *et al.*, 2005a; Müller *et al.*, 2005b).

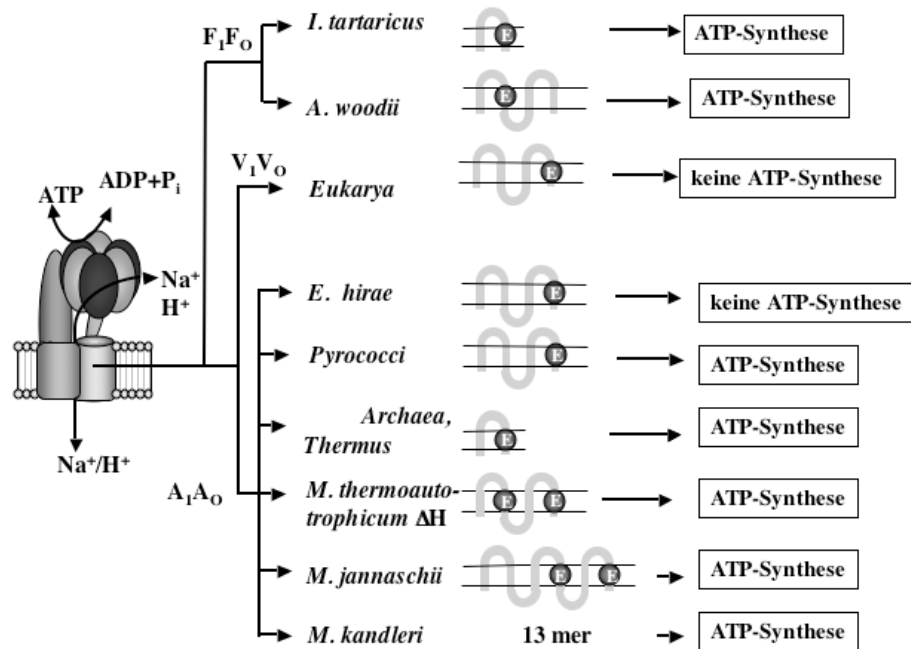
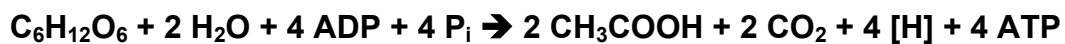


Abb. 10: Modellhafte Darstellung der Evolution der c-Untereinheiten aus einem gemeinsamen Genpool. Die Position der Ionenbindestellen ist aus den Sekundärstrukturen abgeleitet (Müller *et al.*, 2005b).

Eine Einzigartigkeit stellt die F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* dar. Im ATP-Synthase-Operon findet sich nämlich nicht nur wie für F-Typ-ATPasen typisch ein Gen für eine 8-kDa-c-Untereinheit, sondern neben zwei Genen für ein 8-kDa-Protein auch ein Gen für ein 18-kDa-Protein (Rahlfs, 1998), mit jedoch nur einer konservierten Ionenbindestelle zwischen Helix 1 und 3 (Rahlfs *et al.*, 1999). Diese V-Typ-c-Untereinheit ist durch Fusion aus zwei 8-kDa-c-Untereinheiten entstanden und auch im Enzym nachweisbar (Aufurth *et al.*, 2000). In Homologie zu den V-Typ-c-Untereinheiten ist auch in der 18-kDa-c-Untereinheit aus *A. woodii* eine Ionenbindestelle durch Substitution mit einem Glutamin verloren gegangen (Rahlfs *et al.*, 1999). *A. woodii* mit seinen F- und V-Typ-c-Untereinheiten könnte also eine Art „missing link“ in der Evolution der ATP-Synthasen darstellen.

1.7. Die ATP-Synthase aus *Acetobacterium woodii*

A. woodii ist ein anaerobes, homoacetogenes Bakterium (Balch *et al.*, 1977). *A. woodii* verstoffwechselt, wie alle acetogenen Bakterien, Hexosen über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Abb. 13) zu Acetat. Das im ersten Schritt entstehende Pyruvat wird im weiteren Verlauf durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA und CO₂ oxidiert. Das entstandene Acetyl-CoA wird anschließend über Acetyl-Phosphat zu Acetat umgewandelt, wobei während der Acetatkinase-Reaktion ein Mol ATP entsteht (Drake *et al.*, 1981; Schaupp und Ljungdahl, 1974). Pro Mol Hexose werden also zwei Mol Acetat, 2 Mol CO₂ und vier Reduktionsäquivalente sowie durch Substratkettenphosphorylierung vier Mol ATP gebildet:



Das freigesetzte CO₂ ist kein Endprodukt des acetogenen Stoffwechsels, sondern fungiert als terminaler Elektronenakzeptor und wird mittels der im Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und bei der Spaltung des Pyruvats zu Acetyl-CoA und CO₂ entstehenden Reduktionsäquivalente im „Wood-Ljungdahl“-Weg zu einem weiteren Mol Acetat reduziert (Abb.11).

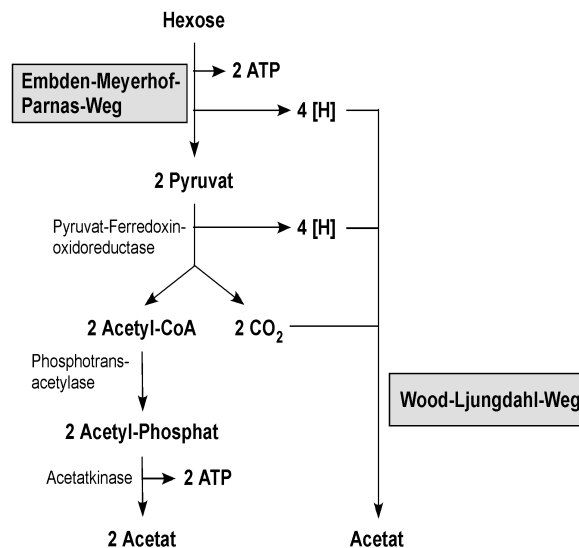


Abb 11: Heterotrophes Wachstum, der Abbau von Hexosen zu Acetat, (Müller, 2003)..

A. woodii ist aber auch in der Lage, autotroph auf $H_2 + CO_2$ (Abb. 12) oder auf methylgruppenhaltigen Substraten wie z. B. Methanol oder Betain zu wachsen. Hierbei werden die Methylgruppen des Substrates durch lösliche Methyltransferasen demethyliert und auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen (Gössner *et al.*, 1994). Anschließend kann das Methyl-THF zu CO_2 und Acetat im Acetyl-CoA-Weg disproportioniert werden (Abb. 12).

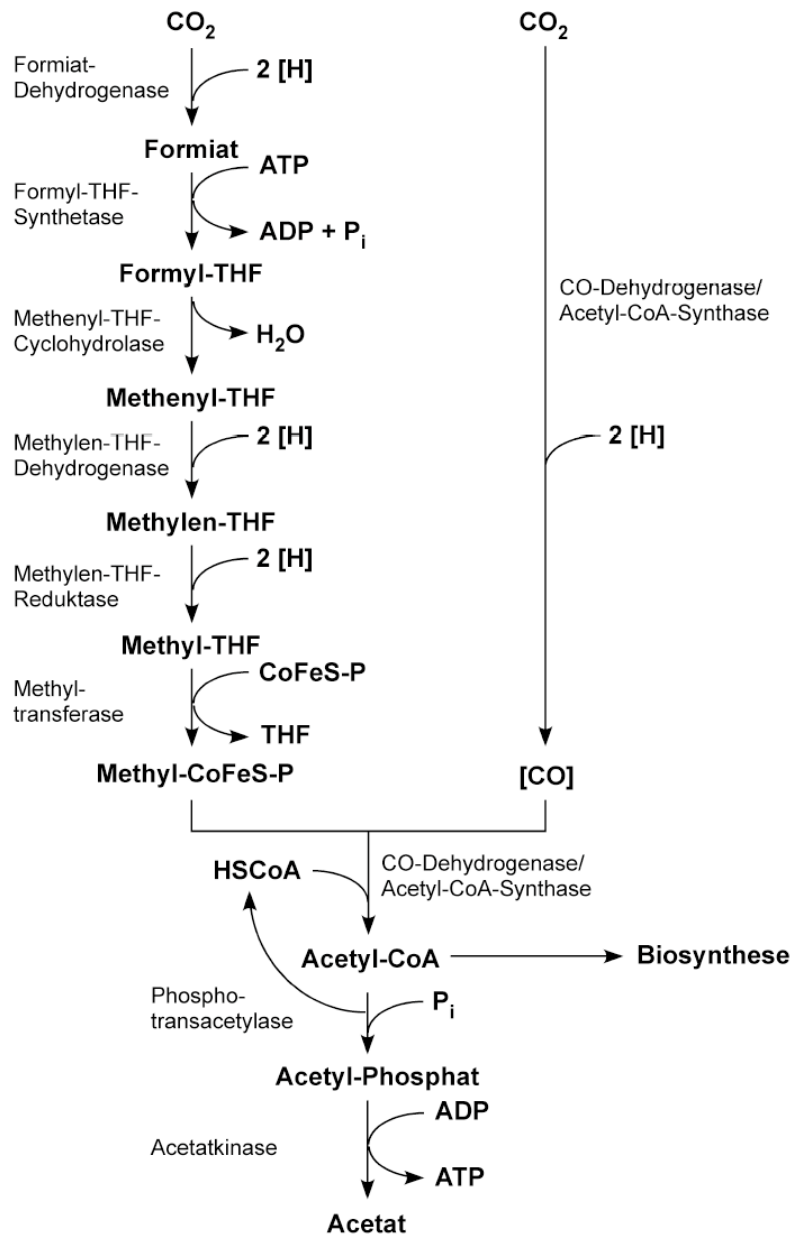


Abb 12: Hypothetisches Schema des autotrophen Wachstums von *A. woodii*. Für nähere Erläuterungen siehe Text (Müller *et al.*, 2004)..

Acetat-Kinase wird zwar 1 mol ATP pro 2 Mol CO₂ gebildet, allerdings verbraucht die Darstellung des Formyl-THF aus Formiat ebenfalls ein ATP. Die Netto-ATP-Synthese muss daher durch die Nutzung eines elektrochemischen Na⁺-Potentials erfolgen. Wie dieses Potential aufgebaut wird, ist derzeit noch nicht bekannt. Es wurde jedoch zuerst im Genom, aber auch in den Membranen von *A. woodii* ein Proteinkomplex gefunden (Biegel *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009), welcher große Ähnlichkeit mit Proteinkomplexen aufweist, für die Na⁺-Transport nachgewiesen werden konnte (Tokuda und Unemoto, 1981). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass dieser Rnf-Komplex in *A. woodii* für die Erzeugung des elektrochemischen Na⁺-Potentials verantwortlich sein könnte.

Dieses transmembrane, elektrochemische Na⁺-Potential treibt dann die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase an (Heise *et al.*, 1992b, 1993). Die erste Reinigung und Analyse des Enzyms ergab eine Untereinheitenzusammensetzung aus sechs Proteinen, die als die Untereinheiten α , β , γ , δ , ϵ und *c* identifiziert wurden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des gereinigten Komplexes zeigten starke Übereinstimmungen mit F-Typ-ATP-Synthasen (Reidlinger und Müller, 1994). Die für F-Typ-ATP-Synthasen typischen (Forster *et al.*, 1995) Untereinheiten *a* und *b* konnten allerdings in dem gereinigten Enzym nicht detektiert werden. Das in Liposomen rekonstituierte Enzym katalysierte des Weiteren lediglich einen ATP-abhängigen Na⁺-Transport (Reidlinger, 1994; Spruth *et al.*, 1995), aber keine ATP Synthese. Die Untersuchung des ATP-Synthase-Operons aus *A. woodii* bewies jedoch, dass die Gene für die Untereinheiten *a* und *b* vorhanden waren (Forster *et al.*, 1995; Rahlfs, 1998; Rahlfs *et al.*, 1999; Rahlfs und Müller, 1997). Zusätzlich zu allen bekannten Genen der F-Typ-ATP-Synthasen wurde nicht nur ein Gen für die *c*-Untereinheit gefunden sondern insgesamt drei.

1.7.1. Das Operon der F₁F₀-Synthase aus *A. woodii*

Die Untereinheitenzusammensetzung der bakteriellen F₁F₀-ATP-Synthase ist hoch konserviert. Nahezu alle bekannten Enzyme bestehen aus den Untereinheiten α , β , γ , δ , ϵ , *a*, *b*, (*i*) sowie *c*. Diese werden chromosomal durch

ein ca. 7 kb großes Operon codiert (Brusilow, 1993; Das und Ljungdahl, 1997; Hensel *et al.*, 1995; Ivey und Krulwich, 1991; Santana *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1984b). Es existieren lediglich geringe Abweichungen zum Beispiel bei *Lactobacillus acidophilus* (Fehlen des *atpI*-Gens; Kullen und Klaenhammer 1999) und bei *Streptococcus sanguis* sowie *Streptococcus mutans* (Fehlen des *atpI*-Gens, *atpB* und *atpE* vertauscht; Kuhnert und Quivey 2003 sowie Smith *et al.* 1996). Die einzelnen Untereinheiten kommen in stark unterschiedlicher Kopienzahl im Enzym vor, von bis zu 15 *c*-Untereinheiten bis hin zu den nur einmal vorkommenden γ - und δ -Untereinheiten. Reguliert wird dies durch die Effizienz der Translationsinitiation, die Stabilität der mRNA und die Translationskopplung (McCarthy *et al.*, 1991; McCarthy *et al.*, 1985)

A. woodii hingegen ist einzigartig in der Struktur seines ATP Synthase Operons (Abb. 13).

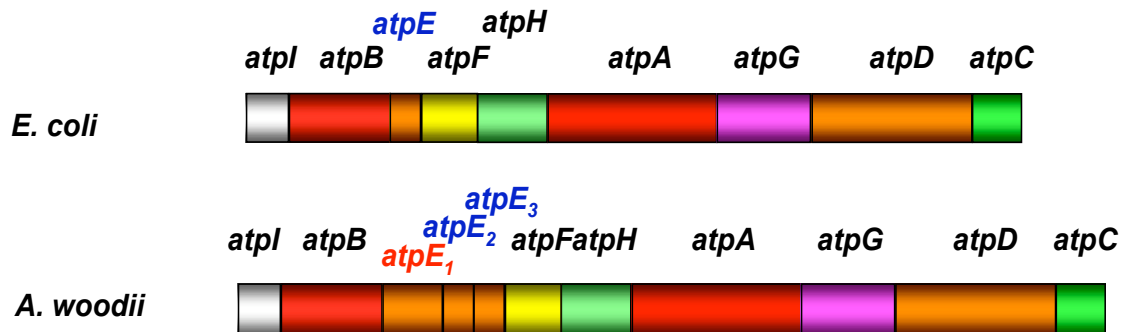


Abb. 13: Schematischer Vergleich der ATP-Synthase-Operone aus *E. coli* und *A. woodii*. Auffällig ist, dass in *A. woodii* zwei zu *atpE* von *E. coli* homologe Gene vorkommen, *atpE₂* und *atpE₃*. Des Weiteren enthält das Operon aus *A. woodii* ein Gen, das für ein 18-kDa-Protein codiert, *atpE₁* (verändert nach (Rahlfs, 1999 #3769)). Die relevanten Gene für die *c*-Untereinheiten sind farblich hervorgehoben.

Das Operon von *A. woodii* enthält nämlich nicht nur ein, sondern drei Gene für verschiedene *c*-Untereinheiten. Die Gene *atpE₂* und *atpE₃* codieren für zwei identische Proteine von ca. 8 kDa, wohingegen *atpE₁* als Fusion von zwei *atpE*-Kopien für ein 18 kDa großes Protein codiert (Rahlfs *et al.* 1999). Diese

Untereinheit besitzt zudem in ihrer ersten Hälfte an der Position des für die Na^+ Translokation essentiellen Carboxylates (Glutamat) ein Glutamin (Abb. 14).

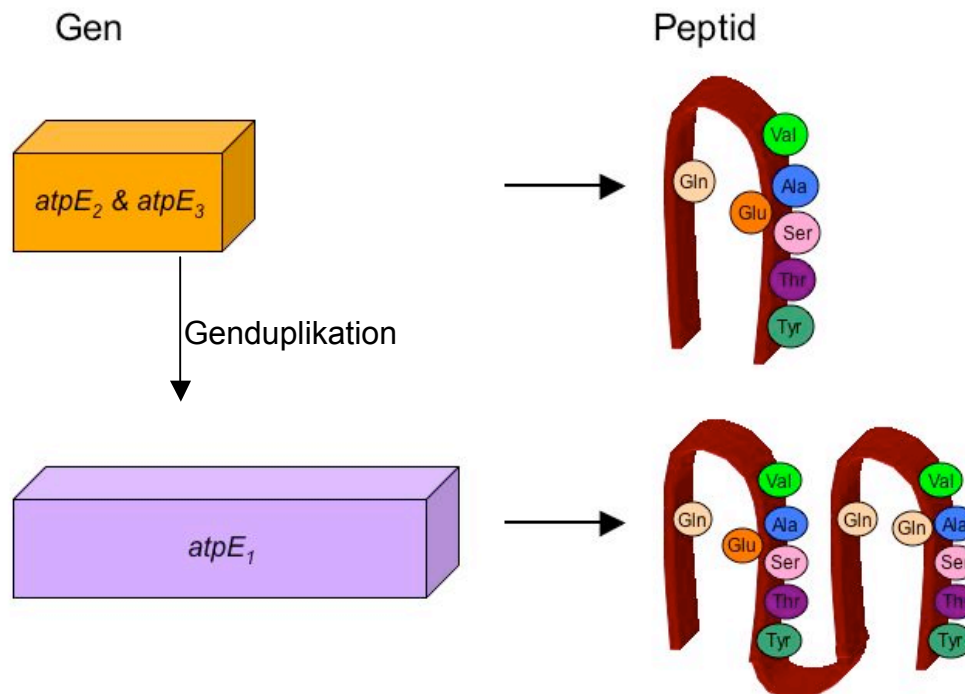


Abb. 14: Schematische Darstellung der Organisation der vermutlich an der Ionenkoordination beteiligten Aminosäuren in den c-Untereinheiten der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Darstellung analog zur Na^+ -Koordinationsstelle in *I. tartaricus* (Meier *et al.*, 2009). In Helix 4 des Proteins aus *atpE*₁ ist das Glutamat (E) durch ein Glutamin (Q) substituiert.

Solche duplizierten c-Untereinheiten sind vor allem in V- (Arai *et al.*, 1988) und A-Typ-ATP-Synthasen (Müller *et al.*, 1999; Ruppert *et al.*, 1999; Ruppert *et al.*, 1998) vorhanden. In V-Typ-ATP-Synthasen werden diese duplizierten c-Untereinheiten mit nur noch einer Ionenkoordinationsstelle für den Verlust der Fähigkeit zur ATP-Synthese verantwortlich gemacht (Nelson und Taiz, 1989; Taiz *et al.*, 1994). Von Aufferth konnte gezeigt werden, dass die c₁-Untereinheit in der Membranfraktion vorhanden ist (Aufferth *et al.*, 2000). Es stellt sich nun die Frage, ob die c₁-Untereinheit in der gereinigten ATP-Synthase zu finden ist, wie die Stöchiometrie der c-Untereinheiten im c-Ring beschaffen ist und ob ein Enzym, welches F- und V-Typ c-Untereinheiten enthält, zur Synthese von ATP fähig ist.

Die Einzigartigkeit der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* würde außerdem eine Veränderung der c_1 - zu $c_{2/3}$ -Stöchiometrie und damit eine Variation des Ionen-zu-ATP-Verhältnisses ohne Veränderung des Ringdurchmessers ermöglichen.

1.8. Fragestellung der Arbeit

Das Operon für die F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* ist einzigartig, es enthält zwei Gene für F-typische Untereinheiten, aber auch ein Gen, das für eine V-typische Untereinheit codiert. Es sollte daher untersucht werden, ob beide c-Untereinheiten in einem c-Ring vorkommen und ob ein Enzym, welches solche V-typischen Untereinheiten enthält, zur Synthese von ATP fähig ist. Dazu sollte das Enzym zuerst unter Erhaltung aller Untereinheiten gereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

Von zentraler Bedeutung war außerdem, wie viele Untereinheiten bzw. konservierte Ionenbindungsstellen der c-Ring der ATP-Synthase aus *A. woodii* besitzt. Dazu sollte der c-Ring isoliert werden und auf seine Größe und Untereinheitenstöchiometrie hin untersucht werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich die Untereinheitenstöchiometrie mit dem Substrat verändert.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstamm

Für die Isolierung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase wurde der Wildtypstamm von *Acetobacterium woodii* (DSM 1030) verwendet.

2.2. Medien

Die Herstellung und Zusammensetzung der Medien erfolgte nach Vorgaben des Standardmediums für *A. woodii* nach DSMZ-Katalog, Medium 141 (Balch *et al.*, 1977).

Carbonat-gepuffertes Medium für *A. woodii*

K_2HPO_4	0,2 g	1,5 mM
NH_4Cl	0,25 g	4,7 mM
CaCl_2	0,11 g	1 mM
KCl	0,5 g	6,7 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,45 g	1,63 mM
NaCl	1,16 g	20 mM
Hefeextrakt	2,0 g	
Spurenelementelösung SL9	2 ml	
Selenitlösung	1 ml	
Vitaminlösung	2 ml	
KHCO_3	6,0 g	60 mM
Resazurin	1,0 mg	
Cystein-HCl	0,5 g	
pH 7,0 - 7,2		

Selenitlösung

NaOH	0,5 g
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	3 mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	4 mg

H₂O_{dest.} ad 1000 ml

Spurenelementelösung (SL9)

Nitrilotriessigsäure	12,8 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,8 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ x 2H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg

H₂O_{dest.} ad 1000 ml

Die Vitaminlösung wurde als 10fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und entsprach in ihrer Zusammensetzung den Angaben im DSMZ-Katalog (Medium Nr. 141)

2.3. Anzucht von *A. woodii*

Kulturen von *A. woodii* wurden stets bei 30°C angezogen (Heise *et al.*, 1992a). Die Herstellung der anaeroben Medien für *A. woodii* erfolgte durch Begasen des Mediums im Kulturgefäß mit N₂/CO₂, bis ein pH von 7,0 – 7,2 erreicht wurde (Hungate, 1969). Die Substrate wurden nach dem Autoklavieren aus anaeroben Stammlösungen mit sterilen Plastikspritzen zu den Medien gegeben. *A. woodii* wurde auf Carbonat-gepuffertem Medium bei 30°C unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre angezogen. Zur Herstellung von Vorkulturen wurden Kulturvolumina von 0,3 und 1 l in 1-l-Serumflaschen (Fa. Müller Krempel, Schweiz) verwendet. Zur Herstellung von gewaschenen Membranen wurden 17,5-l-Kulturen in 20-l-Steilbrustflaschen (Fa. Schott, Mainz, BRD) herangezogen. Bei den 17,5-l-Kulturen wurde neben dem Substrat auch KHCO₃ und Cystein erst nach dem Autoklavieren zugegeben, da die 17,5-l-Steilbrustflaschen ihrer

Druckempfindlichkeit wegen offen autoklaviert werden mußten. Dazu wurde das benötigte KHCO_3 (105 g für 17,5 l) in 1 l Wasser gelöst und auf drei 1-l-Müller-Krempel-Flaschen gleichmäßig verteilt. Diese wurden geschlossen autoklaviert. Anschließend konnte die Lösung über sterile Zuleitungen durch leichten Überdruck in die 17,5-l-Steilbrustflasche gegeben werden. Die Zugabe der Substrate erfolgte analog, die jeweils benötigte Menge wurde in 500 ml Wasser gelöst und in 1-l-Müller-Krempel-Flaschen autoklaviert. Als Substrate dienten Fruktose (40 mM), Methanol (60 mM), Betain (80 mM) oder Formiat (200 mM). Die Begasung der 17,5-l-Ansätze mit N_2/CO_2 erfolgte ebenfalls steril nach dem Erkalten des Mediums, bis zur Entfärbung des Redoxindikators.

2.4. Kultivierung in Serum- und in 1-l-Druckflaschen

Aus einer maximal 7 Tagen alten, bei 4°C gelagerten Stammkultur (120-ml-Serumflasche) von *A. woodii* wurden mit einer 1-ml-Spritze (Ersta, Maersk, DK), je nach Zelldichte der Stammkultur, 1 ml bis 0,5 ml steril entnommen und einer Kulturflasche mit sterilem Medium zugespritzt. Dem Verwendungszweck entsprechend, wurden für die Kultivierung Serum- bzw. 1-l-Glasflaschen (Typ Müller-Krempel) gewählt. Die Kulturen wurden dann im Wärmeschrank bei 30°C (T5090, Heraeus, Kendro, Laboratory Products GmbH, Langenselbold) bis zur gewünschten Wachstumsphase bzw. Zelldichte inkubiert.

2.4.1. Kultivierung in 20-l-Steilbrustflaschen

Um größere Mengen von *A. woodii* zu ziehen, wurden 20-l-Steilbrustflaschen verwendet. Diese wurden mit 17,5 l Medium gefüllt, allerdings ohne die Zugabe von KHCO_3 . Dieses wurde separat in 1 l H_2O gelöst und zu je 333 ml in 1-l-Druckflaschen autoklaviert. Dies war nötig, da die 20-l-Steilbrustflaschen offen autoklaviert werden mussten, da der beim Autoklavieren entstehende Druck zur Sprengung der Flaschen geführt hätte. Nach dem Autoklavieren und Erkalten wurde dem Medium die KHCO_3 -Lösung steril zugeführt. Die Einstellung des pH-

Wertes erfolgte durch ca. 20-minütiges, steriles Durchgasen des Mediums mit N_2/CO_2 bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin.

2.5. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt (Hitachi, Modell 100-20, Tokyo, Japan). Zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin wurde die Probe zuvor durch Zugabe von einer Spatelspitze Natriumdithionit (Merck, Darmstadt, Deutschland) reduziert und somit entfärbt.

2.6. Reinheitskontrollen

Die Kulturen wurden regelmäßig durch das Mikroskopieren im Phasenkontrast (Standard RA, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) auf Kontaminationen überprüft. Hierbei sollte *A. woodii* als kurzes Stäbchen, welches oft paarweise an den Polen verbunden ist, sichtbar sein (Balch *et al.*, 1977).

2.7. Herstellung von gewaschenen Membranen aus *A. woodii*

Zur Herstellung gewaschener Membranen für die Reinigung der $Na^+F_1F_0$ -ATPase wurde *A. woodii* im 17,5-l-Maßstab in 20-l-Steilbrustflaschen in carbonatgepuffertem Medium angezogen. Die Kultur wurde mit 1 l frischer Vorkultur (24 h, 30°C, mit dem jeweils verwendeten Substrat) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte unter sanftem Rühren für ca. 18 h bei 30°C. Die Zellernte erfolgte in der spätexponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 0,8 - 1,2 (Durchlaufzentrifuge, Heräus, Kendro, Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Beim Wachstum auf 40 mM Fructose wurden ca. 20 – 30 g Zellen (Nassgewicht) erhalten, dies entspricht etwa 60% des Maximalertrages aus einer 17,5-l-Kultur. Die Zellen wurden in 200 ml Erntepuffer (50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,5) resuspendiert und viermal gewaschen (Beckman Avanti J25 Zentrifuge; Rotor JA14, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Die Zellen wurden dann in 200 ml Protoplastenpuffer (50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 420 mM Saccharose, pH 8) aufgenommen, mit 0,5 g Lysozym versetzt und 1 h bei 37°C

inkubiert. Nach einer niedertourigen Zentrifugation (20 min, 6.000 x g, 4°C) wurden die Zellen in 30 ml Protoplastenpuffer und etwas DNase I resuspendiert und zwei- bis dreimal in der "French Pressure Cell Press" (Fa. Amicon, Silver SpRing, USA) mit 1.000 psiG aufgeschlossen. Die Suspension wurde mit Protoplastenpuffer auf 200 ml aufgefüllt und ganze Zellen wurden dann durch niedertourige Zentrifugationen (20 min, 6.000 x g, 4°C) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Membranen durch eine hochoourige Zentrifugation (1,5 h, 120.000 x g, 4°C, Ti50.2-Rotor, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA, Ultrazentrifuge: Beckman Optima L 100K, Beckman Coulter, Fullerton, USA) sedimentiert und anschließend zweimal durch hochoourige Zentrifugationen gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden in 10 ml Membranpuffer (50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0,5 mM PMSF, 17% Glycerin, pH 7,5) aufgenommen und auf Eis gelagert. Der Proteingehalt betrug im Mittel 8-10 mg/ml.

2.8. Enzymaktivitätsmessungen

2.8.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde ein diskontinuierliches Verfahren verwendet, bei dem das durch die Hydrolyse von ATP zu ADP freigesetzte Orthophosphat ermittelt wird (Heinonen und Lahti, 1981). Hierzu wurden 50-200 µl Probe (abhängig von der Aktivität) mit 1 ml Testpuffer (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl₂, pH 7,5), 10 µl NaCl (2 M) und 140 µl H₂O_{bidest.} gemischt. Nach einer fünfminütigen Vorinkubation bei 30°C erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 50 µl 0,1 M ATP. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 200-µl-Proben genommen und mit 40 µl 30% TCA versetzt. Zur Entfernung der gefällten Proteine wurden die Ansätze 10 min mit 21.000 x g zentrifugiert, und 200 µl des Überstandes wurden mit 1 ml AAM-Reagenz (50 ml Aceton, 25 ml 10 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O, 25 ml 2,5 M H₂SO₄) versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze bei 405 nm gemessen und die Orthophosphat-Menge aus einer

Eichgerade abgelesen, die parallel im Bereich von 0 – 200 nmol KH_2PO_4 pro Ansatz (d.h. in 200 μl) aufgenommen wurde. Die Probenmenge und die Zeitpunkte der Probennahme wurden in Abhängigkeit von der Probe so variiert, dass ein linearer Anstieg des freigesetzten Orthophosphates während des Messzeitraumes erreicht wurde.

2.8.2. Aktivitätsmessung unter Na^+ -freien Bedingungen

Es sollte nachgewiesen werden, ob die ATP-Synthase aus *A. woodii* Na^+ -abhängig arbeitet. Dazu wurde die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit der Na^+ -Konzentration bestimmt. Um möglichst Na^+ -arme Bedingungen zu erhalten, wurden alle Reagenzien mit doppelt destilliertem MilliQ-Wasser angesetzt und spezielle Chemikalien mit sehr hohen Reinheitsgraden verwendet. Die pH-Werte wurden mit 1 M KOH (Na^+ -frei) eingestellt. Die jeweiligen Na^+ -Konzentrationen wurden durch Zugabe einer 20-mM-Stammlösung eingestellt und durch Messungen mit einer Natriumelektrode (vgl. 2.11.) genau bestimmt. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte wie unter 2.8.1. beschrieben.

2.9. Charakterisierung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

2.9.1. Bestimmung der optimalen Katalysetemperatur

Zur Bestimmung der optimalen Katalysetemperatur wurden der Reaktionspuffer mit Enzym für 10 min auf die gewünschte Temperatur vorgeheizt und die Enzymreaktion mit der Zugabe von ATP gestartet. Es wurden Reaktionstemperaturen von 10-50°C in Schritten von je 10°C gemessen.

2.9.2. Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Katalyse

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde ein pH-Bereich von 4-11 gewählt. Es wurden jeweils ATPase-Aktivitäten in Testpuffer (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , pH 7,5) gemessen, wobei die MgCl_2 -

Menge in Abhängigkeit des pH-Wertes variiert wurde, um immer die gleiche Menge an frei verfügbarem Mg^{2+} in Lösung zu haben (Reidlinger, 1994).

2.10. Hemmstoffexperimente

Der Hemmstoff DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, Sigma, Deisendorf) wurde in Ethanol gelöst und dem Enzym in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Das Enzym wurde 30 min bei Raumtemperatur mit dem Inhibitor vorinkubiert, bevor die Reaktion gestartet wurde. Es wurde ein möglichst Na^+ -armer Puffer verwendet, da DCCD mit Na^+ um eine Bindestelle konkurriert. Bei Hemmstoffexperimenten wurden zwei separate Kontrollansätze mitgeführt. Ein Kontrollansatz enthielt das Enzym ohne Inhibitor. Ein zweiter Ansatz enthielt das Enzym und das Lösemittel, in dem der Inhibitor gelöst wurde, um zu zeigen, dass das verwendete Lösemittel keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hat und somit eine Hemmung der Enzymaktivität nur auf die Anwesenheit des Hemmstoffes zurückzuführen ist.

2.11. Bestimmung der Na^+ -Konzentration

Die Natriumionenkonzentration von Lösungen wurde mit einem pH/ Ω -Meter "Orion 720A" und der Natriumionen-selektiven Elektrode "Orion 8611BN sure flow" von Orion Research AG (Küsnacht, Schweiz) gemessen. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte vor jeder Messung. Alle zur Kalibrierung benötigten Lösungen ("Ionic Strength Adjuster" (ISA), Orion; natriumhaltige Elektroden-Aufbewahrungslösung) wurden für jede Messung in deionisiertem Wasser frisch hergestellt. Es wurden ausschließlich Kunststoffgefäße verwendet. Die Kalibrierung und die anschließenden Konzentrationsbestimmungen erfolgten bei Raumtemperatur. Durch das Auftragen des dekadischen Logarithmus der gemessenen Spannungswerte der Kalibrierlösungen gegen deren Na^+ -Konzentration (0-200 mM NaCl) wurde eine Kalibriergerade ermittelt. Die Natriumionenkonzentration der zu bestimmenden Lösung konnte anhand des gemessenen Stromflusses abgelesen werden. Um osmotische Effekte zu vermeiden, wurde zu allen Proben 1/10 ISA-Lösung hinzugegeben.

2.12. Rekonstitution der gereinigten Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase

2.12.1. Darstellung von Proteoliposomen

In einem Glasgefäß wurden 3 ml einer Suspension aus 60 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin Typ II-S in 100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 20 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, pH 7,5 auf Eis mit einem Ultraschallgenerator (120 Watt, 20% Intensität; Ultrasonic Desintegrator, Typ MK II, Crawley Inc., UK) beschallt, bis eine transluzierende Lösung entstand.

Zu dieser Liposomenlösung wurde gereinigtes Enzym bis zu einer Lipidkonzentration von 25-30 mg/ml und einem Lipid-zu-Proteinverhältnis von ca. 100:1 zugegeben. Im Ansatz (ca. 20 ml) befanden sich daher ca. 0,3 mg/ml Protein und 25-30 mg/ml Lipid. Die Proteoliposomen wurden dann nach der Methode von Knol *et. al.* (Knol *et al.*, 1998) hergestellt. Hierzu wurde das Detergenz langsam durch Dialyse (12h, 4°C) gegen die zehnfache Menge in 100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 20 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit 10% (w/v) Biobeads (Bio-Rad, München, Deutschland) entzogen. Die Proteoliposomenlösung wurde dazu in einen Dialyseschlauch (Porengröße \approx 100 kDa) gegeben und gegen 200 ml Dialysepuffer, in dem 20 g Biobeads schwammen, dialysiert.

Die erhaltenen Proteoliposomen wurden von freiem, nicht rekonstituiertem Protein durch Gelfiltration über eine 10 ml Sephadex 25 (Bio-Rad)-Säule abgetrennt. Dabei fanden sich 80-85% der ATPase-Aktivität in den Fraktionen der Proteoliposomen (photometrisch in Mikroküvetten durch Absorption bei $\lambda = 600$ nm bestimmt – die liposomenhaltigen Proben weisen eine deutlich höhere Absorption auf), ca. 15-20% der Aktivität wurden im Durchlauf nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um nicht rekonstituiertes Protein. Die erhaltenen Proteoliposomen wurden sofort für die ATP-Synthese-Tests eingesetzt.

2.12.2. Überprüfung der Proteoliposomen auf Impermeabilität durch Na^+ -Ionen

Um einen Nachweis zu führen, ob Proteoliposomen erhalten wurden und ob der Einbau des Enzyms in der richtigen Orientierung erfolgte, wurden die Proben mit einem ATP-Hydrolyse-Test überprüft. Nur bei Proben, welche Proteoliposomen mit in richtiger Orientierung eingebautem Enzym enthalten, ist durch Zugabe eines Na^+ -Ionophors eine Reaktivierung der Aktivität messbar (Abb. 15).

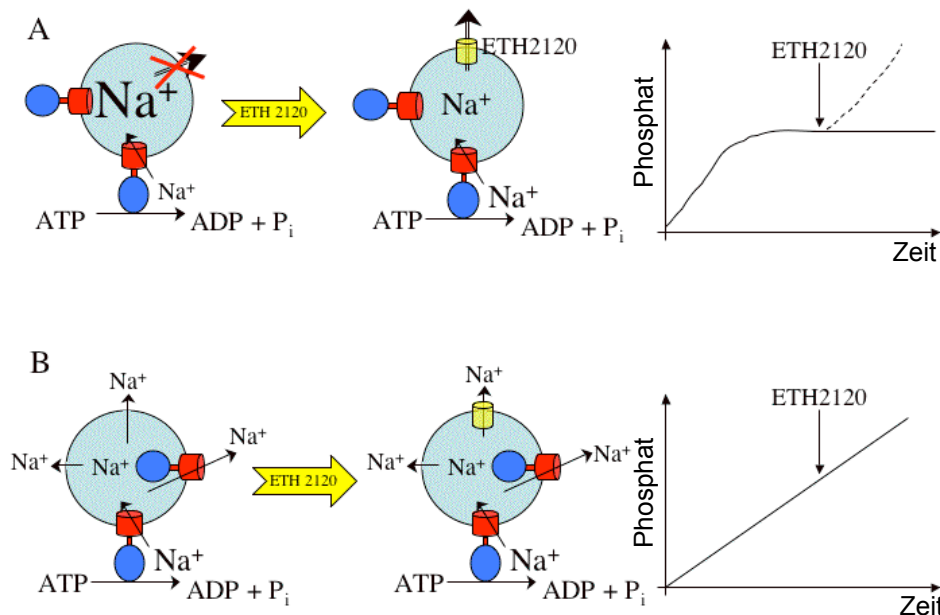


Abb. 15: Kontrolle der Proteoliposomen. Schematische Darstellung des Versuchsansatzes zur Kontrolle der Proteoliposomen. Nur Na^+ -dichte Liposomen, in denen das Enzym in der richtigen Orientierung eingebaut ist, zeigen die Aufhebung der respiratorischen Kontrolle durch Zugabe des Na^+ -Ionophors ETH2120 (A). Die modellhafte Kurve des gebildeten Orthophosphates steigt nach Zugabe von ETH2120 wieder an (gestrichelte Linie), ohne Zugabe des Ionophores bleibt die Menge des gebildeten Orthophosphates konstant (durchgehende Linie) – es ist keine Aktivität mehr vorhanden. Bei nicht Na^+ -dichten Liposomen oder bei solchen mit in falscher Orientierung eingebautem Enzym findet keine Akkumulation von Na^+ im Inneren des Liposomes statt. Die Zunahme des gebildeten Orthophosphates erfolgt linear und die Zugabe von ETH2120 ist darauf ohne Einfluss (B).

Die Überprüfung auf Impermeabilität für Na^+ erfolgte durch Zugabe von ETH2120. ETH2120 ist ein Na^+ -Ionophor. Bei einem Na^+ -undurchlässigem Die

Überprüfung auf Impermeabilität für Na^+ erfolgte durch Zugabe von ETH2120. ETH2120 ist ein Na^+ -Ionophor. Bei einem Na^+ -undurchlässigem Proteoliposom sollte die gebildete Phosphatmenge in Anwesenheit von ETH2120 deutlich größer sein als in dem Ansatz ohne ETH2120. Gleichzeitig sollte die Aktivität in dichten Ansätzen mit korrekter Einbauorientierung ohne Ionophor nach kurzer Zeit stark zurückgehen, da hier der Gradient, gegen den das Enzym die Ionen über die Membran pumpen muss, stetig ansteigt. Die vom Enzym in das Proteoliposom gepumpten Na^+ -Ionen können hier nicht abfließen. Durch Zugabe von ETH2120 bildet das Ionophor einen Kanal in der Membran, durch den das Potential abfließen kann, das Enzym ist wieder in der Lage ATP zu hydrolysieren. Für die Messungen der ATP-Synthase-Aktivitäten wurden dann nur Aliquots mit Na^+ -undurchlässigen Liposomen verwendet. Um die Dichtigkeit der erzeugten Proteoliposomen zu messen, wurden aus jeder erhaltenen Fraktion je 100 μl abgenommen, einmal mit und einmal ohne Zugabe von ETH 2120 (2 μl einer 2 mM Stammlösung), auf ATPase-Aktivität getestet. Hierzu wurden 100 μl der Probe mit 1 ml Testpuffer (100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 20 mM NaCl und 5 mM MgCl_2 , pH 7,5), 10 μl NaCl (2 M) und 130 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gemischt. Nach einer fünfminütigen Vorinkubation bei 30°C erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 50 μl 0,1 M ATP. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 200 μl Proben genommen (1, 2, 3, 4 min) und mit 40 μl 30% TCA versetzt. Zur Entfernung der gefällten Proteine wurden die Ansätze 10 min mit 21.000 x g zentrifugiert, und 200 μl des Überstandes wurden mit 1 ml AAM-Reagenz (50 ml Aceton, 25 ml 10 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 25 ml 2,5 M H_2SO_4) versetzt. Die Extinktion wurde bei 405 nm bestimmt und anhand einer Eichreihe wurden die gebildeten Phosphatmengen bestimmt.

2.12.3. Messung der ATP-Synthase-Aktivität

Die ATP-Synthase-Aktivität wurde über einen Luciferin/Luciferase-Assay nach Herstellerangaben (Lumac, AC Landgraaf, NL) bestimmt, die Messung der abgegebenen Lichtmenge erfolgte in einem Chemiluminometer (Lumac, AC

Landgraaf, NL) bei 30°C. Die Menge des gebildeten ATP ist der Menge des emittierten Lichts proportional. Das Chemiluminometer misst die Menge des abgegebenen Lichtes. Die gemessene emittierte Lichtmenge wird dann anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden mit bekannten ATP-Konzentrationen die Menge des gebildeten ATP zugeordnet. Die Kalibriergerade wurde im Bereich von 0 bis 1000 nmol ATP in Schritten von 100 nmol pro Ansatz, d.h. in 2 ml Reaktionsgemisch nach Herstellerangaben in Triplikaten aufgenommen.

Als Treibkräfte für die ATP-Synthese kommen theoretisch ein reines Na⁺-Potential (Δp_{Na}) von mindesten 180 mV oder ein elektrochemisches Potential, ($\Delta \mu_{\text{Na}^+}$) bestehend aus einem Na⁺-Potential sowie einem K⁺-Diffusionspotential, in Frage. Auch ein rein elektrochemisches Potential ($\Delta \Psi$) in Anwesenheit von Na⁺-Ionen kommt als Triebkraft in Frage. (Eine schematische Darstellung der Treibkräfte und Versuchsansätze ist im Ergebnisteil in Abb. 27 zu sehen.) Die Berechnung des elektrochemischen Potentials aus den Konzentrationsdifferenzen erfolgt nach der Nernstgleichung (Gl. 2):

$$U = -\frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{c_{\text{innen}}}{c_{\text{außen}}}$$

bei 30°C entspricht $RT/zF = 0,026$ V.

Um nun ein Na⁺-Potential von 180 mV zu erzeugen, wäre eine Konzentrationsdifferenz von ca. 1:1000 nötig. Da dies schwer zu erreichen ist, bedient man sich eines artifiziellen elektrochemischen Potentials. Dieses Potential wird durch Zugabe des K⁺-Carriers Valinomycin erzeugt. Valinomycin sorgt für einen gezielten Einstrom von K⁺ durch den Diffusionsdruck in das Proteoliposom. Die damit verbundene Ladungstrennung (das Anion kann nicht einströmen) lässt ein Potential entstehen. Bei 200 mM KCl außen und nahezu keinem K⁺ (errechnet < 0,1 mM) im Proteoliposom sollte durch Zugabe von

Valinomycin ein Potential von etwa 195 mV entstehen; dies wäre ausreichend, um die ATP-Synthese unabhängig vom herrschenden Na^+ -Potential zu ermöglichen.

2.12.4. Erzeugung eines elektrochemischen Na^+ -Potentials ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$)

Das größte Potential entsteht, wenn neben einem Na^+ -Potential auch noch ein K^+ -Diffusionspotential angelegt wird. Die Kombination beider Potentiale wird als elektrochemisches Na^+ -Potential ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) bezeichnet.

Zuerst werden die Proteoliposomen mit Na^+ geladen. Die auf Dichtigkeit geprüften 1-ml-Proteoliposomen wurden dazu mit 1 ml Ladepuffer (100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 400 mM NaCl und 5 mM MgCl_2 , pH 7,5) für 12 h bei 4°C inkubiert. (Der Puffer, in dem die Proteoliposomen gelöst waren, enthielt 20 mM NaCl, durch Zugabe von 1 ml Ladepuffer mit 400 mM NaCl wurde eine Endkonzentration von 210 mM NaCl erreicht.) Um eine Verdünnung der Liposomen zu vermeiden, wurden die geladenen Liposomen von dem Ladepuffer über eine Gelfiltration (10 ml Pipette mit Sephadex S25) getrennt, als Säulenpuffer dienten 200 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 und 10 mM NaCl, in diesem Puffer fand auch die Synthese-Reaktion statt (Assaypuffer). Die liposomenhaltige Fraktion war leicht an der irisierenden Färbung erkennbar. Der Na^+ -Gehalt wurde mittels einer Na^+ -Elektrode als <15 mM bestimmt. Das Na^+ -Potential (Δp_{Na}) beträgt daher ca. 70 mV. Durch Zugabe von Valinomycin wurde zusätzlich ein K^+ -Diffusionspotential von ca. 190 mV erzeugt. Es stand also eine Triebkraft von 260 mV zur Verfügung. Die so vorbereiteten Proteoliposomen (2 ml) wurden mit 2 μM Valinomycin (10 μl einer 0,2 M Stammlsg.) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mM ADP-K (20 μl einer 0,5 M Stammlsg.) gestartet. Die Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Alle 30 s wurden Proben entnommen (je 10 μl). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μl Messpuffer (5 mM NaHAsO_4 , 4 mM MgSO_4 , 20 mM Glycylglycin, pH 8) gestoppt und die Proben wurden sofort nach Zugabe von 5 μl Luciferin/Luciferase-Lösung

chemiluminometrisch vermessen. Ohne Zugabe von ADP war keine ATP-Bildung messbar.

Anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibrierungsgeraden mit definierten ATP-Mengen konnte die gebildete ATP-Menge bestimmt werden.

2.12.5. Erzeugung des Na⁺-Potentials (ΔpNa)

Um zu überprüfen, ob das Na⁺-Potential alleine als Triebkraft für die ATP-Synthese ausreichend ist, wurde ein Ansatz untersucht, bei dem kein Valinomycin zugegeben wurde und so auch kein K⁺-Diffusionspotential vorliegt.

Hierbei werden die Proteoliposomen wie in 2.12.4. behandelt, allerdings wurde kein Valinomycin zugegeben. Zu den so vorbereiteten Proteoliposomen (2 ml) wurden 10 mM K-ADP (20 μ l einer 0,5 M Stammlsg.) gegeben und damit die Reaktion gestartet.

Um einen Einfluss des Valinomycins auf die Aktivität der ATP-Synthase ausschließen zu können, wurden auch Messungen durchgeführt, bei denen in Abwesenheit von 200 mM KCl im Assaypuffer Valinomycin zugesetzt wurde. Die Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Alle 30 s wurden Proben entnommen (je 10 μ l). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ l Messpuffer (5 mM NaHAsO₄, 4 mM MgSO₄, 20 mM Glycylglycin, pH 8) gestoppt und die Proben wurden sofort nach Zugabe von 5 μ l Luciferin/Luciferase-Lösung chemiluminometrisch vermessen.

Anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibrierungsgeraden mit definierten ATP-Mengen konnte die gebildete ATP-Menge bestimmt werden.

2.12.6. Erzeugung eines elektrochemischen Potentials ($\Delta\Psi$)

Für den Mechanismus der Ionentranslokation durch den F_O-Teil des Enzyms ist es von enormer Wichtigkeit, ob ein Na⁺-Potential obligatorisch für die Funktion

der ATP-Synthase ist. Daher wurde auch ein Ansatz gewählt, bei dem lediglich das K^+ -Diffusionspotential als Triebkraft zur Verfügung stand. Dazu wurden die Proteoliposomen nicht mit Na^+ geladen, da der Ladepuffer nur 20 mM NaCl enthielt. Die Proteoliposomen enthielten daher etwa genausoviel Na^+ wie der Assaypuffer. Das bedeutet, dass zwar Na^+ -Ionen vorhanden waren, jedoch kein Gradient und damit auch kein ΔpNa . Ansonsten erfolgte die Durchführung des Versuches wie unter 2.12.4. beschrieben.

Die vorbereiteten Proteoliposomen (2 ml) wurden mit 2 μ M Valinomycin (10 μ l einer 0,2 M Stammlsg.) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mM K-ADP (20 μ l einer 0,5 M Stammlsg.) gestartet. Die Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Alle 30 s wurden Proben entnommen (je 10 μ l). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ l Messpuffer (5 mM NaHAsO₄, 4 mM MgSO₄, 20 mM Glycylglycin, pH 8) gestoppt und die Proben sofort nach Zugabe von 5 μ l Luciferin/Luciferase-Lösung chemiluminometrisch vermessen.

2.13. Proteinbestimmung an ganzen Zellen

Die Proteinbestimmung an ganzen Zellen erfolgte nach Schmidt (1963).

2.14. Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Lowry *et. al.* (1951) in der modifizierten Form von Kresze (1983). Bei Bestimmung stark hydrophober Proteine wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll verwendet, bei dem die Denaturierung der Proteine in NaOH auf 2 h ausgedehnt und die Carbonat-Lösung zusätzlich mit 0,5 M NaOH versetzt wurde. Da die Zugabe des Folin-Reagenz in Gegenwart nichtionischer Detergenzien zur Fällung von Proteinen führen kann, wurden solche Proben mit der 10fachen Konzentration an SDS versetzt (Dulley und Grieve; 1974).

2.15. Proteinbestimmung nach BIURETH

Bei großen Proteinkonzentrationen wurde der Proteingehalt nach der Biuret-Methode mit KCN (Bode *et al.*, 1968) quantifiziert. Zuvor wurden die Proteine durch TCA-Fällung (Wessel und Flügge, 1984) aus der Lösung entfernt. Als Standardprotein diente BSA (Rinderserumalbumin).

2.16. Konzentrierung und Dialyse von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung der Na⁺-F₁F₀-ATPase wurden Vivaspin 20-Röhrchen der Fa. Sartorius (Göttingen, BRD) mit Ausschlussgrößen von 20, 100 und 300 kDa genutzt.

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden Zellutrans-Dialyseschläuche (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, BRD) mit einer Porengröße von 18 Å genutzt. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für 12 h gegen das 100fache Probenvolumen.

2.17. Polyethylenglykol-Fällungen

In Lösung befindliche Proteine wurden durch Zugabe von Polyethylenglycol (PEG), einer hochmolekularen Polymerverbindung, gefällt. Die nach der Bezeichnung PEG aufgeführte Zahl gibt die ungefähre Größe des Moleküls in kDa an. PEG bindet Wasser und entzieht es dem Protein, dadurch verliert dieses seine Löslichkeit und präzipitiert. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation vom Zentrifugat getrennt.

2.18. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophore

Die Auftrennung von Proteinen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach Schagger und von Jagow (1987). Die Gele wurden mit Silber (Blum *et al.*, 1987) oder Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (Weber and Osborne, 1969).

2.19. Native-Gradienten-Page

Die Auftrennung von nativen Proteinkomplexen erfolgte in Gradientengelen (4 - 20%) mit den Maßen 14 cm x 16 x 0,1 cm (Breite x Höhe x Dicke). Die Gele wurden mit Hilfe eines an eine "Microperplex Peristaltic Pump" angeschlossenen Gradientenmischers gegossen. In die vordere Kammer des Gradientenmischers wurde eine 23 ml schwere Lösung (250 mM Tris, 0,25 mM MgCl₂, 20 % Acrylamid, 1% Bisacrylamid, 8,6% Glycerin, 0,1% Triton X-100, pH 8,5) und in die hintere Kammer eine 24 ml leichte Lösung (250 mM Tris, 0,25 mM MgCl₂, 4 % Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 8,6% Glycerin, 0,1% Triton X-100, pH 8,5) gegeben. Kurz vor dem Gießen wurden in beide Kammern 60 µl APS und 12 µl TEMED gegeben. Das Sammelgel wurde mit der leichten Lösung gegossen. Der Gellauf erfolgte bei 120 V für 20 - 24 h bei 4°C.

2.19.1. Elution von Proteinen aus Gelen

Die Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen erfolgte bei 100 V für 12 h in einer S&S-Biotrap-Kammer (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) nach den Herstellerangaben. Als Elutionspuffer dienten 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,025% SDS.

2.20. Immunologische Analysen durch Western-Blot

Zur immunologischen Analyse durch Western-Blot von Proteinen mit Antiseren wurden die Proteine durch eine "Semi dry transfer cell Transblot SD"-Transferkammer (Fa. BioRad Laboratories, Hercules, USA) nach dem Semidry-Verfahren bei 15 V für 90 min auf eine Nitrocellulosemembran (ProtranBA 85, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel, BRD) übertragen. Als Transferpuffer, mit dem die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa. Whatman, Maldstone, GB) angefeuchtet wurden, dienten 100 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% Methanol, pH 7.

Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Amidoschwarz (0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure) für 5 min angefärbt und nach

Markierung der Proteinstandards mit PBST (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 0,05% Tween 20, pH 7) entfärbt. Zur Absättigung der Membranen mit Protein wurden diese dann 1 h in 0,1% Milchpulver (in PBST) bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit PBST wurde das Antiserum einer Konzentration von 4 – 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBST zugegeben und über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBST für 30 min wurde diese 1 h mit Protein-A-Konjugat (6 $\mu\text{l}/20$ ml PBST, Fa. ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA) inkubiert und dann erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Die Detektion von Proteinen erfolgte nach Inkubation der Membran in Detektionslösung (0,03% H_2O_2 , 1,2 mM Luminol, 0,2 mM *p*-Coumarsiure, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) für 2 min. Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (XnAMAT-AR, Fa. Kodak AG, Stuttgart, BRD).

2.20.1. Aufreinigung von IgGs

Zur Aufreinigung von IgGs aus Antiseren kam eine Protein-A-Sepharose-Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml zum Einsatz. Als Säulenpuffer dienten 20 mM Phosphatpuffer (pH 7). Die Säule wurde mit 2 ml Antiserum beladen und so lange mit Säulenpuffer gespült, bis kein Protein mehr im Durchfluss nachweisbar war. Die Elution der gebundenen IgGs erfolgte mit 0,1 M Citrat (pH 3). Um eine Denaturierung der Immunglobuline zu verhindern, wurden Fraktionen von 800 μl aufgefangen und zur Neutralisierung sofort mit 200 μl 1 M K_2HPO_4 (pH 9,5) versetzt. War in den Eluatn kein Protein mehr zu detektieren, wurde die Säule mit 20 ml Säulenpuffer regeneriert. Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei -20°C .

2.21. Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

Zur Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase wurden die gesamten gewaschenen Membranen aus einer 17,5-l-Kultur in 16 ml Membranpuffer resuspendiert und

solubilisiert (Aufurth *et al.*, 2000). Im Mittel wurden etwa 400 mg Protein aus 17,5 l Kultur erhalten.

2.21.1. Solubilisierung des Enzyms aus der Cytoplasmamembran

Zur Solubilisierung der Na⁺ F₁F₀-ATPase aus gewaschenen Membranen wurden diese mit Detergens (1 mg Dodecylmaltosid (DDM) pro mg Protein) versetzt und unter Rühren 1 h bei 4°C inkubiert. Die restlichen Membranen wurden aus dem Ansatz durch Ultrazentrifugation (45 min, 120.000 x g, Ti 50.2-Rotor, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) entfernt. Der Überstand (Solubilisat) wurde zur nachfolgenden Gelfiltration eingesetzt.

2.21.2. Gelfiltration

Zur Gelfiltration wurde als Säulenmaterial Sephacryl S-400 HR (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), das nach Angaben des Herstellers aufbereitet wurde, genutzt. Das Säulenmaterial wurde in einer C-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) mit einer Länge von 100 cm, einem Durchmesser von 2,6 cm und einem Bettvolumen von ca. 420 ml verwendet. Als Säulenpuffer dienten 50 mM Imidazol, 2,5 mM MgSO₄, 50 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5. Alle Gelfiltrationsläufe erfolgten an einem Äkta-prime-plus-System (Fa. Amersham Pharmacia Biotech part of GE Healthcare, General Electric, Atlanta, USA) mit einer Flussrate von 0,2 ml/min. Auf die Säule wurden maximal 4 ml Solubilisat mit einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml aufgetragen. Die Säule wurde vor dem Probenauftrag mit zwei Volumen Säulenpuffer gespült. Die Proteine wurden mit einem Volumen Säulenpuffer eluiert und in 10 ml-Fraktionen durch einen Fraktionssammler aufgefangen.

2.21.3. Dichtegradientenzentrifugation

Die Gradienten wurden in Polyallomerröhrchen (Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) mithilfe eines an eine "Microperplex Peristaltic Pump" (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) angeschlossenen

Gradientenmischers folgendermaßen gegossen: 1 ml einer 30% (v/v) Glycerin-Lösung in Säulenpuffer (50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5) wurde auf den Grund der Röhrrchen gegeben und mit 30 ml eines Gradienten aus je 15 ml der hoch- und niedrig-konzentrierten Lösungen überschichtet. Auf den Gradienten wurde 1 ml Probe (150 µg Protein) aus der Gelfiltration gegeben. Die Dichtegradientenzentrifugationen wurden mit 142.000 x g für 8 h bei 4°C durchgeführt. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation durch eine an eine "Microperplex Peristaltic Pump" (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) angeschlossene Kanüle vom Boden der Röhrrchen in 1,5-ml-Fractionen abgesaugt.

2.21.4. Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauscher-Chromatographie wurde an einem ÄKTA Basic UPC (Fa. Amersham Part of GE Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als Säule wurde eine MonoQ[®] 16/10-Säule verwendet (Fa. Amersham). Als Niedrigsalz- und Hochsalzpuffer wurden 0 bzw. 1 M NaCl in 50 mM Imidazol, 5 mM MgSO₄, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5, genutzt. Die Säulen wurden vor dem Probenauftrag mit drei Volumen Hochsalz- und drei Volumen Niedrigsalzpuffer gespült. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen Gradienten von 0 – 1 M NaCl über vier Säulenvolumen, gefolgt von zwei Volumen Hochsalzpuffer. Die Flussrate betrug in allen Fällen 1 ml/min.

2.22. Isolierung des c-Ringes der Na⁺-F₁F₀-Synthase aus *A. woodii*

Zur Reinigung des c-Ringes kamen zwei Methoden zur Anwendung. Zuerst wurde die Isolierung aus dem gereinigten Enzym vorgenommen. Die erreichten Ausbeuten lagen jedoch im analytischen Maßstab, so dass eine Isolierung aus dem Solubilisat zur Gewinnung größerer Mengen des Oligomers für die 3D-Kristallisation gewählt wurde.

2.22.1. Isolierung aus der gereinigten Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase

Um den c-Ring zu isolieren, bedient man sich der extremen Stabilität des c-Ringes, welcher sogar gegen hohe Konzentrationen von SDS und extreme Temperaturen (>100°C) stabil ist. Zuerst wurde der Enzymkomplex der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase (ca. 10 ml, 8 mg/ml Protein) durch 20-minütige Inkubation mit 1,5% (w/v) N-Lauroylsarcosin dissoziiert. Nach dem Abkühlen auf 20°C wurden durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zu einer Konzentration von 68% (v/v) Sättigung alle Monomere bis auf den c-Ring aus der Lösung gefällt (2h, 20°C). Das Präzipitat wurde durch Filtrationen (Rundfilter mit 2,6 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), gefolgt von einer Mikrofiltration (0,2 µm Porengröße, Nalgene, Rochester, NY, USA), entfernt. Zur Entfernung des Ammoniumsulfates wurde das Filtrat 24h bei 4°C gegen das 100fache Volumen von 10 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0, dialysiert. Das Dialysat wurde zu 1.5% (v/v) mit β-n-Octoylglycosid (Biomol, München, Deutschland) versetzt und mit einem Konzentrator (30 kDa; Amicon, Hannover, Deutschland) bis zu der gewünschten Proteinkonzentration ankonzentriert. Die Reinheit wurde durch SDS-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse überprüft

2.22.2. Isolierung aus dem Solubilisat

Um größere Mengen des c-Ringes zu erhalten, wurde eine Isolierung aus dem Solubilisat entwickelt. Hierbei wird die gesamte ATP-Synthase nur grob vorgereinigt. Dazu wurde das Solubilisat (40-50 ml, 1 mg/ml Protein, ca. 1 mg Detergenz pro mg Protein) mit 8% (w/v) PEG8000 inkubiert, der entstandene Niederschlag wurde mittels Zentrifugation entfernt. Das Zentrifugat wurde dann erneut mit nun 15% (w/v) PEG8000 inkubiert. Der Niederschlag wurde ebenfalls durch Zentrifugation entfernt. Das Sediment wurde nun dreimal mit 10 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 15% PEG8000, pH 8.0, gewaschen und anschließend in 60 ml 10 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0, 1.5% β-n-Octoylglycosid (w/v) mit aufgenommen. Die Isolierung des c-Ringes erfolgte dann wie unter 2.19.1

beschrieben. Die Reinheit wurde durch SDS-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse überprüft.

2.23. Erzeugung von Proteinkristallen

Um die Untereinhenitzusammensetzung, die Größe und Struktur des *c*-Ringes zu untersuchen, wurden aus Proben des gereinigten *c*-Ringes 2- und 3D-Proteinkristalle hergestellt. Die 3D-Kristallisationsarbeiten wurden in Kollaboration mit Dr. Thomas Meier am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt.

2.23.1. Erzeugung von 2D-Proteinkristallen

Für die 2D-Kristallisation wurde die Methode nach Stahlberg *et. al.* (Stahlberg *et al.*, 2001) verwendet. Hierzu wurde eine *c*-Ring-Probe mit 1-Palmitoyl-2-Aleyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL,USA) in verschiedenen Lipid-zu-Proteinverhältnissen (w/w) gemischt (0,5:1; 1:1; 1,5:1). Diese Mischungen wurden in 50 µl Mikrodialyse-Buttons (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) gegen 50 ml of 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl and 3 mM NaN₃ für 24, 48 und 72 h bei 16, 25 und 37°C dialysiert. Die gewonnenen 2D-Kristalle wurden anschließend bei 4°C gelagert. Die Analyse der 2D-Kristalle erfolgte durch Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie.

2.23.1.1. Elektronenmikroskopie

Die gewonnenen 2D-Kristalle wurden durch TEM (Transmissions-Elektronenmikroskopie) untersucht. Dazu wurden die Kristalle in 4,5% (w/v) Trehalose nach der „back-injektion“-Methode auf ein Molybdängitterträger aufgebracht (Pacific Grid-Tech, San Diego, CA,USA). Die Proben wurden dann in einem Helium-gekühlten JEOL 3000 SFF-Elektronenmikroskop bei 4° K und bei einer Beschleunigungsspannung von 300.000 V analysiert. Die Bilder wurden durch Punkt-Abtastung mit einer Auflösung von 24x30 Punkten pro Bild (Kodak-

SO-163-Film) bei einer Vergrößerung von 53.000 und einer Elektronendosis von 20-30 Elektronen/Å² aufgenommen. Die Filme wurden für 12 min im Kodak-D-19-Entwickler entwickelt. Die selektierten Bilder wurden mit einem Zeiss-SCAI-Scanner digitalisiert. Die Pixelgröße von 7 µm entsprach dabei 1,3 Å. Die Daten wurden durch die MRC- (Crowther *et al.*, 1996) bzw. CCP4 (CollaborativeComputationalProject, 1994)-Algorithmen prozessiert und zu einer finalen Auflösung von bis zu 5 Å aufsummiert. Die EM-Aufnahmen wurden am MPI für Biophysik in Frankfurt von Deryck Mills und Janet Vonck gemacht.

2.23.1.2. Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)

Die 2D-Kristalle wurden parallel durch AFM (Atomic Force Microscopy) untersucht. Hierbei tastet eine Piezo-gesteuerte Spitze die Oberfläche des Kristalls physisch ab und entwickelt hieraus ein Oberflächenprofil. Es wurde ein für die Beobachtung von Einzelkomplexen in Lösungen modifiziertes Atomic Force-Mikroskop mit einem 100 µm X/Y Piezoscanner verwendet (Nanoscope IIIa, DI-Veeco, Santa Barbara, CA; USA). Die 100 µm langen Silikonitrit AFM-Nadeln (Olympus, Tokyo, Japan) hatten eine nominelle Federkonstante von 0,9 N/m. Das zu untersuchende Protein wurde durch 30 min Inkubation auf frisch geschnittene Träger aufgebracht. Danach wurden die Träger gespült, um nur lose anhaftendes Material zu entfernen. Die Messungen wurden in Puffer (10 mm Tris-HCl, 200 mm NaCl, 0.02% NaN₃, 10% Glycerol, pH 7.8) bei 25° C durchgeführt. Die Andruckkraft betrug 100 pN bei einer Linienfrequenz von 4-6 Hz. Zur Bildprozessierung wurden individuelle Felder des topografischen Bildes ausgewählt und durch ein referenzfreies Alignment summiert. Dazu wurde die SPIDER-Bild-Verarbeitungssoftware (Wadsworth Labs, NY,USA) verwendet. Zur Berechnung der Korrelationsbilder wurde die SEMPER-Bildverarbeitungssoftware verwendet (Synoptics Ltd, Cambridge, UK). Die AFM Topographen wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. D. Müller an der TU Dresden aufgenommen.

2.24. Erzeugung von 3D-Proteinkristallen

Für die 3D-Kristallisation des c-Ringes wurde eine gereinigte Proteinprobe mit einer Konzentration von 8-10 mg/ml eingesetzt. Zur Eingrenzung des optimalen Detergenzes wurde der „Detergent-Screen-I,II,III-Kit“ von Hampton Research (Hampton Research, NY, USA) verwendet. Es wurden je 72 Detergenzien in verschiedenen Protein-/Detergenz-Verhältnissen (v/v) getestet (0,5:1, 1:1, 2:1). Des Weiteren wurde die Inkubationstemperatur im Bereich von 8 – 24°C variiert. Der Ansatz umfasste im ersten Versuch 1080 verschiedene Bedingungen und benötigte ca. 10 mg gereinigten c-Ring. Die Platten für den Screen wurden im „Hanging Drop“-Verfahren angesetzt (2 µl Tropfenvolumen, 200µl Reservoir). In Tabelle 1 sind die verwendeten Detergenzien aufgeführt.

Tabelle 1, Verwendete Detergenzien im Hampton Screen.

Reagenz Nr.	Detergenz	Mw	CMC* (mM)	[mM]
1	<i>C</i> ₁₂ <i>E</i> ₉	~ 583	0,05	0,5
2	<i>C</i> ₁₂ <i>E</i> ₈	538,8	0,11	1,1
3	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-Maltosid	510,6	0,17	1,7
4	Sucrose-Monolaurat	524,6	0,30	3,0
5	CYMAL-6	508,5	0,56	5,6
6	TRITON X-100	650,0	0,90	9,0
7	CTAB	364,46	1,00	10,0
8	Big CHAP, Deoxy	862,1	1,40	14,0
9	<i>n</i> -Decyl-β-D-Maltosid	482,6	1,80	18,0
10	LDAO	229,41	2,00	20,0
11	CYMAL,-5	494,5	5,00	50,0
12	ZWITTERGENT, 3-12	335,6	4,00	40,0
13	<i>n</i> -Nonyl-β-D-Glucosid	306,4	6,50	65,0
14	<i>n,n</i> ,Actyl-β-D-Thioglucosid	308,4	9,00	90,0
15	DDAO	201,35	10,40	104,0
16	HECAMEG,	335,4	19,50	195,0

17	<i>n, n</i> , Actanoylsucrose	468,5	24,40	244,0
18	<i>n</i> -Heptyl- β -D-Thioglucopyranosid	294,4	30,00	300,0
19	<i>n,n</i> ,Actyl- β -D-Glucosid	292,4	20,00	200,0
20	CYMAL,-3	466,5	34,50	345,0
21	C-HEGA,-10	377,5	35,00	350,0
22	ZWITTERGENT, 3-10	307,6	40,00	400,0
23	MEGA,-8	321,4	79,00	790,0
24	<i>n</i> -Hexyl- β -D-Glucopyranosid	264,3	250,00	2500,0
25	Pluronic [®] F-68	~8350	K. A.	10% w/v
26	Anapoe [®] 35	K. A.	K. A.	10% v/v
27	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltotriosid	672,78	0,2	2 mM
28	Anapoe [®] 58	K. A.	K. A.	10% v/v
29	Anapoe [®] X-114	K. A.	K. A.	10% v/v
30	Anapoe [®] X-305	K. A.	K. A.	10% v/v
31	Anapoe [®] X-405	K. A.	K. A.	10% v/v
32	Anapoe [®] 20	1227,54	0,059	10% v/v
33	Anapoe [®] 80	1309,68	0,012	10% v/v
34	Anapoe [®] C ₁₀ E ₆	427,10	0,9	10% v/v
35	Anapoe [®] C ₁₀ E ₉	K. A.	K. A.	10% v/v
36	Anapoe [®] C ₁₂ E ₁₀	K. A.	K. A.	10% v/v
37	Anapoe [®] C ₁₃ E ₈	K. A.	K. A.	10% v/v
38	IPTG	238,30	K. A.	10% w/v
39	<i>n</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -Dimethylglycin	271,40	1,5	15.0
40	HEGA-10	379,50	7,0	70.0
41	C ₈ E ₅	350,50	7,1	71.0
42	CHAPS	614,90	8,0	80.0
43	CHAPSO	630,90	8,0	80.0
44	C-HEGA-11	391,50	11,5	115
45	HEGA-9	365,50	39,0	390
46	C-HEGA-9	363,50	108,0	1.08 M
47	HEGA-8	351,50	109,0	1.09 M

48	CYPFOS-3	293,30	180,0	1.80 M
49	BAM	384,44	K. A.	10% w/v
50	<i>n</i> -Hexadecyl- β -D-Maltosid	566,6	0,0006	0.006
51	<i>n</i> -Tetradecyl- β -D-Maltosid	538,6	0,01	0.1
52	<i>n</i> -Tridecyl- β -D-Maltosid	524,6	0,033	0.33
53	Thesit [®]	582,9	0,09	0.9
54	ZWITTERGENT [®] 3-14	363,6	0,4	4.0
55	<i>n</i> -Undecyl- β -D-Maltosid	496,6	0,59	5.9
56	<i>n</i> -Decyl- β -D-Thiomaltosid	498,6	0,9	9.0
57	FOS-Choline [®] -12	351,5	1,5	15.0
58	<i>n</i> -Decanoylsucrose	496,6	2,5	25
59	1- <i>s</i> -Nonyl- β -D-Thioglucosid	322,4	2,9	29.0
60	<i>n</i> -Nonyl- β -D-Maltosid	484,6	3,2	32.0
61	DDMAB	299,5	4,3	43.0
62	<i>n</i> -Nonyl- β -D-Maltosid	468,4	6,0	60.0
63	CYMAL [®] -4	480,5	7,6	76.0
64	<i>n,n</i> , Actyl- β -D-Thiomaltosid	470,6	9,0	90.0
65	FOS-Choline [®] -10	323,4	13,0	130
66	FOS-Choline [®] -9	309,4	19,0	190
67	MEGA [®] -9	335,5	25,0	250
68	1- <i>s</i> -Heptyl- β -D-Thioglucosid	294,4	29,0	290
69	FOS-Choline [®] -8	295,4	102,0	1.02 M
70	CYMAL [®] -2	452,5	120,0	1.20 M
71	ZWITTERGENT [®] 3-08	279,6	330,0	3.30 M
72	CYMAL [®] -1	438,5	340,0	3.4 M

*CMC: Kritische Mizellenkonzentration (mM)

Nach der Eingrenzung der optimalen Detergenzien wurde ein Screen verwendet, welcher auch bei der 3D-Kristallisation des *c*-Ringes von *I. tartaricus* verwendet wurde (Meier *et al.*, 2005a). Hier kamen in einem 0,1 M-Natriumacetat-Puffer (pH

4,48) verschiedene Konzentrationen (v/v) von PEG100-400 bei unterschiedlichen Temperaturen (16, 20, 24°C) zum Einsatz (Tabelle 2). Diese Ansätze wurden mit einem Tropfenvolumen von 1 µl bei einem Reservoirvolumen von 500 µl im „Hanging Drop“-Verfahren durchgeführt.

Tabelle 2, Verwendete Detergenzien im c-Ring-Screen mit den jeweiligen Konzentrationen in % (v/v)

Ansatz Nr.	Detergenz	[Konz.] (v/v) (%)
A1	PEG 100	8
A2	PEG 100	12
A3	PEG 100	14
A4	PEG 100	16
A5	PEG 100	18
A6	PEG 100	20
A7	PEG 100	22
A8	PEG 100	26
B1	PEG 200	8
B2	PEG 200	12
B3	PEG 200	14
B4	PEG 200	16
B5	PEG 200	18
B6	PEG 200	20
B7	PEG 200	22
B8	PEG 200	26
C1	PEG 300	8
C2	PEG 300	12
C3	PEG 300	14
C4	PEG 300	16
C5	PEG 300	18
C6	PEG 300	20
C7	PEG 300	22

C8	PEG 300	26
D1	PEG 400	8
D2	PEG 400	12
D3	PEG 400	14
D4	PEG 400	16
D5	PEG 400	18
D6	PEG 400	20
D7	PEG 400	22
D8	PEG 400	26

Der Erfolg der Kristallisation wurde unmittelbar nach dem Ansetzen sowie nach 24h und anschließend im Abstand von 7 Tagen kontrolliert. Um ein möglichst wasserfreies Einfrieren der Kristalle zu gewährleisten, wurden diese vor dem Einfrieren für 120-180 s in 30% PEG inkubiert.

2.25. MALDI-TOF-MS

Massenspektren wurden mit der MALDI-TOF-Technik (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time of Flight) erzeugt. Die Proteine wurden zuerst durch SDS-Gelelektrophores aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (Weber und Osborne, 1969). Alle sichtbaren Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und wie beschrieben behandelt (Rosenfeld *et al.*, 1992; Shevchenko *et al.*, 1996). Die Proben wurden durch einen Microlab Star digestion®-Roboter (Microlab, Bonaduz, Schweiz) nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet und mit Trypsin (Bovin; Roche, Mannheim, Deutschland) verdaut. Pro Ansatz wurden 2 µl Trypsinlösung (5 mg/ml Protein) zugegeben. Der Verdau erfolgte für 2h bei 37°C. Die Spektren wurden mit einem Voyager-DE-STR-Instrument (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA), ausgestattet mit einem Stickstoff-Laser (337 nm), aufgenommen. Die Spektren wurden im Positiv-Ionen-Linear-Modus aufgezeichnet. Die totale Beschleunigungs-Spannung betrug 25 kV. 23,6 kV wurden für das erste Gitter verwendet. Die Verzögerungszeit betrug 125 ns. Für jedes Massenspektrum

wurden 150 Einzelmessungen gesammelt. Als externer Kalibrierungsstandard diente der Sequazyme Peptide Mass Standard KIT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), als interne Kalibrierung ein selbstverdauendes Peptid mit einer Masse von m/z : 2163.0564. Die erhaltenen Spektren wurden mit der Flexanalysis©-Software in der Version 2.2 (Bruker Daltronics) unter Anwendung des SNAP-Algorithmus (Signal/Rausch-Ausschlussgrenze: 3, maximale Peakanzahl: 150; Qualitätsgrenze: 80) ausgewertet. Die Proteine wurden durch mascot© (Matrix Science, Boston, MA, USA) mit einer Toleranz von 50 ppm mit der NCBI_Inr Datenbank identifiziert. Die Signifikanz wurde erst ab einem Scorewert >77 anerkannt, lag zumeist aber über 90.

2.26. LILBID-TOF-MS

Die LILBID (Laser Induced Liquid Beam Ionisation Desorption; Morgner *et al.*, 2006, Morgner *et al.*, 2007)-Massenspektrometrie beruht grundsätzlich auf ähnlichen Messmethoden wie MALDI- oder ESI-TOF auch, gemessen wird die von Partialladung und Masse abhängige Flugzeit der ionisierten Proteinfragmente. Anders als bei anderen Ionisierungsmethoden wird hier jedoch mittels eines Laserpulses ein Mikrotropfen eines Tropfenstrahles (50 nm Tropfendurchmesser, Volumen 65 pl; Frequenz 10 Hz) der Proteinlösung komplett ionisiert, die Energie des Laser ($\lambda = 2,8 \mu\text{m}$) wirkt dabei nur auf die kovalente Bindung zwischen Sauerstoff und Wasserstoff im dipolaren Wassermolekül. Die Energie ist dabei so hoch, dass die Wassermoleküle in einen superkritischen Zustand überführt werden. Bei der daraus resultierenden Tropfenexplosion werden die im Wasser solvatisierten Ionen freigesetzt, beginnen aber gleichzeitig auch aufgrund der Coulombanziehung zu rekombinieren und sind für die Messung wertlos. Die nicht rekombinierten Ionen können hingegen im TOF-Detektor massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Unter sanften Desorptionsbedingungen bleiben nicht kovalent gebundene Komplexe intakt und ermöglichen so eine Bestimmung der Komplexmasse. Erhöhte Laserintensität führt zur Dissoziation von Bindungen, dabei zerfallen die schwächsten Bindungen zuerst, danach die stärkeren

Bindungen. Dies führt zu einer sequenziellen Auflösung des Komplexes. Die LILBID-Analysen stellen eine herausragende, neue Methodik zur Analyse von Proteinkomplexen dar. Die Analysen wurden von Frau Dr. Nina Morgner (Arbeitsgruppe B. Brutschy), Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, durchgeführt.

2.27. Chemikalien und Gase

Alle Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Die verwendeten Gase wurden von Messer-Griesheim GmbH (Krefeld) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, BRD) synthetisiert.

al., 2000) angestellt. Alle vorhergesagten Untereinheiten konnten im Zellextrakt nachgewiesen werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die ATP-Synthase mit einer Masse von ~600 kDa den größten Proteinkomplex in der Cytoplasmamembran darstellt. Es sollte daher in dieser Arbeit ein Reinigungsverfahren etabliert werden, das eine Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase ohne Verlust an Untereinheiten ermöglicht.

3.1.1. Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

Um ausreichende Mengen an Enzym zu erhalten, wurde *A. woodii* in 17,5-l-Steilbrustflaschen mit 40 mM Fructose als Substrat bei 30°C kultiviert. Die Zellernte erfolgte nach 24-27 h in der spätexponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 0,8-1,2 mit einer Durchlaufzentrifuge. Im voll ausgewachsenen Zustand erreichte das Bakterium zwar höhere Zelldichten von OD_{600} 2,5-2,8, allerdings war dann die ATPase-Aktivität geringer. Abbildung 17 zeigt einen Vergleich der Zelldichte zur ATPase-Aktivität.

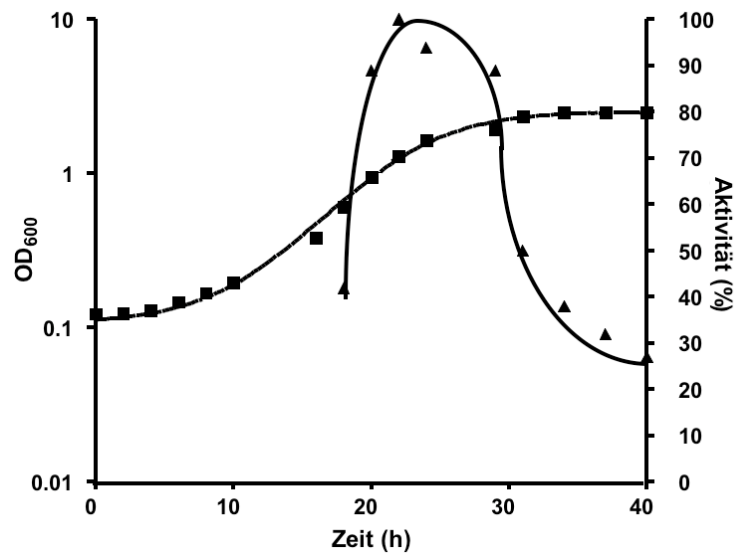


Abb. 17: ATPase-Aktivität in Abhängigkeit des Wachstums von *A. woodii*. Die optische Dichte (■) und die Aktivität (▲) in der Membranfraktion sind graphisch aufgetragen. Es wurde eine 17,5-l-Kultur mit 40 mM Fructose als Substrat bei 30°C angezogen. Zur Bestimmung der Aktivität wurden jeweils 1000 ml Medium steril abgezogen und die Membranen präpariert. Die höchste gemessene ATPase-Aktivität (0,68 U/mg) wurde 100% gesetzt.

Aus einer 17,5-l-Kultur wurden im Mittel ca. 30 g Zellen erhalten. Die Zellen wurden dreimal in Zellaufschlusspuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in Protoplastenpuffer aufgenommen, durch Inkubation mit 0,5 g Lysozym angedaut und anschließend in der Frenchpress bei 1000 PsiG aufgeschlossen; je nach Aufschlussqualität wurde die Passage durch die Frenchpress bis zu 3-mal wiederholt. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation aus dem Zentrifugat präpariert. Die gewonnenen Membranen wurden in Membranpuffer aufgenommen und dreimal gewaschen. Aus 30 g Zellmasse wurden in den gewaschenen Membranen etwa 430-450 mg Protein erhalten und zur Solubilisierung eingesetzt. Obwohl *A. woodii* ein anaerobes Bakterium ist, hatte Sauerstoff keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität an den Membranen, die Reinigung wurde daher unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

3.1.2. Solubilisierung

Um das mit seinem lipophilen F_0 -Teil in der Membran verankerte Enzym isolieren zu können, musste dieses zuerst aus der Membran gelöst werden. Das geschah durch Solubilisierung mit einem Detergenz. Das Detergenz verdrängt dabei die Lipide und hüllt die lipophilen Proteinteile in Detergenzmizellen ein. Verschiedene Detergenzien bilden unterschiedliche große Mizellen und haben auch verschiedene Solubilisierungsintensitäten. Um eine maximale Ausbeute zu erzielen, wurden zunächst verschiedene Detergenzien (Triton X-100, Triton X-100 reduziert, CHAPS und n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM)) in unterschiedlichen Detergenz-zu-Protein-Verhältnissen für die Solubilisierung getestet. Nach jeweils 1h Inkubation des Detergenzes mit gewaschenen Membranen bei 4°C wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation abgetrennt und das Zentrifugat mit Zentrifugationskonzentratorröhrchen (Vivaspin Column, 300 kDa Ausschlussgröße) eingeeengt, dabei wurden auch alle Proteine < 300 kDa abgetrennt. Anschließend wurde die ATPase-Aktivität bestimmt. Da aus vorhergehenden

Untersuchungen bekannt war, dass Triton X-100 auch in geringsten Mengen einen sehr stark stimulierenden Einfluss auf die Enzymaktivität hatte (Reidlinger, 1994), wurde jeder Probe vor der Messung 0,1% Triton X-100 zugegeben, die Vollständigkeit des Enzyms durch Western Blot gegen die α - und c_1 -Untereinheit und 2D-Blue-Native-Page getestet. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse aufgetragen.

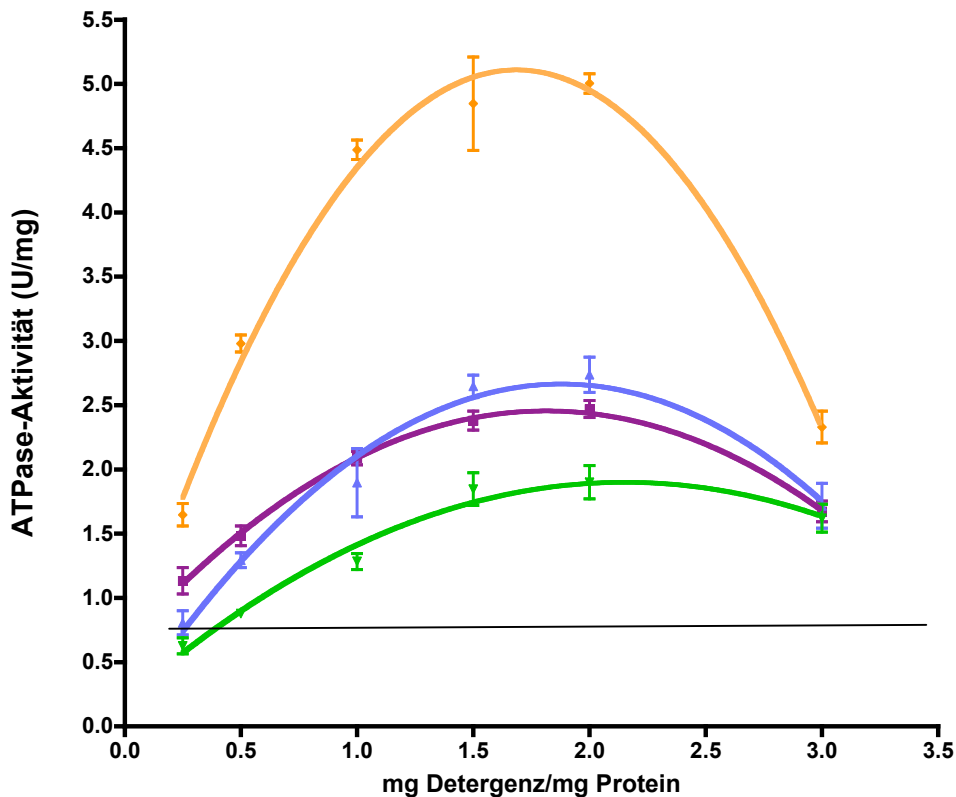


Abb. 18: Solubilisierung der ATP-Synthase aus den gewaschenen Membranen von *A. woodii* durch verschiedene Detergenzien. Die schwarze Linie repräsentiert die Aktivität der Membranfraktion, 0,86 U/mg Protein. Als Detergenzien wurden CHAPS (▼), TRITON X-100 (▲), TRITON X-100 reduced (●) und Dodecylmaltosid verwendet (◆)..

Die Solubilisierungsexperimente zeigten, dass alle Detergenzien in der Lage waren, die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus den Membranen zu lösen. Die besten Ergebnisse lieferte DDM, das ein Solubilisat mit einer ATPase-Aktivität von 5 U/mg bei 2 mg Detergenz pro mg Protein aufwies. Die Detergenzien TRITON

X-100 und TRITON X-100-reduziert zeigten vergleichbare Solubilisierungsleistungen mit maximalen ATPase-Aktivitäten von ca. 2,4 U/mg. Das sanfteste Detergenz CHAPS lieferte die geringsten Ausbeuten mit einer ATPase-Aktivität von ca. 1,8 U/mg im Solubilisat. Untersuchungen der solubilisierten Proteine durch Blue-Native-Page (Abb. 19) zeigten einen prominenten Proteinkomplex bei 600 kDa. Das mit CHAPS gewonnene Solubilisat enthielt darüber hinaus einen Proteinkomplex mit einer Masse oberhalb von 880 kDa. Im nächsten Schritt wurde die Untereinheitenzusammensetzung der prominenten Komplexe untersucht. Dazu wurden diese aus dem Gel der Blue-Native-Page ausgeschnitten und in der zweiten Dimension durch eine 10% SDS-Page aufgetrennt (Abb 19).

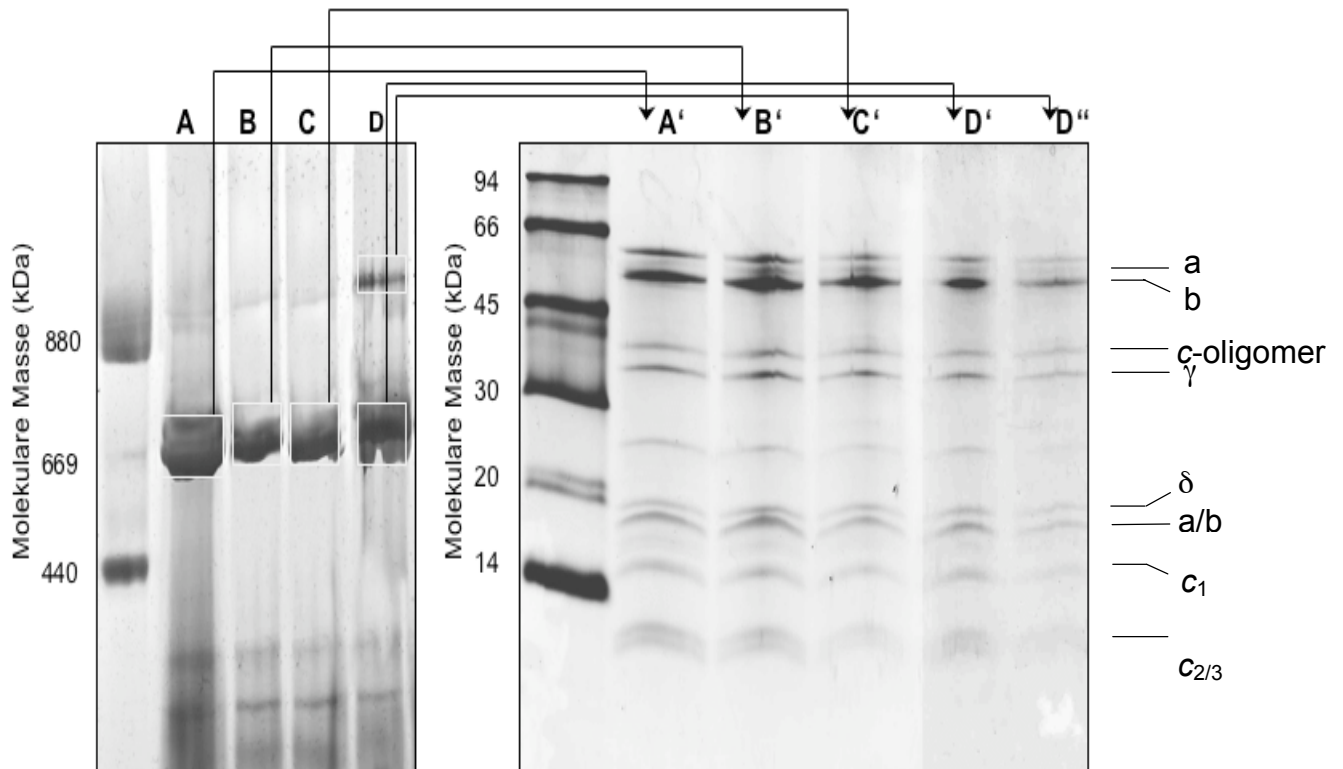


Abb. 19: Untersuchung der Solubilisate durch Blue-Native- und SDS-Page. Es wurden je 50 µg Protein der Solubilisate von DDM (A&A'), TRITON X-100 (B, B'), TRITON X-100 reduziert (C, C') sowie CHAPS (D, D', D'') aufgetragen. Die prominenten Banden der BN-Page wurden ausgeschnitten (helle Markierung) und in der zweiten Dimension durch 10% SDS-Page erneut aufgetrennt. Das erhaltene Bandenmuster ist charakteristisch für die Na⁺-F₁F₀-ATP-

Synthase aus *A. woodii* (Aufurth *et al.*, 2000). Als Marker für die BN-Page dienten der HMW-Native-Standard von Pharmacia (jetzt GE-Healthcare, Upsala, Schweden)

Interessanterweise lieferten die Solubilisierungen mit CHAPS neben dem erwarteten Proteinkomplex im Bereich von ~600 kDa auch einen Komplex mit einer Masse von >1mDa, welcher in der 2D-Auftrennung ein mit der ATP-Synthase identisches Bandenmuster zeigte (Aufurth *et al.*, 2000). Dabei handelte es sich offenbar um ein ATP-Synthase-Dimer. Wie die leichten Schatten auf der Blue-Native-Page zeigen (Abb. 19), scheint dieses Dimer auch in den Präparationen mit den anderen Detergenzien in geringeren Mengen vorzukommen. Ob es sich dabei um ein Artefakt der Präparation handelt oder ob *in vivo* ebenfalls dimere Strukturen auftreten, bleibt zu diskutieren.

Die besten Solubilisierungsergebnisse wurde mit 2 mg DDM pro mg Protein erzielt. Da dieses Detergenz allerdings recht kostenintensiv ist und bei einem Verhältnis von 1 mg DDM pro mg Protein nur eine etwa 5% geringere Ausbeute zu verzeichnen war, wurde die Solubilisierung standardmäßig mit diesem Detergenz-zu-Proteinverhältnis durchgeführt.

3.1.3. Gelfiltration

Da die nativen Gele keine wesentlichen Verunreinigungen von ähnlicher Größe wie die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aufwiesen, wurde eine Aufreinigung nach Größe vorgenommen. Dazu wurde das Solubilisat über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Bei einer Gelfiltration ist der Weg durch die poröse Matrix für kleinere Proteine länger als für größere Proteine, da diese nicht in die Matrix eindringen können. Daher eluieren zuerst die kleinsten Proteine, dann die größeren. Vor der Gelfiltration wurde das Solubilisat durch Druckdialyse mit einer Ausschlussgröße von 300 kDa bis auf 10 ml Volumen eingengt. Dabei wurden sowohl kleinere Proteine abgetrennt als auch eine Konzentrierung der Proteinlösung erreicht. Die Gelfiltration erfolgte über

Sephacryl S-400 in Gegenwart von 0,1% reduziertem Triton X-100 (aus Kostengründen wurde hier kein DDM verwendet). Die Verwendung von reduziertem Triton ermöglichte die Verfolgung der Proteinkonzentrationen bei 280 nm (Abb. 20), da im Gegensatz zu nicht reduziertem Triton keine Eigenabsorption des Detergenzes bei dieser Wellenlänge zu beobachten war. Die Verwendung von Detergenz im Laufpuffer war notwendig, da ohne Detergenz bzw. bei Detergenzkonzentrationen unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) keine Auftrennung erzielt wurde.

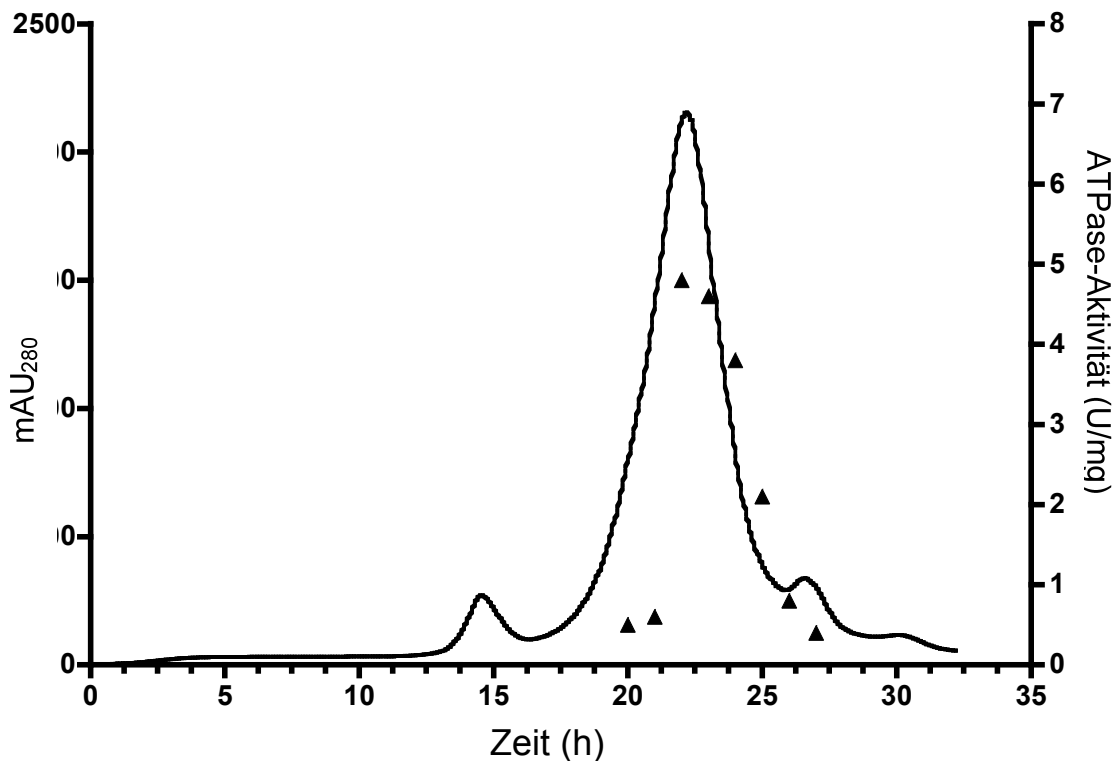


Abb. 20: Die ATPase-Aktivität in den Fraktionen der Gelfiltration, Säulenmaterial Sephacryl S-400, aufgetragen wurde die kontinuierlich aufgezeichnete Absorption bei 280 nm (durchgehende Linie) und die ATP-Hydrolyse-Aktivität (▲). Die Aktivität wurde für die Fraktionen 27-35 bestimmt. Die Flussrate war 0,2 ml/min, die Fraktionsgröße betrug 10 ml. Die Hauptaktivität wurde in den Fraktionen 29-32 gefunden..

Das Gelfiltrationsmaterial Sephacryl S-400 trennt Proteine in einem Größenbereich von 400 kDa bis ca. 1,2 mDa. Die Trennstrecke ist dabei proportional zur Trennleistung und der Durchmesser beschränkt das

Ladevolumen. Um eine möglichst große Menge an Enzym aufzureinigen zu können, wurde eine Säule mit 100 cm Länge bei einem Durchmesser von 2,6 cm verwendet. Pro Lauf konnten etwa 5 ml Lösung mit einem Proteingehalt von 5-10 mg/ml aufgetragen werden. Ein Trennlauf benötigte bei einer Flussrate von 0,2 ml/min 36 h und wurde daher bei 4°C durchgeführt. Während des Trennlaufes wurden 50 Fraktionen à 10 ml gesammelt. Die Elution der ATPase-Aktivität wurde durch die Bestimmung der Aktivität für jede der Fraktionen sowie der Absorption bei 280 nm verfolgt (Abb. 19). Die Hauptmenge der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase ließ sich aufgrund der Aktivität und des Bandenmusters der SDS PAGE in den Fraktionen 29 – 32 nachweisen (Abb. 21).

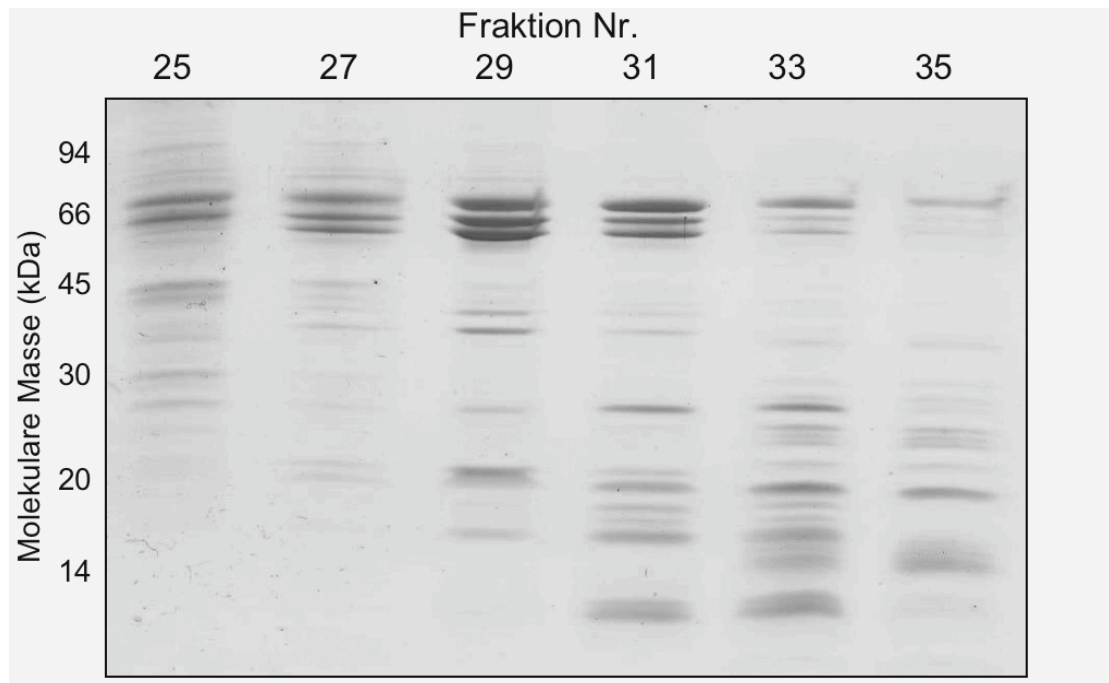


Abb. 21: Aufreinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase durch S-400-Gelfiltration, pro Fraktion wurden 20 mg Protein aufgetragen und durch 12,5% SDS-Page aufgetrennt. In den Fraktionen 29 und 31 zeigt sich das für die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase typische Bandenmuster am deutlichsten.

Die Hauptenzymaktivität wurde in vier Fraktionen (zumeist 29, 30, 31 und 32) gefunden. Diese wurden vereinigt und durch Zentrifugationskonzentratoren (Vivaspin Column, 100 kDa Ausschlussgröße) auf ein Volumen von 1-2 ml eingengt, um eine möglichst hoch konzentrierte Proteinlösung für die

Dichtegradientenultrazentrifugation einsetzen zu können. Die Aktivität der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase betrug nach der Gelfiltration 5 – 9 U, was einer Anreicherung um einen Faktor 10 – 18 gegenüber den Membranen entspricht. Die Ausbeute betrug bis zu 30%. Entscheidend war hier aber, dass im Gegensatz zu den vorherigen Reinigungsversuchen (Reidlinger und Müller, 1994) keine Inaktivierung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase zu beobachten war.

3.1.4. Dichtegradientenzentrifugation

Zur weiteren Aufreinigung wurde anfangs eine Dichtegradientenultrazentrifugation herangezogen. Allerdings war der Verlust von fast 60% der Aktivität sehr groß und der Reinigungsgewinn gering. Daher wurde später auf diesen Reinigungsschritt verzichtet. Als Ersatz wurden vor der Gelfiltration eine Druckdialyse mit einem Cutoff von 300 kDa und nach der Gelfiltration eine nochmalige Filtration mit einem Cutoff von 100 kDa durchgeführt. Diese zwei Schritte führten zu einer ähnlichen Reinheit, verursachten aber nur einen geringen Aktivitätsverlust. Die aus der Gelfiltration gewonnenen Fraktionen wurden vereinigt und auf ein Volumen von ca. 10 ml konzentriert.

3.1.5. Zusammenfassung der Reinigung der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii*

Die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* wurde durch die Solubilisation mit 1 g Dodecylmaltosid pro g Protein, anschließende Abtrennung aller Proteine mit einer Masse <300 kDa durch Filtration, gefolgt von einer Gelfiltration über Sephacryl S-400 mit einer anschließenden Konzentrierung durch Filtration mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa 16fach angereichert. Die Ausbeute betrug 30%. In Tabelle 3 ist eine typische Reinigung zusammenfassend dargestellt. Pro 17,5-l-Kultur mit 40 mM Fructose als Substrat wurden im Mittel etwa 5-9 mg Enzym mit einer Aktivität von ca. 9-12 U/mg präpariert.

Tabelle 3, Anreicherungstabelle für die Reinigung der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii*.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Volumen (ml)	Aktivität (U/ml)	Aktivität (U/mg)	Anreicherung (x-Fach)	Ausbeute (%)
Membranen	430	50	214	0,6	1	100
Solubilisat	41	47	188	4,6	8,3	87
300 kDa Filtration	16	15	98	6,2	11	45
Gelfiltration & 100 kDa Filtration	6,9	10	67	9,7	16	30

3.2. Untereinheitenzusammensetzung Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

Vorhergehende Reinigungsversuche des Enzyms lieferten ein Enzym ohne die Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁, daher war es von besonderer Bedeutung festzustellen, ob das hier entwickelte Verfahren die Reinigung des kompletten Enzymes ermöglichte. Die Reinheit wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft. Alle sichtbaren Banden (beginnend von oben, d.h. Bande 1 entspricht der ersten sichtbaren Bande auf dem Gel aus Abb. 22) wurden aus dem Gel (Abb.22) ausgeschnitten und MALDI-TOF-MS analysiert.

Tabelle 4, Ergebnisse der MALDI-TOF-MS.

Bande	Detektiertes Protein	Score
1	α -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	129
2	β -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	239
3	Ohne Ergebnis	
4	γ -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	179
5	δ -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	186
6.1	<i>b</i> -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	151
6.2	<i>a</i> -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	38
8	ϵ -Untereinheit F_1F_0 -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i>	97
9	Ohne Ergebnis	
10	Ohne Ergebnis	

Die meisten auf dem Gel sichtbaren Banden konnten der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* zugeordnet werden. Da die Untereinheiten *c*₁, *c*_{2/3} und *a* nicht oder nur sehr unsicher durch MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden konnten, was vermutlich auf ihre ausgeprägte Hydrophobizität zurückzuführen ist, wurden die Untereinheiten *c*₁, *c*_{2/3} und *a* durch Western Blot identifiziert (Abb.22).

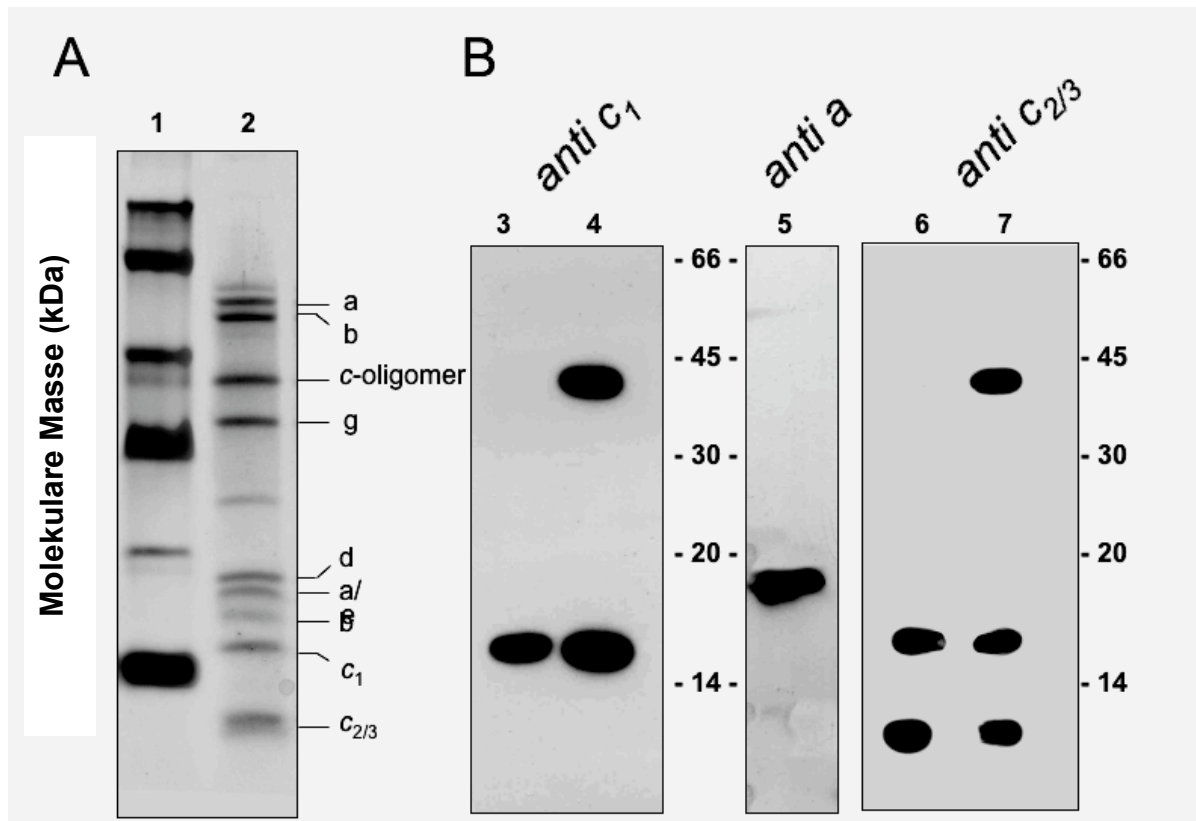


Abb. 22: Untereinhenitzusammensetzung der gereinigten Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Die Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mit Serva Blue G (Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland) visualisiert. Die gefärbten Proteine wurden ausgeschnitten und durch MALDI-MS identifiziert (A). Die gereinigte ATP-Synthase wurde ebenfalls durch Western-Blot-Hybridisierung untersucht (B). Probe 3 und 6 wurden für 5 min bei 120°C denaturiert, auf Spur 4, 5 und 7 wurde bei nur 80°C für 10 min denaturiert. Die Proben 3 und 4 wurden mit einem Antikörper gegen c_1 , Probe 5 mit einem Antikörper gegen Untereinheit a und Proben 6 und 7 mit einem Antikörper gegen die Untereinheiten $c_{2/3}$ hybridisiert. Der Antikörper gegen $c_{2/3}$ detektiert auch Untereinheit c_1 .

Auf dem SDS-Gel der gereinigten Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase waren insgesamt 11 Banden sichtbar. Davon konnten 10 eindeutig identifiziert werden. Das erste visualisierte Fragment entsprach einer Masse von 58 kDa und wurde durch MALDI-TOF-MS als Untereinheit α der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase von *A. woodii* identifiziert. Das zweite Fragment mit einer Masse von 54 kDa wurde als β -Untereinheit identifiziert. Bei dem dritten Fragment handelt es sich um den c-Ring, der durch Hybridisierung mit einem *anti c₁*- und *anti c_{2/3}*-Antikörper

identifiziert wurde. Das Fragment bei 19 kDa konnte durch MALDI-TOF-MS nicht eindeutig identifiziert werden, es wurden mit einem Score 68 Untereinheit *b* und mit einem Score von 18 die Untereinheit *a* identifiziert. Es wurde daher vermutet, dass es sich um ein Gemisch der beiden Untereinheiten handeln könnte und lediglich die Auflösung der verwendeten SDS-Page nicht ausreichend gewesen sei. Zur genaueren Analyse wurde eine 13% SDS-Page gefahren, welche eine bessere Auftrennung im Größenbereich von 5-20 kDa lieferte. Die daraus ausgeschnittenen Fragmente wurden wieder durch MALDI-TOF-MS untersucht und ermöglichten eine Identifizierung eines 19-kDa-Fragmentes als Untereinheit *b* und eines 17,5-kDa-Fragmentes als Untereinheit *a*; der Scorewert für die Zuordnung war allerdings mit nur 38 nicht zufriedenstellend. Daher wurde die Identifizierung als *a*-Untereinheit der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem *anti a*-Antikörper abgesichert.

Während die zuvor gereinigte Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase (Reidlinger und Müller, 1994) nicht die Untereinheiten c_1 sowie *a* und *b* enthielt, konnte durch die jetzt etablierte Reinigungsstrategie die komplette Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* mit allen genetisch vorhergesagten Untereinheiten isoliert werden. Damit war der lange ausstehende Nachweis für das Vorhandensein der genetisch vorhergesagten Untereinheiten *a*, *b* und c_1 in der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase erbracht. Es ist von herausragender Bedeutung, dass die c_1 -Untereinheit in einer funktionellen ATP-Synthase nachgewiesen werden konnte. Mit einer Masse von 18 kDa und einer vorhergesagten Struktur aus 4 transmembranen Helices ist diese Untereinheit für F-Typ-ATP-Synthasen äußerst ungewöhnlich und neuartig. In der Tat ist die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* die bisher einzige gereinigte und charakterisierte F-Typ-ATP-Synthase, welche eine *c*-Untereinheit mit mehr als 2 transmembranen Helices beherbergt. Betrachtet man die Sekundärstruktur der c_1 -Untereinheit, so fällt auf, dass dieser durch Mutation eines Glutamates in ein Glutamin eine Ionenbindestelle fehlt. Dies hat zur Folge, dass die c_1 -Untereinheit nur ein Ion pro 4 transmembranen Helices binden kann (typisch für F-Typ-ATP-

Synthasen ist eine Ionenbindestelle pro 2 transmembranen Helices). Solche Untereinheiten sind dagegen typisch für V-Typ-ATPase, welche aber nicht mehr zur Synthese von ATP fähig sind. Mit der Reinigung der vollständigen Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* ist es also gelungen, ein einzigartiges Enzym für weitere Untersuchungen zu reinigen, das als mögliches Bindeglied in der Evolution der F- zu den V-Typ-ATPasen fungieren könnte. Eine Untersuchung der biochemischen Charakteristika und insbesondere der Fähigkeit zur ATP-Synthese ist daher von essentieller Wichtigkeit. In Abb. 24 ist das neue Modell für die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* zu sehen.

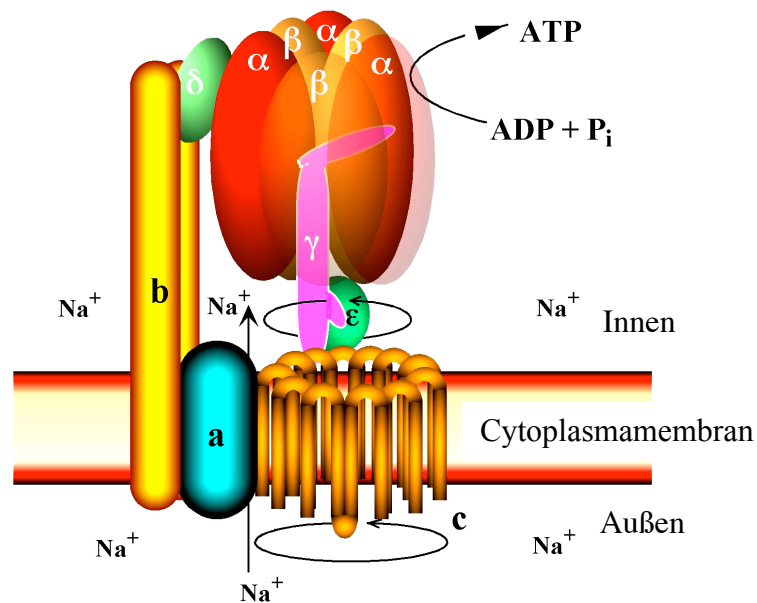


Abb. 24: Modell der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Das Enzym enthält die Untereinheiten a und b_2 sowie c_1 . Die Positionierung der Untereinheiten orientiert sich an der Struktur der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *E. coli*.

Das Enzym enthält alle für F-Typ-ATP-Synthasen typische Untereinheiten α , β , γ , δ , ϵ und a , b und $c_{2/3}$ sowie die extraordinäre Untereinheit c_1 .

3.3. Biochemische Charakterisierung Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

A. woodii ist ein anaerobes, mesophiles Bakterium, welches bei pH-Werten im leicht sauren Bereich um pH 5 ein optimales Wachstum zeigt (Balch *et al.*,

1977). Die vorgenommene biochemische Charakterisierung der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* soll nun zeigen ob dies auch die optimalen Parameter für dieses Enzym darstellt.

3.3.1. Bestimmung des Substratspektrums

Es ist bekannt, dass ATP-Synthasen nicht nur ATP, sondern auch andere Triphosphate hydrolysieren können. Daher wurde untersucht, inwieweit die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* in der Lage ist andere Triphosphate als Energiequelle zu nutzen (Abb. 25).

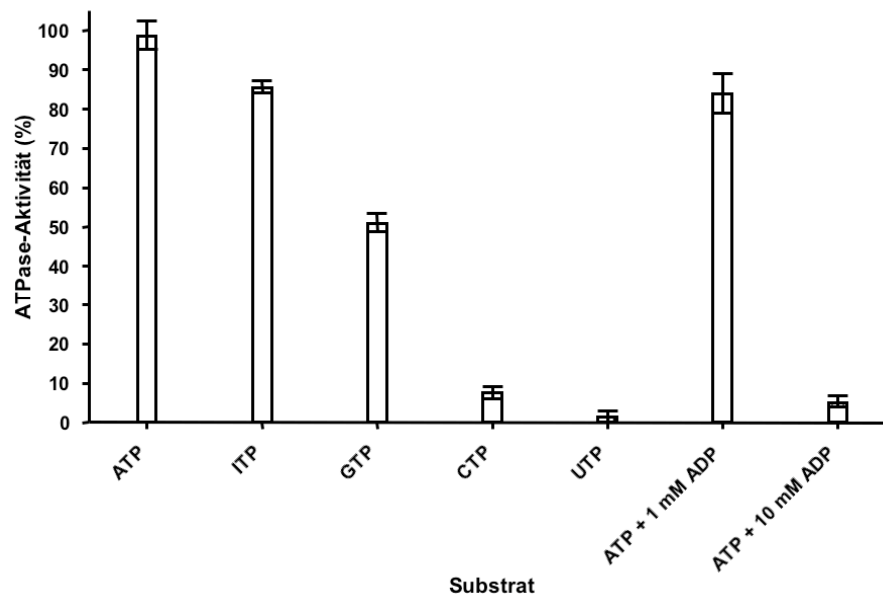


Abb. 25 Substratabhängigkeit der Hydrolyse der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase. Die ATPase-Aktivität (9 U/mg) wurde als 100% angenommen. Die getesteten Substrate (ITP- Inosintriphosphat, GTP- Guanosintriphosphat, CTP- Cytosintriphosphat, UTP- Uracitriphosphat, ATP- Adenosintriphosphat) wurden jeweils in Konzentrationen von 10 mM eingesetzt.

Dazu wurden jeweils 50 μl der gereinigten Enzymlösung (0,7 mg/ml) mit den in Zellen vorkommenden Triphosphaten (jeweils 10 mM) ATP, GTP, ITP, CTP und UTP als Substrat in einem diskontinuierlichen Hydrolyseaktivitätstest eingesetzt. Der Testpuffer zur Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität enthielt

100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO₃, 5 mM MgCl₂ und 200 mM KCl. Die mit ATP erzielte Hydrolyserate von 9 U/mg wurde 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt. Da viele Enzyme von ihrem Produkt gehemmt wurden, wurde der Einfluss von ADP auf die ATPase-Aktivität getestet. Es zeigte sich, dass bereits bei einer Konzentration von 10 mM ADP die ATPase-Aktivität nahezu zum Erliegen kommt. Dies beweist, dass die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* einer Regulation durch ihr Produkt (ADP) unterliegt. Dies ist für die Funktionsweise als Na⁺-Pumpe essentiell, da es für den Organismus von entscheidender Bedeutung ist, zelluläre Prozesse, welche mit Energieverbrauch verbunden sind, effektiv zu regulieren.

3.3.2. Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die ATP-Hydrolyse

Die ATP-Hydrolyse-Aktivität wurde über einen pH-Bereich von 4 – 10 bestimmt. Dazu wurden je 50 µl Enzymlösung (0,7 mg/ml) eingesetzt. Der Testpuffer zur Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität enthielt 100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO₃, 5 mM MgCl₂ und 200 mM KCl. Der Testpuffer wurde bei Raumtemperatur auf den zu testenden pH-Wert eingestellt. Abbildung 26 veranschaulicht die Aktivität des Enzyms über den untersuchten pH-Bereich. Das Aktivitätsoptimum erstreckte sich über einen Bereich von pH 5 – 8,5, die beste Aktivität wurde bei pH 7,5 ermittelt (Abb. 26). Unterhalb von pH 4 und oberhalb von pH 10 konnte keine Aktivität mehr bestimmt werden. Für diesen Versuch wurde die zugegebene Mg²⁺-Menge variiert, um den Einfluss der Verfügbarkeit von Mg²⁺ auf die Reaktion auszuschließen. Bei pH 4 – 5,5 wurden 50 mM, bei pH 6 und 6,5 20 mM und bei pH 7-11 5 mM Mg²⁺ zugegeben. Um einen Einfluss eines pH-induzierten Zerfalls von ATP auf den Test auszuschließen, wurden jeweils Parallelansätze ohne Enzym gefahren und die gemessenen Phosphatmengen vom Ergebnis des jeweiligen ATP-Hydrolysetests abgezogen.

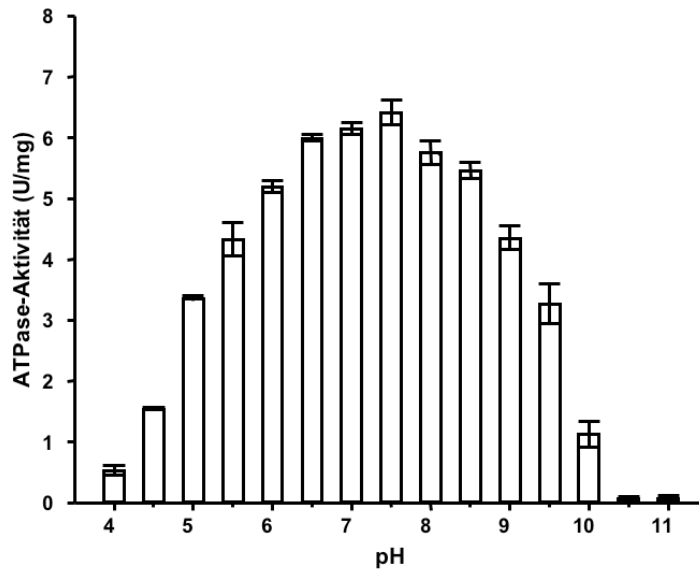


Abb. 26 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der ATPase aus *A. woodii*. Die Grafik zeigt die Aktivität des gereinigten Enzyms bei einer Temperatur von 30°C. Die Balken repräsentieren die mittlere Aktivität aus 3 Replikaten. Die Durchführung der ATP-Hydrolysemessung erfolgte wie beschrieben

3.3.3. Bestimmung der optimalen Katalysertemperatur

A. woodii zeigt ein optimales Wachstum bei etwa 30°C. Die optimale Katalysertemperatur wurde daher im Bereich von 10-50°C ermittelt. Dazu wurden je 50 µl Enzymlösung (0,7 mg/ml) in 1 ml Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO₃, 5 mM MgCl₂ und 200 mM KCl) für 10 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl ATP-Lösung (100 mM) gestartet. In Zeitabständen von je 1 min wurden je 200 µl Proben entnommen und in diesen der Gehalt an gebildetem Phosphat bestimmt (vgl. 2.5.1.). Zur Kontrolle wurden jeweils Proben ohne Enzymzugabe herangezogen, da bei höheren Temperaturen der Zerfall von ATP zu ADP und P_i ebenfalls zunimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt. Bevor der Test durch Zugabe von ATP gestartet wurde, wurden die Proben zuvor 20 min bei der jeweiligen Messtemperatur vorinkubiert.

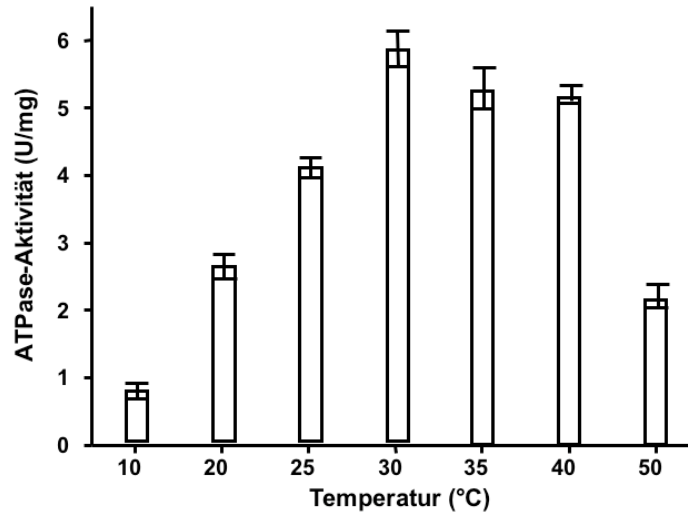


Abb. 27: Temperaturoptimum der ATPase aus *A. woodii*. Die Grafik zeigt die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur. Die Durchführung der ATP-Hydrolysemessung erfolgte wie in 2.5.1. beschrieben und in 3 Replikaten, es wurden jeweils die Mittelwerte aufgetragen.

Die besten Hydrolyseraten für ATP wurden bei 30°C gemessen. Das Enzym zeigt aber ein relatives breites Optimum im Bereich von 20-40°C. Dies ist für ein mesophiles Bakterium nicht ungewöhnlich.

3.3.4. Natriumionenabhängigkeit der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii*

Bereits durch frühere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *A. woodii* eine ausgeprägte Na⁺-Bioenergetik betreibt (Aufurth *et al.*, 1998; Heise *et al.*, 1992b). Auch konnte gezeigt werden, dass die Bildung von ATP eine Na⁺-Abhängigkeit zeigt, es konnte eine $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ -getriebene Synthese von ATP angezeigt werden (Heise *et al.*, 1993; Heise *et al.*, 1991). Auch die früher gereinigte Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* zeigte eine Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von der Anwesenheit von Na⁺ (Reidlinger und Müller, 1994). Jedoch enthielt diese Präparation nicht die für die Ionentranslokation entscheidenden Untereinheiten *a* und *c*₁.

3.3.4.1. Bestimmung des K_m -Wertes für Na^+ und Li^+

Es ist bekannt, dass Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthasen neben Na^+ auch Li^+ als Kation verwenden können (Dimroth *et al.*, 1992; Reidlinger und Müller, 1994). Es war daher interessant zu erfahren, ob das vollständig gereinigte Enzym auch über die Fähigkeit verfügt Na^+ und Li^+ zu verwenden. Denn die bisher fehlenden Untereinheiten c_1 , a und b sind unmittelbar an der Ionentranslokation beteiligt und könnten einen Einfluss auf die Ionenselektivität des Enzyms haben. Des Weiteren ist bei niedrigen pH-Werten (um pH 5) auch die Nutzung von Protonen möglich.

Um den Einfluss von Na^+ auf die ATPase-Aktivität der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase zu testen, wurden Ansätze mit verschiedenen Na^+ -Konzentrationen (0,2-7 mM NaCl) untersucht. Dazu wurden jeweils 50 μl Enzymlösung (0,7 mg/ml) in 1 ml Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO_3 , 5 mM MgCl_2 und 200 mM KCl) mit der jeweiligen Menge an Na^+ (die Zugabe erfolgte aus einer 1- bzw. 20-mM-Stammlösung, deren Na^+ -Gehalt durch eine Na^+ -Elektrode bestimmte wurde) für 1 min inkubiert. Um möglichst geringe Na^+ -Kontaminationen zu erhalten, wurden alle verwendeten Chemikalien in der Reinheitsstufe „Suprapur“ eingesetzt. Das verwendete Wasser war doppelt destilliertes und anschließend über einen Ionentauscher gereinigtes Wasser. Es wurden lediglich mit diesem Wasser gespülte Kunststoffgefäße verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl ATP-Lösung (100 mM) gestartet, auch hier wurde nicht wie sonst üblich das Natriumsalz des ATP verwendet, sondern TRIS-ATP. In Zeitabständen von je 1 min. wurden je 200 μl Proben entnommen und in diesen der Gehalt an gebildetem Phosphat bestimmt. In Abb. 28A und 28B wird die ATPase-Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration gezeigt. In Abb. 29A und 29B ist die ATPase-Abhängigkeit von der Li^+ -Konzentration in Abwesenheit von Na^+ aufgetragen. Beide Tests wurden bei pH 7,5 und 30°C durchgeführt. Die Abhängigkeit von Na^+ wurde bei pH 5 ebenfalls bestimmt. Hierbei zeigt sich deutlich, dass die ATPase-Aktivität zwar zurückgeht, aber selbst in Abwesenheit von Na^+ nicht zum Erliegen kommt (Abb. 30).

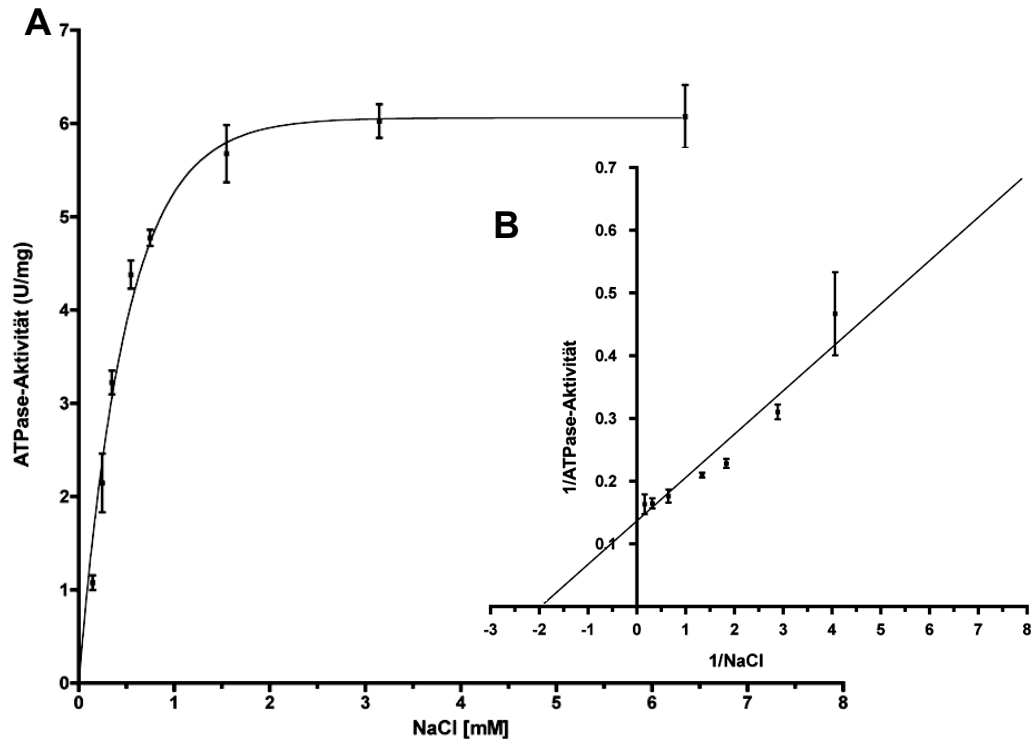


Abb. 28: **Na⁺-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse durch die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase von *A. woodii* (A).** Die Messungen wurden bei 30°C wie unter 2.5.1. beschrieben durchgeführt. Das Insert (B) zeigen die Auftragung nach Lineweaver-Burk.

Aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der X-Achse in der Auftragung nach Lineweaver-Burk kann man den K_m -Wert für Na⁺ ablesen. Der K_m -Wert für Na⁺ beträgt etwa 0,5 mM. Die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* erreicht ihre halbmaximale ATPase-Aktivität bei pH 7,5 und 30°C in Anwesenheit von 0,5 mM Na⁺. Daraus ergibt sich eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von $V_{max} = 7,5$ U/mg. Die erhaltenen Werte befinden sich in etwa der gleichen Größenordnung, wie sie für andere Na⁺-F-Typ-ATP-Synthasen und auch die unvollständige Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* bekannt sind (Reidlinger, 1994). Dies legt den Schluss nahe, dass auch das vollständige Enzym Na⁺ als Kopplungsign nutzt.

Das Fehlen von Aktivität in Abwesenheit von Na⁺ stellt ein Indiz für die Verwendung von Na⁺ als Kopplungsign dar. Ein weiteres Kriterium für die Nutzung von Na⁺ als Kopplungsign ist die für Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase

typische Hemmbarkeit durch DCCD, welche allerdings nur in Abwesenheit von Na^+ (Kluge und Dimroth, 1993; Spruth *et al.*, 1995) festzustellen ist, da DCCD mit Na^+ um die gleiche Bindestelle (Asp-61 in *E. coli*, Glu-65 in *P. modestum* oder Glu-62 in *A. woodii*) in der *c*-Untereinheit des Rotorringes konkurriert. Da Na^+ jedoch eine höhere Bindungsaffinität aufweist, werden die bisher bekannten Enzyme in Gegenwart von ausreichend Na^+ nicht durch DCCD inhibiert. Es wurde die Aktivität der ATPase bei verschiedenen DCCD-Konzentrationen bei 1 und 100 mM Na^+ bestimmt. Dazu wurden jeweils 50 μl Enzymlösung (0,7 mg/ml) in 1 ml Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO_3 , 5 mM MgCl_2 und 200 mM KCl) mit der jeweiligen Menge an Na^+ (die Zugabe erfolgte aus einer 10-mM- bzw. 1-M-Stammlösung) für 1 min inkubiert. Um möglichst geringe Na^+ -Kontaminationen zu erhalten, wurden alle verwendeten Chemikalien in der Reinheitsstufe „Suprapur“ eingesetzt. Das verwendete Wasser war doppelt destilliertes und anschließend über einen Ionentauscher gereinigtes Wasser. Es wurden lediglich mit diesem Wasser gespülte Kunststoffgefäße verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl ATP-Lösung (100 mM) gestartet, auch hier wurde nicht wie sonst üblich das Natriumsalz des ATP verwendet, sondern TRIS-ATP. In Zeitabständen von je 1 min wurden je 200 μl Proben entnommen und in diesen der Gehalt an gebildetem Phosphat bestimmt (vgl. 2.5.1.). Die Ergebnisse sind in Abb. 29 aufgetragen. Es wird deutlich, dass die ATPase bei nur 1 mM Na^+ bereits bei einer Konzentration von 20 μM DCCD um mehr als 75% gegenüber der Probe mit 100 mM Na^+ gehemmt ist. Die als 100% gesetzte Anfangsaktivität betrug 6,8 U/mg.

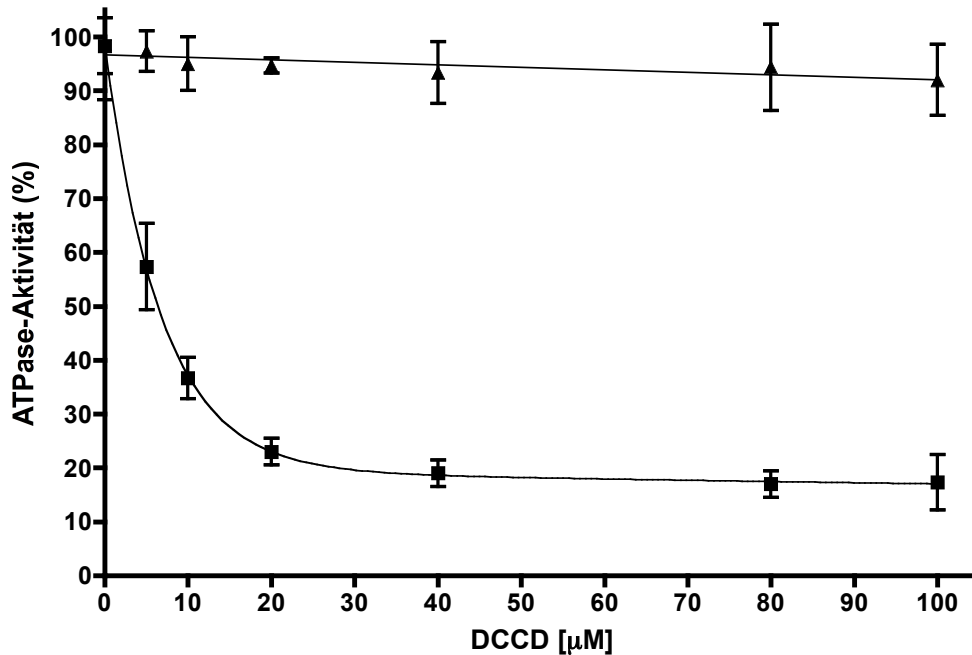


Abb. 29: Konkurrenz von Na⁺ und DCCD. Gemessen in Anwesenheit von 1 (■) und 100 mM (▲) Na⁺. Die Proben wurden jeweils 30 min vorinkubiert. Die Durchführung der ATP-Hydrolysemessung erfolgte, wie in 2.5.1. beschrieben, bei pH 7,5.

Die Aufhebung der DCCD-Hemmbarkeit der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* durch Na⁺ beweist, dass das Enzym Na⁺ als Kopplungsign nutzen kann. Die Bindestellen des DCCD sind durch Na⁺ bereits vollständig besetzt, so dass keine Anlagerung und somit auch keine Blockierung des Enzyms mehr stattfinden kann. Gleichzeitig beweist die DCCD-Hemmbarkeit des Enzyms die funktionelle Kopplung des F₁- mit dem F₀-Teil des Enzyms.

Die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* kann aber nicht nur Na⁺ als Kopplungsign verwenden, sondern auch Li⁺ und, in Abwesenheit von Na⁺ bei niedrigem pH, auch Protonen. Um die Abhängigkeit der ATPase-Aktivität des Enzyms von Li⁺ zu bestimmen, wurde der gleiche Ansatz wie bei der Bestimmung der Na⁺-Abhängigkeit gewählt. Allerdings wurde nicht NaCl, sondern LiCl aus einer 1- bzw. 100-mM-Stammlösung zugegeben. Es wurde die ATPase-Aktivität in Ansätzen mit Konzentrationen von 0,5 bis 12 mM LiCl bestimmt (Abb 30).

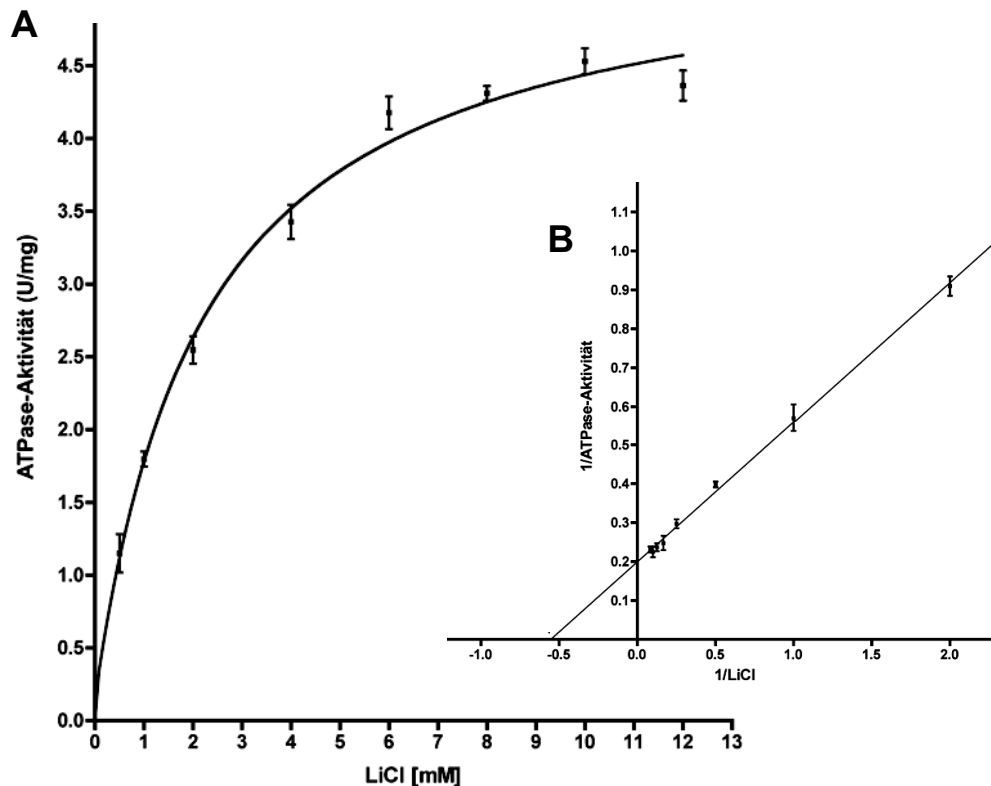


Abb. 30: Li^+ -Abhängigkeit der ATP Hydolyse durch die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase von *A. woodii* (A). Die Messungen wurden bei 30°C wie unter 2.5.1. beschrieben durchgeführt. Das Insert (B) zeigt die Auftragung nach Lineweaver-Burk.

Aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der X-Achse in der Auftragung nach Lineweaver-Burk kann man den K_m -Wert für Li^+ ablesen. Der K_m -Wert für Li^+ beträgt etwa 1,81 mM. Die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* erreicht ihre halbmaximale ATPase-Aktivität bei pH 7,5 und 30°C in Anwesenheit von 1,81 mM Li^+ . Daraus ergibt sich eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\max} = 4,9$ U/mg. Die erhaltenen Werte befinden sich in etwa der gleichen Größenordnung, wie sie für andere Na^+ -F-Typ-ATP-Synthasen und auch die unvollständige Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* bekannt sind (Reidlinger, 1994). Dies legt den Schluss nahe, dass auch das vollständige Enzym Li^+ als Kopplungssion nutzen kann. Dies ist zwar ein äußerst interessantes Erkenntnis, jedoch ohne physiologische Relevanz, da Li^+ unter physiologischen Bedingungen nahezu nicht vorhanden ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass die unvollständige $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATP-Synthase}$ aus *A. woodii* bei entsprechend niedrigen pH-Werten auch H^+ als Kopplungssion verwenden kann (Reidlinger, 1994). Da das Enzym auch bei pH 5 noch eine ausreichende Aktivität aufweist und der Gehalt an Protonen gegenüber pH 7,5 um 2,5 Potenzen höher ist, sollte unter diesen Bedingungen getestet werden, ob die Verringerung des Na^+ -Gehaltes ebenfalls einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität des Enzyms zeigt. Der Ansatz wurde, wie oben beschrieben, nur eben bei pH 5 statt 7,5 (vgl. Abb.28) durchgeführt. Parallel wurde ein Ansatz ohne Enzym gefahren, um den Einfluss des erhöhten ATP-Zerfalls bei pH 5 auszuschließen. Die hierbei erhaltenen Werte wurden von den gemessenen ATPase-Aktivitäten abgezogen (Abb. 31).

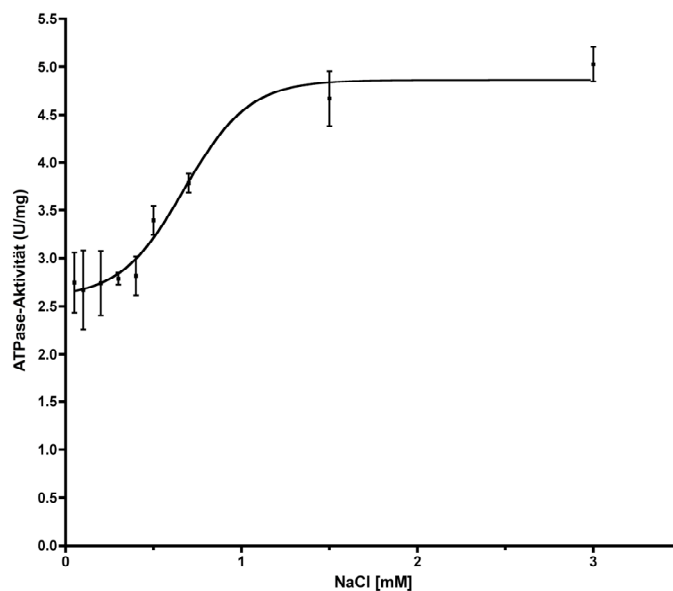


Abb. 31 Na^+ -Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse durch die $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATP-Synthase}$ von *A. woodii* bei pH 5 (A). Die Messungen wurden bei 30°C , aber bei pH 5 wie unter 2.5.1. beschrieben durchgeführt..

Die ATPase-Aktivität der $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATP-Synthase}$ aus *A. woodii* nimmt bei sinkender Na^+ -Konzentration zuerst ab, allerdings zeigt sich bei Na^+ -Konzentrationen unterhalb 0,5 mM keine weitere Abnahme der ATPase-Aktivität. Das Fehlen von Na^+ als Kopplungssion wird also durch ein anderes

Ion kompensiert, dabei kann es sich nur um Protonen bzw. Hydroniumionen handeln.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die vollständig gereinigte Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* Na^+ als primäres Kopplungsignale nutzt. Trotz des Vorhandenseins von V-typischen c_1 -Untereinheiten zeigt die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* unter ATP-Hydrolyse ähnliche biochemische Charakteristika wie andere Na^+ -F-Typ-ATP-Synthasen mesophiler Bakterien (Neumann *et al.*, 1998; Reidlinger und Müller, 1994). Einer der wesentlichen Unterschiede von F- und V-Typ-ATPasen ist die Fähigkeit, ein physiologisches, elektrochemisches Potential zur ATP-Synthese nutzen zu können. Es ist daher entscheidend zu erfahren, ob die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* trotz der V-typischen c_1 Untereinheit zur Synthese von ATP in der Lage ist. Dazu muss das gereinigte Enzym in Proteoliposomen rekonstituiert werden.

3.4. Rekonstitution der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* in Proteoliposomen

Mit dem zuvor gereinigten Enzym (Reidlinger und Müller, 1994) ließ sich keine ATP-Synthese nachweisen. Dies wurde mit der Abwesenheit der *a*- und *b*-Untereinheiten begründet. Da das jetzt gereinigte Enzym aber diese Untereinheiten enthält, zusätzlich aber auch die V-typische c_1 -Untereinheit, war nun von großem Interesse, in Erfahrung zu bringen, ob auch in Gegenwart von c_1 ATP-Synthese möglich sei.

Diese Frage ist von besonderer Wichtigkeit, da das Enzym mit der Untereinheit c_1 im *c*-Ring eine für V-Typ-ATP-Synthasen typische Untereinheit von doppelter Größe einer F-Typ Untereinheit mit nur einer vorhergesagten Na^+ -Ionenbindestelle enthält (siehe auch Einleitung). Dies könnte je nach Verhältnis der c_1 - zu $c_{2/3}$ -Untereinheiten im Ring zu einer so ungünstigen Energiebilanz führen, dass das Enzym nicht mehr zur ATP-Synthese fähig wäre. Um die Fähigkeit des Enzyms zur ATP-Synthese zu untersuchen, wurde die gereinigte ATPase in Liposomen rekonstituiert.

Dazu wurden zuerst Liposomen erzeugt. In einem Glasgefäß wurden 3 ml einer Suspension aus 60 mg/ml L-a-Phosphatidylcholin Typ II-S in 100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 20 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, pH 7,5 auf Eis mit einem Ultraschallgenerator (120 Watt, 20% Intensität; Ultrasonic Desintegrator, Typ MK II, Crawley Inc., UK) beschallt, bis eine transluzierende Lösung entstand. Zu dieser Liposomenlösung wurde gereinigtes Enzym bis zu einer Lipidkonzentration von 25-30 mg/ml und einem Lipid-zu-Proteinverhältnis von ca. 100:1 zugegeben. Im Ansatz (ca. 20 ml) befanden sich daher ca. 0,3 mg/ml Protein und 25-30 mg/ml Lipid) Die Proteoliposomen wurden dann nach der Methode von Knol *et. al.* (Knol *et al.*, 1998) hergestellt. Hierzu wurde das Detergenz langsam durch Dialyse (12h, 4°C) gegen die zehnfache Menge in 100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 20 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, pH 7,5 mit 10% (w/v) Biobeads (Bio-Rad, München, Deutschland) entzogen. Die Proteoliposomenlösung wurde dazu in einen Dialyseschlauch (Porengröße ≈ 100 kDa) gegeben und gegen 200 ml Dialysepuffer, in denen 20 g Biobeads schwammen, dialysiert.

Die erhaltenen Proteoliposomen wurden freiem, nicht rekonstituiertem Protein durch Gelfiltration über eine 10-ml-Sephadex-25-(Bio-Rad)-Säule abgetrennt. Dabei fanden sich 80-85% der ATPase-Aktivität in den Fraktionen der Proteoliposomen (photometrisch in Mikroküvetten durch Absorption bei $\lambda = 600$ nm bestimmt – die liposomenhaltigen Proben weisen eine deutlich höhere Absorption auf), ca. 15-20% der Aktivität wurden im Durchlauf nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um nicht rekonstituiertes Protein. Die erhaltenen Proteoliposomen wurden auf Impermeabilität für Na⁺ überprüft. Dies erfolgte durch einen ATPase-Aktivitätstest unter Zugabe von ETH2120, wie beschrieben. ETH2120 stellt ein Na⁺-Ionophor dar. Bei einem Na⁺-undurchlässigem Proteoliposom sollte die gebildete Phosphatmenge in Anwesenheit von ETH2120 deutlich größer sein als in dem Ansatz ohne

ETH2120. Die auf Dichtigkeit geprüften Proteoliposomen wurden sofort für die ATP-Synthese-Tests eingesetzt.

Unter physiologischen Bedingungen wird ein Membranpotential von ca. 160-180 mV in Bakterien vorgefunden (Thauer). Um nun ein Potential von >160 mV in den Proteoliposomen zu erzeugen, wäre mit Na^+ alleine ein Konzentrationsunterschied von etwa 1000:1 nötig gewesen. Diesen durch Na^+ zu erzeugen scheiterte, da eine höhere Ladung der Proteoliposomen mit Na^+ wiederum einen höheren Gehalt an Na^+ im Reaktionspuffer zur Folge hatte. Diverse Versuche zeigten, dass lediglich ein Verhältnis von 1:40-50 zu erreichen war.

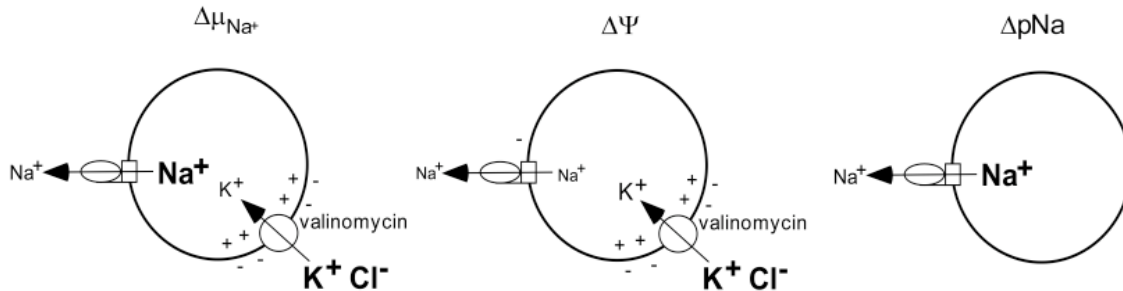


Abb.32: Allgemeines Schema zur Darstellung von

artificialen Potentialen an den Proteoliposomen. Bei einem reinen Na^+ -Potential (Δp_{Na}) ist die einzige Triebkraft der Na^+ -Konzentrationsunterschied zwischen innen und außen. Beim elektrochemischen Potential ($\Delta \Psi$) dient ein durch Ladungstrennung (hier K^+ - Cl^-) erzeugtes elektrochemisches Potential als Triebkraft für die Na^+ -Ionen, die innen und außen in etwa gleicher Konzentration vorliegen. Beim elektrochemischen Na^+ -Potential ($\Delta \mu_{\text{Na}^+}$) dienen sowohl ein Na^+ -Potential als auch ein elektrochemisches Potential als Triebkraft. Das elektrochemische Potential wird durch Valinomycin erzeugt. Valinomycin sorgt für einen gezielten Einstrom von K^+ durch den Diffusionsdruck in das Proteoliposom. Die damit verbundene Ladungstrennung (das Anion kann ja nicht einströmen) lässt ein Potential entstehen. Bei 200 mM KCl außen und nahezu keinem K^+ (errechnet $< 0,1$ mM) im Proteoliposom sollte durch Zugabe von Valinomycin ein Potential von etwa 195 mV (Kaim und Dimroth, 1998) entstehen; dies wäre ausreichend, um ATP-Synthese unabhängig vom herrschenden Na^+ -Potential zu ermöglichen.

Dies entspräche allerdings nur einem Na^+ -Potential ($\Delta p\text{Na}$) von etwa 90 mV. Daher wurde zusätzlich ein Valinomycin-induziertes elektrochemisches K^+ -Diffusionspotential ($\Delta\Psi$) erzeugt. Die Kombination beider Ansätze erzeugte ein elektrochemisches Na^+ -Potential ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$). Als Negativkontrolle wurde $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ in Abwesenheit von ADP getestet. In Abb. 32 ist die Strategie schematisch dargestellt.

3.4.1. Messung von ATP-Synthese

Die ATP-Synthase-Aktivität wurde über einen Luciferin/Luciferase-Assay nach Herstellerangaben (Lumac, AC Landgraaf, NL) bestimmt, die Messung der abgegebenen Lichtmenge erfolgte in einem Chemiluminometer (Lumac, AC Landgraaf, NL) bei 30°C. Die Menge des gebildeten ATP ist der Menge des emittierten Lichts proportional. Das Chemiluminometer misst die Menge des abgegebenen Lichtes. Der gemessenen emittierten Lichtmenge wird dann anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden mit bekannten ATP-Konzentrationen die Menge des gebildeten ATP zugeordnet. Die Kalibriergerade wurde im Bereich von 0 bis 1000 nmol ATP in Schritten von 100 nmol pro Ansatz, d.h. in 2 ml Reaktionsgemisch, nach Herstellerangaben in Triplikaten aufgenommen.

Als Treibkräfte für die ATP-Synthese kommen theoretisch ein reines Na^+ -Potential ($\Delta p\text{Na}$) von mindestens 180 mV oder ein elektrochemisches Potential mit einem elektrochemischen Na^+ -Potential, bei dem der Hauptteil des elektrischen Potentials von einem K^+ -Gradienten gebildet wird ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$), oder auch ein rein elektrochemisches Potential ($\Delta\Psi$) in Anwesenheit von Na^+ -Ionen in Frage. (Eine schematische Darstellung der Treibkräfte und Versuchsansätze ist in Abb. 32 zu sehen.) Zu klären, welches Potential das Enzym zur Synthese von ATP befähigt, ist von besonderer Bedeutung, da der exakte Mechanismus der Krafterzeugung in der ATP-Synthase noch nicht geklärt ist.

3.4.1.1. ΔpNa als Triebkraft für die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase

Zuerst wurde untersucht, ob das erzeugte Na^+ -Potential (ΔpNa , vgl. Schema in Abbildung 32.) ausreichend ist, um das Enzym zur ATP-Synthese zu befähigen. Dazu wurden die Proteoliposomen mit Na^+ geladen, 1 ml der auf Dichtigkeit geprüften Proteoliposomen wurde dazu mit 1 ml Ladepuffer (100 mM TRIS, 100 mM Maleinsäure, 400 mM NaCl und 5 mM $MgCl_2$, pH 7,5) für 12 h bei 4°C inkubiert. (Die Endkonzentration von NaCl im Proteoliposom betrug ca. 210 mM.) Um eine Verdünnung der Liposomen zu vermeiden, wurden die geladenen Liposomen von dem Ladepuffer über eine Gelfiltration (10 ml Pipette mit Sephadex S25) getrennt, als Säulenpuffer dienten 200 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 und 10 mM NaCl, in diesem Puffer fand auch die Synthase-Reaktion statt (Assaypuffer). Die liposomenhaltige Fraktion war leicht an der irisierenden Färbung erkennbar. Der Na^+ -Gehalt wurde mittels einer Na^+ -Elektrode als <15 mM bestimmt. Das Na^+ -Potential (ΔpNa) beträgt daher ca. 70-100 mV. Zu den so vorbereiteten Proteoliposomen (2 ml) wurden 10 mM ADP-K (20 μ l einer 0,5 M Stammlsg.) gegeben und damit die Reaktion gestartet.

Die Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Alle 30 s wurden Proben entnommen (je 10 μ l). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ l Messpuffer (5 mM $NaHAsO_4$, 4 mM $MgSO_4$, 20 mM Glycylglycin, pH 8) gestoppt und die Proben wurden sofort nach Zugabe von 5 μ l Luciferin/Luciferase-Lösung chemiluminometrisch vermessen. Unter diesen Bedingungen war keine ATP-Synthese messbar (Abb.33).

3.4.1.2. $\Delta\Psi$ als Triebkraft für die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase

Für den Mechanismus der Ionentranslokation durch den F_0 -Teil des Enzyms ist es von enormer Wichtigkeit, ob ein Na^+ -Potential obligatorisch für die Funktion der ATP-Synthase ist. Daher wurde auch ein Ansatz gefahren, bei dem lediglich das K^+ -Diffusionspotential als Triebkraft zur Verfügung steht ($\Delta\Psi$). Dazu wurden die Proteoliposomen nicht mit Na^+ geladen, der Ladepuffer enthält nur 20 mM NaCl. Die Proteoliposomen enthalten daher

etwa genausoviel Na^+ wie der Assaypuffer. Das bedeutet, dass zwar Na^+ -Ionen vorhanden waren, jedoch kein Gradient und damit auch kein $\Delta\mu_{\text{Na}}$, ansonsten erfolgte der Versuch analog 3.4.1.1.). Die vorbereiteten Proteoliposomen (2 ml) wurden mit 2 μM Valinomycin (10 μl einer 0,2-M-Stammlsg) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mM ADP-K (20 μl einer 0,5-M-Stammlsg.) gestartet. Die Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Alle 30 s wurden Proben entnommen (je 10 μl). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μl Messpuffer (5 mM NaH_2PO_4 , 4 mM MgSO_4 , 20 mM Glycylglycin, pH 8) gestoppt und die Proben wurden sofort nach Zugabe von 5 μl Luciferin/Luciferase-Lösung chemiluminometrisch vermessen. Anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibrierungsgeraden mit definierten ATP-Mengen konnte die gebildete ATP-Menge bestimmt werden.

In diesem Versuchsansatz war die ATP-Synthese messbar. Das erzeugte $\Delta\Psi$ war als Triebkraft ausreichend, um die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* zur Synthese von ATP zu befähigen. Ein Mol-Enzym katalysierte die Bildung von 35 mol ATP pro Minute. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie andere an Proteoliposomen gemessenen Syntheseraten von Na^+ -F-Typ-ATP-Synthasen (Neumann *et al.*, 1998). Besonders wichtig ist der durch diesen Versuch erbrachte Beweis, dass als Triebkraft nicht zwangsläufig ein Na^+ -Potential benötigt wird, sondern die Triebkraft auch von einem elektrochemischen Potential aufgebracht werden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 graphisch aufgetragen.

3.4.1.3. $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ als Triebkraft für die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase

Das größte Potential entsteht, wenn neben einem Na^+ -Potential auch noch ein K^+ -Diffusionspotential angelegt wird. Die Kombination beider Potentiale wird als elektrochemisches Na^+ -Potential ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) bezeichnet.

Zuerst werden die Proteoliposomen mit Na^+ geladen. Die auf Dichtigkeit geprüften 1-ml-Proteoliposomen wurden dazu mit 1 ml Ladepuffer für 12 h bei 4°C inkubiert. (Die Endkonzentration von NaCl im Proteoliposom betrug ca. 210 mM.) Um eine Verdünnung der Liposomen zu vermeiden, wurden die

geladenen Liposomen von dem Ladepuffer über eine Gelfiltration (10 ml Pipette mit Sephadex S25) getrennt, als Säulenpuffer dienten 200 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 und 10 mM NaCl, in diesem Puffer fand auch die Synthesereaktion statt (Assaypuffer). Der Na^+ Gehalt wurde mittels einer Na^+ -Elektrode als <15 mM bestimmt. Das Na^+ -Potential (D_{pNa}) betrug daher ca. 70 mV. Durch Zugabe von Valinomycin wurde zusätzlich ein K^+ -Diffusionspotential von ca. 190 mV erzeugt. Es stand also eine Triebkraft von 260 mV zur Verfügung. Die so vorbereiteten Proteoliposomen (2 ml) wurden mit 2 μM Valinomycin (10 μl einer 0,2-M-Stammlsg) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mM ADP-K (20 μl einer 0,5-M-Stammlsg.) gestartet. Die Versuche wurden bei 30°C durchgeführt. Alle 30 s wurden Proben entnommen (je 10 μl). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μl Messpuffer (5 mM NaH_2AsO_4 , 4 mM MgSO_4 , 20 mM Glycylglycin, pH 8) gestoppt und die Proben wurden sofort nach Zugabe von 5 μl Luciferin/Luciferase-Lösung chemiluminometrisch vermessen. Ohne Zugabe von ADP war keine ATP-Bildung messbar. In diesem Versuchsansatz war ebenfalls ATP-Synthese messbar.

Das erzeugte elektrochemische Na^+ -Potential war als Triebkraft ausreichend, um die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* zur Synthese von ATP zu befähigen. Ein Mol-Enzym katalysierte die Bildung von 37 mol ATP pro Minute. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie andere an Proteoliposomen gemessene Syntheseraten vom F-Typ-ATP-Synthase (Cook *et al.*, 2003; Dimroth *et al.*, 2003; Feniouk *et al.*, 1999; Pitard *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 1995) und ist auch nur geringfügig größer als die durch $\Delta\Psi$ erzielte Syntheseleistung. Dieses Ergebnis untermauert die These, dass das Na^+ -Potential eine untergeordnete Rolle spielt und der größte Teil der Triebkraft von einem elektrochemischen Potential aufgebracht werden könnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 graphisch aufgetragen.

3.4.1.4. Zusammenfassung der Versuche zur ATP-Synthese

Die durchgeführten Versuche zeigen eindeutig, dass die vollständig gereinigte Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* zur Synthese von ATP fähig ist. Das Vorhandensein der V-typischen c_7 -Untereinheit hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Enzyms zur ATP-Synthese. Ein Na^+ -Potential ist nicht obligat für die Synthese (Abb. 33), sondern die Triebkraft kann auch von einem elektrochemischen Potential zur Verfügung gestellt werden.

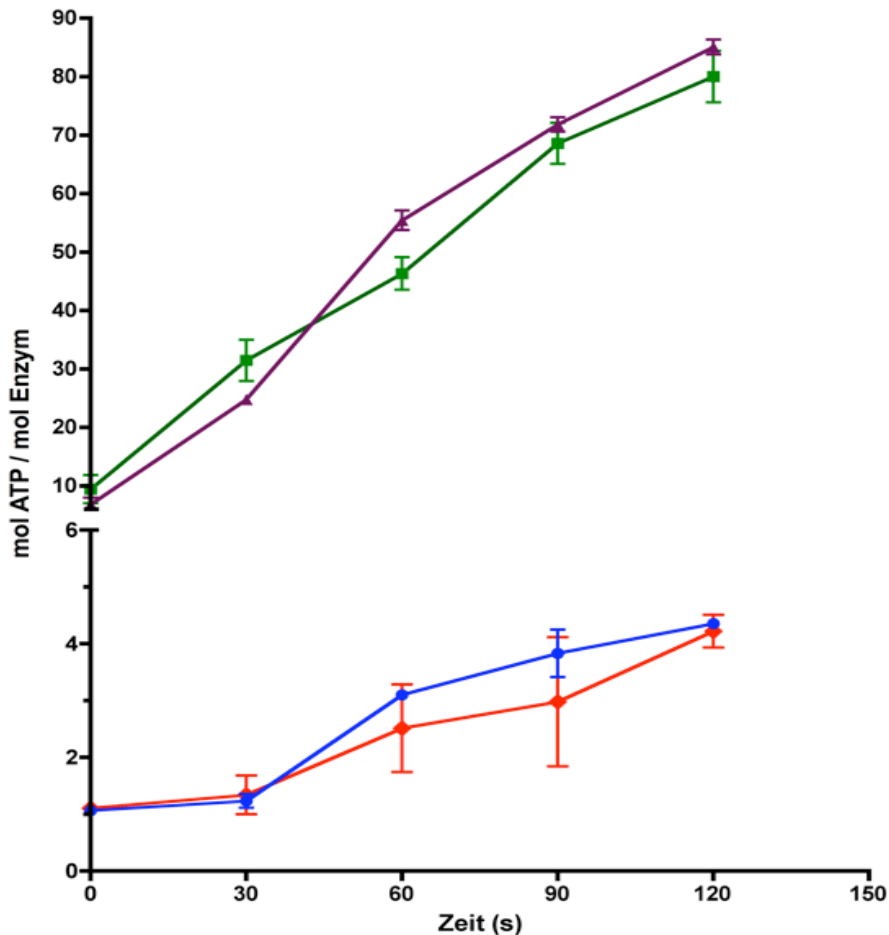


Abb. 33 Verschiedene Triebkräfte treiben die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase. Die artifizialen Triebkräfte $\Delta\Psi$ (■), Δp_{Na} (●) und $\Delta\mu\text{Na}^+$ (▲) wurden wie im Text beschrieben erzeugt. Als Negativkontrolle (◆) diente ein $\Delta\mu\text{Na}^+$ -Ansatz ohne ADP-Zugabe.

3.5. Der c-Ring der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

Die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* ist die einzige bisher gereinigte und charakterisierte ATP-Synthase, welche V-Typ-c-Untereinheiten beherbergt. Bemerkenswert und einzigartig ist, dass die Na^+ - F_1F_0 -ATP-

Synthase zur Synthese von ATP fähig ist, obwohl sie einen heterooligomeren *c*-Ring mit V- und F-Typ-*c*-Untereinheiten besitzt. Diese Tatsache führt nun zu der Frage, in welchem Verhältnis die Untereinheiten c_1 zu $c_{2/3}$ vorkommen, denn dies hat gravierende Auswirkungen auf die Energetik des Enzyms und auf alle existierenden Theorien zur Krafterzeugung in ATP-Synthasen. Das Ionen-zu-ATP-Verhältnis ist hier von entscheidender Bedeutung (siehe auch Einleitung). Es wäre sogar denkbar, dass gemischte Populationen von ATP-Synthasen existieren, welche unterschiedliche Untereinheitenstöchiometrien im *c*-Ring aufweisen (Abb. 34). Auch wäre es denkbar, dass die Untereinheitenstöchiometrie je nach Wachstumsbedingungen variabel wäre..

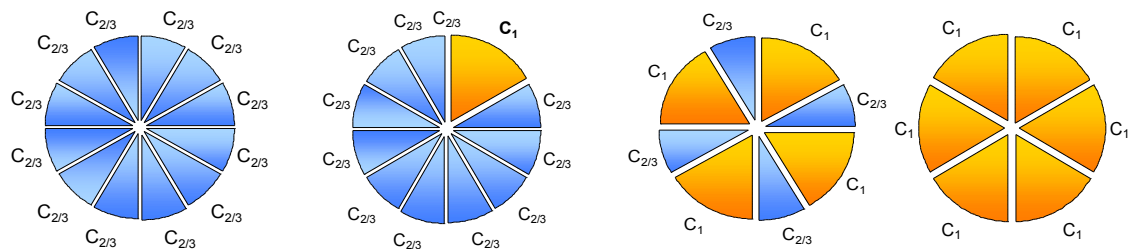


Abb. 34 Schematische Darstellung von verschiedenen denkbaren Untereinheitenstöchiometrien für den *c*-Ring der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Der Nachweis der Präsenz der c_1 - und $c_{2/3}$ -Untereinheiten im gereinigten Enzym lässt keinen Schluss auf die Untereinheitenstöchiometrie zu. Es sind Ringe nur aus $c_{2/3}$ - oder c_1 -Untereinheiten denkbar, sowie Ringe mit verschiedensten Verhältnissen von c_1 zu $c_{2/3}$

Um die Frage zu klären, welche Größe und Untereinheitenstöchiometrie der *c*-Ring aufweist, sollte dieser aus der gereinigten Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase von *A. woodii* isoliert und untersucht werden.

3.5.1. Isolierung des *c*-Ringes

Die Anzucht von *A. woodii* und die Reinigung des Enzymes erfolgte wie in 3.2. beschrieben. Die Isolierung des *c*-Ringes erfolgte entweder aus dem gereinigten Enzym oder aus einem vorbehandelten Solubilisat, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Die Isolierungsprozedur beruht im Wesentlichen auf

der enormen Stabilität des *c*-Ringes, der selbst nach Kochen in 10% SDS noch intakt ist (Reidlinger und Müller, 1994). Um den *c*-Ring zu isolieren, wurde das Enzym zuerst durch Inkubation in 1,5% (w/v) N-Lauroylsarcosin dissoziiert. Anschließend wurde durch 65% Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Im Filtrat befand sich dann ausschließlich der isolierte *c*-Ring (vgl. Abb. 35). Über Hybridisierung mit Antikörpern gegen *c*₁ und *c*_{2/3} wurde gezeigt, dass es sich bei dem gereinigten Protein um den *c*-Ring handelt. Dieser enthielt die Untereinheiten *c*₁, *c*₂ und *c*₃. Der Ring ließ sich durch Kochen in 10% SDS denaturieren. Es wurden zwei Proteine als Zerfallsprodukte identifiziert, ein größeres mit einer Masse von 18 kDa (*c*₁) und ein kleineres mit einer Masse von etwa 8 kDa (*c*_{2/3}). Damit war der Beweis erbracht, dass der *c*-Ring aus den Untereinheiten *c*₁, *c*₂ und *c*₃ aufgebaut wird (Abb. 35).

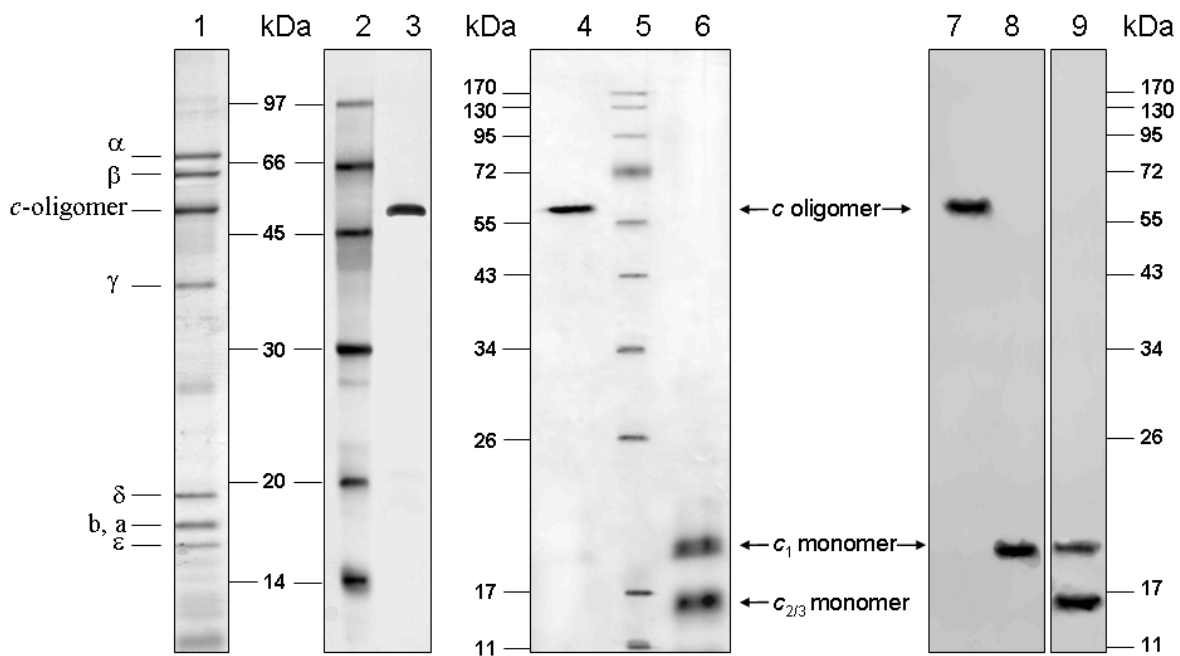


Abb. 35: Isolation und Untereinheitenkomposition des *c*-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Proben des Enzymes (1) und des isolierten *c*-Ringes (3, 4 und 7) wurden 20 min bei 80°C denaturiert und auf einem 10% (1-3) bzw. 13,5% (4-9) SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden wie in 2.7.6.1. beschrieben mit Silber gefärbt. Der *c*-Ring wurde durch TCA denaturiert (6). Der *c*-Ring (7) und seine durch Denaturierung mit TCA gewonnenen Untereinheiten (8, 9) wurden durch ein 13,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Hybridisierung mit dem Antikörper gegen *c*₁ (7, 8) bzw. gegen *c*_{2/3} (9) identifiziert.

Um eine erste Abschätzung der Ringgröße vornehmen zu können, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit *c*-Ringen bekannter Größe als Vergleich durchgeführt. In Abb. 36 ist zu sehen, dass der *c*-Ring aus *A. woodii* ein ähnliches Laufverhalten wie der Ring aus *I. tartaricus* zeigt. Dies deutet auf eine vergleichbare Ringgröße von etwa 95 kDa hin.

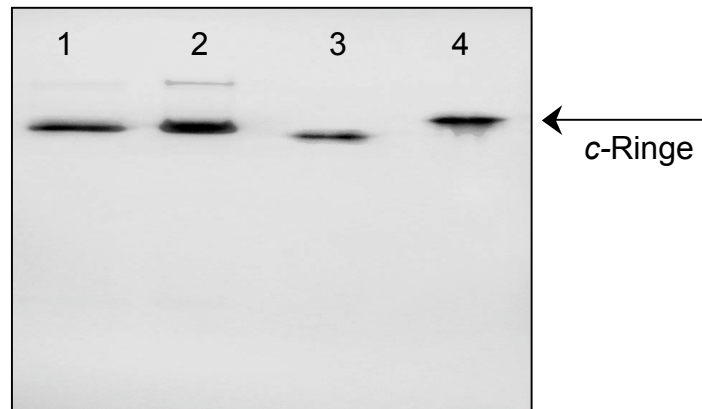


Abb. 36: Größenvergleich verschiedener isolierter *c*-Ringe. Es wurden jeweils Proben der gereinigten *c*-Ringe aus *A. woodii* (1&2) Präparation aus dem gereinigten Enzym (1), Präparation aus dem Solubilisat (2), *C. paradoxum* (3) und *I. tartaricus* (4) auf ein 10% SDS-Page aufgetragen und durch Silberfärbung visualisiert. Die Proben von *C. paradoxum* (Meier *et al.*, 2006) und *I. tartaricus* (Meier *et al.*, 2001) wurden von T. Meier (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Unerklärlich ist, dass der *c*-Ring aus *C. paradoxum* kleiner zu sein scheint als die Ringe aus *A. woodii* und *I. tartaricus*.

3.5.2. Stabilität des *c*-Ringes

Der gereinigte *c*-Ring sollte zur Aufklärung seiner Untereinheiten-Zusammensetzung denaturiert werden. Dabei zeigte sich, dass der *c*-Ring eine enorme Stabilität aufweist. Selbst durch bis zu 1h-Inkubation in 5% SDS bei 100°C war der gereinigte *c*-Ring nicht zu denaturieren. Erst eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 120°C vermochte den Ring zu denaturieren (Abb. 37).

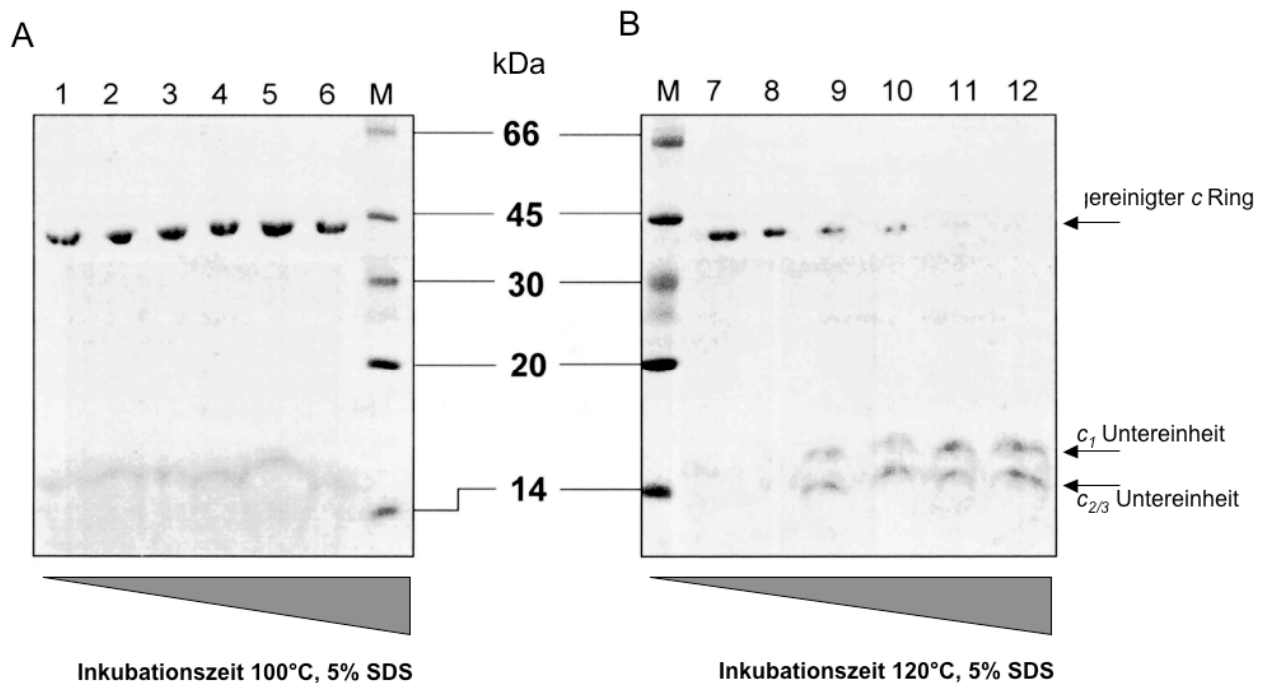


Abb. 37: Stabilität des gereinigten c-Ringes der Na⁺-F₁F_o-ATP-Synthase aus *A. woodii*. Teil A der Abbildung zeigt den bei 100°C inkubierten c-Ring. Ansatz 1 wurde 10 min bei 100°C inkubiert. Die Inkubationszeit erhöht sich bei jedem folgenden Ansatz um jeweils 10 min. bis auf max. 60 min. Teil B der Abbildung zeigt den bei 120°C inkubierten c-Ring. Ansatz 7 wurde 90 s inkubiert. Die Inkubationszeit erhöht sich bei den folgenden Ansätzen um je 90 s Inkubationszeit. Die Identität der sichtbaren Banden wurde durch Western-Blot festgestellt.

3.5.3. Analyse der Untereinheitenstöchiometrie des c-Ringes

Da der c-Ring ein äußerst lipophiles Protein ist, gestaltet sich die Analyse recht schwierig. Aufgrund dieser lipophilen Eigenschaften und des daraus resultierenden, nicht der Größe entsprechenden Laufverhaltens war es nicht möglich, die Größe des Ringes durch SDS-Page abzuschätzen. Lediglich der Vergleich mit anderen bekannten c-Ringen ließ eine gewisse Eingrenzung der Größe zu und legte die Vermutung nahe, dass der Ring eine Größe von etwa 95-100 kDa aufwies (Abb. 37). Das Verhältnis von c₁ zu c_{2/3} konnte durch vollständiges Denaturieren des c-Ringes durch Zugabe von 12% (v/v) TCA aus einer 50% (w/v) Stammlösung und anschließende Gelfiltration

abgeschätzt werden. Dabei ist die Fläche unter den Peaks proportional zur Proteinmenge. Allerdings muss die unterschiedliche Absorption bei $\lambda = 280$ nm der c_1 - bzw. $c_{2/3}$ -Untereinheit berücksichtigt werden, die c_1 -Untereinheit enthält drei Tryptophane und absorbiert auf Grund dessen auch dreimal mehr Licht als die $c_{2/3}$ -Untereinheit mit nur einem Tryptophan. Der Quotient der Flächen sollte also unter Berücksichtigung dieser Fakten eine Abschätzung des Verhältnisses von c_1 zu $c_{2/3}$ zulassen. Der berechnete Quotient lag bei 9,3 (Abb. 38). Dies würde einem Verhältnis von 1:9 für c_1 zu $c_{2/3}$ entsprechen. Unter Berücksichtigung einer ungefähren Ringgröße von ca. 95 kDa würde dies für eine c_1 -Untereinheit und 9 $c_{2/3}$ -Untereinheiten sprechen. Ein solcher Ring hätte rechnerisch eine Masse von 93,4 kDa.

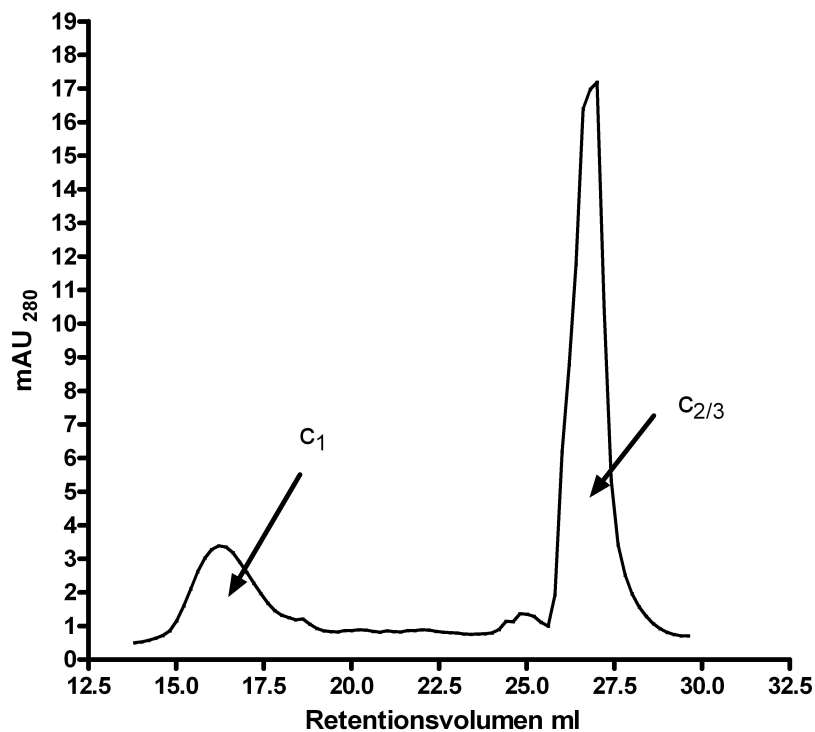


Abb. 38 Elutionsprofil des gereinigten und durch TCA denaturierten c-Ringes. Die ca. 1 mg-Probe wurde über eine Sephadex 25 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Der Säulenlauf wurde durch Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm verfolgt.

Ein weiteres Indiz für diese Stöchiometrie lieferte die densitometrische Auswertung der Silber- und Coomassie-gefärbten Gele des denaturierten Ringes. Hier ergab sich im Mittel ein Verhältnis von 1:8,8 (Abb. 39).

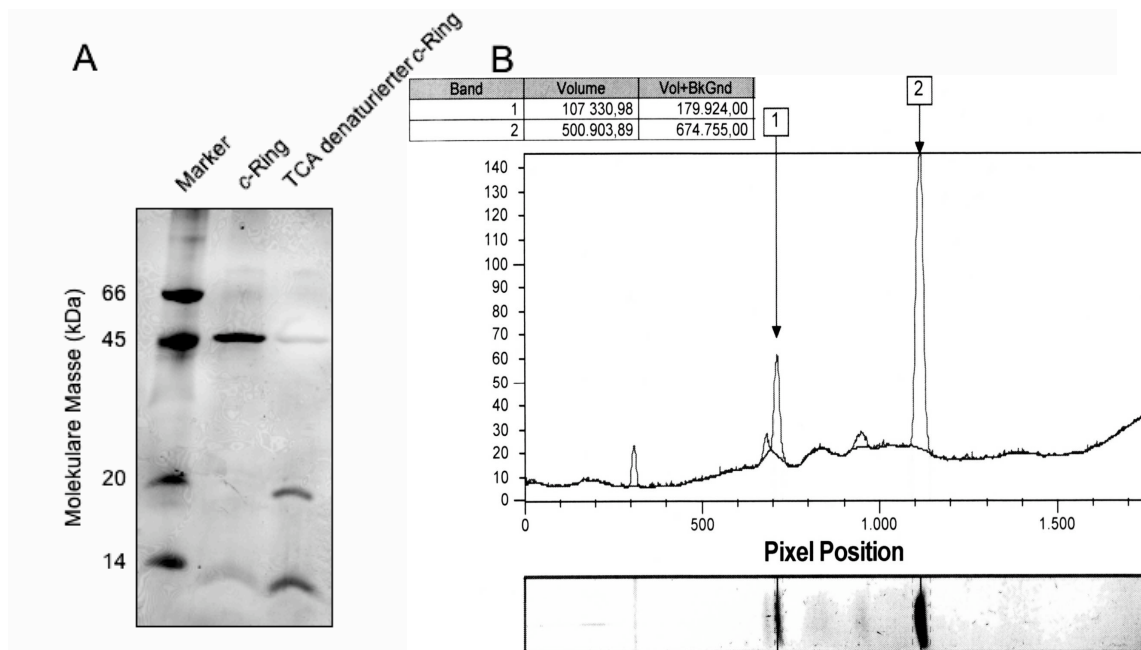


Abb. 39: Densitometrische Auswertung des SDS-Geles des durch 12% TCA denaturierten c-Ringes. In Teil A ist ein 12% SDS-Gel mit dem nativen und dem durch 12% TCA denaturierten c-Ring zu sehen. In Teil B ist die densitometrische Auswertung (Image Quant TL 1D Gel Analysis, Amersham Biosciences, Tacoma, USA) eines durch 12% TCA denaturierten c-Ringes, der auf einem 13,5% SDS-Gel aufgetrennt wurde, zu sehen. Das 13,5% SDS-Gel bietet eine schärfere Auflösung und liefert daher auch genauere Werte. Das densitometrische Verhältnis der Banden von $c_{2/3}$ zu c_1 beträgt 674:179. Unter Berücksichtigung der Massen (ca. 7,8 und ca. 18,4 kDa) der Untereinheiten ergibt sich daraus ein Verhältnis 86:9,7 bzw. 8,8:1 für $c_{2/3}$ zu c_1 .

Da diese Methoden jedoch keinen zweifelsfreien Beweis zulassen und auch die Möglichkeit von Ringen mit variabler Untereinheitenstöchiometrie nicht beantwortet, waren weitere Analysen des c-Ringes notwendig.

3.5.4. 2D-Proteinkristallisation des c-Ringes aus *A. woodii*

Um detailliertere Informationen über Ringgröße und Untereinheitenstöchiometrie zu erhalten, wurden von dem isolierten c-Ring 2D-

Proteinkristalle hergestellt. Hierzu wurde ein je 100 μl -c-Ring (2 mg/ml) mit 1-Palmitoyl-2N-Aleyl-SN-Glycero-3-Phosphocholin (10 mg/ml Lösung, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) in verschiedenen Lipid-zu-Proteinverhältnissen (w/w) gemischt (0,5:1; 1:1; 1,5:1). Diese Mischungen wurden in 50 μl Mikrodialysebuttons (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) gegen 50 ml 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl und 3 mM NaN_3 für 24, 48 und 72 h bei 16, 25 und 37°C dialysiert. Die Proben mit einem Protein-zu-Detergenz-Verhältnis von 1:1 lieferten bei Inkubationstemperaturen von 16 und 25°C Kristallplättchen von einer Größe bis zu 500 nm (Abb.40, 43). Diese wurden dann parallel durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Elektronenmikroskopie untersucht (EM).

3.2.1.1. Untersuchung der 2D-Kristalle des c-Ringes der $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATP-Synthase}$ durch Rasterkraftmikroskopie

Es wurde ein für die Beobachtung von Einzelkomplexen in Lösungen modifiziertes Atomic Force-Mikroskop mit einem 100 μm -X/Y-Piezoscanner verwendet (Nanoscope IIIa, DI-Veeco, Santa Barbara, CA; USA). Die 100 μm langen Silikonitrit-Nadeln (Olympus, Tokyo, Japan) hatten eine nominelle Federkonstante von 0,9 N/m. Das zu untersuchende Protein wurde durch 30 min Inkubation auf frisch geschnittene Träger aufgebracht. Danach wurden die Träger gespült, um nur lose anhaftendes Material zu entfernen. Die Messungen wurden in Puffern (10 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0.02% NaN_3 , 10% Glycerol, pH 7.8) bei 25° C durchgeführt. Die Andruckkraft betrug 100 pN bei einer Linienfrequenz von 4-6 Hz. Unter dem Rasterkraftmikroskop zeigten sich Platten aus geordneten c-Ringen. Die Ringe kristallisierten dabei in zwei Orientierungen (Abb. 40), entweder mit der cytoplasmatischen (heller erscheinende Ringe mit weißem Zentrum) Seite nach oben oder mit der Außenseite nach oben (etwas dunklere Ringe mit dunklem Zentrum). Die cytoplasmatische Seite erscheint heller, da der durch das Fehlen der γ -Untereinheit entstandene Raum mit Lipiden angefüllt ist (Meier *et al.*, 2001).

Jeder Ring wird dabei von zwei Ringen gleicher und vier Ringen entgegengesetzter Orientierung umgeben.

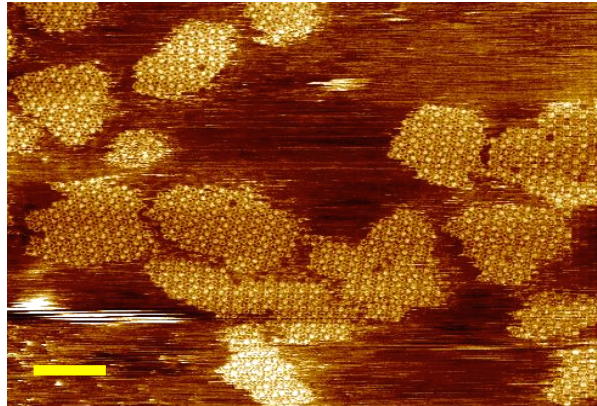


Abb. 40: AFM-Topograph eines Bereiches mit kristallinen Strukturen des c -Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Der gelbe Balken stellt einen Maßstab von 100 nm dar. Für Erläuterungen siehe Text.

Zur besseren Analyse der gewonnenen Daten erfolgte eine Bildprozessierung, bei der individuelle Felder des topographischen Bildes ausgewählt und durch ein referenzfreies Alignment korreliert wurden. Dazu wurde die SPIDER-Bild-Verarbeitungssoftware (Wadsworth Labs, NY, USA) verwendet. Zur Berechnung der Korrelationsbilder wurde die SEMPER-Bildverarbeitungssoftware verwendet (Synoptics Ltd, Cambridge, UK). Die Rasterkraft-Topographien wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. D. Müller an der TU Dresden aufgenommen. Durch Aufsummieren vieler Bilder ließen sich Durchschnittsbilder in höherer Auflösung berechnen. In Abbildung 41-E und 41-F ist die Auflösung so hoch, dass die Anzahl der Untereinheiten einfach abgezählt werden konnte.

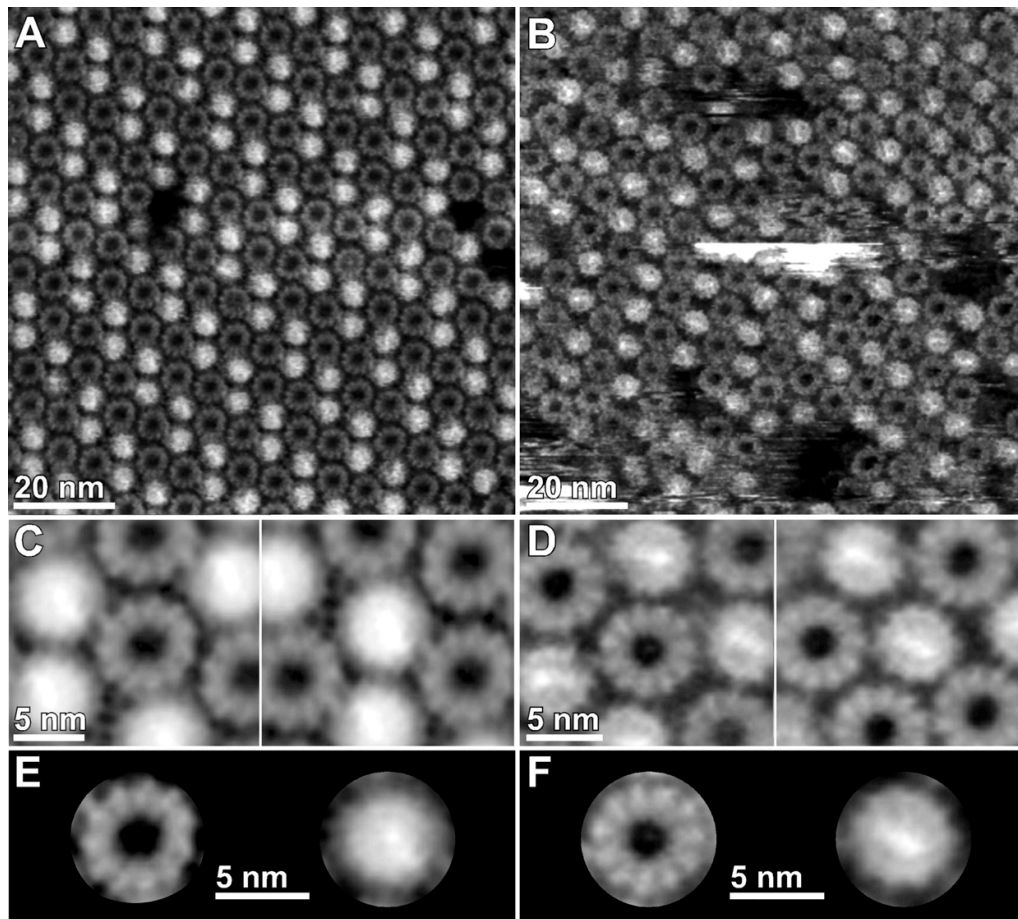


Abb. 41 Hochauflösende Rasterkraft-Topographien der 2D-Kristalle des des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. In A und B sind zwei verschiedene Kristall-Packungen zu sehen. In C, D, E und F wurde die Auflösung durch Korrelation mehrerer Aufnahmen erhöht. Die Ringe beider Packungen zeigen unabhängig von ihrer Orientierung jeweils 11 Dichten und einen Außendurchmesser von etwa 5,5 nm \pm 0,5 nm.

Es sind elf Dichten zu erkennen, welche den Haarnadelstrukturen der einzelnen Untereinheiten entsprechen. Vergleicht man diese Erkenntnisse mit den vorhandenen Daten, so lassen diese den Schluss zu, dass es sich um einen Ring mit insgesamt 11 Haarnadelstrukturen handelt. Der Innendurchmesser des Ringes beträgt ca. 1,9 nm \pm 0,2 nm. Der Durchmesser des Ringes, gemessen von den Zentren der Dichten, wurde zu 5 nm \pm 0,4 nm bestimmt. Der Außendurchmesser betrug etwa 5,5 nm \pm 0,4 nm. Der Durchmesser des Ringes ist mit etwa 5 nm dem ähnlicher Ringe

(Meier *et al.*, 2003) vergleichbar. Daraus lässt sich für den *c*-Ring der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii*. eine Ringmasse von ca. 95 kDa ableiten.

Obwohl hier zum ersten Mal die Gesamtzahl der Haarnadeln im isolierten *c*-Ring der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* bestimmt wurde, ist die erreichte Auflösung der Methode limitiert und reichte nicht aus, um die *c*₁- von den *c*_{2/3}-Untereinheiten zu differenzieren. Eine Analyse der 2D-Kristalle durch Elektronenmikroskopie sollte eine Verbesserung der Auflösung erreichen. Da die *c*₁-Untereinheit mit 18 kDa etwa 2 kDa größer ist als zwei *c*_{2/3}-Untereinheiten, sollte eine Differenzierung möglich sein.

3.5.5. Untersuchung der 2D-Kristalle des *c*-Ringes der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase durch Elektronenmikroskopie

Da die erreichte Auflösung durch Rasterkraftmikroskopie nicht ausreichend war, um die *c*-Untereinheiten differenzieren zu können, und daher auch keine Aussagen über deren Stöchiometrien möglich waren, wurden die 2D-Proteinkristalle des *c*-Ringes der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase durch Elektronenmikroskopie untersucht. Dazu wurden die Kristalle in 4,5% (w/v) Trehalose nach der „back-injektion“-Methode auf ein Molybdängitterträger aufgebracht (Pacific Grid-Tech, San Diego, CA, USA). Die Proben wurden dann in einem Helium-gekühlten JEOL 3000 SFF-Elektronenmikroskop bei 4° K und bei einer Beschleunigungsspannung von 300.000 V analysiert. Die Bilder wurden durch Punkt-Abtastung mit einer Auflösung von 24x30 Punkten pro Bild (Kodak SO-163-Film) bei einer Vergrößerung von 53.000 und einer Elektronendosis von 20-30 Elektronen/Å² aufgenommen. Die Filme wurden für 12 min in Kodak D-19-Entwickler entwickelt. Die selektierten Bilder wurden mit einem Zeiss SCAI-Scanner digitalisiert. Die Pixelgröße von 7 µm entsprach dabei 1,3 Å. Die Daten wurden durch die MRC- (Crowther *et al.*, 1996) bzw. CCP4 (CollaborativeComputationalProject, 1994)-Algorithmen prozessiert und zu einer finalen Auflösung von bis zu 5 Å aufsummiert. Die erzielte Auflösung von 5 Å liefert sehr viel genauere Informationen über die Ringgröße und

Kristallbeschaffenheit als die Rasterkraftmikroskopie. Die *c*-Ringe kristallisierten in der 2D in der $p22_12_1$ Packung. Eine Einfachzelle hat die Dimensionen von 100 x 108 Å und enthält vier Ringe, jeder mit 11 Dichten (Abb. 42).

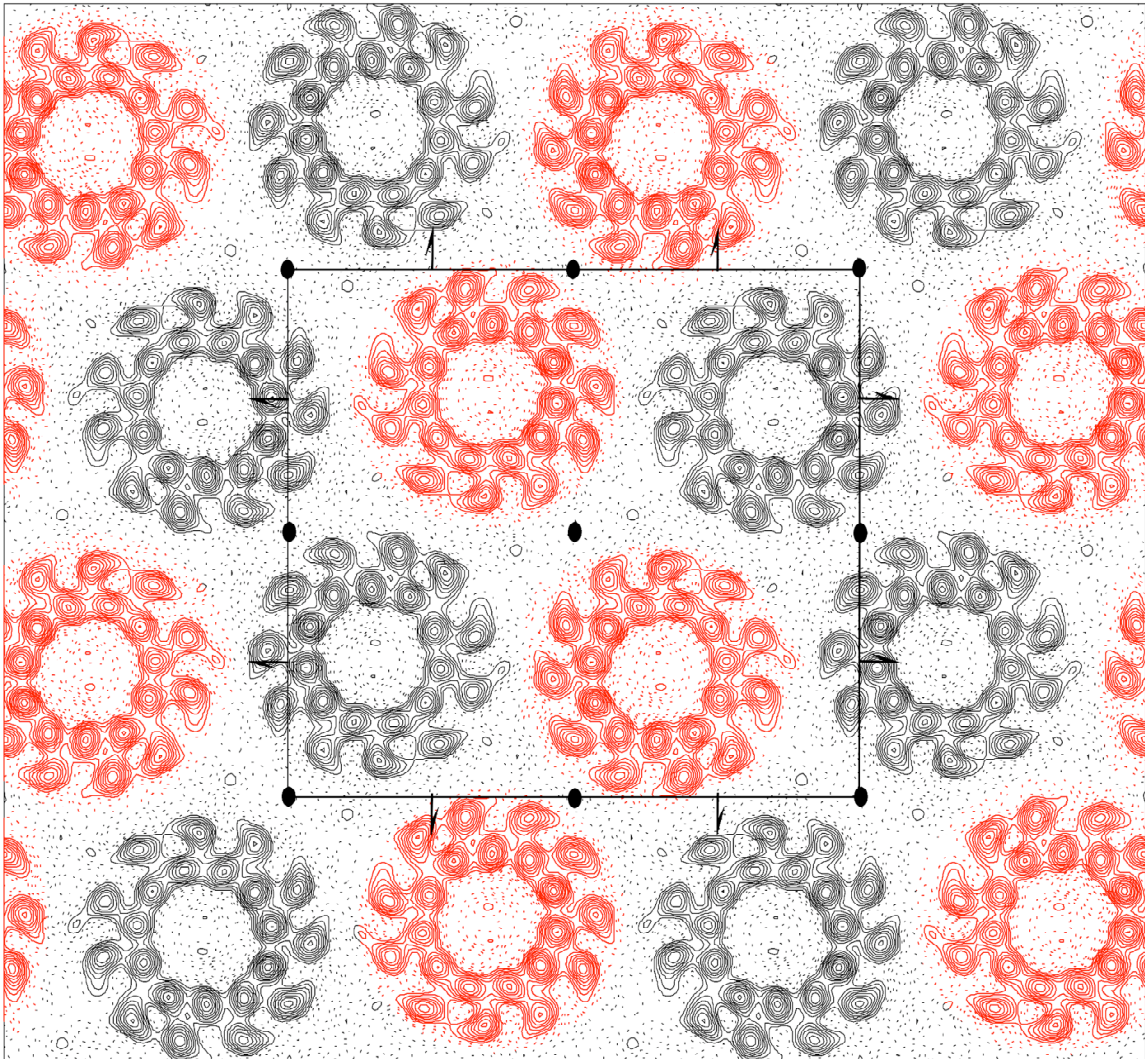


Abb. 42 Elektronenmikroskopie der 2D-Kristalle des *c*-Ringes der $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATP-Synthase}$ aus *A. woodii*. Die Projektionskarten von 13 Bildern wurden zu einer finalen Auflösung von 5 Å korreliert. Eine Zelle mit der Raumgruppe von $p22_12_1$ besitzt die Größe von 100,3 x 108,5 Å. Die Raumgruppe besitzt eine Symmetrie um eine zweifache Rotations- und Schraubenachse.

Jeder Ring besteht aus einem inneren und einem äußeren Ring mit jeweils 11 Dichten, die jeweils eine transmembrane Helix repräsentieren. Die *c*-Ringe

zeigen eine klare Rotationsorientierung, ein Ring ist von jeweils einem Ring mit gleicher und zweien mit entgegengesetzter Orientierung umgeben (Abb. 43).

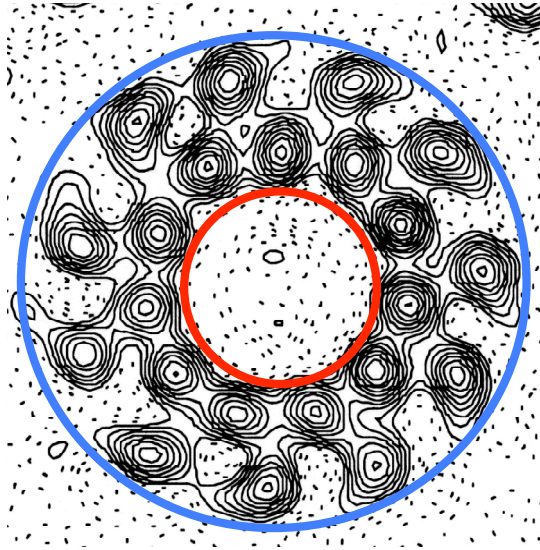


Abb. 43: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 36. Der Ring besteht aus einem inneren und einem äußeren Ring mit jeweils 11 Dichten, die jeweils eine transmembrane Helix repräsentieren. Die c-Ringe zeigen eine klare Rotationsorientierung. Der Außendurchmesser (blau) beträgt ca. 47 Å ($\pm 0,5$ Å), der Innendurchmesser (rot) liegt bei ca. 18,5 Å ($\pm 0,5$ Å).

Die gute Auflösung von 5 Å ermöglicht detaillierte Aussagen über die Struktur des c-Ringes. Der Innendurchmesser liegt bei ca 18,5 Å, der Abstand der elf Dichten im inneren Ring liegt bei 7,8 Å ($\pm 0,5$ Å), daraus errechnet sich ein Umfang des inneren Ringes von ca. 85 Å. Der Außendurchmesser des c-Ringes liegt bei ca. 47 Å und die Abstände der elf äußeren Dichten bei ca. 12,3 Å ($\pm 0,5$ Å), dies entspricht einem Umfang von ca. 135 Å. Die erhaltenen Werte liegen innerhalb der Größenordnung der durch Rasterkraftmikroskopie erhaltenen Werte. Hier wurden ca. 50 Å als Durchmesser bestimmt.

Die Untersuchung der 2D-Kristalle des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* lieferte detaillierte Aussagen über die Größe und

Struktur des Ringes, es konnte klar gezeigt werden, dass der c-Ring aus einem inneren und einem äußeren Ring mit jeweils 11 Transmembranen-Helices besteht. Dies grenzt die möglichen c_1 -zu $c_{2/3}$ -Stöchiometrien ein, da jetzt die Größe des Ringes feststeht. Der c-ring kann nur maximal 5 c_1 -Untereinheiten enthalten und muss mindestens eine $c_{2/3}$ -Untereinheit enthalten, da sonst die ungerade Anzahl von 11 Haarnadelstrukturen nicht erreicht werden kann. Gleichwohl schließen die bisher erhaltenen Daten nicht aus, dass Ringe mit unterschiedlichen c_1 -zu $c_{2/3}$ -Stöchiometrien existieren.

3.5.6. Bestimmung der Masse und Untereinheitenzusammensetzung des c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* durch LILBID-TOF-MS

Die LILBID (Laser Induced Liquid Beam Ionisation Desorption; Morgner *et al.*, 2006, Morgner *et al.*, 2007)-Massenspektrometrie beruht grundsätzlich auf ähnlichen Messmethoden wie MALDI- oder ESI-TOF auch; gemessen wird die von Partialladung und Masse abhängige Flugzeit der ionisierten Proteinfragmente. Anders als bei anderen Ionisierungsmethoden wird hier jedoch mittels eines Laserpulses ein Mikrotropfen eines Tropfenstrahles (50 nm Tropfendurchmesser, Volumen 65 pl; Frequenz 10 Hz) der Proteinlösung komplett ionisiert, die Energie des Lasers ($\lambda = 2,8 \mu\text{m}$) wirkt dabei nur auf die kovalente Bindung zwischen Sauerstoff und Wasserstoff im dipolaren Wassermolekül. Die Energie ist dabei so hoch, dass die Wassermoleküle in einen superkritischen Zustand überführt werden. Bei der daraus resultierenden Tropfenexplosion werden die im Wasser solvatisierten Ionen freigesetzt, beginnen aber gleichzeitig auch aufgrund der Coulombanziehung zu rekombinieren und sind für die Messung wertlos. Die nicht rekombinierten Ionen können hingegen im TOF-Detektor massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Unter sanften Desorptionsbedingungen bleiben nicht kovalent gebundene Komplexe intakt und ermöglichen so eine Bestimmung der Komplexmasse. Erhöhte Laserintensität führt zur Dissoziation von Bindungen, dabei zerfallen die schwächsten Bindungen zuerst, danach die

stärkeren Bindungen. Dies führt zu einer sequenziellen Auflösung des Komplexes. Die LILBID-TOF-MS ist eine neue Methode zur Untersuchung von Proteinen. Durch die direkte Ionisierung des gelösten Proteins ist es möglich, auch nichtkovalent verbundene Proteinkomplexe auf ihre Masse hin zu untersuchen. Dazu sind nur sehr geringe Mengen des Proteins notwendig.

Zuerst wurde die Masse des gesamten Ringes unter niedriger Laserintensität untersucht. Die Masse des *c*-Ringes wurde mit 93,5 kDa bestimmt (Abb. 44). Außerdem wurden Massen detektiert, die der Hälfte bzw. einem Drittel und Viertel der Masse des Ringes entsprechen. Diese Massen resultieren aus Ringen mit zwei-, drei- oder vierfacher Ladung, welche beim Ionisierungsprozess ebenfalls in geringen Mengen entstehen (Abb. 44).

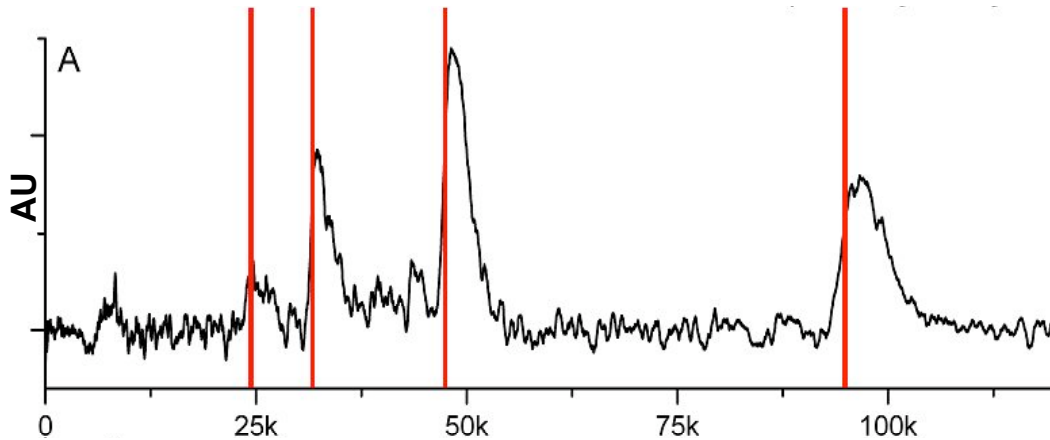


Abb. 44: Massenspektrum des intakten, gereinigten *c*-Ringes unter schwacher Laser-Intensität. Der Ring zerfällt hierbei nicht. Methodenbedingt entstehen ionisierte Ringe nicht nur mit einer, sondern mit bis zu vier Ladungen. Die roten Linien zeigen die errechneten Massen (93,5, 46,75, 31,16 und 23,38 kDa) für intakte Ringe mit 1-4 Ladungen.

Die Masse des *c*-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* wurde zu 93,5 kDa ($\pm 0,1$ kDa) bestimmt. Des Weiteren war es möglich, unter starker Laserintensität den *c*-Ring vollständig in die einzelnen Untereinheiten zu fraktionieren und die exakten Massen für die einzelnen Untereinheiten zu bestimmen. Für die c_1 -Untereinheit wurde eine Masse von 18,7 kDa $\pm 0,1$ und für die $c_{2/3}$ -Untereinheit eine Masse von 8,3 kDa $\pm 0,1$ gemessen.

Aufgrund dieser exakten Massenbestimmung ist es nun möglich, eine Prognose für eine mögliche c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie zu berechnen. Die aus der Elektronenmikroskopie erhaltenen Strukturdaten von 11 Haarnadelstrukturen würden Ringe aus bis zu 5 c_1 -Untereinheiten und mindestens einer $c_{2/3}$ -Untereinheit als möglich zulassen, jedoch weichen die daraus resultierenden Massen teilweise sehr deutlich von der bestimmten Masse ab. In Tabelle 5 sind die möglichen c -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrien mit ihren errechneten Massen dargestellt.

Tabelle 5: Berechnete Massen für die möglichen c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrien.

Anzahl der c_1 -Untereinheiten (18,7 kDa)	Anzahl der $c_{2/3}$ -Untereinheiten (8,3 kDa)	Anzahl der Haarnadelstrukturen	Berechnete Masse des c -Ringes (kDa)
5	1	11	101,8
4	3	11	99,7
3	5	11	97,6
2	7	11	95,5
1	9	11	93,4
0	11	11	91,3

Berücksichtigt man die Messungenauigkeit der Methode von ca. 0,1 kDa, so wären rechnerisch nur c -Ringe mit einer c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie von 2:7 oder 1:9 möglich, da nur deren errechnete Massen mit 95,5 kDa +/- 0,9 kDa und 93,4 kDa +/- 1 kDa in der Größenordnung der bestimmten Ringgröße von 93,5 kDa +/- 0,1 kDa liegen. Ebenso ist die Existenz von Ringen, bestehend aus 11 $c_{2/3}$ -Untereinheiten, auszuschließen, da die errechnete Masse mit 91,3 kDa zu stark von der bestimmten Ringmasse abweicht.

Um die exakte c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie zu bestimmen, wurde die Laserintensität variiert. Durch steigende Laserintensitäten ist es möglich, den Ring gezielt zu fraktionieren. Hierbei zerfallen lediglich die nichtkovalenten Bindungen zwischen den Untereinheiten rein statistisch und es bildet sich ein

spezifisches Spektrum je nach Untereinheitenstöchiometrie (Abb. 45). Nimmt man an, dass der Ring zwei oder mehr c_1 -Untereinheiten enthielte, so müssten sich Fragmente mit einer Masse von $c_1^{(2+n)} + c_{2/3}^{(n)}$ finden lassen. Des Weiteren müsste man, wenn der Ring mehr als 9 $c_{2/3}$ Untereinheiten enthielte, auch Fragmente mit Massen von $^{(9+n)}c_{2/3}$ detektieren können.

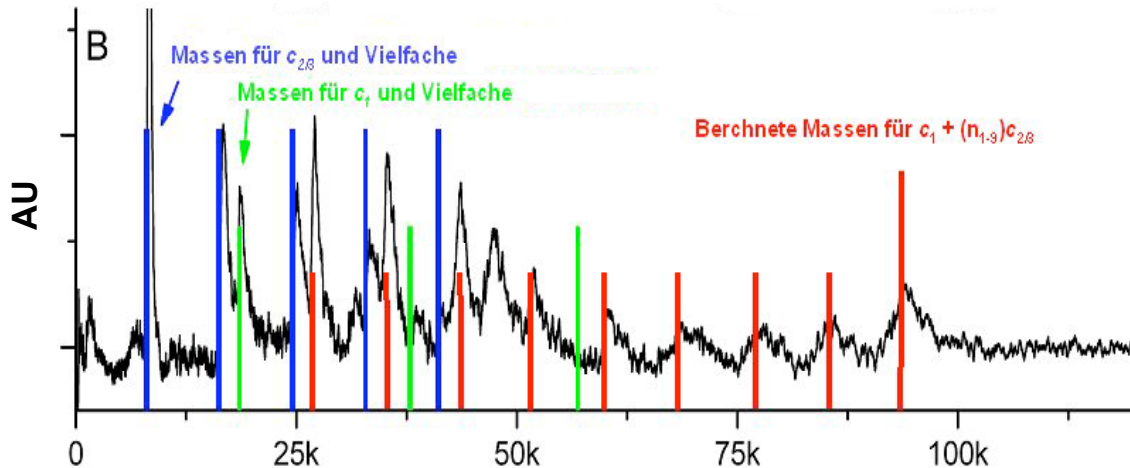


Abb. 45: Massenspektrum des gereinigten c-Ringes unter stärkerer Laser-Intensität. Der Ring zerfällt hierbei statistisch in seine Untereinheiten. Die roten Linien zeigen die berechneten Massen für Fragmente mit $c_1 + c_{2/3}^{(1-9)}$. Die blauen Linien zeigen die berechneten Massen für $c_{2/3}$ und Vielfache davon. Die grünen Linien zeigen die berechneten Massen für c_1 und Vielfache davon.

Die Masse des gesamten c-Ringes wurde zu $93,5 \pm 0,1$ KDa durch die LILBID bestimmt; des Weiteren konnten nur Fragmente mit Massen von $c_1 + c_{2/3}^{(1-8)}$ (rot) bzw. mit Masse von $c_{2/3}^{(1-9)}$ (blau) detektiert werden (Abb. 45). Fragmente mit einer Masse, welche zwei c_1 -Untereinheiten entsprechen würde, (grün) konnten nicht detektiert werden. Daher können c-Ringe mit einer c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie von 2:7 ausgeschlossen werden. Die einzige c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie, welche sowohl mit dem Fraktionierungsmuster unter sanften Laser-Intensitäten, der bestimmten Masse des intakten c-Ringes und der Anzahl von 11 Haarnadelstrukturen kompatibel ist, stellt die c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie von 1:9 dar. Dies beweist eindeutig einen c-Ring der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*, bestehend aus 10 Untereinheiten. Die c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Stöchiometrie beträgt dabei 1:9.

3.5.7. Untersuchungen zur möglichen Variation der Untereinheitenstöchiometrie des c-Ringes

Seit Mitte der 1990er Jahre existierten Theorien, dass es für einen fakultativen Organismus von Vorteil sein könnte, die Anzahl der c-Untereinheiten im c-Ring variieren zu können (Schemidt *et al.*, 1998); es konnte durch densitometrische Auswertung von SDS-Gelen gezeigt werden, dass in *E. coli* die gebildeten Mengen an Untereinheit c beim Wachstum auf Glucose-Minimalmedium größer waren als beim Wachstum auf Succinat-Minimalmedium und die geringsten Mengen an c-Untereinheiten in auf LB-Medium gewachsenen Zellen detektiert wurden. Dem entgegen stehen Experimente aus jüngerer Zeit (Ballhausen *et al.*, 2009; Krebstakies *et al.*, 2008), welche klar belegen, dass die Anzahl der c-Untereinheiten durch ihre Struktur vorgegeben ist. So belegen Strukturdaten eindeutig, dass der c-Ring von *E. coli* aus 10 Untereinheiten (Fillingame und Dmitriev, 2002; Jones *et al.*, 2000) besteht. Ersetzt man diese Gene jedoch durch Gene aus anderen Organismen, so wird ein c-Ring mit der für den Organismus typischen Untereinheitenanzahl gebildet, aus dem das in *E. coli* klonierte Gen ursprünglich stammt (Meier *et al.*, 2007; Meier *et al.*, 2005b). Des Weiteren konnten bisher keine Strukturen gefunden werden, welche Beweise für c-Ringe mit unterschiedlicher Größe in einem Organismus geliefert hätten. Mittlerweile gilt die Annahme als gesichert, dass die Untereinheitengeometrie die Ringgeometrie bedingt und daher keine Variationen in der Größe der Ringe möglich sind.

Die Einzigartigkeit des c-Ringes der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* mit zwei verschiedenen Untereinheiten in einem Ring würde jedoch die Möglichkeit einer Variation der Untereinheitenzusammensetzung unter Wahrung der Ringgröße ermöglichen. Durch Veränderung des Verhältnisses von c_1 zu $c_{2/3}$ wäre eine Anpassung an die jeweiligen

Wachstumsbedingungen möglich. Bei heterotrophem Wachstum des Bakteriums wäre eine ATP-Synthase nicht obligatorisch, da durch Substratkettenphosphorylierung ATP zur Verfügung gestellt werden kann. Eine effiziente Ionenpumpe (was ein kleineres Verhältnis von c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Untereinheiten bedeuten würde) könnte aber von Vorteil sein, um größere elektrochemische Potentiale zu erzeugen. Ein Enzym mit einem kleineren Ionen-zu-ATP-Verhältnis könnte also hier durchaus von Vorteil sein. Bei autotrophem Wachstum hingegen ist eine ATP-Synthase obligatorisch, um ATP zu generieren, wäre ein höheres Ionen-zu-ATP-Verhältnis (was ein größeres Verhältnis von c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Untereinheiten bedeuten würde) vorteilhaft. Da *A. woodii* sowohl zu heterotrophem Wachstum auf Fruktose als auch zu autotrophem Wachstum auf Methanol in der Lage ist, soll getestet werden, ob das Substrat einen Einfluss auf die Untereinheitenstöchiometrie hat. Um zu untersuchen, ob die Untereinheitenstöchiometrie mit den Wachstumsbedingungen variiert, wurden *c*-Ringe aus auf unterschiedlichen Substraten gewachsenen Kulturen isoliert. Es wurden *c*-Ringe heterotroph (mit 20 mM Fruktose als Substrat) kultivierter Zellen von *A. woodii* isoliert, hierbei wäre kein als ATP-Synthase funktionierendes Enzym notwendig. Für das autotrophe Wachstum mit Methanol oder Betain als Substrat hingegen ist die Funktion der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase als ATP-Synthase obligat, daher wurden *c*-Ringe aus Kulturen isoliert, welche mit 40 mM Betain oder 60 mM Methanol als Substrat gewachsen waren. Ebenso wäre denkbar, dass die Na^+ -Konzentration im Medium einen Einfluss auf die Untereinheitenstöchiometrie haben könnte, daher wurden *c*-Ringe aus mit 60 mM Methanol als Substrat in Anwesenheit von 200 mM NaCl gewachsenen Kulturen isoliert. Die isolierten *c*-Ringe wurden dann durch LILBID-TOF-MS auf ihre Untereinheitenstöchiometrie untersucht (Tab. 6).

Tabelle 6, Untereinheitenstöchiometrie des c -Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Substrat	Na^+ [mM]	c_1	$c_{2/3}$
Betaine (40 mM)	20	1	9
Fruktose (20 mM)	20	1	9
Methanol (60 mM)	20	1	9
Methanol (60 mM)	200	1	9

Die Untersuchung der Untereinheitenstöchiometrie des c -Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* zeigte, dass unter den gewählten Wachstumsbedingungen keine Variation des c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Verhältnisses zu beobachten war. Das ermittelte c_1 -zu- $c_{2/3}$ -Verhältniss betrug stets 1:9. Dies ist ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der Theorie, dass die Struktur der Untereinheiten die Struktur des Ringes vorgibt.

3.6. 3D-Kristallisation des c -Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

Die vorangegangenen Untersuchungen konnten die Größe und Untereinheitenstöchiometrie entschlüsseln, jedoch blieb die Frage ungeklärt, wie viele Ionenbindestellen die c_1 -Untereinheit tatsächlich besitzt. Die aus der DNS-Sequenz abgeleitete Primärstruktur der c_1 -Untereinheit besitzt jedenfalls nur eine konservierte Ionenbindungsstelle, allerdings wäre theoretisch auch eine Na^+ -Koordination trotz des fehlenden Glutamates denkbar, denn eine (zwar weitaus schwächere) negativ polarisierte Bindetasche ist nach wie vor vorhanden (siehe auch Einleitung). Diese Fragestellung ist nur über hochauflösende 3D-Kristalle zu klären. Daher wurde in dieser Arbeit schon mit Vorarbeiten begonnen. Es wurden von dem gereinigten c -Ring 3D-Proteinkristalle gezogen.

3.6.1. Ergebnisse der Kristallisation

Der gereinigte c-Ring wurde wie in 2.23. beschrieben kristallisiert. Die größten Kristalle wurden mit PEG 300 bzw. 400 in Konzentrationen von 16-20% (v/v) in 0,1M Na-Acetatpuffer erhalten. Die Ergebnisse der durchgeführten Screens nach 14 Tagen Inkubation sind in Tab. 7 dargestellt. Bei den Proben A1-C8 wurde im ersten Ansatz 1% (W/V) DDM als Detergenz verwendet. Vielversprechende, insbesondere größere Kristalle wurden selektiert und für weitere Untersuchungen in Stickstoff tiefgefroren..

Tab. 7, Kristallisationsergebnisse der im Hampton-Detergenz-Screen-III getesteten Detergenzien.

Nr.	Detergenz	8°C	12°C	18°C	25°C	30°C
1	C1 ₂ E ₉	-	-	PT	PT	PT
2	C1 ₂ E ₈	-	-	PT	PT	-
3	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-Maltosid	-	ND	μK	μK	μK
4	Sucrose-Monolaurat	-	-	-	-	PT
5	CYMAL-6	-	-	ND	ND	PT
6	TRITON X-100	-	PT	NμK	μK	μK
7	CTAB	-	-	-	-	
8	Big CHAP, Deoxy	-	-	-	-	
9	<i>n</i> -Decyl-β-D-Maltosid	-	-	-	-	
10	LDAO	-	PT	μK	μK	PT
11	CYMAL,-5	-	-	-	-	
12	ZWITTERGENT, 3-12	-	-	μK	μK	μK
13	<i>n</i> -Nonyl-β-D-Glucosid	-	-	-	-	
14	<i>n,n</i> ,Actyl-β-D-Thiogluco- sid	-	-	-	-	
15	DDAO	-	-	KN	-	
16	HECAMEG,	-	-	-	PT	
17	<i>n, n</i> , Actanoylsucrose	-	PT	-	-	
18	<i>n</i> -Heptyl-β-D-Thiogluco- pyranosid	-	-	PT	-	
19	<i>n,n</i> ,Actyl-β-D-Glucosid	-	-	KN	KN	
20	CYMAL,-3	-	-	-	-	
21	C-HEGA,-10	-	-	-	-	
22	ZWITTERGENT, 3-10	-	-	μK	μK	KN

23	MEGA,-8	-	-	-	-	-
24	<i>n</i> -Hexyl- β -D-Glucopyranosid	-	KN	PT	KN	KN
25	Pluronic [®] F-68	-	-	-	-	-
26	Anapoe [®] 35	-	-	-	-	-
27	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltotriosid	-	-	-	-	-
28	Anapoe [®] 58	-	-	-	-	-
29	Anapoe [®] X-114	-	-	-	-	-
30	Anapoe [®] X-305	-	-	-	-	-
31	Anapoe [®] X-405	-	-	-	-	-
32	Anapoe [®] 20	-	-	PT	-	-
33	Anapoe [®] 80	-	PT	PT	-	-
34	Anapoe [®] C1 ₀ E ₆	-	-	PT	PT	-
35	Anapoe [®] C1 ₀ E ₉	-	-	PT	-	-
36	Anapoe [®] C1 ₂ E ₁₀	-	PT	PT	-	-
37	Anapoe [®] C1 ₃ E ₈	-	-	PT	-	-
38	IPTG	-	-	-	-	-
39	<i>n</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -Dimethylglycin	-	-	-	-	-
40	HEGA-10	-	-	-	-	-
41	C ₈ E ₅	-	-	-	-	-
42	CHAPS	-	-	-	-	-
43	CHAPSO	-	-	-	-	-
44	C-HEGA-11	-	-	-	-	-
45	HEGA-9	-	-	-	-	-
46	C-HEGA-9	-	-	-	-	-
47	HEGA-8	-	-	-	-	-
48	CYPFOS-3	-	-	-	-	-
49	BAM	-	-	-	-	-
50	<i>n</i> -Hexadecyl- β -D-Maltosid	-	-	-	-	-
51	<i>n</i> -Tetradecyl- β -D-Maltosid	-	-	-	-	-
52	<i>n</i> -Tridecyl- β -D-Maltosid	-	-	-	-	-
53	Thesit [®]	-	-	-	-	-
54	ZWITTERGENT [®] 3-14	-	PT	KN	-	-
55	<i>n</i> -Undecyl- β -D-Maltosid	-	-	-	-	-
56	<i>n</i> -Decyl- β -D-Thiomaltosid	-	-	-	-	-

57	FOS-Choline [®] -12	-	-	-	-	-
58	<i>n</i> -Decanoylsucrose	-	-	-	-	-
59	1- <i>s</i> -Nonyl- β -D-Thioglucosid	-	-	-	-	-
60	<i>n</i> -Nonyl- β -D-Maltosid	-	-	-	-	-
61	DDMAB	-	-	-	-	-
62	<i>n</i> -Nonyl- β -D-Maltosid	-	-	-	-	-
63	CYMAL [®] -4	-	-	-	-	-
64	<i>n,n</i> , Actyl- β -D-Thiomaltosid	-	-	-	-	-
65	FOS-Choline [®] -10	-	-	-	-	-
66	FOS-Choline [®] -9	-	-	-	-	-
67	MEGA [®] -9	-	-	-	-	-
68	1- <i>s</i> -Heptyl- β -D-Thioglucosid	-	-	-	-	-
69	FOS-Choline [®] -8	-	-	-	-	-
70	CYMAL [®] -2	-	-	-	-	-
71	ZWITTERGENT [®] 3-08	-	-	-	-	-
A1	8% PEG 100	nA	-	-	nA	nA
A2	12% PEG 100	nA	PT	PT	nA	nA
A3	16% PEG 100	nA	PT	PT	nA	nA
A4	18% PEG 100	nA	PT	PT	nA	nA
A5	20% PEG 100	nA	PT	PT	nA	nA
A6	22% PEG 100	nA	KN	KN	nA	nA
A7	24% PEG 100	nA	KN	KN	nA	nA
A8	26% PEG 100	nA	KN	KN	nA	nA
B1	8% PEG 200	nA	PT	PT	nA	nA
B2	12% PEG 200	nA	PT	PT	nA	nA
B3	16% PEG 200	nA	PT	PT	nA	nA
B4	18% PEG 200	nA	PT	PT	nA	nA
B5	20% PEG 200	nA	KN	KN	nA	nA
B6	22% PEG 200	nA	KN	KN	nA	nA
B7	24% PEG 200	nA	μ K	μ K	nA	nA
B8	26% PEG 200	nA	μ K	μ K	nA	nA
C1	8% PEG 300	nA	KN	KN	nA	nA
C2	12% PEG 300	nA	KN	KN	nA	nA
C3	16% PEG 300	nA	K	K	nA	nA
C4	18% PEG 300	nA	K	K	nA	nA
C5	20% PEG 300	nA	GK	GK	nA	nA
C6	22% PEG 300	nA	GK	GK	nA	nA
C7	24% PEG 300	nA	K	K	nA	nA
C8	26% PEG 300	nA	K	K	nA	nA
D1	8% PEG 400	nA	μ K	μ K	nA	nA
D2	12% PEG 400	nA	μ K	μ K	nA	nA
D3	16% PEG 400	nA	μ K	μ K	nA	nA
D4	18% PEG 400	nA	K	K	nA	nA

D5	20% PEG 400	nA	K	K	nA	nA
D6	22% PEG 400	nA	μK	μK	nA	nA
D7	24% PEG 400	nA	μK	μK	nA	nA
D8	26% PEG 400	nA	KN	KN	nA	nA

Es wurde pro Ansatz je 1 μl (8,6 μg/μl Protein) gereinigter c-Ring in einem 0,1M-Na-Acetatpuffer pH 4,48 mit 18% (v/v) PEG300 eingesetzt. Dieser Puffer diente auch als Reservoirpuffer (je 500 μl). Die Kristallisation erfolgte bei den angegebenen Temperaturen für 14 Tage. Die Ergebnisse der Kristallisation wurden wie folgt dargestellt: Es erfolgte keine erkennbare Reaktion: (-), bei erfolgter Phasentrennung: (PT), bei kristallinem Niederschlag: (ND), bei kleinsten Kristallen: (μK), bei Kristallen: (K) und bei Kristallen >100μm: GK. Beispielbilder sind in Abb. 46 zu sehen.

Für jedes gefundene Kristallisationsergebnis sind in Abb. 46 Beispiele gezeigt. In Abb. 46-a ist ein Kristallisationstropfen mit erfolgter Phasentrennung zu sehen. In Abb. 46-b ist ein kristalliner Niederschlag zu erkennen. In Abb. 46-c werden erste kleinere Kristalle sichtbar, während in Abb. 46-d und -e die Proteinkristalle klar erkennbar werden. Abb. 46-f zeigt einen Kristall mit einer Länge von mehr als 800 μm, der auch schon mit bloßem Auge sichtbar war. Die schwarzen Balken repräsentieren eine Länge von 100 μm..

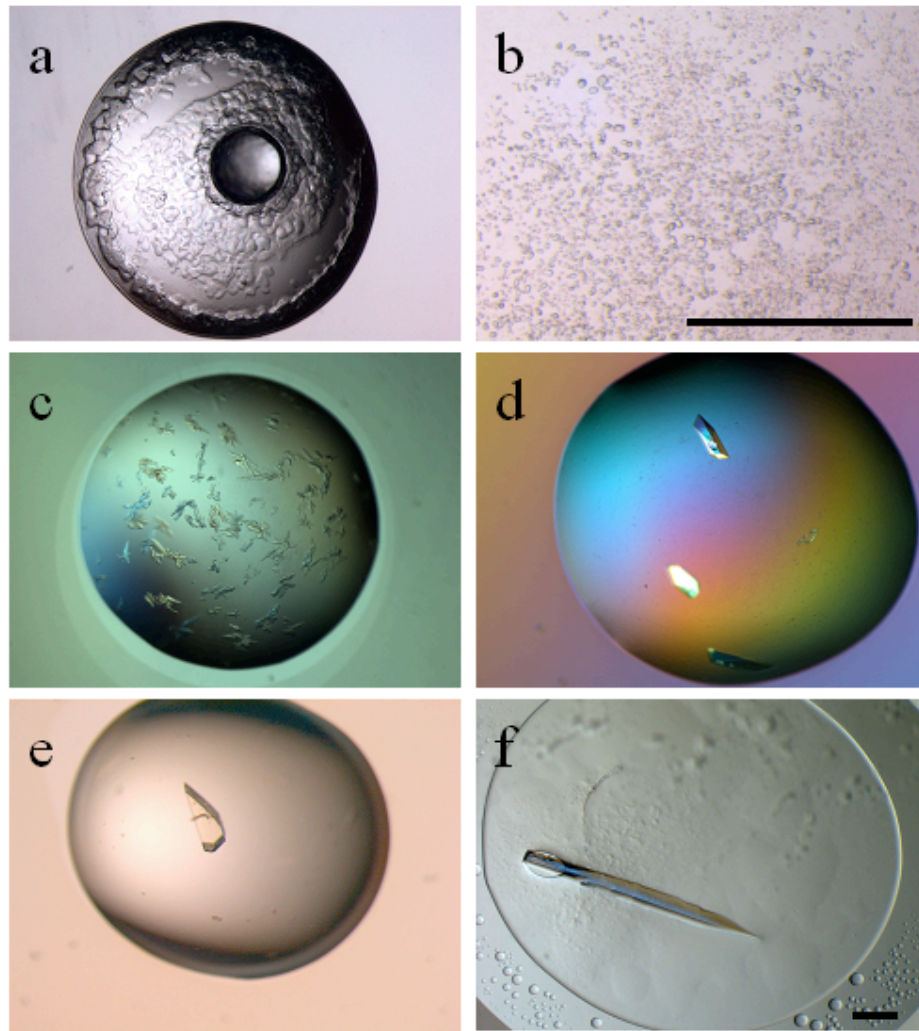


Abb. 46: 3D-Proteinkristalle des isolierten c-Ringes der $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATP-Synthase}$ aus *A. woodii*. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Kristallisationsversuche aufgeführt. In (a) ist ein Kristallisationstropfen mit erfolgter Phasentrennung zu sehen. In (b) ist ein kristalliner Niederschlag zu erkennen. In (c) werden erste kleinere Kristalle sichtbar, während in (d) und (e) die Proteinkristalle klar erkennbar werden. (f) zeigt einen Kristall mit einer Länge von mehr als 800 μm , der auch schon mit bloßem Auge sichtbar war. Die schwarzen Balken repräsentieren eine Länge von 100 μm (a, c, d, e und f wurden bei identischer Vergrößerung aufgenommen)..

Ein kristallines Wachstum zeigte sich mit den Detergenzien CYMAL, Zwittergent 3-12, Zwittergent 3-10, n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid, LDAO, DDM, TRITON X-100 und OG, und mit PEG₃₀₀ bzw PEG₄₀₀. Daher wurden komplette Isolierungen des c-Ringes vorgenommen, in denen anstatt OG die

o.g. Detergenzien verwendet wurden. Anschließend wurden Kristallisationsansätze (C1-D8) mit diesen Detergenzien angesetzt. Dabei wuchsen Kristalle mit je nach Detergenz unterschiedlicher Morphologie. Die größten Kristalle, welche auch vermessen wurden, sind in Abb. 47 zu sehen.

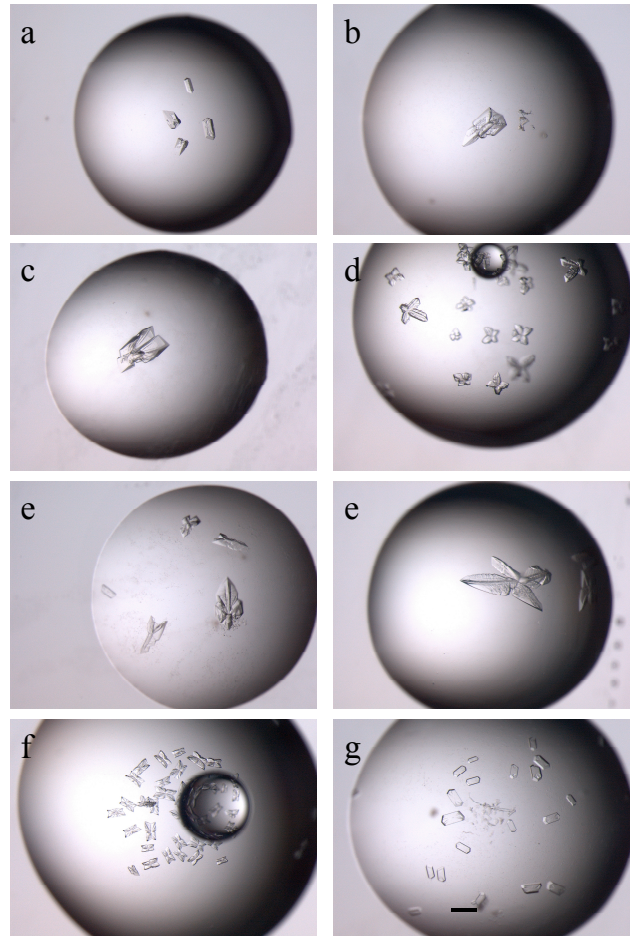


Abb. 47: Ergebnisse der Kristallisation des isolierten c-Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*. Die Ansätze wurden im Puffer C4 bei 20°C für 14 Tage im „Hanging-Drop-Verfahren“ bei einem Reservoirvolumen von $500\ \mu\text{l}$ und einer Tropfengröße von $2\ \mu\text{l}$ durchgeführt. Es wurden die Detergenzien CYMAL (a), Zwittergent 3-12 (b), Zwittergent 3-10 (c), n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid (d), LDAO (d), DDM (e), TRITON X-100 (f) und OG (g) verwendet. Der schwarze Balken repräsentiert eine Länge von $200\ \mu\text{m}$.

Kristalle, welche größer als $100\ \mu\text{m}$ waren, wurden selektiert und vermessen, dabei zeigte sich, dass die Morphologie bei den getesteten Kristallen keinen Einfluss auf die Auflösung oder Geometrie der Raumgruppe hatte.

Den besten Datensatz mit einer Auflösung von 4,3 Å lieferte der Kristall AW_1023. Als Puffer diente mit 18% PEG 300 bei 18°C, die Proteinkonzentration betrug 9,3 mg/ml bei einer Tropfengröße von 1 µl. Der Kristall wurde vor dem Tiefkühlen für 120 s und 30% PEG 300 mit 0,5 % OG (V/V), bei 18°C inkubiert. Der Datensatz wurde in Kooperation mit Dr. Thomas Meier an der SLS Synchrotron Beamline PX-II (Paul-Scherrer-Institut, SLS, Villach, Suisse) aufgenommen (Oscillation range: 1.0 Degree, Rotation axis: 1.0 0.0 0.0, X-ray wavelength: 0.97972 Å, Crystal to detector distance: 350 mm, Frames: 120 (1 pass per frame), 30° - 150°, Filter: 50%). Eine erste Auswertung erfolgte auf Softwarebasis (XDS/MOSFLM). Diese ergab eine tetragonale Packung mit möglicher Schraubenachse. Der Datensatz zeigte eine Vollständigkeit von 99% bis zu einer Auflösung von 4.3 Å. Diese Auflösung würde zwar unter Zuhilfenahme bekannter Strukturen die Modellierung einer 3D-Struktur zulassen, allerdings wäre diese nicht ausreichend, um den erhaltenen Dichten auch zweifelsfrei Aminosäurereste zuzuordnen zu können.

Die durchgeführten Arbeiten zur 3D-Kristallisation geben erste Hinweise, unter welchen Bedingungen Kristalle von hoher Auflösung zu erzeugen sein könnten. Um eine Struktur zu erhalten, bei der die Zuordnung der einzelnen Aminosäuren zweifelsfrei möglich ist, sollte eine Auflösung von < 3 Å erreicht werden. Trotzdem ist es erstmals gelungen, 3D-Proteinkristalle von c-Ringen mit unterschiedlichen c-Untereinheiten zu erhalten, was eine ausgezeichnete Basis für weitere Untersuchungen darstellt.

4. Diskussion

4.1. Na⁺-Energetik in *A. woodii*

Acetogene Bakterien stellen eine spezielle Gruppe der anaeroben Bakterien dar, welche über fast alle Ökosysteme verbreitet sind (Müller *et al.*, 2004). Acetogene Bakterien sind in der Lage, viele verschiedene organische Substrate zu nutzen, aber auch C₁-Verbindungen wie Methanol (Gottschalk, 1989). Zusätzlich sind sie in der Lage, autotroph auf H₂ + CO₂ zu wachsen (Diekert und Wohlfarth, 1994; Müller *et al.*, 2004). Während beim Wachstum auf Zuckern pro Mol Glukose vier Mol ATP gebildet werden (Ragsdale und Pierce, 2008), findet beim autotrophen Wachstum keine Netto-ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung statt (Fuchs, 1986). Die Energiekonservierung erfolgt durch Aufbau eines Na⁺-Gradienten über die Membran (Müller, 2003). Acetogene Bakterien bedienen sich zum Aufbau von Membranpotentialen verschiedener Strategien, einige Bakterien nutzen eine pH-getriebene Bioenergetik wie *M. thermoacetica* (Hugenholtz und Ljungdahl, 1990; Kamlage und Blaut, 1992; Ljungdahl, 1986) andere zeigen eine Abhängigkeit von Na⁺ (Geerligs *et al.*, 1989; Heise *et al.*, 1989; Yang und Drake, 1990). *A. woodii* zeigt ein Na⁺-abhängiges Wachstum unter autotrophen Bedingungen (Heise *et al.*, 1989). Daher wurde für *A. woodii* eine geschlossene Na⁺-Bioenergetik mit einer Na⁺-abhängigen ATP-Synthase postuliert (Müller, 2003; Müller und Gottschalk, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass im Zuge der Acetogenese ein elektrochemisches Na⁺-Potential von –90 mV aufgebaut wurde (Heise *et al.*, 1993). Wie der von *A. woodii* erzeugte elektrochemische Na⁺-Gradient aufgebaut wird, ist bislang unklar, es wurde allerdings in den Membranen von *A. woodii* ein Proteinkomplex gefunden (Biegel *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009), welcher große Ähnlichkeit mit einem bekannten Proteinkomplex (Rnf) aufweist, für den Na⁺-Transport nachgewiesen werden konnte (Tokuda und Unemoto, 1981). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass dieser Rnf-Komplex in *A. woodii* für die Erzeugung des elektrochemischen Na⁺-Potentials verantwortlich sein könnte.

Das elektrochemische Na⁺-Potential wiederum stellt die Antriebskraft für eine Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase (Heise *et al.*, 1992a; Heise *et al.*, 1991; Müller, 2003)

und einen Flagellenmotor (Aufurth *et al.*, 1998) dar. Die Verwendung von Na^+ als Kopplungssion ist für F_1F_0 -ATP-Synthasen nicht unbekannt. Eine Na^+ -gekoppelte F_1F_0 -ATP-Synthase kommt beispielsweise in *P. modestum* (Laubinger und Dimroth, 1988) oder *I. tartaricus* (Neumann *et al.*, 1998) vor.

4.2. Die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii*

Vergleicht man die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* mit bekannten Na^+ -getriebenen ATP-Synthasen (Laubinger und Dimroth, 1988; Müller *et al.*, 2001), so fällt auf, dass die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* im Gegensatz zu allen übrigen isolierten und charakterisierten F-Typ-ATP-Synthasen eine Besonderheit aufweist: Sie enthält nicht nur eine c -Untereinheit, sondern insgesamt drei (Müller, 2001 #3895; diese Arbeit). Die F-typischen c_2 - und c_3 -Untereinheiten bestehen aus zwei transmembranen Helices, wie sie auch in allen anderen F-Typ-ATP-Synthasen zu finden sind (Rahlf's und Müller, 1997). Die Untereinheit c_1 dagegen stellt mit einer Masse von 18,7 kDa ein V-typisches Proteolipid, bestehend aus vier transmembranen Helices, dar (Aufurth *et al.*, 2000). *A. woodii* ist damit das einzige bisher bekannte Bakterium, welches nachgewiesene c -Untereinheiten vom F- und V-Typ im c -Ring seiner Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase enthält (diese Arbeit).

Der c -Ring der V-Typ-ATPasen besteht aus 24 transmembranen Helices mit 6 Ionenbindestellen (Clare *et al.*, 2006; Hanada *et al.*, 1991; Murata *et al.*, 2005). Die aus dieser Stöchiometrie abgeleitete Zahl von 6 translozierten Ionen pro Rotation (Yokoyama *et al.*, 2003) würde einem ΔG_p von ca. 36 kJ/mol entsprechen (Nakanishi-Matsui und Futai, 2006), für die Reaktion von $\text{ADP} + \text{P}_i$ zu ATP wären aber 50 kJ/mol nötig. Daher sind diese Enzyme bei einem normalen Membranpotential von ca. 180 mV (Thauer *et al.*, 1977) nicht zur Synthese von ATP fähig (Nelson und Taiz, 1989), stellen aber effiziente Ionenpumpen dar (Mulikidjanian *et al.*, 2007; Müller und Grüber, 2003). Der aus der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* isolierte hybride c -Ring besitzt eine Untereinheitenstoichiometrie von einer c_1 - und neun $c_{2/3}$ -Untereinheiten (diese Arbeit). Daraus ergeben sich 10 konservierte Ionenbindestellen und ein

Phosphorylierungspotential von etwa 60 kJ/mol. Dies ist rechnerisch zur ATP-Synthese ausreichend, die Fähigkeit des Enzyms zur ATP-Synthese wurde aber auch experimentell an Proteoliposomen gezeigt (diese Arbeit). Die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* stellt also das bisher einzige Enzym dar, welches V-Typ-c-Untereinheiten enthält und zur Synthese von ATP fähig ist. Es stellt sich daher die Frage, ob der hybride c-Ring der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* eine einzigartige Mutation darstellt oder ob weitere Bakterien mit V-Typ-c-Untereinheiten vorkommen. In der Tat finden sich in Genom-Datenbanken weitere Bakterien, in deren F-Typ-ATP-Synthase-Operonen Gene enthalten sind, die für V-typische c-Untereinheiten codieren (Abb 48).

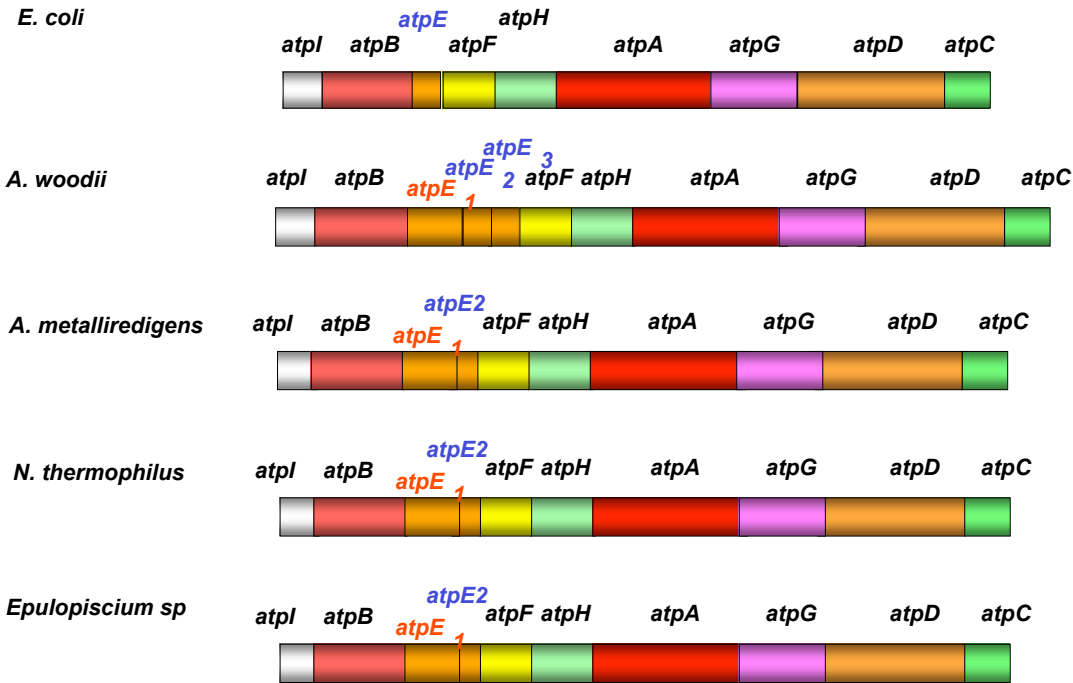


Abb. 48: Graphischer Vergleich der Operonstrukturen aus *E. coli*, *A. woodii*, *A. metalliredigens*, *N. thermophilus* und *Epulopiscium sp.*, Die Operonstrukturen wurden nach den Annotationen aus NCBI erstellt. Die für die F-Typ-c-Untereinheit codierenden Gene sind blau, die für die V-Typ-c-Untereinheit codierenden Gene rot hervorgehoben.

A. woodii ist also nicht das einzige Bakterium mit Genen für F- und V-Typ-c-Untereinheiten. Interessant ist, dass alle gefundenen V-Typ-c-Untereinheiten bei einer Größe von 16-18 kDa nur eine Ionenbindestelle besitzen (Abb 49)

typische *c*-Untereinheiten enthalten, eine Zwischenstufe in der Evolution der ATP-Synthasen darstellen.

4.3. Evolution der *c*-Untereinheiten

Phylogenetische Untersuchungen der 8-kDa-*c*-Untereinheiten aus F- und A-Typ-ATP-Synthasen sowie der *c*- und *c'*-Untereinheiten der V-Typ-ATPasen zeigen eine Evolution, welche homolog zu der der katalytischen Untereinheiten verläuft (Blair *et al.*, 1996; Hilario und Gogarten, 1998). Es wird ebenfalls ein Vorläuferprotein vermutet, von dem aus die anderen *c*-Untereinheiten evolvierten (Müller *et al.*, 2005b). Als Vorläuferprotein kommt hier nur eine 8-kDa-Untereinheit mit einer Ionenbindestelle in Betracht (Blair *et al.*, 1996; Nelson und Klionsky, 1996). Auch in der V/A-Typ ATPase war zu Anfang nur ein 8-kDa-Proteolipid vorhanden (Gogarten *et al.*, 1992; Kibak *et al.*, 1992; Nelson, 1992). Erst nach der Auftrennung der A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen kam es in den letzteren durch Genverdopplungen und Genfusionen zur Ausbildung der 16-kDa-Proteolipide (Mandel *et al.*, 1988). Die große Diversität in der *c*-Untereinheiten in Archäen entwickelte sich vermutlich erst später als Anpassung an ihre jeweiligen Habitate (Cross und Müller, 2004; Müller *et al.*, 2005a). Erst im Laufe der Evolution verlor dieses 16-kDa-Proteolipid eine Ionenbindestelle und nachfolgende Mutationen führten zur Aufspaltung in *c*-, *c'*- einerseits und *c''*-Untereinheiten andererseits (Finbow und Harrison, 1997). Unter Berücksichtigung der biochemischen Eigenschaften und der phylogenetischen Analyse der *c*-Untereinheiten wurden auch einige Enzyme in andere Typ-Klassen eingeteilt; so ist die ATP-Synthase aus *T. thermophilus* kaum ein Enzym des V-Types. Es erscheint vielmehr sinnvoll, es als bakterielle A-Typ-ATP-Synthase zu klassifizieren (Hilario und Gogarten, 1998). Eine phylogenetische Analyse auf Basis der Sekundärstrukturen verschiedener *c*-Untereinheiten ist in Abb. 51 (für F-Typ) und in Abb. 50 (für A-Typ) zu sehen und verdeutlicht die Evolution der *c*-Untereinheiten.

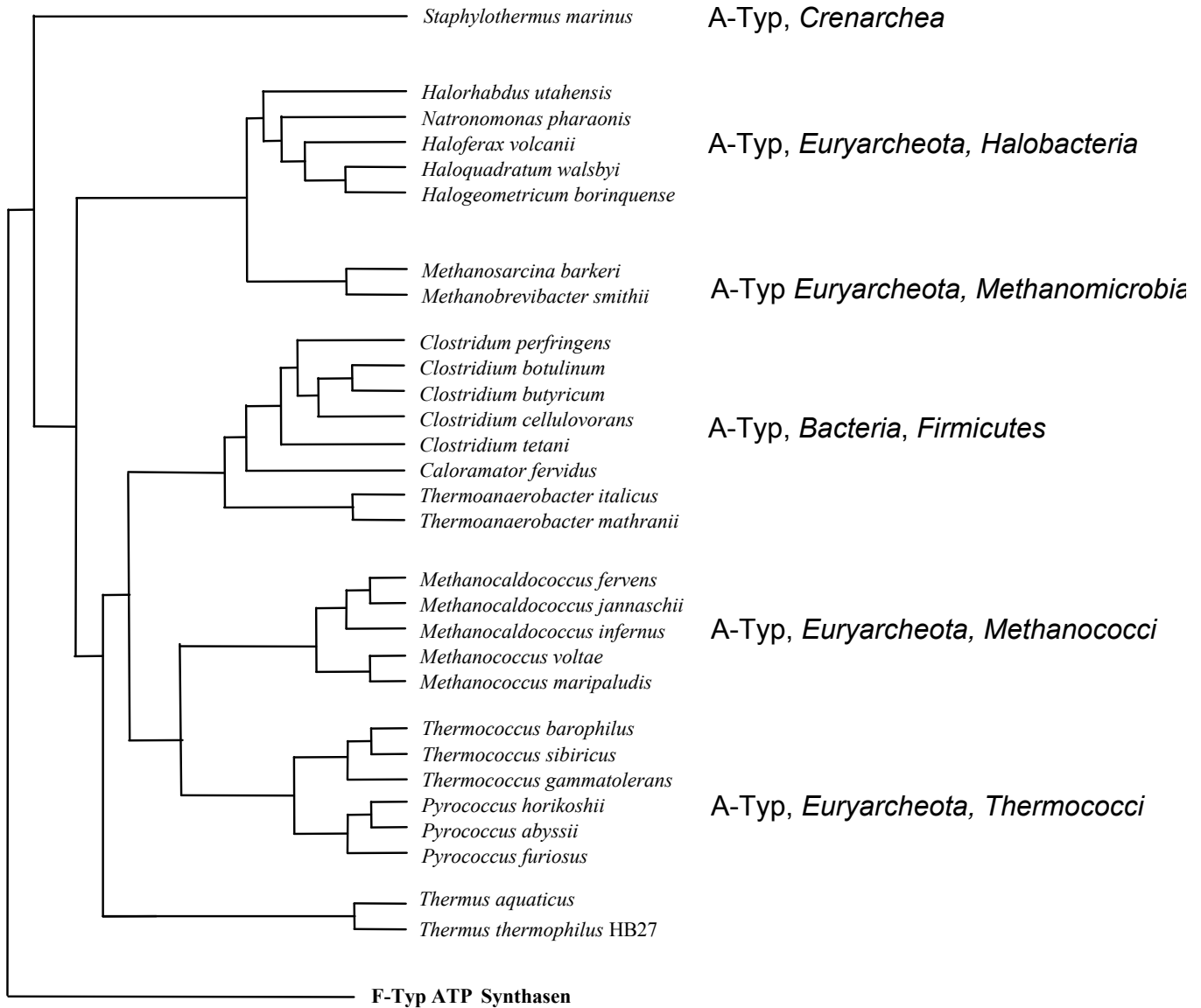


Abb. 50 Phylogenetischer Stammbaum der c-Untereinheiten der V- und A-Typ-ATP-Synthasen. Grundlage der Berechnung sind die Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank (siehe Anhang A1). Die Berechnung wurde nach dem Maximum-likelihood-Algorithmus mit einer für die Verwendung von Aminosäuresequenzen modifizierten Softwareversion des Programms ARB durchgeführt. Mit dieser wurde auch das Alignment per ClustalW-Algorithmus und Nachbearbeitung von Hand durchgeführt. Die Abstände wurden zur besseren Darstellung normiert und spiegeln nicht die realen phylogenetischen Distanzen wider.

Die phylogenetische Untersuchung der *c*-Untereinheiten zeigt, dass diese durchaus geeignet sind, die einzelnen Spezies hinreichend aufzulösen. Auffällig ist, dass die *Archea* sich jeweils nach den Besonderheiten ihrer Habitate oder Stoffwechsel zusammen gruppieren. Die halophilen *Halobacteria* finden sich in einem Ast zusammen, genauso wie die thermophilen *Thermococci* und die hyperthermophilen *Methanococci*. Möglicherweise hat die Sekundärstruktur der *c*-Untereinheiten einen Einfluss auf die Ionenkoordination oder Ringstabilität. Leider sind von zu wenigen *c*-Ringen der A-Typ-ATP-Synthasen Größe und Untereinheitenstoichiometrie bekannt, um diese Hypothese zu untermauern. Die phylogenetische Untersuchung der F-Typ-ATP-Synthasen zeigt ein ähnliches Bild.

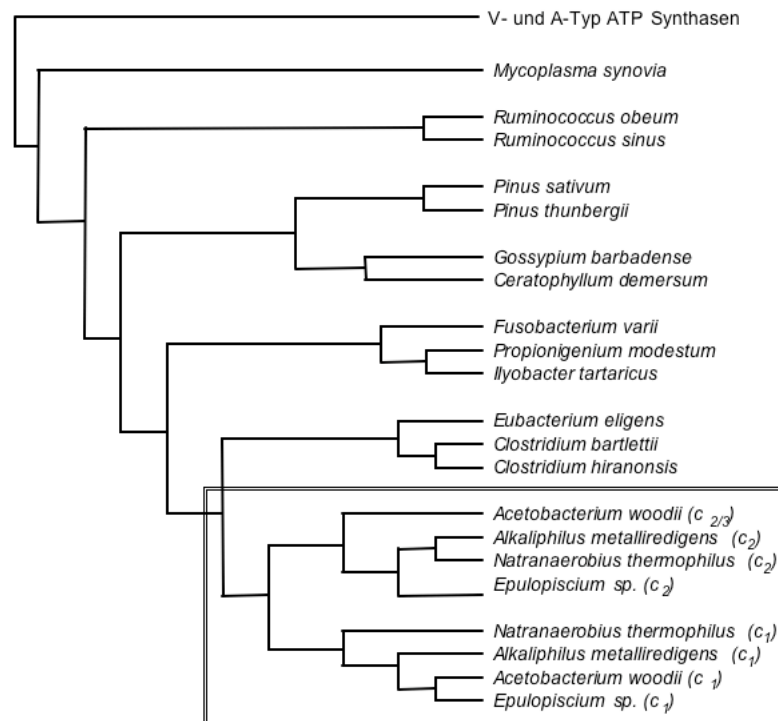


Abb. 51: Phylogenetischer Stammbaum der *c*-Untereinheiten der F-Typ-ATP-Synthasen. Grundlage der Berechnung sind die Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank (siehe Anhang A1). Die Berechnung wurde nach dem Maximum-likelihood-Algorithmus mit einer für die Verwendung von Aminosäuresequenzen modifizierten Softwareversion des Programms ARB durchgeführt. Mit dieser wurde auch das Alignment per ClustalW-Algorithmus und Nachbearbeitung von Hand durchgeführt. Die Abstände wurden zur besseren Darstellung normiert und spiegeln nicht die realen phylogenetischen Distanzen wider.

Auch hier gruppieren die *c*-Untereinheiten aus pflanzlichen ATP-Synthasen sich zusammen und auch die mitochondrialen bzw. bakteriellen Enzyme finden sich in eigenen Ästen (Abb. 51). Die Position der Mycoplasmen außerhalb des Hauptastes für die F-Typ-ATP-Synthasen ist besonders beachtenswert. Mycoplasmen sind parasitär oder sogar intrazellulär lebende Bakterien. Sie besitzen das kleinste Genom selbstständig replizierender Organismen (mit Ausnahme von *Nanoarchaeum equitans*). Die Mycoplasmen stellen daher eine Zwischenstufe in der Evolution hin zu den Endosymbionten dar. Dass sie sich außerhalb des Hauptastes, näher an den V-Typ-ATPasen-gruppieren, stützt die Theorie der Evolution der ATPasen (Cross und Müller, 2004).

Beachtenswert ist außerdem, dass die ATP-Synthasen, welche V-Typ-*c*-Untereinheiten enthalten, sich auch in einem eigenen Ast zusammen gruppieren (blau unterlegt). Auffällig ist, dass der Ast der V-typischen *c*₁-Untereinheiten (orange unterlegt mit rotem Rahmen) sich nicht innerhalb der *c*-Untereinheiten aus V-Typ-ATPasen gruppiert; dies wäre aber zu erwarten, wenn die *c*₁-Untereinheiten eine evolutionärer Zwischenschritt in der Entwicklung der F- zu den V-Typ-ATPasen darstellen würde. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei der Entwicklung der *c*₁-Untereinheiten um ein später erfolgtes, von der Evolution der V-Typ-ATPasen unabhängiges Ereignis handelt. Besonders auffällig ist die Tatsache, dass die Sekundärstruktur der *c*-Untereinheiten im Bereich der Ionenbindestelle der vier Organismen mit V-Typ-*c*₁-Genen in ihren ATP-Synthase-Operonen nahezu 100% übereinstimmt.

4.4. Die Ionenbindestellen der *c*-Untereinheiten

Durch Mutagenesestudien konnten zuerst die für Ionenkoordination essentiellen Aminosäuren bestimmt werden. Es konnte durch Mutationsstudien gezeigt werden, dass jeweils ein Carboxylat für die H⁺-Koordination essentiell ist (Hoppe *et al.*, 1980; Hoppe *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1990). Bei der protonengetriebenen ATP-Synthase von *E. coli* handelt es sich um den Aspartatrest D61 (Fillingame *et al.*, 1991). Durch den Sequenzvergleich der *c*-Untereinheiten aus *A. woodii* und *P.*

modestum wurden zwei weitere Aminosäuren gefunden (Prolin-25 und Glutamin-29 in *A. woodii* Untereinheit c_2/c_3 , die an einer Na^+ -Komplexierung beteiligt sein könnten (Rahlfs *et al.*, 1997). Hochauflösende Strukturen sind von von den Na^+ -komplexierenden c -Ringern aus *E. hirae* (Murata *et al.*, 2005) und *I. tartaricus* (Meier *et al.*, 2009; Meier *et al.*, 2005a) bekannt. Sie zeigen, dass neben dem Carboxylat auch noch andere Aminosäuren an der Ionenkoordination beteiligt sind. Im Falle von *I. tartaricus* sind dies Q32 (Helix 1) und E65 (Helix 2) von der ersten Untereinheit und V63, S66 und Y70 (jeweils aus Helix 2) von der folgenden Untereinheit. Zusätzlich findet sich ein Wassermolekül in der Bindetasche, das, koordiniert von A64 und T67 (Helix 2), ebenfalls an der Na^+ -Koordination beteiligt ist (Meier *et al.*, 2009) (Abb. 52). Ob alle diese Aminosäuren als für die Na^+ -Koordination essentiell sind und ein konserviertes Na^+ -Bindemotiv bilden, ist spekulativ, da von zu wenigen Enzymen bekannt ist, ob diese tatsächlich Na^+ -abhängig arbeiten.

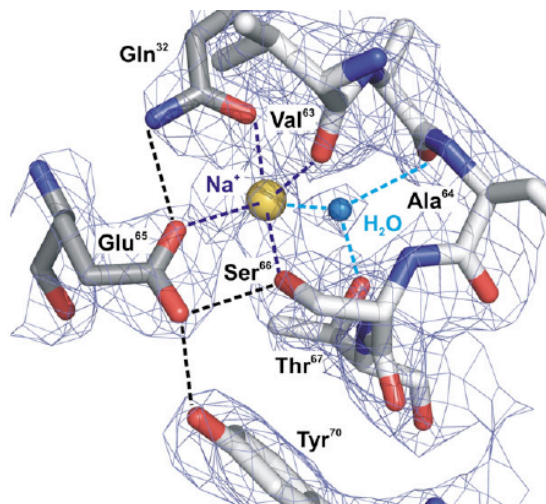


Abb. 52: Die Na^+ -Koordination zwischen den c -Untereinheiten des c -Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *I. tartaricus* (Meier *et al.*, 2009). Für Erklärungen siehe Text.

Betrachtet man die Bindestellen in den c -Untereinheiten verschiedener Organismen, so wird deutlich, dass sich je nach Phylum verschiedene Arten der Ionenkoordination entwickelt haben. In Tabelle 8 ist ein Aminosäure-Alignment der Ionenbindestellen von verschiedenen F-Typ-ATP-Synthasen gezeigt. Auffällig

ist, dass die untersuchten *Clostridia*, *Dinophyceae*, *Erysipelotrichi*, *Fusobacteria* und *Deltaproteobacteria* alle zumindest biochemisch ähnliche Aminosäuren aufweisen, welche auch im Na⁺-Bindemotiv aus *I. tartaricus* zu finden sind. Es finden sich stets fünf Aminosäuren an vergleichbaren Positionen (Nummerierung nach *I. tartaricus*) zusammen: 1. Q (Q39), (Glutamin) bzw E (Glutamat), gefolgt von 2. V (V63 Valin) oder I (Isoleucin), in seltenen Fällen auch M (Methionin), die dritte Aminosäure ist stets ein hochkonserviertes E (E65), (Glutamat), 4. T (T66), (Threonin) oder S (Serin) und schließlich 5. eine aromatische Aminosäure Y (Y70), (Tyrosin) oder F (Phenylalanin). Ob allerdings alle diese ATP-Synthasen deswegen auch in der Lage sind, Na⁺ als Kopplungssion zu nutzen, ist spekuativ und erst zu zeigen.

Tabelle 8, Sequenzvergleich der Ionenbindestelle verschiedener F-Typ ATP-Synthasen.

	Sequenz der Ionenbindestelle	Phylum
<i>Ilyobacter tartaricus</i>	...35...40...45...50...55...60...65....	
<i>Acetobacterium woodii</i> C ₂₃	QGFAAGKGAEAVGRQPEAQSDIIRTMLLGAAVAETTGIY	<i>Clostridia</i>
<i>Alkaliphilus</i>	QGYAAGKGAEGVGRQPEAQGDIVRTMLLGAAVAETTGIY	<i>Clostridia</i>
<i>Alkaliphilus</i>	QGFAAGKGAEEASLNPKSAKSASMVLLGAAVAETSGLI	<i>Clostridia</i>
<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	QGI AAGKGA EAVGRQPEAQGDILRTMLLGQAV AETTGIY	<i>Clostridia</i>
<i>Anaerofustis</i>	QGNATGKACESVARQPEAEGTILRTLLVGC AVAETS AIY	<i>Clostridia</i>
<i>Clostridium bartlettii</i>	QGYAAGKGA EAVGNQPEAKGDIISTMLLGAAVA ESTGIY	<i>Clostridia</i>
<i>Clostridium hiranonis</i>	QGYAAGKLAEAVGNQPEAKSEIMSSFIVGAAIA ESTAIY	<i>Clostridia</i>
<i>Clostridium nexile</i>	QGVAAHGAAAVGRNPGAKSDITSTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Clostridium paradoxum</i>	QGFAAGKGA EAVGKQPEAQGDILRTMLLGAAVA ESTGIY	<i>Clostridia</i>
<i>Clostridium sp. SS2/1</i>	QGYAAGQGAAAVGRNPGAKGDIISTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Eubacterium eligens</i>	QGI AAGYGASAVGRNPGAKSDITSTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Eubacterium hallii</i>	QGI AAGYGASAVGRNPGAKGDMSTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Eubacterium siraeum</i>	EGFCGGKAVEAIGRQPEASGAI TRTMIIGDAL AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Anaerostipes caccae</i>	QGYAAGQGAAAVGRNPGAKGDIISTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Bryantella formatexigens</i>	QGI AAGYGANAVGRNPGAKSDITSTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	QGI AAGHAAA VGRNPGAKSDITSTMLLGQAV AETTGLY	<i>Clostridia</i>
<i>Natronaerobius</i>	QGFAAGKGAESVGTNPKRGRQVTVMMLLGAAVAETS GFI	<i>Clostridia</i>
<i>Natronaerobius</i>	QGFAAGKGAESVGRQPEAQSDIIRTMLLGAAVAETT GIY	<i>Clostridia</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	EGYAVGKTIESIARQPEAQGDCTRTMFIGVAMA ESTGIY	<i>Clostridia</i>
<i>Ruminococcus obeum</i>	EGNAVASALEAIGRQPECKGDVITSTMLLGCAIAETT GIY	<i>Clostridia</i>
<i>Ruminococcus sp.</i>	EGNAVAKALEAIGRQPECKGDVITSTMLLGCAIAETT GIY	<i>Clostridia</i>
<i>Amphidinium carterae</i>	QGIASGRCIDGISRQPEVADDLRGVLLLSLAFMESL TIY	<i>Dinophyceae</i>
<i>Eubacterium bifforme</i>	QGI AASKGAESVGRNPDAASKIQSIMVLGIALAETT GIY	<i>Erysipelotrichi</i>
<i>Eubacterium dolichum</i>	QGI AASKGA EAVGRNPEAAGKIRSIMVLGIA MAETTGIY	<i>Erysipelotrichi</i>
<i>Holdmania filiformis</i>	EGFVAGKAVEAIGRNPEAEGKIRSTMILGIALSETCAIY	<i>Erysipelotrichi</i>
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	EGYAAGKAVESVARQPEAKGDIISTMILGQAVSEST GIY	<i>Fusobacteriales</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	EGYAAGKAVESVARQPEARGSIISTMILGQAV AESTGIY	<i>Fusobacteriales</i>
<i>Fusobacterium sp.</i>	EGYAAGKAVEAVARQPEARGNIISTMILGQAV AESTGIY	<i>Fusobacteriales</i>
<i>Fusobacterium varium</i>	EGYAAGKAVEAVVKIPEQKGNIIITMILGQAV AESTGIF	<i>Fusobacteriales</i>
<i>Ilyobacter tartaricus</i>	QGYAAGKAVESVARQPEAKGDIISTMVLGQAV AESTGIY	<i>Fusobacteriales</i>
<i>Desulfatibacillum</i>	EGMAAAKACEAIGRNPK EAGLLTRTMLVGGAVSEST GIY	<i>Deltaproteobacteria</i>

	...35...40...45...50...55...60...65....	
<i>Chromobacterium viola</i>	FAILGGKFLESSARQPEMIPVLQTKLFI IAGLLDAISMI	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Laribacter hongkongensis</i>	FGILGGKFLESSARQPEMIPVLQTKLFI IAGLLDAISMI	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Dechloromonas aromatica</i>	FGILGGRFLEGAARQPEMIPTLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	IGVLGGRFLEGAARQPELIPMLRTQFFIVMGLVDAVPMI	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Shewanella amazonensis</i>	FGLLGGKFLEGAARQPEMAPMLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Shewanella benthica</i>	FGLLGGKFLEGAARQPEMAPMLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Shewanella denitrificans</i>	FGLLGGKFLEGAARQPEMAPMLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Shewanella frigidimarina</i>	FGLLGGKFLEGAARQPEMAPMLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Shewanella oneidensis</i>	FGLLGGKFLEGAARQPEMAPMLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Shewanella sp.</i>	FAILGGKFLEASARQPELAPALQIKMFIVAGLLDAISMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Tolomonas auensis</i>	IGVLGGRFLEGAARQPDLLPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPTLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Candidatus Blochmannia</i>	IGILGSKFLEGAARQPDLIPLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Candidatus Hamiltonella</i>	IGILGGKFLEGAARQPELIPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Citrobacter youngae</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFVVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFVVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Escherichia coli</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Escherichia coli</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Pantoea sp.</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFVVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Pectobacterium</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Photobacterium angustum</i>	IGNLAGKYLEGVARQPDLTPLMRQFFIMMGLVDAVPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Vibrio splendidus</i>	IGNLAGKYLEGVARQPDLTPLMRQFFIMMGLVDAVPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IGILGGKFLEGAARQPDLIPLLRQFFIVMGLVDAIPMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Reinekeia blandensis</i>	VGLLGSKLLESTARQPELGPMQLTKFFIVAGLLDAIPII	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Thioalkalivibrio sp.</i>	FGLLGGRFLEGAARQPEMVPMLQVKMFIVAGLLDAVTMI	<i>Gammaproteobacteria</i>
	...35...40...45...50...55...60...65....	
<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	QGIAGAKAVEAVGRNPEAQKEIFKTLFSSAIAETSAY	<i>Mollicutes</i>
<i>Mycoplasma</i>	QGYAAGKACDAIARNPEAQKQVFRVLVIGTAISETSSII	<i>Mollicutes</i>
<i>Mycoplasma synoviae</i>	QGYAAGKTVEAVGRNPEMISKIRATFIIGAGIAETASII	<i>Mollicutes</i>
<i>Pavlova lutheri</i>	QGSAAQALEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Pavlovales</i>
<i>Aureococcus</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEVENQIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Pelagophyceae</i>
<i>Aureoumbra lagunensis</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEVENKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Pelagophyceae</i>
<i>Phaeodactylum</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAENKIRGVLLSLAFMEALTIY	<i>Bacillariophyta</i>
<i>Micromonas sp.</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Chlorophyta</i>
<i>Monomastix sp.</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Chlorophyta</i>
<i>Oocystis solitaria</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGALLSLAFMESLTIY	<i>Chlorophyta</i>
<i>Ostreococcus tauri</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Chlorophyta</i>
<i>Heterosigma akashiwo</i>	QGNAAGQAVEGIARQPEAENKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Raphidophyceae</i>
<i>Alsophila spinulosa</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Angiopteris evecata</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Atropa belladonna</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Ceratophyllum demersum</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Chara vulgaris</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Chlorokybus atrophyticus</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Cicer arietinum</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEDKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Cryptomeria japonica</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>
<i>Cuscuta gronovii</i>	QGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIY	<i>Streptophyta</i>

* Die Nummerierung der Aminosäuren orientiert sich an der Sekundärstruktur der c-Untereinheit der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *I. tartaricus*. Die Auswahl der Organismen erfolgte willkürlich durch Datenbanksuche (NCBI, die ersten 100 Treffer).

Die untersuchten *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, wie z.B. *E. coli* besitzen im Gegensatz dazu ein Bindemotiv, welches nur eine geladene Aminosäure, Aspartat, enthält. Dieses ist allein für die Ionenkoordination verantwortlich. Das deutet darauf hin, dass *c*-Untereinheiten, welche ein D (Aspartat) zur Ionenkoordination nutzen, nur in H^+ -getriebenen ATP-Synthasen vorkommen. In der Tat ist für keines dieser Enzyme bisher eine Na^+ getriebene ATP-Hydrolyse oder -Synthese gezeigt worden. Es ist allerdings auch zu beachten, dass bei H^+ -getriebenen Enzymen lediglich eine Protonierung des Carboxylates stattfindet (Pogoryelov *et al.*, 2009). Der strukturell benötigte Raum zwischen den *c*-Untereinheiten ist in diesem Fall sehr gering, wohingegen bei Na^+ -Koordination Raum für das größere Ion und noch ein Wassermolekül zwischen zwei *c*-Untereinheiten vorhanden sein muss (Meier *et al.*, 2009). Ist der strukturelle Abstand zwischen den *c*-Untereinheiten sehr gering, so könnte dies trotz des Vorhandenseins aller für die Na^+ -Koordination benötigten Aminosäuren eine Na^+ -Koordination verhindern.

Die Sequenzvergleiche zeigten auch weitere F_1F_0 -ATP-Synthasen, die wie *A. woodii* ein Gen für V-Typ-*c*-Untereinheiten enthalten: *N. thermophilus* und *A. metalliredigens* und *Epulopiscium sp.* Vergleicht man die Sekundärstrukturen dieser vier Organismen, so fällt auf, dass sie im Bereich der Ionenbindestelle 100% homolog sind. Ihre Sekundärstruktur beinhaltet ebenfalls alle für die Na^+ -Ionenkoordination typischen Aminosäuren an den vorhergesagten Positionen (Abb. 53). Auch im zwischen der ersten und zweiten transmembranen Helix der größeren *c*₁-Untereinheiten findet sich dieses klassische Bindemotiv.

Positon (nach <i>I. tartaricus</i>):	30...35...40...45... 50...55...60...65...70...
A <i>Ilyobacter tartaricus</i>	--QGYAAGKAVESVARQPEA-KGDIISTMVLGQAVAE STGIY ---
<i>Paracoccus modestum</i>	--QGYAAGKAVESVARQPEA-KGDIISTMVLGQAVAE STGIY ---
<i>Clostridium paradoxum</i>	--QGYAAGKAVESVARQPEA-KGDIISTMVLGQAVAE STGIY ---
B <i>Acetobacterium woodii c₂</i>	--QGFAAGKGAEAVGRQPEA-QSDIIRTMLLGAAVA ETTGIY ---
<i>Epulopiscium sp. c₂</i>	--QGYAAGKGAEAVGRQPEA-QSDVVRTMLLGAAVA ETTGIY ---
<i>Alkaliphilus metalliredigens c₂</i>	--QGYAAGKGAEVGRQPEA-QGDIVRTMLLGAAVA ETTGIY ---
C <i>Alkaliphilus metalliredigens c₁</i>	--QGFAAGKGAEAAASLNPKS-AKSASVMMLLGAAVA ETSGIF ---
<i>Natranaerobius thermophilus c₁</i>	--QGFAAGKGAEAVGVTNPKR-GRQVTVVMLLGAAVA ETSGIF ---
<i>Acetobacterium woodii c₁</i>	--QGFAAGKGAEAVGKNPTK-SNDIVMIMMLLGAAVA ETSGIF ---
<i>Epulopiscium sp. c₁</i>	--QGFAAGKAAEAMGKNPEHGGKPATLVMLLGAAVA ETSGIF ---

Abb. 53: Ausschnitt aus den Sekundärstrukturen (aus NCBI, Zugangsnummer siehe Anhang) der *c*-Untereinheiten der F-Typ-ATP-Synthasen verschiedener Organismen. Die konservierten Aminosäuren der Ionenbindestelle sind grün hinterlegt. Ein Pfeil markiert das geladene Glutamat. Bei den *c₁*-Untereinheiten (C) ist nur die vordere Ionenbindestelle zwischen Helix 1 und 2 gezeigt. Die hintere Ionenbindestelle zwischen Helix 3 und 4 ist in Abb. 47 zu sehen.

Zwischen Helix drei und vier dagegen zeigen alle bekannten Organismen in der *c₁* Untereinheit eine veränderte Sequenz. Das Glutamat ist durch ein Glutamin ersetzt (Abb 54).

Positon (nach <i>I. tartaricus</i>):	30...35...40...45...50...55...60...65...70...
<i>Ilyobacter tartaricus_b</i>	--QGYAAGKAVESVARQPEAKGDIISTMVLGQAVAE STGIY ---
<i>Alkaliphilus metalliredigens c_{1b}</i>	--QGYAAGKGTEMVVGKRPQYQPMIVRTMFLGQAV AQTTGIY ---
<i>Natranaerobius thermophilus c_{1b}</i>	--QGYAAGKGAETVGVREPHHGNIKVMMLLGQAV GQTTGIY ---
<i>Epulopiscium sp. c_{1b}</i>	--QGYAAGKAAEAVGKRPKLQSAIVRTMLLGQAV AQTTGIY ---
<i>Acetobacterium woodii c_{1b}</i>	--QGYAAGKGAEAVGIRPEMKSAILRVMLLGQAV AQTTGIY ---

Abb. 54: Ausschnitt aus den Sekundärstrukturen (aus NCBI, Zugangsnummer siehe Anhang) der *c*-Untereinheiten der F-Typ-ATP-Synthasen verschiedener Organismen. Die konservierten Aminosäuren der Ionenbindestelle sind grün hinterlegt. Ein Pfeil markiert die Position für das essentielle geladene Glutamat.

Interessanterweise findet man bei allen Organismen mit V-typischen *c*-Untereinheiten in der zweiten Ionenbindestelle der *c₁*-Untereinheiten eine Mutation des Glutamates in ein Glutamin, in keinem kommt eine andere Aminosäure an dieser Stelle vor (Abb. 54).

Obwohl die Aminosäuren Glutaminsäure/Glutamat (T-RNA Codons:GAA, GAG) und Glutamin (CAA, CAG) in ihrer Struktur nur in einem Punkt voneinander abweichen, unterscheiden sie sich doch stark in ihren Eigenschaften. Glutaminsäure/Glutamat liegt unter physiologischen Bedingungen meist deprotoniert als Säure (Glutamat) vor. Der Carboxylat-Sauerstoff ist dann negativ geladen und ermöglicht starke ionische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Teilchen. Die funktionelle Gruppe des Glutamin hingegen liegt unter physiologischen Bedingungen als Amin vor und ist lediglich negativ polarisiert. Die resultierenden Wechselwirkungen sind daher erheblich schwächer als beim Glutamat. Der Austausch nur einer Base in der DNA ($G \rightarrow C$) führt also in der zweiten Ionenbindestelle der c_1 -Untereinheit zu einer erheblichen Veränderung in der Fähigkeit zur Koordination von geladenen Teilchen.

Die Ionenbindestelle der $c_{2/3}$ -Untereinheiten weist eine große Homologie zum bekannten Ionenbindemotiv der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *I. tartaricus* auf. Ein aus den Sequenzdaten berechnetes Modell für die Struktur der Ionenbindestelle zwischen zwei $c_{2/3}$ -Untereinheiten zeigt große Ähnlichkeiten mit der Struktur aus *I. tartaricus* (PDB: 1yce, 1yav; Meier 2005) (Abb 55). Obwohl es sich hierbei lediglich um eine Modellstruktur handelt, kann aufgrund der großen Homologie (>98% in der Bindestelle) dieses Modell für die Na^+ -Koordination als wahrscheinlich angenommen werden.

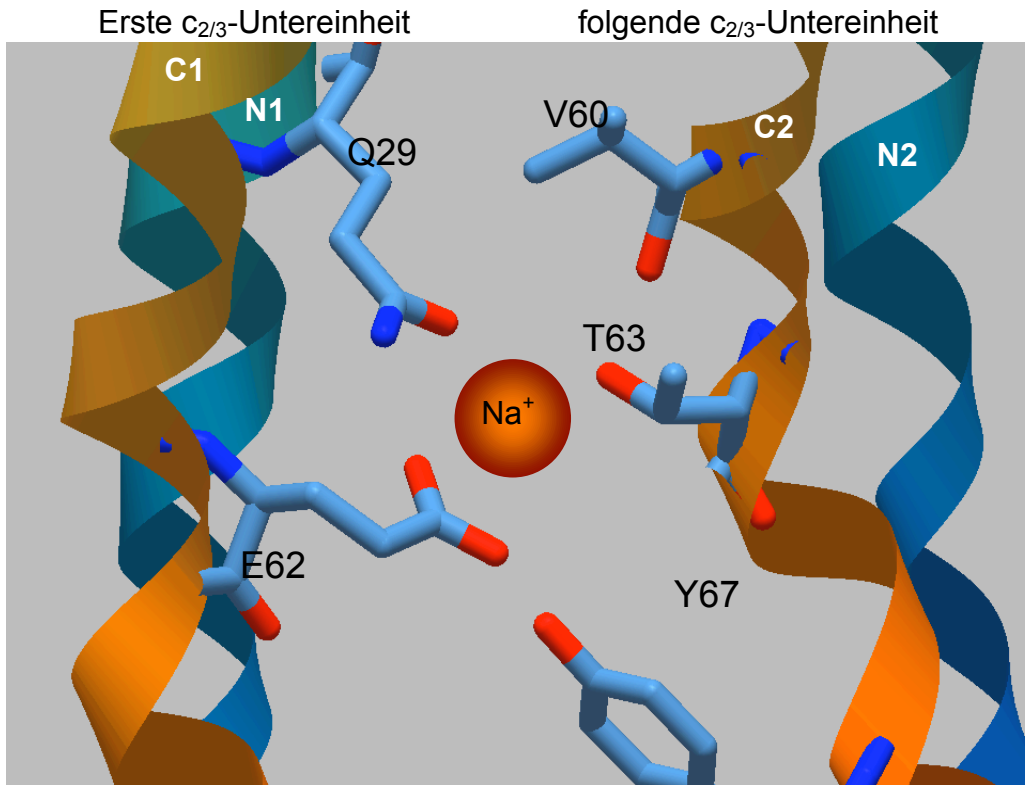


Abb. 55: Modellstruktur für die Ionenkoordination zwischen zwei $c_{2/3}$ -Untereinheiten im c -Ring von *A. woodii*. Die Berechnung erfolgte aus der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Sekundärstruktur mit der Software Swissmodel (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Schwede *et al.*, 2003; Guex *et al.*, 1997; Peitsch *et al.*, 1995). Als Templatestruktur diente 1YCE (Meier *et al.*, 2005a). Die Koordination des Na^+ erfolgte analog zu *I. tartaricus* (Meier *et al.*, 2005a) durch die Aminosäuren Q29 und E62 aus der ersten $c_{2/3}$ -Untereinheit und V60, T63 und Y67 aus der zweiten $c_{2/3}$ -Untereinheit. Die graphische Aufbereitung und Modellierung wurde mit der Software Biodesigner rev. 0.7a durchgeführt.

Die Modellberechnung für die c_1 -Untereinheit gestaltete sich schwieriger. Die gelösten Strukturen der V-Typ-ATPase aus *E. hirae* sind zwar auf den ersten Blick sehr ähnlich, doch fehlt dieser zwischen der ersten und zweiten Helix die Ionenbindestelle (Murata *et al.*, 2005), wogegen in der c_1 -Untereinheit von *A. woodii* die Ionenkoordination zwischen Helix drei und vier durch die Mutation des Glutamates in ein Glutamin verändert ist. In Analogie zur Ionenkoordination zwischen den $c_{2/3}$ -Untereinheiten führt dies dazu, dass zwischen der c_1 -Untereinheit und der rechts benachbarten $c_{2/3}$ -Untereinheit eine veränderte

Ionenkoordination stattfindet. Dies ist im *c*-Ring von *E. hirae* ähnlich, denn durch eine andere Struktur sind Helix drei und vier so angeordnet, dass auch hier die Ionenkoordination in der Untereinheit erfolgt (Murata *et al.*, 2005) (vgl. Abb 5).

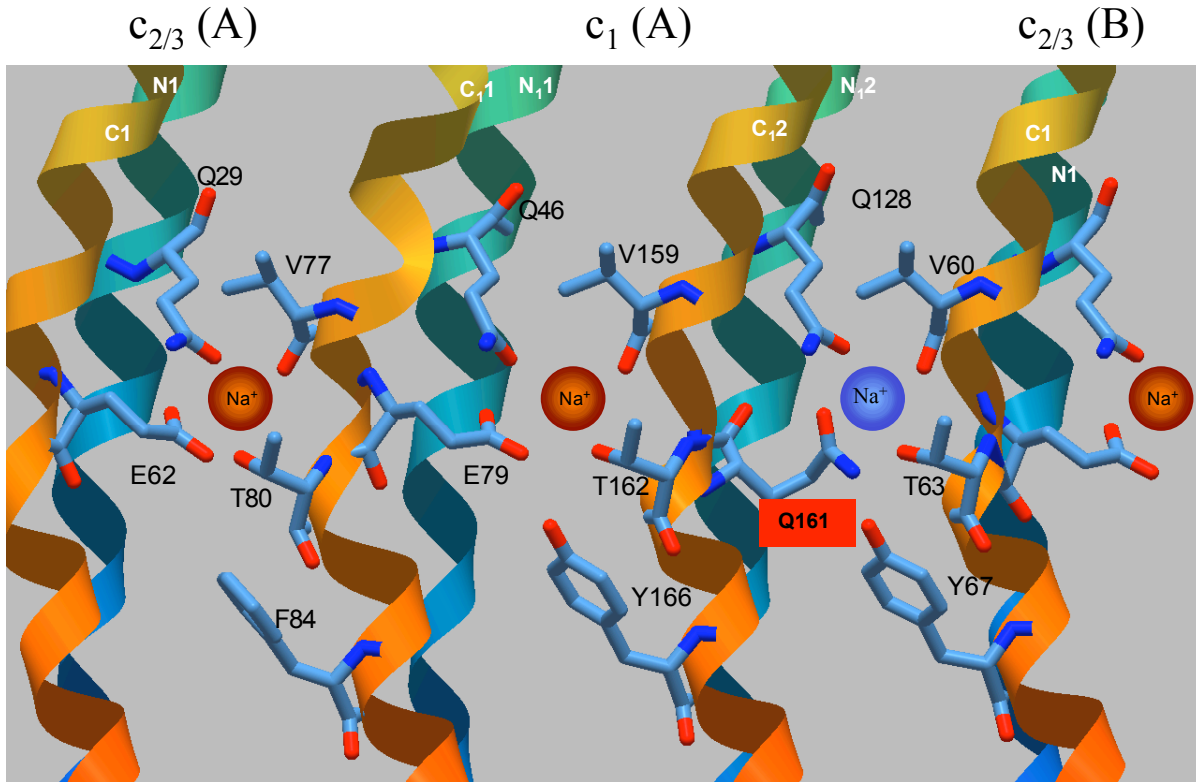


Abb. 56: Modellstruktur für die Na⁺-Koordination zwischen einer c₁-Untereinheit und den beachtlichen c_{2/3}-Untereinheiten im c-Ring von *A. woodii*. Die Berechnung erfolgte aus der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Sekundärstruktur mit der Software Swissmodel (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Schwede *et al.*, 2003; Guex *et al.*, 1997; Peitsch *et al.*, 1995). Als Templatestruktur diente 1YCE (Meier *et al.*, 2005a). Die Ionenkoordination erfolgte analog zu Meier *et al.* (Meier *et al.*, 2005a) durch die Aminosäuren Q29 und E62 aus der ersten c_{2/3}-Untereinheit und V77, T80 und F84 aus der folgenden c₁-Untereinheit. Die Koordination in der c₁-Untereinheit wird durch die Aminosäuren Q46, E79, V159, T162 und Y166 ermöglicht. Zwischen der c₁-Untereinheit und der folgenden c_{2/3}-Untereinheit ist das konservierte Bindemotiv gestört. Das geladene Carboxylat fehlt. Die Ionenkoordination (blaues Na⁺) müsste durch die Aminosäuren Q128 und Q161 (rot hinterlegt) aus c₁ und V60, T63 und Y67 aus der folgenden c_{2/3}-Untereinheit ermöglicht werden. Die graphische Aufbereitung und Modellierung wurde mit der Software Biodesigner rev. 0.7a durchgeführt.

Bezieht man diese Erkenntnisse in die Modellberechnung ein, so lässt sich auch ein realistisches Modell für die c_1 -Untereinheit berechnen. Es wurde zuerst eine Struktur für Helix 1&2 (58% homolog) berechnet (Template: *I. tartaricus*, PDB: 1yce) (Meier *et al.*, 2005a) und anschließend eine Struktur für Helix 3&4 (63% homolog). Beide Strukturen wurden dann in Analogie zur c -Untereinheit von *E. hirae* (PDB 2db4) (Murata *et al.*, 2005) verbunden (Abb. 56). Die Struktur einer negativ polarisierten Tasche bleibt weiterhin erhalten, da die ebenfalls an der Ionenkoordination beteiligten Aminosäuren Q128, V60, T63 und Y67 erhalten bleiben und auch Glutamin (Q161) zumindest eine schwach polarisierte Aminosäure ist (Abb 56).

Umfangreiche Studien zur Ionenkoordination in Proteinen (Harding *et al.*, 2004) haben gezeigt, dass auch ohne geladene Aminosäuren (Carboxylate) eine Koordination von Ionen in Proteinen möglich ist. Es waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 135 Strukturen zur Koordination von Na^+ -Ionen in Proteinen bekannt. In 93 Strukturen wurde die Koordination nur durch Carbonylgruppen der Hauptkette ermöglicht. In 22 Strukturen erfolgte die Bindung einzig durch Asparaginsäure. Eine Koordination von Na^+ nur durch Glutamine erfolgte in 12 Fällen. Die Aminosäuren Serin und Threonin allein koordinierten Na^+ in 6 von 135 Strukturen. Allerdings trifft Harding keine detaillierten Aussagen zur jeweiligen Umgebung der Ionenkoordinationsstellen oder differenziert die untersuchten Proteine. Trotzdem erlauben seine statistischen Untersuchungen die Aussage, dass eine Na^+ -Koordination auch nur durch polare Aminosäuren wie Glutamin, Serin oder Threonin möglich ist.

Würde man eine wenn auch weniger starke Ionenkoordination zwischen einer c_1 - und der nächsten $c_{2/3}$ -Untereinheit als theoretisch möglich annehmen, so könnte die Wahrscheinlichkeit der Koordination von der Na^+ -Konzentration abhängig sein. Bei einer hohen Na^+ -Konzentration würde eine Koordination stattfinden. Dies wäre insbesondere von Vorteil, wenn das Enzym als ATPase Na^+ -Ionen aus der Zelle pumpen möchte. Wird der Gradient größer und die Na^+ -

Konzentration in der Zelle geringer, so könnte das Enzym einen Gang herunterschalten und mit einer freien Ionenkoordinationsstelle gegen einen etwas höheren Gradienten anpumpen. Im Fall der ATP-Synthesereaktion wäre ein solches Verändern der Übersetzung ebenfalls denkbar, um leichte Schwankungen im Membranpotential zu kompensieren.

Gegen die These einer lediglich schwächeren Ionenbindung sprechen Mutationsstudien an der H^+ -ATP-Synthase aus *E. coli* (Gumbiowski *et al.*, 2002). Hier führte eine Mutation des Aspartat-61 zu einem Asparagin in der c-Untereinheit zur Unfähigkeit des Enzyms ATP zu synthetisieren. Das System war noch in der Lage ATP zu hydrolysieren, verlor jedoch seine Fähigkeit zum Pumpen von Protonen (Fillingame *et al.*, 2002; Fillingame *et al.*, 2003). Allerdings ist zu bedenken, dass neueste Strukturdaten zeigen, dass im Falle des c-Ringes der H^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase von *S. platensis* keine Ionenkoordination im eigentlichen Sinne stattfindet (Abb. 57), sondern das deprotonierte Glutamat zuerst protoniert wird und nach der Rotation wieder deprotoniert wird.

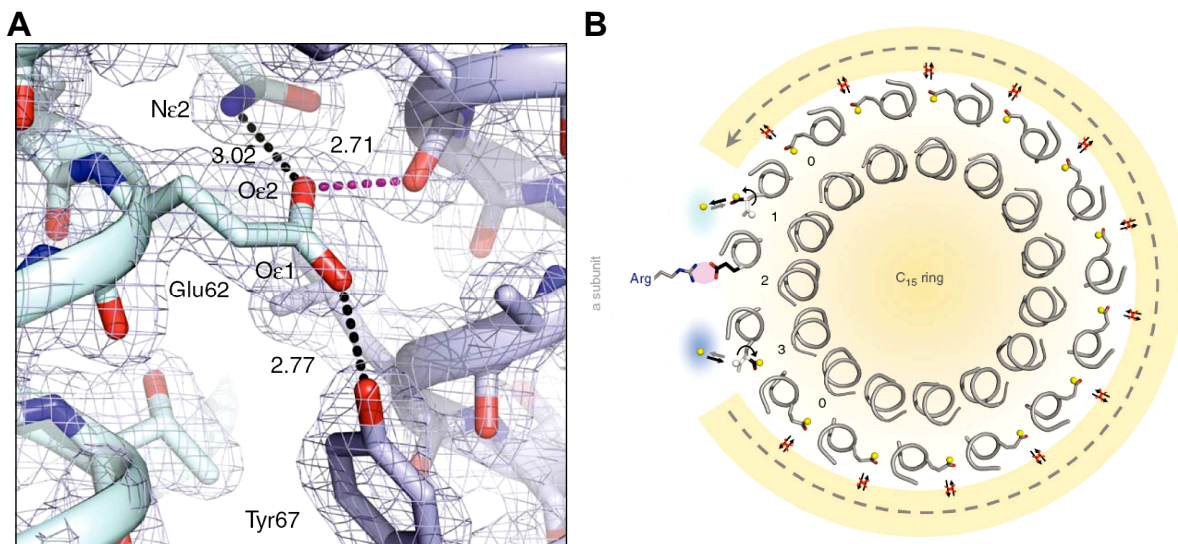


Abb. 57: Struktur der H^+ -Bindestelle im c-Ring der ATP-Synthase aus *S. platensis* (A), Modellvorstellung für die Funktion der H^+ -Koordination und Ringrotation in *S. platensis* (Pogoryelov *et al.*, 2009).

Das Fehlen des Carboxylates wirkt sich daher für H^+ - F_1F_0 -ATP-Synthasen letal aus, wohingegen bei der ionischen Koordination des Na^+ die Bindung in einer polaren Tasche mit insgesamt 7 Aminosäuren erfolgt. In dieser polaren Umgebung könnte das Fehlen eines Carboxylates durch die anderen Liganden kompensiert werden und so eine schwächere Bindung ermöglichen.

4.5. Modellvorstellungen zur Funktion der F_0 -Untereinheit

An der Ionentranslokation ist neben dem c -Ring auch noch maßgebend die Untereinheit a beteiligt. Leider existieren keine hochauflösenden Strukturen der a -Untereinheit, jedoch konnte durch Mutagenesestudien gezeigt werden, dass ein zentral sitzendes Arginin essentiell für die Funktion der Untereinheit ist (Valiyaveetil und Fillingame, 1997; Vorburger *et al.*, 2008).

Es existieren mehrere Modelle für die Funktionsweise der F_0 -Untereinheit, die zwei favorisierten sind das Modell von Junge (Junge *et al.*, 1997) und das Modell von Dimroth (Dimroth *et al.*, 1998). Das Modell von Junge (Junge *et al.*, 1997; Junge *et al.*, 2009) orientiert sich an der Protonentranslokation unter der Annahme von drei Eigenschaften des F_0 -Komplexes (vgl. Abb 58). Ein elektrostatischer Zwang verhindert, dass das Carboxylat (D61) der c -Untereinheit unprotoniert ist. Grund hierfür ist die Lage des Carboxylates in der hydrophoben Umgebung in der Mitte der Membran. Erst wenn dieses Carboxylat durch die Rotation des c -Ringes in Interaktion mit einer hydrophilen Region der a -Untereinheit in Wechselwirkung tritt, ist eine Deprotonierung möglich. Die Untereinheit a besitzt zwei Zugangskanäle, einen vom Cytoplasma aus zugänglichen und einen, der vom Periplasma aus zugänglich ist. Beide reichen so weit in die Membran hinein, dass Ionen in diesen Kanälen mit den Carboxylaten des c -Rings interagieren können. Drittens unterliegt das c -Oligomer unter dem Einfluss von Stößen aus der benachbarten Lipid- und Wasserphase der Brown'schen Molekularbewegung relativ zur Untereinheit a . Diese Bewegung bildet die Grundlage für eine gerichtete Rotation auf der Basis der beiden erstgenannten Eigenschaften. Da eine in ihrem unprotonierten Zustand negativ geladene c -

Untereinheit aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen den Interaktionsbereich zur Untereinheit *a* nicht verlassen kann, bewegen sich die Fluktuationen des *c*-Ringes in sehr engem Rahmen. Nur wenn der elektrostatische Zwang durch die Bindung eines Protons entfällt, kann sich das betreffende Proteolipid von der Untereinheit *a* entfernen und sich zusammen mit dem *c*-Ring in die entsprechende Richtung drehen. Die Drehrichtung wird allein dadurch bestimmt, dass die Protonierungswahrscheinlichkeit vom Periplasma her aufgrund des höheren Protonenpotentials deutlich höher ist.

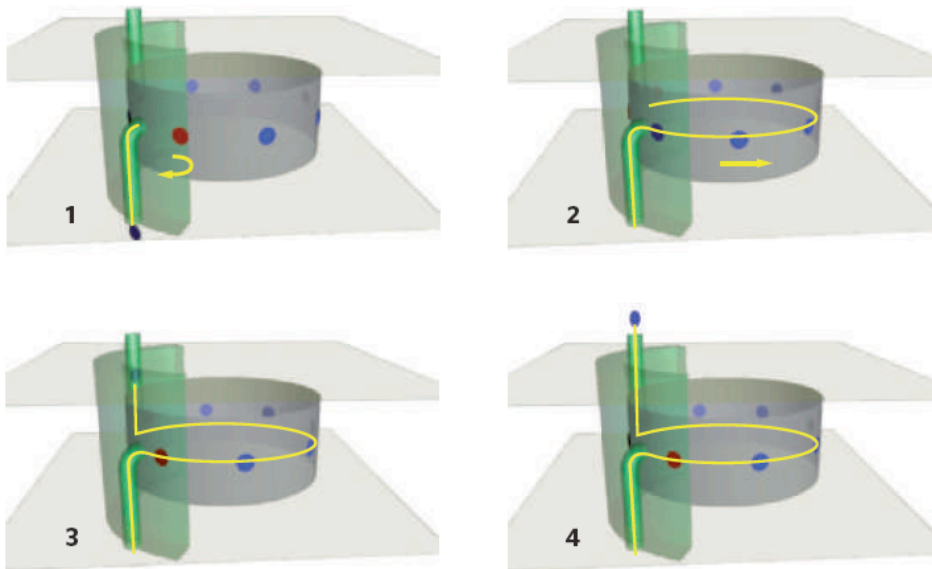


Abb 58 Modell der Protonentranslokation (Junge *et al.*, 2009).
Für Erläuterungen siehe Text.

Anders ausgedrückt, zählt und vergleicht die F_0 -Untereinheit die Anzahl der Protonen auf beiden Seiten der Membran (Junge *et al.*, 1997). Dabei werden Konzentrations- und Potentialunterschiede als gleichwertig betrachtet, maßgeblich ist $\Delta\mu H^+$.

Das Modell von Dimroth (Dimroth *et al.*, 1998) dagegen favorisiert das Membranpotential $\Delta\Psi$ als treibende Kraft für die Rotation. Anfangs wurde von Dimroth ein Modell mit nur einem Zugangskanal in der Untereinheit *a*, welcher vom Periplasma aus über die Na^+ -Bindungstasche in der Untereinheit *c* bis ins Cytoplasma reicht. Ein zentrales Arginin in der Mitte des Kanals verhindert den

direkten Durchfluss der Ionen. Durch die Asymmetrie in der Untereinheit *a*, welche mit einem Teil des *c*-Oligomers in Kontakt steht, wird die Drehrichtung des *c*-Oligomers bestimmt. Ein hydrophiler Durchgang, der in Abb. 59 unterhalb des Restes *a*R227 (homolog zu *a*R210 in *E. coli*) dargestellt ist, erlaubt es der geladenen Carboxylgruppe der Na^+ -Bindungstasche, in die Grenzfläche zwischen den Untereinheiten *c* und *a* einzutreten, um dort über einen Kanal in der Untereinheit *a* aus dem Periplasma heraus mit Na^+ neutralisiert zu werden. Dadurch wird eine weitere Bewegung nach links über einen hydrophoben Abschnitt in der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten *a* und *c* ermöglicht. Nachdem die Untereinheit *c* die Grenzfläche zur Untereinheit *a* verlassen hat, dissoziiert das Na^+ wieder aus seiner Bindungstasche, da es jetzt wieder direkt mit dem Cytoplasma im Gleichgewicht steht, wo die Na^+ -Konzentration relativ niedrig ist. Dadurch erhält die Na^+ -Bindungstasche wieder ihre negative Ladung und eine Rückdrehung ist nicht mehr möglich.

Neue Publikationen aus der Arbeitsgruppe von Dimroth modifizieren dieses Modell (von Ballmoos *et al.*, 2008a; von Ballmoos *et al.*, 2009; Vorburger *et al.*, 2008). Es wird ein Kanal durch die *a*-Untereinheit angenommen, welcher aus zwei Halbkanälen und einer horizontalen Verbindung besteht (Abb. 59), in welcher ein Arginin hin- und herpendeln kann. Das Arginin in der *a*-Untereinheit sorgt dafür, dass eine frei gewordene Ionenbindestelle im *c*-Ring nur von der periplasmatischen Seite aus wieder mit einem Ion besetzt wird, indem es die Ionenbindestelle neutralisiert, bis diese durch die Rotation des Ringes wieder in den periplasmatischen Halbkanal gelangt. Das gebundene Ion müsste dann eine vollständige Rotation mit dem Ring unternehmen, um von einem Zugangskanal zum nächsten zu kommen.

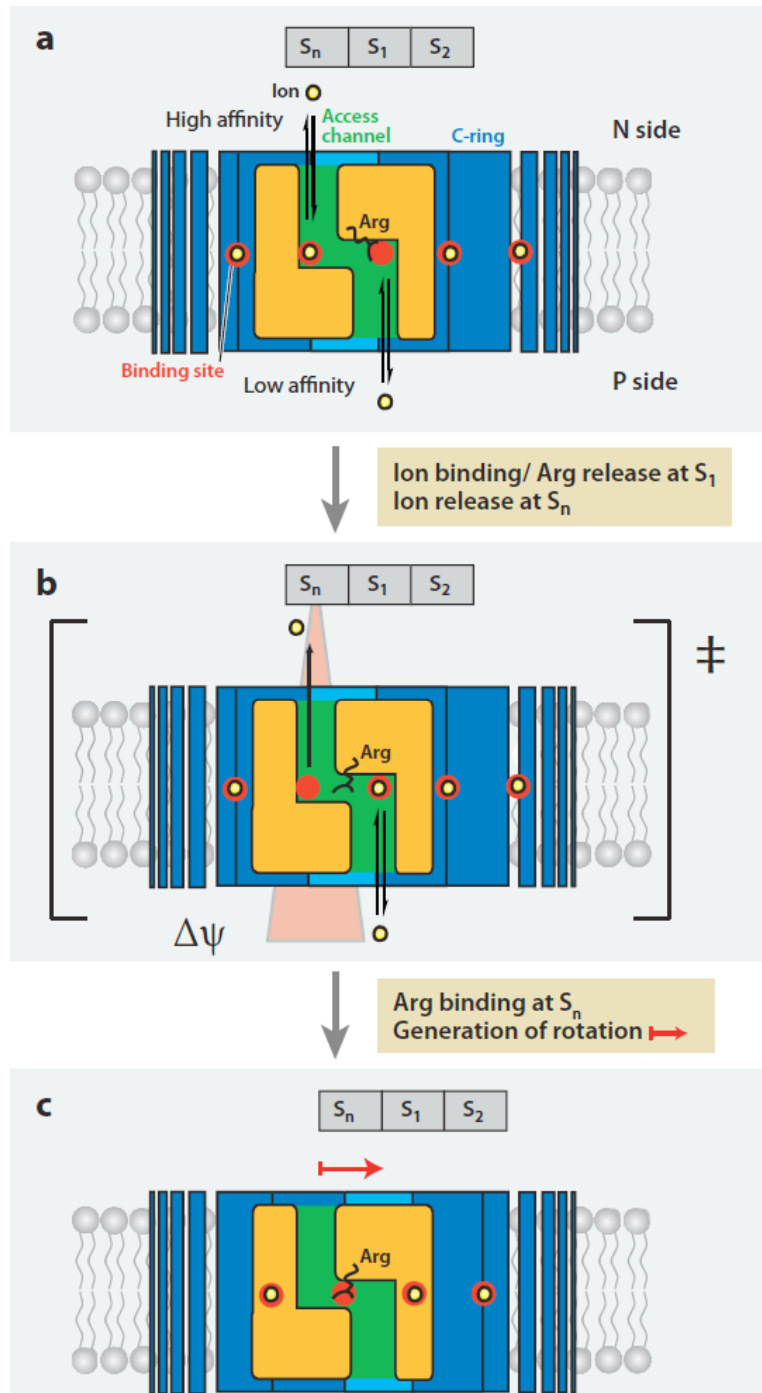


Abb. 59 Modell der Na⁺-Translokation in *I. tartaricus*, (von Ballmoos *et al.*, 2009). Für Erläuterungen siehe Text.

Beide Modelle orientieren sich nur an den 8-kDa-Untereinheiten der F-Typ-ATP-Synthasen. Wie verhält es sich aber bei V-Typ-ATPasen oder den zur ATP-Synthese befähigten A-Typ-ATP-Synthasen? Zumindest unter einem sehr hohen

artifiziellen Potential waren V-Typ-ATPasen zur Synthese von ATP zu zwingen und die A-Typ-ATP-Synthase aus *P. furiosus* (Pisa *et al.*, 2007) sollte zumindest nach ihrem Stoffwechsel und der bestimmten Ringgröße (Vonck *et al.*, 2009) zur ATP-Synthese befähigt sein. Nach dem Modell von Junge ist das Potential also der Ionendruck, nur verantwortlich für die Geschwindigkeit, mit der die Ionen in die Bindungstaschen strömen, für die Rotation essentiell ist aber die Abstoßung einer positiv geladenen Region in der *a*-Untereinheit und der neutralisierten Bindetasche einer *c*-Untereinheit bzw. die Anziehung der leeren negativ geladenen Bindestelle der folgenden *c*-Untereinheit durch ein Arginin der *a*-Untereinheit. Eine Erhöhung des Membranpotentials ohne Veränderung des Ionenpotentials dürfte nach dem Modell von Junge dann keine Einfluss auf die Fähigkeit zur ATP-Synthese haben. Was aber der Fall ist (Dimroth *et al.*, 2000; Turina und Melandri, 2002). Dies zeigt, dass das Modell von Junge zumindest nicht auf Na⁺-getriebene ATP-Synthasen, bzw. nur auf H⁺-F₁F₀-ATP-Synthasen mit F-typischen 8-kDa-*c*-Untereinheiten anwendbar ist.

Bei 18 kDa großen Untereinheiten mit nur einer Ionenbindestelle ist der Abstand zwischen den einzelnen Ionenbindestellen doppelt so groß. Da die ionische bzw. elektrostatische Wechselwirkung mit dem Quadrat des Abstandes abnimmt, sollte dies gravierende Folgen für die Funktion des Enzyms haben. Die entstehenden Kräfte müssten erheblich geringer sein, so dass keine ATP-Synthese mehr zu erwarten wäre. Die Lösung für das Problem des größeren Abstandes zwischen den gebundenen Ionen wäre eine Veränderung in der *a*-Untereinheit, so müsste lediglich der Abstand zwischen den beiden Halbkanälen dem Abstand der Ionenbindestellen angepasst sein, um bei entsprechendem Ringdurchmesser wieder ATP-Synthese zu ermöglichen.

Maßgeblich für die Funktion des Modells nach Dimroth ist weniger die Konzentrationsdifferenz des von der ATP-Synthase verwendeten Ions, sondern vielmehr das elektrochemische Potential $\Delta\Psi$. Dies wird auch die Ergebnisse der Versuche zur ATP-Synthese bei der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase von *A. woodii*

unterstützen, da auch hier ein ausreichendes $\Delta\Psi$ ohne großes $\Delta p\text{Na}^+$ zur Synthese von ATP ausreichend war (diese Arbeit).

Auch wäre nach beiden Modellen ein Enzym mit einem *c*-Ring wie *A. woodii* mit einer fehlenden Ionenbindestelle nicht zur Synthese von ATP fähig, da an einer Stelle eine Komponente für den Antriebsrichtungsimpuls fehlt. Man könnte nun argumentieren, dass durch die Trägheit des Moleküls der Ring diese fehlende Position einfach überspringe – ähnlich einer Schwungscheibe; jedoch scheint dies energetisch nicht sehr sinnvoll und es würde auch bedeuten, dass ein stehendes Enzym, welches zufällig mit der fehlenden Ionenbindestelle an der *a*-Untereinheit zur Ruhe kommt, nicht mehr anlaufen könnte. Des Weiteren gehen beide Modelle davon aus, dass eine nicht neutralisierte Bindetasche nicht in die Lipidphase eintreten kann. Die zweite Bindetasche der *c*₁-Untereinheit der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase von *A. woodii* ist von dieser Annahme aber weniger betroffen, da sie kein Carboxylat enthält. Die durch das Fehlen des Carboxylates bedingte schwächere Polarisierung der Bindetasche würde es der Untereinheit ermöglichen, auch ohne ein koordiniertes Ion, welches die Ladung der Bindetasche neutralisiert, in die Lipidphase einzutreten.

Aus diesen Daten lässt sich ein Arbeitsmodell für die Funktion der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* entwickeln, das es dem Bakterium erlaubt, ohne Veränderung der Untereinheitenstöchiometrie im *c*-Ring das Verhältnis der translozierten Ionen pro ATP zu variieren. Während der ATP-Synthese kann ein elektrochemischer Na^+ -Gradient zur Synthese von ATP genutzt werden. Dieser Gradient sorgt dafür, dass auch in der zweiten, schwächer polarisierten Ionenbindestelle der *c*₁-Untereinheit ein Na^+ -Ion gebunden wird. Bei der ATP-Synthese sind also alle 11 Bindestellen besetzt. Funktioniert die Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* dagegen als Ionenpumpe, so führt das nun umgekehrte Potential dazu, dass in der zweiten, schwächer polarisierten Ionenbindestelle der *c*₁-Untereinheit keine Na^+ -Bindung stattfindet. Dies würde es dem Enzym ermöglichen, gegen einen höheren Gradienten anzupumpen, da das Verhältnis an

einer Position des Ringes nicht 3,6 Na⁺ pro ATP, sondern nur 2.6 Na⁺ pro ATP beträgt, was zu einem Wachstumsvorteil bei der Anpassung an anaerobe Habitate mit verschiedenen Na⁺-Konzentrationen führen könnte. In der Tat kommen die Bakterien mit c₁-Untereinheiten auch in solchen Habitaten vor. *A. woodii* ist in der Lage, sowohl in marinen Sedimenten mit relativ hoher Na⁺-Konzentration als auch in Süßwasser-Sedimenten autotroph zu wachsen (Balch *et al.*, 1977). *N. thermophilus* wächst ebenfalls autotroph bei Na⁺-Konzentrationen von 3,1 bis 4,9 M (Mesbah *et al.*, 2007), also bei Konzentrationsdifferenzen von über 1,8 M. *A. metalliredigens* wächst autotroph bei Na⁺-Konzentrationen von 0 bis 80 g/l (Ye *et al.*, 2004), muss also ebenfalls über eine Strategie zur Anpassung an variierende Na⁺-Konzentrationen verfügen. Diese Gemeinsamkeiten und die Tatsache, dass die phylogenetische Analyse (Abb. 47) der c-Untereinheiten nicht auf eine Evolution hin zu V-typischen c-Untereinheiten, sondern vielmehr auf eine eigenständige Anpassung hindeutet, erlauben den Schluss, dass es sich bei der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* um eine neue Untergruppe der bakteriellen F-Typ-ATP-Synthasen handelt. Neben den bakteriellen und den mitochondrialen F-Typ-ATP-Synthasen könnten die Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *N. thermophilus* und *A. metalliredigens* eine adaptive Na⁺-F-Typ-ATP-Synthase darstellen, welche im Gegensatz zu den bakteriellen F-Typ-ATP-Synthasen 18-kDa-c-Untereinheiten und somit Na⁺-Konzentration-abhängige Ionenbindestellen besitzt.

4.6. Ausblick

Der heterooligomere c-Ring der Na⁺-F₁F₀-ATP-Synthase bietet interessante Einblicke in die Funktionsweise der ATP-Synthasen. Durch das Vorhandensein einer eher V-typischen c-Untereinheit zwingt er uns, die bekannten Modelle für die Funktion der F₀-Domäne zu modifizieren. Um nun Aussagen über die Funktion des Ringes treffen zu können, wäre es sinnvoll den Ring genetisch manipulieren zu können. Da dies *A. woodii* nicht möglich ist, erscheint es am einfachsten, das komplette Operon der ATP-Synthase mittels eines geeigneten Plasmides in einen ATP-Synthase-negativen Stamm von *E. coli* zu transferieren. Hier wären

genetische Manipulationen möglich. Man könnte die Gene für die $c_{2/3}$ -Untereinheit entfernen und untersuchen, ob sich ein Ring nur aus c_1 -Untereinheiten bildet und ob dieses Enzym dann noch zur Synthese von ATP fähig ist.

Um die Hypothese der adaptiven Na^+ -F-Typ-ATP-Synthase zu verifizieren, müssten weitere Bakterien untersucht werden, die autotroph wachsen können und unter wechselnden Na^+ -Konzentrationen Na^+ -Gradient-getriebene ATP-Synthase betreiben.

Um zu ergründen, ob trotz des fehlenden Carboxylates in der c_1 -Untereinheit eine Ionenkoordination möglich ist, ist eine hochauflösende 3D-Struktur des c -Ringes notwendig. Zur Verifizierung des Modells der Na^+ -Konzentrations-abhängigen Na^+ -Bindung müssten hochauflösende 3D-Strukturen des c -Ringes der Na^+ - F_1F_0 -ATP-Synthase aus *A. woodii* in Abhängigkeit der Na^+ -Konzentration analysiert werden. Erste Vorarbeiten zur Erzeugung hochauflösender Kristalle wurden bereits in dieser Arbeit unternommen. Ein etabliertes Verfahren zur Erzeugung von 3D-Kristallen liegt vor. Allerdings zeigten diese bisher nur eine Auflösung im Bereich bis 4.2 Å. In der Literatur sind zwar c -Ring-Strukturen gelöst worden, bei denen die Auflösung mit 3.8 Å nur geringfügig höher war (Vollmar 2009), jedoch ist erst bei einer Auflösung von >2.4 Å eine zuverlässige Unterscheidung von Glutamin und Glutamat sowie eine sichere Detektion des koordinierten Na^+ möglich.

5. Literaturverzeichnis

- Abrahams, J.P., Buchanan, S.K., Vanraaij, M.J., Fearnley, I.M., Leslie, A.G.W. and Walker, J.E. (1996) The structure of bovine F₁-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9420-9424.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. and Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628.
- Altendorf, K., Stalz, W., Greie, J. and Deckers-Hebestreit, G. (2000) Structure and function of the F_o complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *J. Exp. Biol.*, **203**, 19-28.
- Arai, H., Terres, G., Pink, S. and Forgac, M. (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8796-8802.
- Aris, J.P., Klionsky, D.J. and Simoni, R.D. (1985) The F_o subunits of the *Escherichia coli* F₁F_o-ATP synthase are sufficient to form a functional proton pore. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11207-11215.
- Armbrüster, A., Svergun, D.I., Coskun, Ü., Juliano, S., Bailer, S.M. and Grüber, G. (2004) Structural analysis of the stalk subunit V_{map} of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Lett.*, **570**, 119-125.
- Aufurth, S., Madkour, M., Mayer, F. and Müller, V. (1998) Structure of the Na⁺-driven flagellum from the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *FEBS Lett.*, **434**, 325-328.
- Aufurth, S., Schägger, H. and Müller, V. (2000) Identification of subunits *a*, *b*, and *c*₁ from *Acetobacterium woodii* Na⁺-F₁F_o-ATPase. Subunits *c*₁, *c*₂, and *c*₃ constitute a mixed *c*-oligomer. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33297-33301.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S. and Wolfe, R.S. (1977) *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon-dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bact.*, **27**, 355-361.
- Ballhausen, B., Altendorf, K. and Deckers-Hebestreit, G. (2009) Constant c10 ring stoichiometry in the *Escherichia coli* ATP synthase analyzed by cross-linking. *J. Bacteriol.*, **191**, 2400-2404.
- Biegel, E., Schmidt, S. and Müller, V. (2009) Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Environ. Microbiol.*, **11**, 1438-1443.

- Blair, A., Ngo, L., Park, J., Paulsen, I.T. and Saier, M.H. (1996) Phylogenetic analyses of the homologous transmembrane channel-forming proteins of the F_0F_1 -ATPases of bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Microbiology - UK*, **142**, 17-32.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-98.
- Boekema, E.J. and Bottcher, B. (1992) The Structure of ATP Synthase from Chloroplasts - Conformational Changes of CF_1 Studied by Electron Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 131-143.
- Boekema, E.J., van Breemen, J.F., Brisson, A., Ubbink-Kok, T., Konings, W.N. and Lolkema, J.S. (1999) Connecting stalks in V-type ATPase. *Nature*, **401**, 37-38.
- Böttcher, B., Lucken, U. and Gräber, P. (1995) The structure of the H^+ -ATPase from chloroplasts by electron cryomicroscopy. *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 780-785.
- Brusilow, W.S.A. (1993) Assembly of the Escherichia-Coli F_1F_0 -ATPase, a large multimeric Membrane-Bound enzyme. *Mol. Microbiol.*, **9**, 419-424.
- Butsch, B.M. and Bachofen, R. (1984) The membrane potential in whole cells of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.*, **138**, 293-298.
- Capaldi, R.A. and Aggeler, R. (2002) Mechanism of the F_1F_0 -type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci*, **27**, 154-160.
- Capaldi, R.A., Aggeler, R., Gogol, E.P. and Wilkens, S. (1992) Structure of the *Escherichia coli* ATP synthase and role of the gamma subunit and epsilon subunit in coupling catalytic site and proton channeling functions. *J. Bioenerg. Biomembrane*, **24**, 435-439.
- Clare, D.K., Orlova, E.V., Finbow, M.A., Harrison, M.A., Findlay, J.B. and Saibil, H.R. (2006) An expanded and flexible form of the vacuolar ATPase membrane sector. *Structure*, **14**, 1149-1156.
- CollaborativeComputationalProject. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **50**, 760-763.
- Cook, G.M., Keis, S., Morgan, H.W., von Ballmoos, C., Matthey, U., Kaim, G. and Dimroth, P. (2003) Purification and biochemical characterization of the F_1F_0 -ATP synthase from thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* strain TA2.A1. *J. Bacterio.*, **185**, 4442-4449.

- Coskun, Ü., Chaban, Y.L., Lingl, A., Müller, V., Keegstra, W., Boekema, E.J. and Grüber, G. (2004) Structure and subunit arrangement of the A-type ATP synthase complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii* visualized by electron microscopy. *J. Biol. Chem.*, **279**, 38644-38648.
- Cross, R.L. (1981) The mechanism and regulation of ATP synthesis by F₁-ATPases. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 681-714.
- Cross, R.L. and Duncan, T.M. (1996) Subunit rotation in F₀F₁-ATP synthases as a means of coupling proton transport through F₀ to the binding changes in F₁. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 403-408.
- Cross, R.L. and Müller, V. (2004) The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP stoichiometry. *FEBS Lett.*, **576**, 1-4.
- Cross, R.L. and Taiz, L. (1990) Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of F₀F₁ ATPases and synthases. *FEBS Lett.*, **259**, 22227-22229.
- Crowther, R.A., Henderson, R. and Smith, J.M. (1996) MRC image processing programs. *J. Struct. Biol.*, **116**, 9-16.
- Das, A. and Ljungdahl, L.G. (1997) Composition and primary structure of the F₁F₀ ATP synthase from the obligately anaerobic bacterium *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.*, **179**, 3746-3755.
- Deckers-Hebestreit, G. and Altendorf, K. (1996) The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 791-824.
- Del Rizzo, P.A., Bi, Y., Dunn, S.D. and Shilton, B.H. (2002) The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase: Structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry*, **41**, 6875-6884.
- Diekert, G. and Wohlfarth, G. (1994) Metabolism of homoacetogens. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.*, **66**, 209-221.
- Diez, M., Zimmermann, B., Borsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekyan, S., Kudryavtsev, V., Seidel, C.A. and Graber, P. (2004) Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 135-141.

- Dimroth, P., Kaim, G. and Matthey, U. (1998) The motor of the ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 87-92.
- Dimroth, P., Kaim, G. and Matthey, U. (2000) Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. *J. Exp. Biol.*, **203 Pt 1**, 51-59.
- Dimroth, P., Laubinger, W., Kluge, C., Kaim, G., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1992) Sodium-Translocating adenosinetriphosphatase of *Propionigenium modestum*. In Scarpa, A., Carafoli, E. and Papa, S. (eds.), *Ion - Motive ATPases : Structure, Function, and Regulation*. New York Acad Sciences, 2 East 63RD St, New York, NY 10021, **Vol. 671**, pp. 310-322.
- Dimroth, P. and von Ballmoos, C. (2008) ATP synthesis by decarboxylation phosphorylation. *Results. Probl. Cell. Diffet.*, **45**, 153-184.
- Dimroth, P., von Ballmoos, C. and Meier, T. (2006) Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. *EMBO Rep.*, **7**, 276-282.
- Dimroth, P., von Ballmoos, C., Meier, T. and Kaim, G. (2003) Electrical power fuels rotary ATP synthase. *Structure*, **11**, 1469-1473.
- Dmitriev, O., Jones, P.C., Jiang, W. and Fillingame, R.H. (1999) Structure of the membrane domain of subunit *b* of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15598-15604.
- Drake, H.L., Hu, S.I. and Wood, H.G. (1981) Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate. *J. Biol. Chem.*, **56**, 11137-11144.
- Edgell, D.R. and Doolittle, W.F. (1997) Archaeobacterial genomics: The complete genome sequence of *Methanococcus jannaschii*. *Bioessays*, **19**, 1-4.
- Feniouk, B.A., Cherepanov, D.A., Junge, W. and Mulkidjanian, A.Y. (1999) ATP-synthase of *Rhodobacter capsulatus*: coupling of proton flow through F₀ to reactions in F₁ under the ATP synthesis and slip conditions. *FEBS Lett.*, **445**, 409-414.
- Ferguson, S.A., Keis, S. and Cook, G.M. (2006) Biochemical and molecular characterization of a Na⁺-translocating F₁F₀-ATPase from the thermoalkaliphilic bacterium *Clostridium paradoxum*. *J. Bacteriol.*, **188**, 5045-5054.
- Fillingame, R.H. (1992) H⁺ transport and coupling by the F₀ sector of the ATP synthase - insights into the molecular mechanism of function. *J. Bioenerg. Biomembrane*, **24**, 485-491.

- Fillingame, R.H., Angevine, C.M. and Dmitriev, O.Y. (2002) Coupling proton movements to c-ring rotation in F₁F₀ ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 29-36.
- Fillingame, R.H. and Dmitriev, O.Y. (2002) Structural model of the transmembrane F₀ rotary sector of H⁺-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking *in situ*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1565**, 232-245.
- Fillingame, R.H., Oldenburg, M. and Fraga, D. (1991) Mutation of Alanine-24 to Serine in Subunit-C of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP Synthase Reduces Reactivity of Aspartyl-61 with Dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20934-20939.
- Finbow, M.E. and Harrison, M.A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.*, **324**, 697-712.
- Forgac, M. (1999) Structure and properties of the vacuolar H⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12951-12954.
- Forgac, M. (2000) Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H⁺-ATPases. *J. Exp. Biol.*, **203**, 71-80.
- Forster, A., Daniel, R. and Müller, V. (1995) The Na⁺-translocating ATPase of *Acetobacterium woodii* is a F₁F₀-type enzyme as deduced from the primary structure of its β , γ and ϵ subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 393-397.
- Fricke, W.F., Seedorf, H., Henne, A., Kruer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G. and Thauer, R.K. (2006) The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J. Bacteriol.*, **188**, 642-658.
- Fritz, M., Klyszejko, A.L., Morgner, N., Vonck, J., Brutschy, B., Müller, D.J., Meier, T. and Müller, V. (2008) An intermediate step in the evolution of ATPases: a hybrid F₀-V₀ rotor in a bacterial Na⁺ F₁F₀ ATP synthase. *Febs J.*, **275**, 1999-2007.
- Fuchs, G. (1986) CO₂ fixation in acetogenic bacteria: variations on a theme. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 181-213.
- Futai, M., Omote, H., Sambongi, Y. and Wada, Y. (2000) Synthase (H⁺ ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 276-288.

- Geerligs, G., Schönheit, P. and Diekert, G. (1989) Sodium dependent acetate formation from CO₂ in *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). *FEMS Microbiol. Lett.*, **57**, 253-258.
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1055-1061.
- Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L. and Fillingame, R.H. (1998) Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₁F₀ATP synthase. *Biochemistry*, **37**, 8817-8824.
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T. and Oshima, T. (1989) Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 6661-6665.
- Gogarten, J.P., Starke, T., Kibak, H., Fishmann, J. and Taiz, L. (1992) Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. *J. Exp. Biol.*, **172**, 137-147.
- Gogarten, J.P. and Taiz, L. (1992) Evolution of proton pumping ATPases - rooting the tree of life. *Photosynth. Res.*, **33**, 137-146.
- Gössner, A., Daniel, S.L. and Drake, H.L. (1994) Acetogenesis coupled to the oxidation of aromatic aldehyde groups. *Arch. Microbiol.*, **161**, 126-131.
- Gottschalk, G. (1989) Bioenergetics of methanogenic and acetogenic bacteria. In Schlegel, H.G. and Bowwien, B. (eds.), *Autotrophic bacteria*. Science Tech Publishers, Madison, pp. 383-396.
- Groth, G. and Pohl, E. (2001) The structure of the chloroplast F₁-ATPase at 3.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **276**, 1345-1352.
- Grüber, G. (2005) Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V₁V₀ ATPases. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 883-885.
- Grüber, G., Svergun, D.I., Coskun, Ü., Lemker, T., Koch, M.H., Schägger, H. and Müller, V. (2001a) Structural insights into the A₁ ATPase from the archaeon, *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry*, **40**, 1890-1896.
- Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R. and Müller, V. (2001b) Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.*, **204**, 2597-2605.
- Hanada, H., Hasebe, M., Moriyama, Y., Maeda, M. and Futai, M. (1991) Molecular Cloning of cDNA encoding the 16kDa Subunit of Vacuolar H⁺-ATPase from Mouse Cerebellum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 1062-1067.

- Hausrath, A.C., Grüber, G., Matthews, B.W. and Capaldi, R.A. (1999) Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia coli* F₁ ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13697-13702.
- Heinonen, J.E. and Lahti, R.J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.*, **113**, 313-317.
- Heise, R., Müller, V. and Gottschalk, G. (1989) Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.*, **171**, 5473-5478.
- Heise, R., Müller, V. and Gottschalk, G. (1992a) Presence of a sodium-translocating ATPase in membrane vesicles of the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 553-557.
- Heise, R., Müller, V. and Gottschalk, G. (1992b) Presence of a sodium-translocating ATPase in membrane vesicles of the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 553-557.
- Heise, R., Müller, V. and Gottschalk, G. (1993) Acetogenesis and ATP synthesis in *Acetobacterium woodii* are coupled via a transmembrane primary sodium ion gradient. *FEMS Microbiol. Lett.*, **112**, 261-268.
- Heise, R., Reidlinger, J., Müller, V. and Gottschalk, G. (1991) A sodium-stimulated ATP synthase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *FEBS Lett.*, **295**, 119-122.
- Hensel, M., Lill, H., Schmid, R., Deckershebestreit, G. and Altendorf, K. (1995) The ATP synthase F₁F₀ of *Streptomyces lividans*: Sequencing of the atp operon and phylogenetic considerations with subunit beta. *Gene*, **152**, 11-17.
- Hermolin, J., Dmitriev, O.Y., Zhang, Y. and Fillingame, R.H. (1999) Defining the domain of binding of F₁ subunit epsilon with the polar loop of F₀ subunit c in the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17011-17016.
- Hilario, E. and Gogarten, J.P. (1993) Horizontal transfer of ATPase genes - the tree of life becomes a net of life. *Biosystems*, **31**, 111-119.
- Hilario, E. and Gogarten, J.P. (1998) The prokaryote-to-eucaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. *J. Mol. Evol.*, **46**, 703-715.
- Hirata, R., Graham, L.A., Takatsuki, A., Stevens, T.H. and Anraku, Y. (1997) VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the

- Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4795-4803.
- Hirata, R., Ohsumk, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. and Anraku, Y. (1990) Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6726-6733.
- Hirata, T., Nakamura, N., Omote, H., Wada, Y. and Futai, M. (2000) Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 386-389.
- Höner zu Bentrup, K., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J.S. and Konings, W.N. (1997) An Na⁺-pumping V₁V₀-ATPase complex in the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. *J. Bacteriol.*, **179**, 1274-1279.
- Hugenholtz, J. and Ljungdahl, L.G. (1990) Metabolism and Energy Generation in Homoacetogenic Clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 383-389.
- Hungate, R.E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York and London., Vol. 3b, pp. 117-132.
- Ihara, K., Abe, T., Sugimura, K.I. and Mukohata, Y. (1992) Halobacterial A-ATP synthase in relation to V-ATPase. *J. Exp. Biol.*, **172**, 475-485.
- Ihara, K., Watanabe, S., Sugimura, K. and Mukohata, Y. (1997) Identification of proteolipid from an extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* as an N',N'-dicyclohexyl-carbodiimide binding subunit of ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **341**, 267-272.
- Inatomi, K.I., Eya, S., Maeda, M. and Futai, M. (1989) Amino acid sequence of the alpha and beta subunits of *Methanosarcina barkeri* ATPase deduced from cloned genes. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10954-10959.
- Ishii, N., Yoshimura, H., Nagayama, K., Kagawa, Y. and Yoshida, M. (1993) 3-Dimensional structure of F1-ATPase of thermophilic bacterium PS3 obtained by electron crystallography. *J. Biochem. Tokyo*, **113**, 245-250.
- Ivey, D.M. and Krulwich, T.A. (1991) Organization and Nucleotide Sequence of the atp Genes Encoding the ATP Synthase from Alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 292-300.
- Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M. and Futai, M. (1991) Mutations in Ser174 and the Glycine-Rich Sequence (Gly149, Gly150, and Thr156) in the beta-Subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16350-16355.

- Iwamoto, A., Oritasaita, Y., Maeda, M. and Futai, M. (1994) N-ethylmaleimide-sensitive mutant (beta Val-153->Cys) *Escherichia coli* F₁-ATPase: cross-linking of the mutant beta subunit with the alpha subunit. *FEBS Lett*, **352**, 243-246.
- Jiang, W., Hermolin, J. and Fillingame, R.H. (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 4966-4971.
- Jones, P.C., Hermolin, J., Jiang, W. and Fillingame, R.H. (2000) Insights into the rotary catalytic mechanism of F₀F₁ ATP synthase from the cross-linking of subunits b and c in the *Escherichia coli* enzyme. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31340-31346.
- Junge, W., Lill, H. and Engelbrecht, S. (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 420-423.
- Junge, W., Sielaff, H. and Engelbrecht, S. (2009) Torque generation and elastic power transmission in the rotary F₀F₁-ATPase. *Nature*, **459**, 364-370.
- Kaim, G. and Dimroth, P. (1998) Voltage-generated torque drives the motor of the ATP synthase. *Embo J.*, **17**, 5887-5895.
- Kakinuma, Y. and Igarashi, K. (1994) Purification and characterization of the catalytic moiety of vacuolar-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *J. Biochem. Tokyo*, **116**, 1302-1308.
- Kakinuma, Y., Yamato, I. and Murata, T. (1999) Structure and function of vacuolar Na⁺-translocating ATPase in *Enterococcus hirae*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 7-14.
- Kalckar, H. (1939) The nature of phosphoric esters formed in kidney extracts. *Biochem. J.*, **33**, 631-641.
- Kamlage, B. and Blaut, M. (1992) Characterization of Cytochromes from *Methanosarcina Strain Gö1* and Their Involvement in Electron Transport During Growth on Methanol. *J. Bacteriol.*, **174**, 3921-3927.
- Karrasch, S. and Walker, J.E. (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.*, **290**, 379-384.
- Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K., Jr. and Yoshida, M. (1998) Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19375-19377.

- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. and Forgac, M. (2001) Arg-735 of the 100 kDa subunit *a* of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 12397-12402.
- Kibak, H., Taiz, L., Starke, T., Bernasconi, P. and Gogarten, J.P. (1992) Evolution of structure and function of V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomemb.*, **24**, 415-424.
- Kluge, C. and Dimroth, P. (1993) Specific protection by Na⁺ or Li⁺ of the F₁F₀-ATPase of *Propionigenium-Modestum* from the reaction with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14557-14560.
- Knol, J., Sjollem, K. and Poolman, B. (1998) Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry*, **37**, 16410-16415.
- Krebstakies, T., Aldag, I., Altendorf, K., Greie, J.C. and Deckers-Hebestreit, G. (2008) The stoichiometry of subunit *c* of *Escherichia coli* ATP synthase is independent of its rate of synthesis. *Biochemistry*, **47**, 6907-6916.
- Kresze, G.-B. (1983) Methods for protein determination. In Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Vol. 2, pp. 84-99.
- Laubinger, W. and Dimroth, P. (1988) Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry*, **27**, 7531-7537.
- Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S. and Müller, V. (2001) Overproduction of a functional A₁ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3744-3750.
- Lemker, T., Schmid, R., Grüber, G. and Müller, V. (2002) Subcomplexes of the heterologously produced archaeal A₁ ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1: subunit composition and redox modulation. *FEBS Lett.*, **544**, 206-209.
- Lewalter, K. and Müller, V. (2006) Bioenergetics of archaea: ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 437-445.
- Lingl, A., Huber, H., Stetter, K.O., Mayer, F., Kellermann, J. and Müller, V. (2003) Isolation of a complete A₁A₀ ATP synthase comprising nine subunits from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Extremophiles*, **7**, 249-257.
- Lipmann, F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Advanced Enzymology*, **1**, 99-162.
- Lipmann, F. (1948) Biosynthetic mechanisms. *Harvey Lect.*, **Series 44**, 99-123.

- Lipmann, F. (1949) Mechanism of peptide bond formation. *Fed. Proc.*, **8**, 597-602.
- Ljungdahl, L.G. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**, 415-450.
- Lokanath, N.K., Ukita, Y., Sugahara, M. and Kunishima, N. (2005) Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the vacuole-type ATPase subunit E from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Acta Crystallograph. Sect. f. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **61**, 56-58.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y.-C.E., Nelson, H. and Nelson, N. (1988) cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 5521-5524.
- Matthies, D., Preiss, L., Klyszejko, A.L., Müller, D.J., Cook, G.M., Vonck, J. and Meier, T. (2009) The c₁₃ ring from a thermoalkaliphilic ATP synthase reveals an extended diameter due to a special structural region. *J. Mol. Biol.*, **388**, 611-618.
- McCarthy, J.E., Gerstel, B., Surin, B., Wiedemann, U. and Ziemke, P. (1991) Differential gene expression from the *Escherichia coli* *atp* operon mediated by segmental differences in mRNA stability. *Mol. Microbiol.*, **10**, 2447-2258.
- McCarthy, J.E., Schairer, H.U. and Sebald, W. (1985) Translational initiation frequency of *atp* genes from *Escherichia coli*: identification of an intercistronic sequence that enhances translation. *EMBO J.*, **4**, 519-526.
- Meier, T., Ferguson, S.A., Cook, G.M., Dimroth, P. and Vonck, J. (2006) Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. *J. Bacteriol.*, **188**, 7759-7764.
- Meier, T., Krah, A., Bond, P.J., Pogoryelov, D., Diederichs, K. and Faraldo-Gomez, J.D. (2009) Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na⁺-dependent F-ATP synthases. *J. Mol. Biol.*, **391**, 498-507.
- Meier, T., Matthey, U., Henzen, F., Dimroth, P. and Müller, D.J. (2001) The central plug in the reconstituted undecameric c cylinder of a bacterial ATP synthase consists of phospholipids. *FEBS Lett.*, **505**, 353-356.
- Meier, T., Matthey, U., von Ballmoos, C., Vonck, J., Krug von Nidda, T., Kuhlbrandt, W. and Dimroth, P. (2003) Evidence for structural integrity in the

- undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases. *J. Mol. Biol.*, **325**, 389-397.
- Meier, T., Morgner, N., Matthies, D., Pogoryelov, D., Keis, S., Cook, G.M., Dimroth, P. and Brutschy, B. (2007) A tridecameric c ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase from the thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* strain TA2.A1 facilitates ATP synthesis at low electrochemical proton potential. *Mol. Microbiol.*, **391**, 498-507.
- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. and Dimroth, P. (2005a) Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science*, **308**, 659-662.
- Meier, T., Yu, J., Raschle, T., Henzen, F., Dimroth, P. and Müller, D.J. (2005b) Structural evidence for a constant c₁₁ ring stoichiometry in the sodium F-ATP synthase. *Febs J.*, **272**, 5474-5483.
- Menz, R.I., Walker, J.E. and Leslie, A.G. (2001) Structure of bovine mitochondrial F₁-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*, **106**, 331-341.
- Mesbah, N.M., Hedrick, D.B., Peacock, A.D., Rohde, M. and Wiegel, J. (2007) *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2507-2512.
- Miki, J., Ishihara, Y., Mano, T., Noumi, T. and Kanazawa, H. (1994a) Residues interacting with serine-174 and alanine-295 in the beta-subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATP synthase: Possible ternary structure of the center region of the subunit. *BBA-Bioenergetics*, **1187**, 67-72.
- Miki, J., Kusuki, H., Tsugumi, S. and Kanazawa, H. (1994b) Amino acid replacements at binding sites of monoclonal antibody in the F-1-ATPase beta subunit from *Escherichia coli* caused altered subunit interactions. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4227-4232.
- Mountfort, D.O. (1978) Evidence for ATP synthesis driven by a proton gradient in *Methanosarcina barkeri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1346-1350.
- Mukohata, Y., Isoyama, M. and Fuke, A. (1986) ATP synthesis in cell envelope vesicles of *Halobacterium halobium* driven by membranepotential and/or base-acid transition. *J. Biochem.*, **99**, 1 - 8.
- Mulkijanian, A.Y., Makarova, K.S., Galperin, M.Y. and Koonin, E.V. (2007) Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 892-899.

- Müller, V. (2003) Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6345-6353.
- Müller, V. (2004) An exceptional variability in the motor of archaeal A₁A₀ ATPases: from multimeric to monomeric rotors comprising 6 -13 ion binding sites. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **36**, 115-125.
- Müller, V., Aufferth, S. and Rahlfs, S. (2001) The Na⁺ cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na⁺ translocating F₁F₀-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 108-120.
- Müller, V. and Gottschalk, G. (1994) The sodium ion cycle in acetogenic and methanogenic bacteria: generation and utilization of a primary electrochemical sodium ion gradient. In Drake, H.L. (ed.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York, pp. 127 - 156.
- Müller, V. and Grüber, G. (2003) ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 474-494.
- Müller, V., Imkamp, F., Rauwolf, A., Küsel, K. and Drake, H.L. (2004) Molecular and cellular biology of acetogenic bacteria. In Nakano, M.M. and Zuber, P. (eds.), *Strict and facultative anaerobes. Medical and environmental aspects*. Horizon Biosciences, Norfolk, pp. 251-281.
- Müller, V., Lemker, T., Lingl, A., Weidner, C., Coskun, Ü. and Grüber, G. (2005a) Bioenergetics of archaea: ATP synthesis under harsh environmental conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 167-180.
- Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K. and Fritz, M. (2005b) ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 455-460.
- Müller, V., Ruppert, C. and Lemker, T. (1999) Structure and function of the A₁A₀ ATPases from methanogenic archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 15-28.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (2005) Structure of the rotor of the V-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science*, **308**, 654-659.
- Nakanishi-Matsui, M. and Futai, M. (2006) Stochastic proton pumping ATPases: from single molecules to diverse physiological roles. *IUBMB Life*, **58**, 318-322.
- Nelson, N. (1992) Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1100**, 109-124.

- Nelson, N. and Klionsky, D.J. (1996) Vacuolar H⁺-ATPase: From mammals to yeast and back. *Experientia*, **52**, 1101-1110.
- Nelson, N. and Taiz, L. (1989) The evolution of H⁺-ATPases. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 113 - 116.
- Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G. and Dimroth, P. (1998) Purification and properties of the F₁F₀ ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump. *J. Bacteriol.*, **180**, 3312-3316.
- Neumüller, O.A. (1979) *Roempps Lexikon der Chemie*. Georg Thieme Verlag.
- Nishi, T. and Forgac, M. (2002) The vacuolar H⁺-ATPases - Nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 94-103.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinosita, K. (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature*, **386**, 299-302.
- Orriss, G.L., Runswick, M.J., Collinson, I.R., Miroux, B., Fearnley, I.M., Skehel, J.M. and Walker, J.E. (1996) The delta- and epsilon-subunits of bovine F₁-ATPase interact to form a heterodimeric subcomplex. *Biochem. J.*, **314**, 695-700.
- Pisa, K.Y., Huber, H., Thomm, M. and Müller, V. (2007) A sodium ion-dependent A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Febs J.*, **274**, 3928-3938.
- Pitard, B., Richard, P., Dunach, M. and Rigaud, J.L. (1996) ATP synthesis by the F₀F₁ ATP synthase from thermophilic *Bacillus PS3* reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin . Relationships between proton motive force and ATP synthesis. *Eur. J. Biochem.*, **235**, 779-788.
- Pogoryelov, D., Yildiz, O., Faraldo-Gomez, J.D. and Meier, T. (2009) High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1068-1073.
- Pogoryelov, D., Yu, J., Meier, T., Vonck, J., Dimroth, P. and Müller, D.J. (2005) The c₁₅ ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F₁/F₀ symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO Rep.*, **6**, 1040-1044.
- Qi, J. and Forgac, M. (2007) Cellular environment is important in controlling V-ATPase dissociation and its dependence on activity. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24743-24751.
- Ragsdale, S.W. and Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1873-1898.

- Rahlfs, S. (1998) Klonierung und molekularbiologische Analyse der Gene der Na⁺-translozierenden F₁F₀-ATPase aus *Acetobacterium woodii*. Dissertation an der Georg-August-Universität, Göttingen.
- Rahlfs, S., Aufurth, S. and Müller, V. (1999) The Na⁺-F₁F₀-ATPase operon from *Acetobacterium woodii*. Operon structure and presence of multiple copies of *atpE* which encode proteolipids of 8- and 18-kDa. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33999-34004.
- Rahlfs, S. and Müller, V. (1997) Sequence of subunit *c* of the Na⁺-translocating F₁F₀ ATPase of *Acetobacterium woodii*: Proposal for determinants of Na⁺ specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS Lett.*, **404**, 269-271.
- Reidlinger, J. (1994) Reinigung und Charakterisierung einer Na⁺-translozierenden F₁F₀-ATPase aus *Acetobacterium woodii*. *Department of Microbiology*. University of Göttingen, Göttingen, p. 160.
- Reidlinger, J. and Müller, V. (1994) Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F₁F₀-type enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **223**, 275-283.
- Richard, P., Pitard, B. and Rigaud, J.L. (1995) ATP synthesis by the F₀F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* co-reconstituted with bacteriorhodopsin into liposomes - Evidence for stimulation of ATP synthesis by ATP bound to a noncatalytic binding site. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21571-21578.
- Robb, F.T., Maeder, D.L., Brown, J.R., DiRuggiero, J., Stump, M.D., Yeh, R.K., Weiss, R.B. and Dunn, D.M. (2001) Genomic sequence of hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods Enzymol.*, **330**, 134-157.
- Rodgers, A.J. and Wilce, M.C. (2000) Structure of the *g/e* complex of ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1051-1054.
- Rodgers, A.J.W. and Capaldi, R.A. (1998) The Second Stalk composed of the *b*- and *delta*-Subunits connects FO to F1 via an *alpha*-Subunit in the *Escherichia coli* ATP Synthase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29406-29410.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C. and Ferrara, P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **203**, 173-179.
- Rottenberg, H. (1979) The measurement of membrane potential and DpH in cells, organelles and vesicles. *Methods Enzymol.*, **55**, 547 - 569.

- Ruppert, C., Kavermann, H., Wimmers, S., Schmid, R., Kellermann, J., Lottspeich, F., Huber, H., Stetter, K.O. and Müller, V. (1999) The proteolipid of the A_1A_0 ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25281-25284.
- Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. and Müller, V. (1998) The A_1A_0 ATPase from *Methanosarcina mazei*: cloning of the 5' end of the *aha* operon encoding the membrane domain and expression of the proteolipid in a membrane-bound form in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3448-3452.
- Santana, M., Ionescu, M.S., Vertes, A., Longin, R., Kunst, F., Danchin, A. and Glaser, P. (1994) *Bacillus subtilis* F_0F_1 ATPase: DNA sequence of the *atp* operon and characterization of *atp* mutants. *J. Bacteriol.*, **176**, 6802-6811.
- Schäfer, G., Engelhard, M. and Müller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 570-620.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 369-379.
- Schaupp, A. and Ljungdahl, L.G. (1974) Purification and properties of acetate kinase from *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.*, **100**, 121-129.
- Schemidt, R.A., Qu, J., Williams, J.R. and Brusilow, W.S. (1998) Effects of carbon source on expression of F_0 genes and on the stoichiometry of the *c* subunit in the F_1F_0 ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3205-3208.
- Schmidt, K., Liaanen-Jensen, S. and Schlegel, H.G. (1963) Die Carotinoide der *Thiorodaceae*. *Arch. Mikrobiol.*, **46**, 117-126.
- Schmidt, S., Biegel, E. and Müller, V. (2009) The ins and outs of Na^+ bioenergetics in *Acetobacterium woodii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 691-696.
- Schneider, E. and Altendorf, K. (1987) Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F_1F_0): purification and reconstitution of F_0 complexes and biochemical and functional characterization of their subunits. *Microbiol. Rev.*, **51**, 477-497.
- Seelert, H., Dencher, N.A. and Müller, D.J. (2003) Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *J. Mol. Biol.*, **333**, 337-344.
- Senior, A.E., Nadanaciva, S. and Weber, J. (2002) The molecular mechanism of ATP synthesis by F_1F_0 -ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 188-211.

- Senior, A.E., Weber, J. and Alshawi, M.K. (1995) Catalytic mechanism of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 747-752.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
- Shirakihara, Y., Leslie, A.G.W., Abrahams, J.P., Walker, J.E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y. and Yoshida, M. (1997) The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 is a symmetric trimer. *Structure*, **5**, 825-836.
- Slesarev, A.I., Mezhevaya, K.V., Makarova, K.S., Polushin, N.N., Shcherbinina, O.V., Shakhova, V.V., Belova, G.I., Aravind, L., Natale, D.A., Rogozin, I.B., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., Stetter, K.O., Malykh, A.G., Koonin, E.V. and Kozyavkin, S.A. (2002) The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 4644-4649.
- Speelmans, G., Poolman, B., Abee, T. and Konings, W.N. (1994) The F- or V-type Na⁺-ATPase of the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. *J. Bacteriol.*, **176**, 5160-5162.
- Spruth, M., Reidlinger, J. and Müller, V. (1995) Sodium ion dependence of inhibition of the Na⁺-translocating F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii*. Probing the site(s) involved in ion transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 96-102.
- Stahlberg, H., Müller, D.J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U. and Dimroth, P. (2001) Bacterial Na⁺-ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Rep.*, **2**, 229-233.
- Steinert, K., Wagner, V., Kroth-Pancic, P.G. and Bickel-Sandkötter, S. (1997) Characterization and subunit structure of the ATP synthase of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and organization of the ATP synthase genes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6261-6269.
- Stock, D., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, **286**, 1700-1705.
- Taiz, L., Nelson, H., Maggert, K., Morgan, L., Yatabe, B., Taiz, S.L., Rubinstein, B. and Nelson, N. (1994) Functional analysis of conserved cysteine residues in the catalytic subunit of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *BBA-Biomembranes*, **1194**, 329-334.

- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact. Review*, **41**, 100-180.
- Tokuda, H. and Unemoto, T. (1981) A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 265-271.
- Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M. and Capaldi, R.A. (2000) Observations of rotation within the F_0F_1 -ATP synthase: deciding between rotation of the F_0 c subunit ring and artifact. *FEBS Lett.*, **470**, 244-248.
- Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M. and Capaldi, R.A. (2001) Large conformational changes of the e subunit in the bacterial F_1F_0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 6560-6564.
- Turina, P. and Melandri, B.A. (2002) A point mutation in the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus* results in differential contributions of $\Delta\mu\text{H}$ and $\Delta\mu\text{pH}$ in driving the ATP synthesis reaction. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1984-1992.
- Valiyaveetil, F.I. and Fillingame, R.H. (1997) On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the *Escherichia coli* F_0F_1 -ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32635-32641.
- Vik, S.B. and Ishmukhametov, R.R. (2005) Structure and function of subunit a of the ATP synthase of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 445-449.
- von Ballmoos, C., Cook, G.M. and Dimroth, P. (2008a) Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **37**, 43-64.
- von Ballmoos, C., Cook, G.M. and Dimroth, P. (2008b) Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 43-64.
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. and Dimroth, P. (2009) Essentials for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 649-672.
- Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B. and Müller, V. (2009) Three-dimensional structure of A_1A_0 ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10110-10119.
- Vonck, J., von Nidda, T.K., Meier, T., Matthey, U., Mills, D.J., Kuhlbrandt, W. and Dimroth, P. (2002) Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na^+ -ATP synthase. *J. Mol. Biol.*, **321**, 307-316.

- Vorburger, T., Ebner, J.Z., Wiedenmann, A., Morger, D., Weber, G., Diederichs, K., Dimroth, P. and von Ballmoos, C. (2008) Arginine-induced conformational change in the c-ring/a-subunit interface of ATP synthase. *Febs J.*, **275**, 2137-2150.
- Walker, J.E., Collinson, I.R., Vanraaij, M.J. and Runswick, M.J. (1995) Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. In Attardi, G.M. and Chomyn, A. (eds.), *Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Pt A*. Academic Press Inc, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, Vol. 260, pp. 163-190.
- Walker, J.E. and Gay, N.J. (1983) Analysis of *Escherichia coli* ATP synthase subunits by DNA and protein sequencing. *Methods Enzymol.*, **97**, 195-218.
- Walker, J.E., Gay, N.J., Saraste, M. and Eberle, A.N. (1984a) DNA sequence around the *Escherichia coli* unc operon. Completion of the sequence of a 17 kilobase segment containing *asnA*, *oriC*, *unc*, *glmS* and *phoS*. *Biochem. J.*, **224**, 799-815.
- Walker, J.E., Saraste, M. and Gay, N.J. (1984b) The *unc* operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 164-200.
- Wang, Y., Cipriano, D.J. and Forgac, M. (2007) Arrangement of subunits in the proteolipid ring of the V-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **282**, 34058-34065.
- Watts, S.D. and Capaldi, R.A. (1997) Interactions between the F₁ and F₀ parts in the *Escherichia coli* ATP synthase - Associations involving the loop region of C subunits. *J Biol Chem*, **272**, 15065-15068.
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H. and Capaldi, R.A. (1995) The gamma subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF₁F₀) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F₀ part. *FEBS Lett.*, **368**, 235-238.
- Weber, J. and Senior, A.E. (2000) ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 300-309.
- Wieczorek, H. (1992) The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport - molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J. Exp. Biol.*, **172**, 335-343.
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J. and Harvey, W.R. (1999) Animal plasma membrane energization by proton motive V-ATPases. *BioEssays*, **21**, 637-648.

- Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W.R., Huss, M., Merzendorfer, H. and Zeiske, W. (2000) Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.*, **203 Pt 1**, 127-135.
- Wilkins, S. and Capaldi, R.A. (1992) Monomaleimidogold labeling of the gamma-Subunit of the *Escherichia coli* F₁ ATPase examined by cryoelectron microscopy. *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 105-109.
- Wilkins, S. and Capaldi, R.A. (1998a) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 93-97.
- Wilkins, S. and Capaldi, R.A. (1998b) Solution structure of the e subunit of the F₁-ATPase from *Escherichia coli* and interactions of this subunit with b subunits in the complex. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26645-26651.
- Wilkins, S., Dunn, S.D., Chandler, J., Dahlquist, F.W. and Capaldi, R.A. (1997) Solution structure of the N-terminal domain of the delta subunit of the *E. coli* ATP-Synthase. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 198-201.
- Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F. and Müller, V. (1996) Subunit structure and organization of the genes of the A₁A₀ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18843-18852.
- Xing, J., Wang, H., von Ballmoos, C., Dimroth, P. and Oster, G. (2004) Torque generation by the F₀ motor of the sodium ATPase. *J. Biophys.*, **87**, 2148-2163.
- Yang, H. and Drake, H.L. (1990) Differential effects of sodium on hydrogen- and glucose-dependent growth of the acetogenic bacterium *Acetogenium kivui*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 81-86.
- Ye, Q., Roh, Y., Carroll, S.L., Blair, B., Zhou, J., Zhang, C.L. and Fields, M.W. (2004) Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5595-5602.
- Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M. and Ohkuma, S. (1998) V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20504-20510.
- Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M. and Tamakoshi, M. (2003) Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **278**, 24255-24258.

Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, T., Wakabayashi, T. and Yoshida, M. (2000) V-Type H⁺-ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.*, **275**, 13955-13961.

Eigene Publikationen:

Müller V, Lingl A, Lewalter K, Fritz M. ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J Bioenerg Biomembr.* 2005 Dec; **37**(6):455-460.

Fritz M, Müller V. An intermediate step in the evolution of ATPases--the F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis. *FEBS J.* 2007 Jul; **274**(13):3421-3428.

Fritz M, Klyszejko AL, Morgner N, Vonck J, Brutschy B, Müller DJ, Meier T, Müller V. An intermediate step in the evolution of ATPases: a hybrid F₀-V₀ rotor in a bacterial Na⁺-F₁F₀ ATP synthase. *FEBS J.* 2008 May; **275**(9):1999-2007.

6. Anhang

Tabelle A1, Zuordnung der jeweiligen NCBI-Nummern zu den in den phylogenetischen Analysen verwendeten Organismen.

Organismus	NCBI® Nummer
<i>Acetobacterium woodii</i>	AAC45088
<i>Acetobacterium woodii</i>	AAF01474
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	YP_001318237
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	YP_001318236
<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	YP_001514092
<i>Alsophila spinulosa</i>	YP_002970631
<i>Amphidinium carterae</i>	ACF28677
<i>Amphidinium carterae</i>	ACF28674
<i>Amphidinium carterae</i>	ACF28683
<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	ZP_02862981
<i>Anaerostipes caccae</i>	ZP_02419536
<i>Angiopteris evecta</i>	YP_001023687
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_051046
<i>Atropa belladonna</i>	NP_783219
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	YP_003002034
<i>Aureoumbra lagunensis</i>	YP_003002262
<i>Bacteroides pectinophilus</i>	ZP_03464180
<i>Bryantella formatexigens</i>	ZP_05344863
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	ZP_05791338
<i>Ceratophyllum demersum</i>	YP_001542434
<i>Chara vulgaris</i>	YP_635717
<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	YP_001019099
<i>Cicer arietinum</i>	YP_002149738
<i>Clostridium bartlettii</i>	ZP_02212931
<i>Clostridium hiranonis</i>	ZP_03293725
<i>Clostridium nexile</i>	ZP_03289879
<i>Clostridium paradoxum</i>	Q0ZS24
<i>Clostridium sp.</i>	ZP_02440386
<i>Coprococcus comes</i>	ZP_03799680
<i>Cryptomeria japonica</i>	YP_001806691
<i>Cuscuta gronovii</i>	YP_001430033
<i>Cycas taitungensis</i>	YP_001312178
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	YP_002433459
<i>Ephedra equisetina</i>	YP_002519955
<i>Epulopiscium sp.</i>	ZP_02692171
<i>Epulopiscium sp.</i>	ZP_02692170
<i>Erodium chrysanthum</i>	ACH47679
<i>Erodium texanum</i>	ACH47680
<i>Eubacterium bifforme</i>	ZP_03488400
<i>Eubacterium dolichum</i>	ZP_02076997
<i>Eubacterium eligens</i>	YP_002931369
<i>Eubacterium hallii</i>	ZP_03717390
<i>Eubacterium siraeum</i>	ZP_02422279

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ZP_02089952
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ZP_05613930
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	ZP_04566826
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	NP_603267
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum</i>	ZP_04970142
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii</i>	ZP_00144394
<i>Fusobacterium sp.</i>	ZP_04574566
<i>Fusobacterium sp.</i>	ZP_05627041
<i>Fusobacterium sp.</i>	ZP_05618145
<i>Fusobacterium varium</i>	ZP_04859679
<i>Fusobacterium varium</i>	ZP_04861112
<i>Geranium carolinianum</i>	ACH47681
<i>Gossypium barbadense</i>	YP_913174
<i>Halothermothrix orenii</i>	YP_002509530
<i>Heterosigma akashiwo</i>	YP_001936378
<i>Holdemania filiformis</i>	ZP_03633468
<i>Huperzia lucidula</i>	YP_209546
<i>Ilyobacter tartaricus</i>	Q8KRV3
<i>Ipomoea purpurea</i>	YP_001468295
<i>Jonquetella anthropi</i>	ZP_05860355
<i>Lotus japonicus</i>	NP_084801
<i>Marchantia polymorpha</i>	NP_039280
<i>Medicago truncatula</i>	YP_001381723
<i>Mesostigma viride</i>	NP_038380
<i>Micromonas sp.</i>	YP_002808622
<i>Monomastix sp.</i>	YP_002601012
<i>Monsonia speciosa</i>	ACH47684
<i>Monsonia vanderietiae</i>	ACH47685
<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	YP_002961148
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	YP_287448
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	YP_115565
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	YP_278849
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Q4A5Z9
<i>Mycoplasma synoviae</i>	YP_278533
<i>Natranaerobius thermophilus</i>	YP_001918985
<i>Natranaerobius thermophilus</i>	YP_001918984
<i>Nicotiana tabacum</i>	NP_054483
<i>Oocystis solitaria</i>	ACQ90747
<i>Oribacterium sinus</i>	ZP_03992481
<i>Oribacterium sp.</i>	ZP_05797500
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	NP_039378
<i>Ostreococcus tauri</i>	YP_717248
<i>Pavlova lutheri</i>	P28530
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	YP_874422
<i>Pinus contorta</i>	YP_002905132
<i>Pinus thunbergii</i>	NP_042362
<i>Pisum sativum</i>	P08212
<i>Propionigenium modestum</i>	P21905

<i>Ruminococcus albus</i>	BAA23683
<i>Ruminococcus obeum</i>	ZP_01962610
<i>Ruminococcus sp.</i>	ZP_04856422
<i>Staurastrum punctulatum</i>	YP_636450
<i>Thermus aquaticus</i>	YP_628456
<i>Thermus thermophilus</i>	YP_675832
<i>Trifolium subterraneum</i>	YP_002456460
<i>Vaucheria litorea</i>	YP_002327469
<i>Welwitschia mirabilis</i>	BAH11228
<i>Welwitschia mirabilis</i>	YP_001876577
<i>Zygnema circumcarinatum</i>	YP_636517

7. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Müller, der mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht und mich immer konstruktiv unterstützt hat. Danke auch für das lang anhaltende Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Meier für die stete Hilfsbereitschaft und die telefonische Unterstützung bei Problemen, sowie die gute Zusammenarbeit bei der Kristallisation.

Ganz besonders danke ich Dr. Janet Vonck und Dipl. Ing. Deryck Mills für die exzellenten elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die tolle Zusammenarbeit, sowie bei Prof. Dr. Daniel J. Müller und Adriana Klyszejko für die gute Zusammenarbeit bei der Rasterkraftmikroskopie.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Brutschy und Dr. Nina Morgner für die hervorragende Zusammenarbeit bei der LILBID-Analyse der c-Ringe.

Ansonsten danke ich allen Doktoranden und Diplomanden Frank, Judith, Conny, Iris, Sarah, Kathi, Ellen, Tina, Melanie, Saskia, Silke, Benjamin, Anni, Stella, Janine, Eva, Oliver, Bernhard, Judith, Sabrina, Miriam und Kathrin sowie natürlich Juniorprofessor Dr. Michael Rother und allen die ich jetzt vergessen habe für die schöne Zeit.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Ihre Unterstützung.

Lebenslauf

Michael Fritz
Steinweg 5
35085 Ebsdorfergrund

Telefon 06424/924927
Geboren am 04.11.1977 in Marburg
Verheiratet



Ausbildung

Schule:

1984 – 1988: Grundschule Hachborn

1988 – 1997: Gymnasium Philippinum Marburg

Mai 1997: Abitur

1997-1998 Wehrdienst

Universität:

Oktober 1998 – September 2001: Student an der Chemischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

Oktober 2001 – September 2004 Student an der Biochemischen Fakultät der Universität Bayreuth

September 2004 Abschluss des Studiums als „Diplom Biochemiker univ.“ mit der (Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Makromolekulare Chemie, bioorganische Chemie und Genetik)

Oktober 2004 – Ende 2007: Dissertation bei Prof. Dr. Volker Müller (Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt am Main) im Rahmen des Projektes: „Energiekonservierung bei acetogenen Bakterien“.

Veröffentlichungen: (Vorträge & Poster nicht aufgeführt)

1: Müller V, Lingl A, Lewalter K, Fritz M.

ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function

and evolution of ATPases. J Bioenerg Biomembr. 2005 Dec;37(6):455-60. Review.

2: Fritz M, Müller V.

An intermediate step in the evolution of ATPases--the F1F0-ATPase from Acetobacterium woodii contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis. FEBS J. 2007 Jul;274(13):3421-8. Epub 2007 Jun 6.

3: Fritz M, Klyszejko AL, Morgner N, Vonck J, Brutschy B, Müller DJ, Meier T, Müller V.

An intermediate step in the evolution of ATPases: a hybrid F(0)-V(0) rotor in a bacterial Na(+)-F(1)F(0) ATP synthase. FEBS J. 2008 May;275(9):1999-2007.

Berufserfahrung:

- 2002-2004 Als studentische Nebenbeschäftigung bei der Geschäftsleitung des Kompetenzzentrums für neue Materialien Nordbayern in Bayreuth.
- 2008-2009 Als Bereichsleiter im Media Markt Wetzlar.
- 2010- Area Sales Manager Norddeutschland, Leica Microsystems