

---

**Reinigung, biochemische Charakterisierung und  
Struktur der  $A_1A_0$ -ATPase aus *Methanococcus  
jannaschii***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Astrid Lingl  
aus München

Frankfurt 2006  
(D 30)

---

---

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

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig

Gutachter: Prof. Dr. Volker Müller

Datum der Disputation: 10.03.2006

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Energiekonservierung in methanogenen Archaea	1
1.2 Die Rolle der ATP-Synthase/ATPase im Stoffwechsel	5
1.3 Bakterielle ATP-Synthasen/ATPasen	6
1.4 Vakuoläre ATPasen	11
1.5 Archäelle ATP-Synthasen/ATPasen	13
1.6 Fragestellung der Arbeit	14
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
2.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	15
2.2 Anzucht und Nährmedien	16
2.2.1 Anzucht von <i>M. jannaschii</i> und <i>M. kandleri</i>	16
2.2.2 Nährmedium für <i>E. coli</i>	17
2.3 Methoden zur Enzymreinigung	17
2.3.1 Gewinnung der Membranfraktion	17
2.3.2 Solubilisierung des Gesamt-ATPase-Komplexes aus der Cytoplasmamembran	18
2.3.3 Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten	18
2.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie	19
2.3.5 Gelfiltration	20
2.3.6 Bestimmung der Molekularmasse durch Gelpermeationschromatographie	20
2.3.7 Konzentrierung von Proteinlösungen	20
2.4 Enzymaktivitätsmessung	21
2.4.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität	21
2.4.2 Verschiedene Puffersysteme zur Bestimmung der ATPase-Aktivität	22
2.4.3 Biochemische Charakterisierung der ATPase	22
2.4.4 Hemmung der ATPase-Aktivität durch DCCD	23

<b>2.5</b>	<b>Methoden zur Analyse von Proteinen</b>	<b>23</b>
2.5.1	Proteinbestimmung	23
2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
2.5.3	Native Gradienten-Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.5.4	Silberfärbung (Blum <i>et al.</i> , 1987), modifiziert	24
2.5.5	Coomassie-Färbung (Weber und Osborne, 1969)	25
2.5.6	Molekulargewichtsbestimmung	25
2.5.7	Trypsinverdau der gereinigten A <sub>1</sub> A <sub>0</sub> -ATPase aus <i>M. jannaschii</i>	25
<b>2.6</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>26</b>
2.6.1	Expression von <i>malE</i> -Fusionsgenen	26
2.6.2	Herstellung von Antiseren	26
2.6.3	Reinigung eines Antikörpers über Protein-A-Affinitätschromatographie	26
2.6.4	Western-Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	27
<b>2.7</b>	<b>Extraktion des Proteolipids von <i>M. kandleri</i> durch Chloroform/Methanol</b>	<b>28</b>
<b>2.8</b>	<b>Isolierung der Ether-Lipide aus <i>M. jannaschii</i></b>	<b>29</b>
2.8.1	Herstellung des Lipid-Rohextraktes (Bligh und Dyer, 1959)	29
2.8.2	Fraktionierung der Lipide	29
<b>2.9</b>	<b>Rekonstitutionsexperimente</b>	<b>30</b>
2.9.1	Herstellung von Liposomen	30
2.9.2	Rekonstitution der A <sub>1</sub> A <sub>0</sub> -ATPase von <i>M. jannaschii</i> in Liposomen	30
2.9.3	Messen einer ATP-Synthese-Aktivität durch inkorporiertes <sup>32</sup> P, modifiziert nach (Kagawa und Sone, 1979)	31
<b>2.10</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.10.1	Standardmethoden	32
2.10.2	Isolierung chromosomaler DNS (Marmur, 1961; Rahlfs und Müller, 1997)	33
2.10.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	33
<b>2.11</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b>	<b>34</b>
<b>2.12</b>	<b>Chemikalien, Enzyme und Gase</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung und Expression einzelner A<sub>1</sub>-Untereinheiten als MalE-Fusionsproteine zur Generierung von Antikörpern</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Anreicherung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus <i>M. jannaschii</i></b>	<b>38</b>
3.2.1	Vorversuche zur Solubilisierung der A <sub>1</sub> A <sub>0</sub> -ATPase	38
3.2.2	Herstellung der Membranfraktion	41

INHALTSVERZEICHNIS	III
3.2.3 Solubilisierung des ATPase-Gesamtkomplexes	42
3.2.4 Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten	42
3.2.5 Anionenaustausch-Chromatographie	43
3.2.6 Gelfiltration	45
3.2.7 Übersicht der Reinigung des ATPase-Gesamtkomplexes	45
<b>3.3 Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase</b>	<b>47</b>
3.3.1 Gelelektrophoretische Analyse und Untereinheitenzusammensetzung	47
3.3.2 Bestimmung der molekularen Masse des A <sub>1</sub> A <sub>0</sub> -ATPase Komplexes	55
3.3.3 Nachweis der funktionellen Kopplung der A <sub>1</sub> - und A <sub>0</sub> -Domäne	56
3.3.4 Untersuchungen zur Ionenspezifität	59
3.3.5 Substratspezifität der ATPase	62
3.3.6 Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität von divalenten Kationen	63
3.3.7 pH-Optimum der ATPase	64
3.3.8 Temperaturoptimum der ATPase	64
3.3.9 Ermittlung des K <sub>M</sub> -Wertes der ATPase für [Mg-ATP]	66
<b>3.4 Strukturelle Analyse der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase</b>	<b>67</b>
<b>3.5 Versuche zur Isolierung von Subkomplexen der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus <i>M. jannaschii</i></b>	<b>73</b>
<b>3.6 Rekonstitution der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATPase aus <i>M. jannaschii</i> in Liposomen</b>	<b>75</b>
3.6.1 Herstellung von Liposomen aus Lipiden von <i>M. jannaschii</i>	75
3.6.2 Rekonstitution der A <sub>1</sub> A <sub>0</sub> ATPase aus <i>M. jannaschii</i>	76
<b>3.7 Versuche zur Extraktion und Klonierung des Proteolipids aus <i>M. kandleri</i></b>	<b>80</b>
3.7.1 Versuche zur Reinigung des Proteolipids durch Chloroform/Methanol-Extraktion	80
3.7.2 Klonierung von <i>ntpK</i> aus <i>M. kandleri</i>	81
3.7.3 Herstellung eines Antikörpers gegen das Proteolipid	84
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>86</b>
<b>4.1 Genetische Organisation bekannter A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPasen</b>	<b>86</b>
<b>4.2 Struktur und Funktion der Untereinheiten der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus <i>M. jannaschii</i></b>	<b>90</b>
<b>4.3 Die Proteolipide der Archaea</b>	<b>95</b>
<b>4.4 Das Na<sup>+</sup>-Bindemotiv verschiedener Proteolipide</b>	<b>98</b>

---

<b>4.5</b>	<b>Aufbau verschiedener Rotoren der ATP-Synthasen/ATPasen</b>	<b>104</b>
<b>4.6</b>	<b>Elektronenmikroskopische Struktur der ATPase-Familien</b>	<b>108</b>
<b>4.7</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus <i>M. jannaschii</i></b>	<b>114</b>
<b>4.8</b>	<b>Verbreitung der ATP-Synthasen/ATPasen</b>	<b>116</b>
<b>4.9</b>	<b>Evolution der ATPasen</b>	<b>119</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>122</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>124</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
ATPase	Adenosin-5`-triphosphatase
ca.	cirka
°C	Grad Celsius
kDa	Kilo Dalton
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> : und andere
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
m-	milli-
M	molar (Mol pro Liter)
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry
min	Minute(n)
MW	molecular weight = Molekulargewicht
µ-	mikro-
n-	nano-
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro min
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen



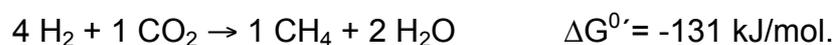
## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Energiekonservierung in methanogenen Archaea

Die Methanogenese ist einer der bedeutendsten biologischen Prozesse, sie stellt den letzten Schritt des anaeroben Abbaus organischer Materie unter Sulfat-limitierten Bedingungen dar (Deppenmeier, 2002). Sümpfe, Reisfelder, der tierische Verdauungstrakt, anaerobe Sedimente in fließenden und stehenden Gewässern sind die Hauptquellen einer mittleren Methanproduktion von  $10^9$  Tonnen jährlich (Weiss und Thauer, 1993). Ein Teil des gebildeten Methans wird durch aerobe methanotrophe Bakterien oxidiert, der Hauptteil gelangt jedoch in die Atmosphäre und trägt somit wesentlich zum Treibhauseffekt bei (Thauer, 1998).

Zur Methanogenese sind ausschließlich Vertreter der Archaea befähigt, die neben den Eukarya und Bacteria die dritte Domäne des Lebens darstellt (Woese et al., 1990). Die Domäne der Archaea gliedert sich in zwei große Gruppen, die Euryarchaeota zu denen die extrem Halophilen, die sulfatreduzierenden Thermophilen und die Methanogenen gezählt werden und die Crenarchaeota, die aufgrund ihres Vorkommens in ausschließlich thermophilen Habitaten eine relativ homogene Gruppe bilden (Woese, 1990). Die Gruppe der Methanogenen innerhalb der Euryarchaeota besteht aus strikt anaeroben, methanbildenden Mikroorganismen, die sich aufgrund ihres Stoffwechsels in drei Gruppen einteilen lassen: hydrogenotrophe, methylo trope und acetiklastische Methanogene. Die Methanogenen sind eine sehr heterogene Gruppe, deren GC-Gehalt der DNA von 26-68 mol% variiert, die Morphologie der Vertreter der Methanogenen ist ebenfalls sehr unterschiedlich. Die hydrogenotrophen Methanogenen, zu denen auch *Methanococcus jannaschii* zählt, reduzieren Kohlendioxid mit Hilfe von Wasserstoff zu Methan (Abb. 1).

Hydrogenotrophe Methanogene verwerten  $H_2 + CO_2$  über folgende Umsatzgleichung:



Während der Methanogenese sind die Intermediate an ungewöhnliche Kofaktoren wie Methanofuran (MF) (Romesser und Wolfe, 1982; Leigh *et al.*, 1985) und Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT) (Escalante-Semerena *et al.*, 1984; Van Beelen *et al.*, 1984a) gebunden. Im ersten Schritt der Methanogenese aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wird *N*-Carboxymethanofuran gebildet, das anschließend durch einen membranständigen Formyl-Methanofuran-Dehydrogenasekomplex (Formyl-MF-DH) zu Formylmethanofuran (Formyl-MF) reduziert wird (Thauer *et al.*, 1993). Formylmethanofuran ist das erste stabile Zwischenprodukt der Methanogenese. Die Reduktionsäquivalente für die Reaktion stammen aus dem Wasserstoff, der durch eine membranständige Hydrogenase oxidiert wird. Die Formylgruppe wird anschließend auf Tetrahydromethanopterin übertragen. Das entstandene Formyl-Tetrahydromethanopterin wird nun schrittweise zu Methyl-H<sub>4</sub>MPT reduziert (Breitung und Thauer, 1990; Ma und Thauer, 1990; Enssle *et al.*, 1991; Ermler *et al.*, 1997; Grabarse *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 2000). Alle Enzyme, die für die Reduktion der Formylgruppe zum Methylrest benötigt werden, sind cytoplasmatisch. Die Reduktionsäquivalente für die Reduktion von Methenyl-H<sub>4</sub>MPT zu Methylen-H<sub>4</sub>MPT werden vom reduzierten Kofaktor F<sub>420</sub> bereitgestellt, der seine Reduktionsäquivalente von einer cytoplasmatischen F<sub>420</sub>-reduzierenden Hydrogenase bezieht (Vaupel und Thauer, 1998; Brodersen *et al.*, 1999).

Die Methylgruppe wird anschließend durch die membranständige Methyl-H<sub>4</sub>MPT:HS-CoM-Methyltransferase auf Coenzym M übertragen. Diese exergone Reaktion ist an die Bildung eines elektrochemischen Na<sup>+</sup>-Gradienten gekoppelt (Müller *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1988; Kaesler und Schönheit, 1989; Becher *et al.*, 1992; Gottschalk und Thauer, 2001).

Die Methyl-CoM-Reduktase katalysiert die Freisetzung von Methan, wobei Coenzym B (HS-CoB) als Elektronenakzeptor dient. HS-CoM und HS-CoB bilden ein gemischtes Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB), das im letzten Schritt der anaeroben Atmung der Methanogenen von der Heterodisulfid-Reduktase gespalten wird. Die beiden Kofaktoren HS-CoM und HS-CoB sind damit wieder regeneriert. Die Elektronen für diese Reaktion stammen aus dem Wasserstoff, der durch eine membrangebundene Hydrogenase (F<sub>420</sub> unabhängig) reduziert wird. Die Elektronen werden dann in der Gruppe der



In einer vorausgegangenen Arbeit an Zellsuspensionen von *M. jannaschii* konnte gezeigt werden, dass beide Ionen zur ATP-Synthese genutzt werden (Kuhle, 2000). Allerdings konnte nicht gezeigt werden, ob die Natrium-Ionen direkt zur ATP-Synthese genutzt werden. Es wäre möglich, dass der primäre Natriumgradient über einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter in einen sekundären Protonengradienten umgewandelt wird. Eine solche indirekte Nutzung wurde für die ATP-Synthese in *Methanosarcina barkeri* vorgeschlagen (Kaesler und Schönheit, 1989). Potentielle Gene, die einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter kodieren, konnten in der genomischen Sequenz von *Methanosarcina mazei* Gö1 identifiziert werden (Deppenmeier et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung des primären Protonengradienten durch eine A-Typ-ATPase und in der Nutzung des primären Natriumgradienten durch eine F-Typ-ATPase. Inhibitorstudien an invertierten Vesikeln von *M. mazei* Gö1 sprechen für die Präsenz beider ATPase-Familien (Becher und Müller, 1994), aber die Genomsequenz schließt eine  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase klar aus.

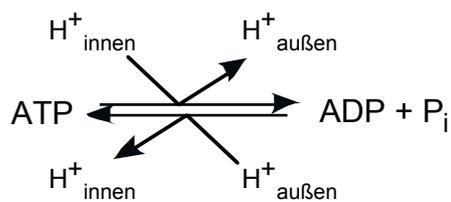
Eine weitere Option wäre die direkte Nutzung des Natriumionengradienten zur ATP-Synthese durch  $\text{A}_1\text{A}_0$ -ATPasen.  $\text{Na}^+$ -abhängige ATP-Synthese wurde an ganzen Zellen verschiedener Archaea beobachtet. In Versuchen an ganzen Zellen von *Methanothermobacter thermautotrophicus* (früher *Methanobacterium thermautotrophicum*  $\Delta\text{H}$ ) konnte eine  $\text{Na}^+$ -getriebene ATP-Synthese nachgewiesen werden (Al-Mahrouq et al., 1986; Smigan et al., 1994). Auch Experimente mit ganzen Zellen von *M. barkeri* sprachen für die Präsenz einer  $\text{Na}^+$ -abhängigen ATPase (Müller et al., 1988; Müller et al., 1988). Membranpräparationen von *M. thermautotrophicus* und *Methanococcus halophilus* zeigten eine induzierbare,  $\text{Na}^+$ -stimulierbare ATPase-Aktivität (Smigan et al., 1988; Smigan et al., 1992). In *Methanococcus voltae* wird von beiden primären Ionenpumpen (Methyltransferase und Heterodisulfidreduktase)  $\text{Na}^+$  gepumpt (Dybas und Konisky, 1992), weshalb nur ein primärer Natriumgradient über der Membran anliegt und eine  $\text{Na}^+$ -getriebene ATP-Synthese beschrieben wurde (Crider et al., 1985; Carper und Lancaster, 1986; Chen und Konisky, 1993). Da diese Versuche allerdings mit ganzen Zellen oder Membranpräparationen gemacht wurden, können sekundäre Protonenströme, die zur ATP-Synthese führten, nicht

ausgeschlossen werden. Zur Klärung der Ionenspezifität der  $A_1A_0$ -ATP-Synthase sind daher Untersuchungen an gereinigten Enzymen von Nöten, eine gereinigte  $A_1A_0$ -ATP-Synthase liegt aber bis dato noch nicht vor und sollte in dieser Arbeit erzeugt werden.

## 1.2 Die Rolle der ATP-Synthase/ATPase im Stoffwechsel

Die Energie, die durch den Metabolismus einer Zelle erzeugt wird, muss in einer für die Zelle verwertbaren Form gespeichert werden. In jedem lebenden Organismus ist ATP dieser universelle Energieträger, der von den Zellen genutzt wird. Eine Möglichkeit zur Herstellung von ATP ist die Substratkettenphosphorylierung, wobei die frei werdende Energie einer chemischen Reaktion zur Phosphorylierung von ADP genutzt wird. Die zweite Möglichkeit ist die Speicherung der Energie in Form eines transmembranen Ionengradienten ( $H^+$  oder  $Na^+$ ). Die Ionen fließen dann über den membrangebundenen Teil einer ATP-Synthasen wieder ins Cytoplasma, wobei Konformationsänderungen des Enzyms zur Synthese von ATP führen.

ATP-Synthasen katalysieren die *in vitro* vollkommen reversible Reaktion:



$$\Delta G^0 = -50 \text{ kJ/mol}$$

ATP-Synthasen wandeln das elektrochemische Potential in ein chemisches Potential um, wobei beide Potentiale über die transportierten Ionen miteinander in Verbindung stehen:

$$\Delta G_p = -n \cdot F \cdot \Delta \mu_{H^+} \quad n = \text{translozierte Ionen}; F = \text{Faraday-Konstante}$$

Das Phosphorylierungspotential ( $\Delta G_p$ ) ist dabei proportional dem an der Membran anliegenden elektrochemischen Potential. Bei einem physiologischen elektrochemischen Protonenpotential von -180 mV und

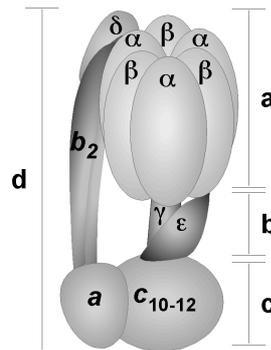
einem  $\Delta G_p$  von 50-70 kJ/mol müssten drei bis vier Ionen transloziert werden, um die Synthese von ATP zu ermöglichen. Umgekehrt werden bei der Hydrolyse eines Moleküls ATP drei bis vier Ionen über die Cytoplasmamembran transportiert. Demzufolge ist die Richtung der Reaktion, ATP-Hydrolyse oder ATP-Synthese, abhängig von  $\Delta\mu_H^+$ ,  $\Delta G_p$  und  $n$ . Gärende Bakterien, die keine Elektronentransport-getriebene Translokation von Ionen über die Cytoplasmamembran betreiben können, gewinnen ATP ausschließlich über eine Substratkettenphosphorylierung. Ein Teil des gebildeten ATP's wird dann von den ATPasen hydrolysiert, um einen Ionengradienten über der Membran zu generieren. Dieser Ionengradient kann dann für Transportprozesse und die Flagellenrotation genutzt werden. Verfügt der Organismus aber über die Möglichkeit, einen Protonengradienten *via* einer Elektronentransportkette aufzubauen, liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der ATP-Synthese und die ATPase dient als sekundärer Energiekonverter. Neben dem elektrochemischen Ionengradienten verschiebt auch ein hoher ADP-Gehalt in der Zelle das Gleichgewicht hin zur ATP-Synthese. In Cyanobakterien und Pflanzen wird die ATPase zusätzlich über eine Thiolmodifikation reguliert. Diese Modifikation verhindert, dass wertvolles ATP bei Dunkelheit hydrolysiert wird.

ATP-Synthasen/ATPasen sind für jedes Leben essentiell und sind somit ubiquitär verbreitet. Molekulare sowie biochemische und immunologische Analysen zeigten, dass die ATPasen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben (Nelson und Nelson, 1989; Gogarten und Taiz, 1992). Generell besteht das Enzym aus einer hydrophoben Membrandomäne und einem hydrophilen Kopfteil, die durch mindestens zwei Stiele miteinander verbunden sind. Entsprechend den drei Domänen des Lebens, Archaea, Eukarya und Bacteria, unterscheidet man zwischen  $A_1A_0$ -,  $V_1V_0$ - und  $F_1F_0$ -ATPasen.

### 1.3 Bakterielle ATP-Synthasen/ATPasen

Die  $F_1F_0$ -ATPasen sind außer in Bakterien noch in Chloroplasten und Mitochondrien zu finden, wo sie einen Großteil des ATP's generieren. Im einfachsten Fall, dem der bakteriellen  $F_1F_0$ -ATPasen, haben sie eine

Untereinheitenzusammensetzung von  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10-12}$ . In Abb. 2 ist der schematische Aufbau eines  $F_1F_0$ -Partikels gezeigt. Die  $F_1$ -Domäne ( $\alpha_3\beta_3$ , Abb. 2a) ist über einen zentralen Stiel ( $\gamma\epsilon$ , Abb. 2b) mit der Membrandomäne ( $ac_{10-12}$ , Abb. 2c) verbunden. Der Stator ( $\delta ab_2$ , Abb. 2d) fixiert die  $F_1$ -Domäne gegenüber den rotierenden Domänen,  $c_{10-12}$  und  $\gamma\epsilon$ .



**Abb. 2** Aufbau der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase aus *E. coli*

**a:**  $F_1$ -Domäne  $\alpha_3\beta_3$ , **b:** zentraler Stiel  $\gamma\epsilon$ , **c:** Membrandomäne  $ac_{10-12}$ , **d:** Stator  $\delta ab_2$  (Weber und Senior, 2003).

Die Röntgenstrukturdaten eines  $F_1$ -Partikels aus Rinderherzmitochondrien zeigten die Struktur eines Hexamers, das aus den alternierend angeordneten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  aufgebaut ist (Abrahams *et al.*, 1994). An den Zwischenflächen der Untereinheiten liegen sechs Nukleotid-Bindestellen, wobei nur die  $\beta$ -Untereinheit katalytisch aktiv ist (Abrahams *et al.*, 1994).

Die Untereinheit  $\gamma$  befindet sich im Zentrum des  $(\alpha\beta)_3$ -Komplexes, ist asymmetrisch und antiparallel  $\alpha$ -helical geformt, wobei sich der C-Terminus in einer hydrophoben Mulde, die durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit gebildet wird, befindet (Müller *et al.*, 2004). Aufgrund weiterer Strukturuntersuchungen der  $F_1F_0$ -ATPase aus Rinderherzmitochondrien konnte nachgewiesen werden, dass  $\gamma$  zusammen mit  $\delta$  (entspricht der Untereinheit  $\epsilon$  im bakteriellen Enzym) und  $\epsilon$  (keine entsprechende Untereinheit in den bakteriellen Enzymen) den zentralen Stiel bilden (Stock *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2000).

Die Membrandomäne der ATPasen ist weniger untersucht als die hydrophile Domäne, was nicht zuletzt mit der Schwierigkeit der Isolation und Kritallisation von Membranproteinen zu tun hat. Die Untereinheit  $a$  des

bakteriellen Rotors besteht aus 5 Transmembranhelices (**Valiyaveetil und Fillingame, 1997; Long et al., 1998; Wada et al., 1999**) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Translokation von Ionen durch den Rotor. In Transmembranhelix 4 liegt eine hoch konservierte Aminosäure, das Arg210, welches essentiell für die Ionentranslokation ist (**Valiyaveetil und Fillingame, 1997; Cain, 2000; Fillingame et al., 2002; Angevine und Fillingame, 2003**). Vermutlich interagiert Arg210 zusammen mit dem essentiellen Carboxylat Asp61, der *c*-Untereinheit von *E. coli*, so dass der  $pK_a$ -Wert des Carboxylats verringert wird und somit die Ionentranslokation erfolgen kann (**Valiyaveetil und Fillingame, 1997**).

Die Reinigung und erste NMR-Analysen der Untereinheit *a* der *E. coli* ATPase gelang durch eine Chloroform/Methanol/Wasser-Extraktion (**Dmitriev et al., 2004**). Die Extraktion durch die organischen Lösungsmittel scheint die Funktion und Faltung des Proteins nicht negativ beeinflusst zu haben, da das gereinigte Protein erfolgreich mit der Untereinheit *b* und dem Proteolipid rekonstituiert werden konnte, um einen funktionellen  $F_o$ -Komplex auszubilden (**Dmitriev et al., 2004**).

Die Untereinheit *b* besteht aus einer transmembranen Helix und einer cytoplasmatischen Domäne und kommt in 2 Kopien im Gesamtkomplex vor (**Dunn, 1992; McLachlin und Dunn, 1997**). Zusammen mit der Untereinheit  $\delta$  verbindet sie die  $F_1$ - mit der  $F_o$ -Domäne und bildet einen peripheren Stiel (**Sorgen et al., 1998**). Der C-Terminus der Untereinheit *b* scheint eine essentielle Rolle bei der Verbindung der  $F_1$ - mit der  $F_o$ -Domäne zu übernehmen (**Schneider und Altendorf, 1984; Steffens et al., 1987; Greie et al., 2004**). Elektronenmikroskopische Studien unterstützen die Annahme, dass die Untereinheiten *a* und *b* ausserhalb des *c*-Rings liegen (**Birkenhäger et al., 1995; Singh et al., 1996; Takeyasu et al., 1996; Seelert et al., 2000**).

Die *c*-Untereinheit oder das Proteolipid der F-ATPasen besteht aus zwei transmembranen Helices, die durch eine hydrophile Schleife miteinander verbunden sind (**Girvin et al., 1998**). Im Oligomer sind die N-terminalen Enden der *c*-Untereinheiten zu einem dichten inneren Ring gepackt, während die C-terminalen Helices einen lockeren äußeren Ring ausbilden (**Stock et al., 1999; Vonck et al., 2002**). Der *c*-Ring bildet so den membrangebundenen Rotor. Die Zahl der *c*-Untereinheiten, die ein Oligomer

ausbilden ist variabel. In *Enterococcus hirae* wird der Ring von 10 Monomeren ausgebildet (Murata *et al.*, 2005), in Spinatchloroplasten von 14 (Seelert *et al.*, 2003), in *Ilyobacter tartaricus* von 11 (Stahlberg *et al.*, 2001; Vonck *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2005), in *E. coli*, abhängig von den Wachstumsbedingungen, von 10 oder 11 Monomeren (Schemidt *et al.*, 1995; Schemidt *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001) und im Cyanobakterium *Spirulina platensis* aus 15 Monomeren (Pogoryelov *et al.*, 2005).

Die Hydrolyse bzw. Synthese von ATP erfolgt nach dem „binding-change“-Mechanismus (Cross, 1981). Nach diesem Modell haben die drei katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten zu jeder Zeit der Rotation verschiedene Affinitäten zu den Nukleotiden, weshalb jede Untereinheit eine Konformationsänderung erfährt, die zur Substratbindung (loose), der ATP-Synthese (tight) und schließlich zur Freisetzung von ATP führt (open) (Boyer, 1993; Boyer, 1997). Dieser Mechanismus setzt die Rotation des zentralen Stiels ( $\gamma$ ) voraus, der die Konformationsänderungen im  $F_1$ -Hexamer bzw. den katalytischen Untereinheiten vorantreibt. Wird ATP hydrolysiert, wird die oben genannte Sequenz umgekehrt und es kommt zu einer entgegengesetzten Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit.

Durch spaltbare Quervernetzungen zwischen den Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  konnte erstmals eine Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit gezeigt werden (Duncan *et al.*, 1995). Noji *et al.* konnten dann erstmals zeigen, dass sich die  $\gamma$ -Untereinheit tatsächlich dreht (Noji *et al.*, 1997). Ein fluoreszierendes Actinfilament wurde dazu an der Untereinheit  $\gamma$  befestigt und der Kopfteil der ATPase auf einem Objektträger fixiert. Das Actinfilament bewegte sich in drei 120° Schritten unidirektional mit plötzlichen Transitionen von einer Position zur nächsten (Yasuda *et al.*, 1997; Yasuda *et al.*, 1998; Adachi *et al.*, 2000).

Die  $\varepsilon$ -Untereinheit ist ebenfalls wie die  $\gamma$ -Untereinheit Teil des zentralen Stiels, was durch biochemische Analysen (Aggeler *et al.*, 1997) und später direkt nachgewiesen werden konnte (Kato-Yamada *et al.*, 1998). Ein Enzym, in dem die Untereinheit  $\gamma$  mit  $c$  und  $\varepsilon$  vernetzt wurde, konnte weiterhin ATP hydrolysieren (Tsunoda *et al.*, 2001), woraus man schließen kann, dass sich die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit im  $c$ -Ring forsetzt und somit die Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse/-Synthese und dem Ionentransport

erfolgt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die  $F_0$ -Domäne tatsächlich mit den Untereinheiten  $\gamma$  und  $\epsilon$  in engem Kontakt steht (Fillingame *et al.*, 1995; Watts *et al.*, 1995; Watts *et al.*, 1996; Hermolin *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 1999; Stahlberg *et al.*, 2001).

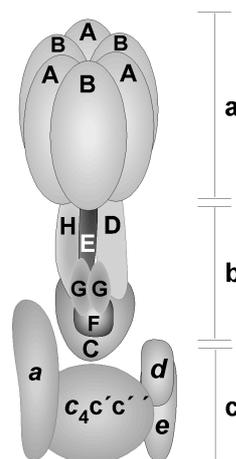
Die Drehung des Proteolipid-Oligomers konnte nachgewiesen werden, indem in Analogie zu dem Actin-Filament an der  $\gamma$ -Untereinheit ein Filament am Oligomer angebracht wurde (Sambongi *et al.*, 1999; Pänke *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe um Dimroth konnte an einem vollständig gekoppelten Enzym aus *Propionigenium modestum* die Rotation während der Hydrolyse und der Synthese zeigen (Kaim *et al.*, 2002).

Bisher wurde gezeigt, dass die ATP-Hydrolyse zu einer Rotation von  $\gamma$  gegen den Uhrzeigersinn führt. Aufgrund der Struktur und der biochemischen Daten ist dann natürlich die Annahme, dass die ATP-Synthese zu einer Rotation mit dem Uhrzeigersinn führt, naheliegend. Dies konnte durch elegante Experimente kürzlich gezeigt werden. Zum einen wurde die  $F_1F_0$ -ATPase aus *E. coli* in Liposomen rekonstituiert (Diez *et al.*, 2004), und die Rotation wurde über FRET-Analysen (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) beobachtet. Dazu wurde ein Donor-Fluorophor an  $\gamma$  gekoppelt und das Akzeptor-Fluorophor an das Statordimer  $b_2$ . Wird das Donormolekül angeregt, erfolgt ein strahlungsloser Energietransfer zwischen den beiden Molekülen, dieser Energietransfer (FRET) kann gemessen werden. Je weiter die Fluorophore voneinander entfernt sind, umso kleiner wird der Energietransfer (Kohl *et al.*, 2002). Mit dieser Methode konnte bestätigt werden, dass sich die  $\gamma$ -Untereinheit während der Synthese entgegen der Hydrolyse-Richtung dreht. Ein anderer erstaunlicher Ansatz, der zu dem gleichen Ergebnis führte, wurde von Itoh *et al.* unternommen (Itoh *et al.*, 2004). Es wurden magnetische Beads an die  $\gamma$ -Untereinheit eines  $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Subkomplexes gekoppelt und das Köpfchen fixiert. Ein Magnet sorgte nun dafür, dass sich die  $\gamma$ -Untereinheit in die Syntheserichtung, also im Uhrzeigersinn, dreht, und eine ATP-Synthese konnte mit einem Luciferin-Luciferase-Assay gemessen werden (Itoh *et al.*, 2004).

## 1.4 Vakuoläre ATPasen

Die  $V_1V_O$ -ATPasen wurden zunächst in den Clathrin-ummantelten Vesikeln und später in anderen eukaryontischen Organellen gefunden (Skulachev, 1994). Die V-Typ-ATPasen sind ATP-getriebene Protonenpumpen und kommen in Endomembranen und Plasmamembranen der Eukaryonten vor. Dort sind sie für die Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente verantwortlich und sind am Ionentransport beteiligt (Nishi und Forgac, 2002).

Während die  $F_1F_O$ - und  $A_1A_O$ -ATPasen einen stabilen Komplex bilden, kann der  $V_1$ -Komplex reversibel von  $V_O$  abdissoziieren. Diese Besonderheit der V-Typ-ATPasen dient der Regulation und konnte während der Verpuppung im Tabakschwärmer und als Antwort auf eine Glucose-Limitierung in Hefen beobachtet werden (Kane, 1995; Sumner *et al.*, 1995). Die Dissoziation verringert die Mg-ATPase-Aktivität und den Protonenfluss an der Membran, die Assoziation der beiden Komplexe hebt diese Hemmungen wieder auf (Wieczorek *et al.*, 2000; Kane, 2000). Bemerkenswert ist, dass keine Neusynthese von Proteinen benötigt wird. In Abb. 3 ist der schematische Aufbau der  $V_1V_O$ -ATPase aus *Manduca sexta* gezeigt.



**Abb. 3** Aufbau der  $V_1V_O$ -ATPase aus *M. sexta*

**a:**  $V_1$ -Domäne  $A_3B_3$ , **b:** zentraler Stiel und periphere Stiele C:D:E:F:G<sub>x</sub>:H<sub>y</sub>, **c:** Membrandomäne  $adc_4c'c''e$  (Wieczorek *et al.*, 2000).

Die Nukleotidbindestellen liegen in der Untereinheit A (70 kDa) und B (60 kDa), die in je drei Kopien in der  $V_1$ -Domäne vorkommen und ein

Hexamer bilden (Boekema *et al.*, 1998; Svergun *et al.*, 1998; Radermacher *et al.*, 1999; Grüber *et al.*, 2000). Die Untereinheiten C-H bilden die verschiedenen Stiele aus und liegen in einer Stöchiometrie von C:D:E:F:G<sub>x</sub>:H<sub>y</sub> vor (Xu *et al.*, 1999; Armbrüster *et al.*, 2003).

Die V<sub>O</sub>-Domäne wird von den fünf Untereinheiten *a*, *d*, *c*, *c'* und *c''* gebildet. Die Untereinheit *a* setzt sich aus einem hydrophilen N-Terminus mit 50 kDa und einem hydrophoben C-Terminus mit ebenfalls 50 kDa zusammen. Der hydrophobe Teil der 100 kDa-Untereinheit wird in Hefen von neun transmembranen Helices aufgebaut, die hydrophile Domäne ist  $\alpha$ -helical und liegt im Lumen (Leng *et al.*, 1999). Eine für die Ionentranslokation entscheidende Rolle hat das Arg735 in der siebten Helix (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001), es könnte damit eine ähnliche Aufgabe wie das Arg210 der F-Typ-ATPasen übernehmen (Cain, 2000; Vik *et al.*, 2000).

Die Proteolipide *c*, *c'* und *c''* sind sich untereinander sehr ähnlich und zeigen auch Ähnlichkeiten zu den Proteolipiden anderer V-, A- und F-Typ-ATPasen. Die *c*- und *c'*-Untereinheit sind mit 16 kDa doppelt so groß wie die Proteolipide der meisten Bakterien und Archäen, sie entstanden durch eine Genduplikation und anschließende Fusion eines 8 kDa-Vorläuferpeptids (Mandel *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1997). Die Untereinheit *c''* hat eine Transmembranhelix mehr und ist damit größer als *c* und *c'*. Im V<sub>O</sub>-Komplex kommt jede der drei Proteolipid-Untereinheiten in mindestens einer Kopie vor (Hirata *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass *c''* im V<sub>O</sub>-Komplex mit nur vier Transmembranhelices vorkommt, was wahrscheinlich auf eine Prozessierung zurückzuführen ist (Nishi *et al.*, 2003). Die Untereinheitenzusammensetzung des Proteolipid-Oligomers wurde zu  $c_{4-5}c'_1c''_1$  bestimmt (Arai *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen an der V-ATPase aus *S. cerevisiae* ergaben, dass *c''* mit 5 Transmembranhelices im Komplex vorliegt, wobei der N-Terminus von *c''* im Cytoplasma und der C-Terminus im Lumen lokalisiert ist, die N- und C-Termini von *c* und *c'* liegen dagegen beide im Lumen (Flannery *et al.*, 2004).

Die Untereinheit *d* ist hydrophil und kann zusammen mit der V<sub>O</sub>-Domäne aufgereinigt werden (Wang *et al.*, 1988), *d* könnte an der Regulation des Protonenflusses durch V<sub>O</sub> beteiligt sein. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der V<sub>O</sub>-Domäne der ATPase Clathrin-ummantelter Vesikel

zeigten Proteolipid-Monomere, die mit der *a*-Untereinheit auf einer Seite in engem Kontakt stehen (Wilkins und Forgac, 2001). Die *d*-Untereinheit und der N-terminale Bereich der *a*-Untereinheit formen eine Art Deckel auf der cytoplasmatischen Seite des Proteolipid-Rings (Wilkins und Forgac, 2001).

## 1.5 Archäelle ATP-Synthasen/ATPasen

Die archäellen ATPasen wurden erst kürzlich entdeckt und zunächst aufgrund struktureller Ähnlichkeiten als  $V_1V_0$ -ATPasen klassifiziert. Phylogenetische Analysen und funktionelle Eigenschaften zeigten jedoch, dass es sich hier um ein chimäres Enzym handelt, das sowohl Eigenschaften der bakteriellen wie auch der eukaryontischen ATPasen in sich vereint und somit eine neue Klasse von ATPasen darstellt. Über die Struktur und Funktion der archäellen ATPasen ist bisher wenig bekannt. Zunächst wurden die Enzyme der Archaea den F-Typ ATPasen zugeordnet, da diese als ubiquitär verbreitet galten und in allen Domänen des Lebens die Funktion der Energiekonservierung übernehmen (Lübbers *et al.*, 1987; Lübbers und Schäfer, 1989). Die Unempfindlichkeit der ATPase halophiler Archäen gegenüber Azid, einem Hemmstoff der F-Typ ATPasen, ließ erstmals vermuten, dass es sich hier um eine neue Art von ATPasen handelt (Mukohata und Yoshida, 1987; Mukohata und Yoshida, 1987).

Die Versuche, ATPasen aus verschiedenen Archäen zu isolieren, führten zu Enzymen mit sehr unterschiedlicher Anzahl an Untereinheiten. Die Zahl der Untereinheiten der in der Literatur beschriebenen und gereinigten ATPasen aus Archäen schwankte zwischen drei und sechs (Inatomi, 1986; Hochstein *et al.*, 1987; Nanba und Mukohata, 1987; Lübbers *et al.*, 1987; Inatomi *et al.*, 1989; Lübbers und Schäfer, 1989; Scheel und Schäfer, 1990; Hochstein und Stanlotter, 1992; Chen und Konisky, 1993; Steinert und Bickel-Sandkötter, 1996; Wilms *et al.*, 1996; Ihara *et al.*, 1997), was zu der Annahme führte, dass die Anzahl der Untereinheiten variabel ist.

Erst die Sequenzierung des Operons aus *M. mazei* (Wilms *et al.*, 1996; Ruppert *et al.*, 1998) und die anschließende Sequenzierung anderer Archäen, führte zu der Erkenntnis, dass die Organisation der archäellen Enzyme weitestgehend konserviert ist. Die Operone bestehen aus 9-10 Genen, deren

Produkte mehr Ähnlichkeiten zu den V-Typ-ATPase-Untereinheiten als zu  $F_1F_0$ -ATPasen zeigen. Ihre Funktion als ATP-Synthasen haben sie dagegen mit den F-Typ-ATPasen gemein.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Reinigung einer  $A_1A_0$ -ATPase, die alle der vorausgesagten Untereinheiten enthält, stand im Vordergrund der Arbeit. Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die strukturelle Untersuchung. Der Organismus, der zur Anreicherung des  $A_1A_0$ -Gesamtkomplexes gewählt wurde, war das hyperthermophile Archaeon *M. jannaschii*. Die erwartete Stabilität hyperthermophiler Proteine sollte die Reinigung komplexer Enzyme erleichtern. Nach Einbau der archäischen  $A_1A_0$ -ATPase in Liposomen sollte die Ionenspezifität und die ATP-Synthese untersucht werden. Die Methanogenen sind hinsichtlich ihrer verschiedenen Proteolipide besonders interessant, die Proteolipide sind aus 2, 4, 6 oder 13 Haarnadeln aufgebaut (Müller, 2004). Daraus ergeben sich interessante Konsequenzen für die  $H^+/Na^+$ :ATP-Stöchiometrie. Das Proteolipidmonomer von *Methanopyrus kandleri* sollte gereinigt werden, um zu überprüfen, ob das Protein tatsächlich ein 13mer des bakteriellen Proteolipids darstellt, wie aus der Genomsequenz vorhergesagt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 1 Verwendete Organismen

Stamm	relevanter Geno- oder Phänotyp	Referenz
<i>Methanococcus jannaschii</i>	Wildtyp	DSM 2661
<i>Methanopyrus kandleri</i>	Wildtyp	DSM 6324
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80 $\Delta$ /lacZ M15 $\Delta$ (lacZYA - argF) U169 recA1 endA1 hspR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , hsdS, Gal, $\lambda$ DE3, argU, ileY, leuW	Stratagene

Tab. 2 Plasmide

Plasmid	Merkmal	Referenz
pMal-c2	Amp <sup>R</sup> , malE, lacI, P <sub>lac</sub> , lacZ, M13 ori	New England BioLabs
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , lacZ $\alpha$ , f1ori, pucori	Invitrogen
pET-21a(+)	Amp <sup>R</sup> , T7lac, T7•Tag <sup>®11</sup> , f1ori	Novagen

Tab. 3 Plasmid-Konstrukte

Plasmid	Schnittstellen des klonierten Gens	Insertionsgröße	Ursprungsvektor
pMalE-AtpA <i>M.j.</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	1760 Bp	pMal-c2
pMalE-AtpB <i>M.j.</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	1398 Bp	pMal-c2
pMalE-AtpC <i>M.j.</i>	<i>BamHI/SalI</i>	1197 Bp	pMal-c2
pMalE-AtpD <i>M.j.</i>	<i>BamHI/SalI</i>	648 Bp	pMal-c2
pMalE-AtpE <i>M.j.</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	621 Bp	pMal-c2
pMalE-AtpF <i>M.j.</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	294 Bp	pMal-c2
pMalE-AtpH <i>M.j.</i>	<i>BamHI/SalI</i>	315 Bp	pMal-c2
pTOPO <sup>®</sup> -NtpK(flankierend) <i>M. k.</i>	-	3387 Bp	pTOPO <sup>®</sup>
pTOPO <sup>®</sup> -NtpK <i>M. k.</i>	<i>EcoRI/SalI</i>	3066 Bp	pTOPO <sup>®</sup>

*M.j.*: *Methanococcus jannaschii*, *M.k.*: *Methanopyrus kandleri*, Bp: Basenpaare

Tab. 4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
<i>atpA</i> ( <i>EcoRI</i> )down <i>atpA</i> ( <i>PstI</i> )up	5'-GTTGAGAATTCGTTGTTGGTAAG-3' 5'-TCTCCATCTGCAGTTTTGATTTAAC-3'	<i>atpA M. j.</i>
<i>atpB</i> ( <i>EcoRI</i> )down <i>atpB</i> ( <i>PstI</i> )up	5'-GGTGATGATGAATTCACAGCAGCATCA-3' 5'-CTTTCTGTATTCTGCAGGATACTTCTC-3'	<i>atpB M. j.</i>
<i>atpC</i> ( <i>BamHI</i> )down <i>atpC</i> ( <i>SalI</i> )up	5'-GATGCCTAGGATCCATGGATATAG-3' 5'-CATTACTTGTGCACCAATGATATAA-3'	<i>atpC M. j.</i>
<i>atpD</i> ( <i>BamHI</i> )down <i>atpD</i> ( <i>SalI</i> )up	5'-GGATTTACGGATCCAAGAGTGAATC-3' 5'-ATTATTTTTGGTCGACTACTGTCTC-3'	<i>atpD M. j.</i>
<i>atpE</i> ( <i>EcoRI</i> )down <i>atpE</i> ( <i>PstI</i> )up	5'-GGTGAAAGAATTCGGAGTTG-3' 5'-GAATTCAGTGCAGAGGCAATTAG-3'	<i>atpE M. j.</i>
<i>atpF</i> ( <i>EcoRI</i> )down	5'-TGAGGTAAAGAATTCGTTGGCGTT-3'	<i>atpF M. j.</i>

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
<i>atpF</i> ( <i>PstI</i> )up	5'-TTATCGTAACTGCAGTTATCATT-3'	
<i>atpH</i> ( <i>Bam</i> HI)down	5'-GGTGGAAAGTGGATCCGTTAGTGTT-3'	<i>atpH M. j.</i>
<i>atpH</i> ( <i>Sall</i> )up	5'-AATCACCTTTTGTGCGACAATTTCAAG-3'	
<i>ntpK</i> up	5'-GGATCATCCTCATCGCTGGACACTTG-3'	<i>ntpK M. k.</i>
<i>ntpK</i> down	5'-GACGGATACGTTCCGCGTCTCGTTTC-3'	
<i>ntpK</i> ( <i>Eco</i> RI) down	5'-TTTTTTTTTTGAATTCAGTACCGAACTCACGATCGCC-3'	
<i>ntpK</i> ( <i>Sall</i> ) up	5'-TTTTTTTTTTGTGCGACGCGAACACTATCAGGATCGCG-3'	
<i>ntpK</i> (loop <i>Eco</i> RI) down	5'-TTTTTTTTTTGAATTCGCCGAAGACGAAGCGACGTTCCGGT-3'	TMH 1 <i>ntpK M. k.</i>
<i>ntpK</i> (loop <i>PstI</i> ) up	5'-TTTTTTTTTTCTGCGAGGGCAGCTCCGAGCAGTCCAAT-3'	
<i>ntpK</i> + atg down	5'-ATGGTGAGTACCGAACTCACGATCGCC-3'	<i>ntpK M. k.</i>
<i>ntpK</i> - atg down	5'-GTGAGTACCGAACTCACGATCGCCGC-3'	
<i>ntpK</i> + stop up	5'-AGAGGCCGCGAGGGCGGC-3'	

*M.j.*: *Methanococcus jannaschii*, *M.k.*: *Methanopyrus kandleri*, TMH: Transmembranhelix

## 2.2 Anzucht und Nährmedien

### 2.2.1 Anzucht von *M. jannaschii* und *M. kandleri*

Zur Reinigung des ATPase-Gesamtkomplexes wurden tiefgekühlte Zellen von *M. jannaschii* verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Harald Huber, Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg, bereitgestellt.

Die Anzucht erfolgte in einem 300-l Fermenter bei 85°C in Nährmedium nach Jones (Jones *et al.*, 1983), mit der Ausnahme, dass 3 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 18 g/l NaCl, 0,5 g/l Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> zugesetzt wurden, aber kein Cystein/HCl. Der Fermenter wurde mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20 [v/v]) bis zur Einstellung eines Drucks von 0,3 MPa begast. Der Gasdurchfluß wurde je nach Wachstumsphase auf 1-7 l/min eingestellt. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen, durch Zentrifugation (10.000 x g, 20 min, 4°C) in einer Sorvall Superspeed RC2-B geerntet und bei -70°C gelagert (Ausbeute: 2,5 g Zellen/l).

Für die Untersuchungen an *M. kandleri* wurden die Zellen ebenfalls von Dr. Harald Huber bereitgestellt. Die Anzucht erfolgte analog der Anzucht von *M. jannaschii* in einem 300-l Fermenter bei 95°C im Nährmedium nach Kurr (Kurr *et al.*, 1991) (Ausbeute: 0,6 g Zellen/l).

### 2.2.2 Nährmedium für *E. coli*

LB-(Luria-Bertani) Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurde Agar in einer Endkonzentration von 1,5% [w/v] zugesetzt.

*E. coli* wurde aerob in LB-Medium bei 37°C angezüchtet. Die Medien wurden bei Bedarf mit 100 µg/ml Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml in 50% Ethanol) oder 50 µg/ml Kanamycin (Stammlösung 25 mg/ml in H<sub>2</sub>O) versetzt.

## 2.3 Methoden zur Enzymreinigung

### 2.3.1 Gewinnung der Membranfraktion

36 g der tiefgekühlten Zellen wurden in 300 ml Puffer geringer Ionenstärke (Lysepuffer: 25 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM PMSF, pH 7,0) aufgenommen und für ca. 30 min auf Eis mit DNase inkubiert und homogenisiert. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde in einem Mikroskop überprüft.

Größere Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch zwei niedertourige Zentrifugationen (11.000 x g, 30 min, 4°C) in einer Sorvall-Zentrifuge (Du Pont Instruments, Bad Homburg) aus dem Zellextrakt entfernt. Um eine Auftrennung in Cytoplasma und Membranen zu erreichen, wurde der Zellextrakt in Ti50.2-Gefäße überführt und für zwei Stunden zentrifugiert (40.000 Upm, Ti50.2-Rotor, 4°C; Sorvall OTD-50B Ultrazentrifuge, Du Pont Instruments, Bad Homburg). Das tiefbraune Membransediment wurde nach abgießen des Cytoplasmas in Membranpuffer (Membranpuffer: 100 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin [v/v], 0,05 mM PMSF, pH 7,0) aufgenommen und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (40.000 Upm,

Ti50.2-Rotor, 2h, 4°C) wurden die Membranen in Membranpuffer resuspendiert und für weitere Untersuchungen auf Eis gelagert.

### **2.3.2 Solubilisierung des Gesamt-ATPase-Komplexes aus der Cytoplasmamembran**

Zur Optimierung der Solubilisierung wurden Membransuspensionen (11-12 mg Protein/ml) mit unterschiedlichen Detergenzien in einer Konzentration von 1 g Detergens/g Protein versetzt. Dazu wurden die Membransuspensionen in 1 ml bzw. 0,5 ml Aliquots aufgeteilt und für 30 min bei 35°C in einem Thermoheizblock mit dem entsprechenden Detergens inkubiert. Die Solubilisierungsansätze wurden vereinigt und in einem Ti70.1-Zentrifugenröhrchen durch Ultrazentrifugation (40.000 Upm, Ti70.1-Rotor, 90 min, 4°C) in Solubilisat und Membranen getrennt. Die Membranen wurden in Membranpuffer (entsprechend dem Volumen des Solubilisierungsansatzes) resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Im Rahmen der verschiedenen Versuche wurden folgende Detergenzien verwendet: Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen), Cholamidopropylsulfonsäure (CHAPS; GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg), n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Octylglucosid; GLYCON Bioch. GmbH, Luckenwalde) und  $\beta$ -Dodecylmaltosid (GLYCON Bioch. GmbH, Luckenwalde).

Die Solubilisierung wurde im Laufe der Arbeit von 30 min auf 60 min verlängert, die Solubilisierungs-Temperatur wurde um 2°C auf 37°C erhöht.

### **2.3.3 Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten**

Mit einem Gradientenmischer wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient von 20-66% in TV850-Zentrifugenröhrchen (Sorvall, Du Pont, Bad Homburg) gegossen. Die Saccharoselösungen wurden mit Membranpuffer ohne Glycerin (100 mM HEPES, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,0) angesetzt. Für die leichte Lösung (20%) wurden 40 g Saccharose, für die schwere Lösung (66%) 133,3 g Saccharose in je 200 ml Membranpuffer ohne Glycerin gelöst. Das Gesamtvolumen des

Gradienten betrug 37 ml und setzte sich aus je 18,5 ml leichter und schwerer Lösung zusammen.

Bis zu 2 ml des Solubilisats wurden vorsichtig auf den Gradienten aufgebracht und mit Membranpuffer ohne Glycerin überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 43.000 Upm für 18 h (Sorvall OTD-50B, Du Pont, Bad Homburg; TV850-Rotor). Nach der Zentrifugation wurde der Gradient vorsichtig in 2 ml Fraktionen aliquotiert, und die ATPase-Aktivität wurde bestimmt (s. 2.4.1). Die Fraktionen mit der höchsten ATPase-Aktivität wurden vereinigt.

#### **2.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie**

Die Anionenaustausch-Chromatographie erfolgte an einer BioLogic-DuoFlow-Anlage (BioRad Laboratories GmbH, München). Die Säulenpuffer wurden vor Gebrauch filtriert (NC 45/20 Membranfilter, Schleicher und Schuell, Dassel) und entgast.

Das Säulenmaterial (Macro-Prep DEAE Support, BioRad Laboratories GmbH, München) wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet und in eine Glassäule (XK26, Amersham Bioscience) gefüllt. Das Bettvolumen betrug 9 ml. Zunächst wurde mit drei Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer (50 mM Tris, 10% Glycerin, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5) gespült. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit fünf Volumen Hochsalzpuffer (50 mM Tris, 10% Glycerin, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, 1 M NaCl, pH 7,5). Überschüssige Ionen wurden durch spülen mit 45 ml Niedrigsalzpuffer entfernt.

Die vereinigten Fraktionen des Saccharosegradienten wurden mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Proteine, die nicht an die Säule gebunden hatten, wurden mit fünf Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in Säulenpuffer über 90 ml, die Fraktionsgröße betrug 1,5 ml. Die Fraktionen mit hoher ATPase-Aktivität wurden vereinigt und über Centrex UF-2-Röhrchen eingengt (s. 2.3.7).

### **2.3.5 Gelfiltration**

Die Gelfiltration erfolgte an einer BioLogic-DuoFlow-Anlage (BioRad Laboratories GmbH, München). Die Säulenpuffer wurden vor Gebrauch filtriert (NC 45/20 Membranfilter, Schleicher und Schuell, Dassel) und entgast.

Für die Gelfiltration wurde eine Bio-Prep-Se-1000/17 Säule mit einem Bettvolumen von 15 ml (BioRad Laboratories GmbH, München) verwendet. Der Vorlauf der Säule erfolgte mit 75 ml Säulenpuffer (50 mM Tris, 10% Glycerin, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, 150 mM NaCl, pH 7,0). 0,3 ml der Probe wurde für einen Säulenlauf aufgetragen und in 1,5 ml großen Fraktionen über 30 ml (inklusive Probenvolumen) eluiert, die Flußrate betrug dabei 0,1 ml/min. Insgesamt fanden drei Läufe hintereinander mit jeweils 0,3 ml Probe statt.

### **2.3.6 Bestimmung der Molekularmasse durch Gelpermeationschromatographie**

Durch die Gelpermeationschromatographie wird die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Stoke'schem Radius ermöglicht. Bei globulärer Form der Proteine ist das Elutionsvolumen umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse. Für die Gelpermeationschromatographie an einer BioRad DuoFlow-Anlage wurde eine Superose6-HighPrep-Säule der Firma Amersham Bioscience verwendet. Als Proteinstandard wurde der „High-Molecular-Weight-Gelfiltration Calibration-Kit“ der Firma Amersham Bioscience eingesetzt.

### **2.3.7 Konzentrierung von Proteinlösungen**

Proteinlösungen wurden in Centrex UF-2 Ultrazentrifugationsröhrchen (100 kDa MWCO, Schleicher & Schuell, Dassel) nach Angaben des Herstellers konzentriert. Es war aber zu beachten, dass die Membranen vor Gebrauch mit RSA-Lösung (1 mg/ml) abgesättigt und nachfolgend zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> gespült wurden.

## 2.4 Enzymaktivitätsmessung

### 2.4.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATPase katalysiert die Umsetzung von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat. Für den Test wurden 1000  $\mu\text{l}$  ATPase-Testpuffer (ATPase-Testpuffer: 100 mM Mes, 100 mM Tris, 40 mM  $\text{NaHSO}_3$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0 bzw. pH 6,0) in Reagiergefäße (Sarstedt AG, Nürnberg) vorgelegt und dann mit unterschiedlichen Mengen (5  $\mu\text{l}$ -50  $\mu\text{l}$ ) der zu testenden Proben versetzt. Das Endvolumen wurde mit Testpuffer auf 1100-1200  $\mu\text{l}$  gebracht. Die Ansätze wurden für 3 min bei RT und dann weitere 3 min bei 80°C auf einem Thermoheizblock inkubiert. Nach der sechsminütigen Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 M  $\text{Na}_2$ -ATP-Lösung gestartet. Die Endkonzentration von ATP in der Lösung betrug 2,5 mM. Sofort nach Zugabe des ATPs und nach 3, 6, 9 und 12 min wurden 200  $\mu\text{l}$  des Testansatzes entnommen. Diese Aliquots wurden sofort in Reagiergefäße, die 40  $\mu\text{l}$  Trichloressigsäure (30% [v/v]) enthielten, überführt, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Wurden die Ansätze durch ausgefallenes Protein trüb, erfolgte eine Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, Eppendorf-Tischzentrifuge), und 200  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden in ein neues Gefäß überführt.

Um die enzymatische Aktivität der einzelnen Fraktionen nach den Reinigungsschritten zu überprüfen, wurde ein „ATPase-Schnelltest“ durchgeführt. Dazu wurden 5-50  $\mu\text{l}$  der Fraktionen mit 250  $\mu\text{l}$  Testpuffer versetzt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von  $\text{Na}_2$ -ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 80°C wurden 200  $\mu\text{l}$  des Testansatzes entnommen. Als Kontrolle wurde stets die physikalische Hydrolyse des ATP in einem Ansatz ohne Enzym bestimmt.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde das aus ATP freigesetzte  $\text{P}_i$  nach Heinonen und Lahti (Heinonen und Lahti, 1981) quantifiziert. Eine Eichgerade wurde im Bereich von 0 bis 80 mM Phosphat vorbereitet (Phosphatstammlösung: 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Die Proben des ATPase-Inkubationsansatzes und die Proben der Eichgeraden wurden mit 1 ml frischem AAM-(Aceton-Acid-Molybdat)-Reagenz (AAM-Reagenz: 10 mM Ammonium-

heptamolybdat, 5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Aceton, im Verhältnis 1:1:2) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 355 nm gegen einen Leerwert (ohne Phosphat) gemessen.

Eine Enzymeinheit (1 mU) entspricht der Freisetzung von 1 nmol anorganischem Phosphat aus ATP pro min.

#### **2.4.2 Verschiedene Puffersysteme zur Bestimmung der ATPase-Aktivität**

Im Rahmen dieser Versuche sollte ein möglichst Na<sup>+</sup>-freier Testpuffer entwickelt werden, in dem eine hohe ATPase-Aktivität messbar ist. Für die Testpuffer wurden alle Komponenten in destilliertem Wasser angesetzt und einzeln den Reaktionsansätzen zugegeben. Die pH-Werte wurden mit 1 M Tris (suprapur) bzw. 1 M Maleinsäure eingestellt. MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, NaHSO<sub>3</sub> und Acetat wurden als 1 M Lösungen hergestellt. Folgende Puffersubstanzen wurden getestet: MES-Puffer (100 mM MES, pH 6,0); Tris-Puffer (40 mM Tris, pH 6,5), oder Maleinsäure-Puffer (40 mM Maleinsäure, pH 6,0). Alle ATPase-Inkubationsansätze mit dem entsprechenden Puffer enthielten MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 mM. Die anderen Komponenten wurden entsprechend hinzugefügt. Nach 5 Minuten Vorinkubation bei RT und weiteren 3 min bei 80°C wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM gestartet.

#### **2.4.3 Biochemische Charakterisierung der ATPase**

Alle Tests wurden in Testpuffer (100 mM Tris, 100 mM MES, 40 mM NaHSO<sub>3</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0) bei 80°C durchgeführt, oder die Parameter wie angegeben verändert. Das pH-Optimum der ATPase wurde in einem Bereich von pH 4-pH 9 getestet, der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH bei RT eingestellt. Das Temperaturoptimum wurde bei RT, 40, 50, 60, 70, 80 oder 90°C bestimmt. Dazu wurde die ATPase bei RT 3 min vorinkubiert und anschließend bei der entsprechenden Temperatur (s.o.) weitere 3 min inkubiert, der Test wurde dann durch Zugabe von 2,5 mM Na<sub>2</sub>-ATP gestartet und wie beschrieben durchgeführt (s. 2.4.1). Sollte das Mg<sup>2+</sup> durch ein

anderes zwei-wertiges Kation ersetzt werden, wurde das  $\text{MgCl}_2$  durch  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$  oder  $\text{NiCl}_2$  in einer Konzentration von 5 mM ersetzt. Der  $K_M$ -Wert des gereinigten Enzyms wurde für Mg-ATP bei pH 6 bestimmt. Dazu wurde zunächst das Verhältnis von ATP:Mg bestimmt, bei dem die Hydrolyse-Aktivität am höchsten war. Die  $K_M$ -Wert Bestimmung erfolgte dann in verschiedenen ATPase-Tests, in denen die Reaktionen mit unterschiedlichen Mg-ATP Konzentrationen gestartet wurden.

#### **2.4.4 Hemmung der ATPase-Aktivität durch DCCD**

Der ATPase-Inkubationsansatz wurde mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD, Sigma, Deisenhofen; DCCD wurde in Ethanol gelöst) in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Für die Hemmstoffversuche wurde folgender Puffer (50 mM Tris<sub>ultrapur</sub>, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM  $\text{K}_2\text{SO}_3$ , pH 6,0) verwendet. Die Vorinkubation mit DCCD erfolgte für 20 min bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ATP zu einer Endkonzentration von 2,5 mM gestartet. Als Kontrollen dienten Ansätze mit und ohne Ethanol.

## **2.5 Methoden zur Analyse von Proteinen**

### **2.5.1 Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt einer Probe wurde nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) oder Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

### **2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Proteine wurden im Denaturierungspuffer (50 mM Tris, 4% SDS [w/v], 12% Glycerin [v/v], 0,01% Servablau G 250 [w/v], pH 6,8) 10 min gekocht und dann in 10, 12 oder 16%igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Schägger und von Jagow, 1987). Die Proteine wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Brilliant-Blue (s. 2.5.5) oder Silbernitrat (s. 2.5.4) angefärbt.

### 2.5.3 Native Gradienten-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine in ihrem nativen Zustand aufzutrennen, wurden lineare Polyacrylamidgradienten von 4-13% mit einem Gradientenmischer gegossen. Die Lösungen wurden nach den Angaben von Schägger hergestellt (Schägger *et al.*, 1994).

Gelpuffer (3x):	150 mM Bis-Tris, pH 7,0, 1,5 mM Aminocaprinsäure, 0,1% Triton X-100
4%ige Lösung:	20 ml Acrylamidlösung (Rotiphorese 30), 0,1% Triton X-100, 50 ml Gelpuffer, ad 150 ml H <sub>2</sub> O
13%ige Lösung:	65 ml Acrylamidlösung (Rotiphorese 30), 0,1 % Triton X-100, 12,9 ml Glycerin, Gelpuffer, ad 150 ml H <sub>2</sub> O
Anodenpuffer:	50 mM Bis-Tris, pH 7,0
Kathodenpuffer:	50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris, pH 7,0

Die Proben wurden mit 0,001% PonceauS versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 15 h bei 15 mA und 4°C. Die Proteine wurden durch Coomassie oder Silbernitrat sichtbar gemacht.

### 2.5.4 Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987), modifiziert

Die Gele wurden für 1-24 h in 100 ml Methanol, 24 ml Eisessig, 200 µl Formaldehyd, H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> ad 200 ml fixiert. Anschließend wurden die Gele mit 50% Ethanol gewaschen und für 1 min in Thiosulfatlösung (0,04 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> ad 200 ml) geschwenkt. Es folgten weitere Waschschriffe mit H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> und eine Inkubation mit Imprägnierlösung (0,4 g AgNO<sub>3</sub>, 150 µl Formaldehyd, H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> ad 200 ml) für 20 min. Nachdem die Gele mit H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> gespült worden waren, erfolgte die Entwicklung der Proteinbanden mit folgender Lösung (18 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x 10 H<sub>2</sub>O, 2ml Thiosulfatlösung, 100 µl Formaldehyd, H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> ad 200 ml). War die Proteinbande deutlich zu sehen, wurde die Entwicklung durch Zugabe von EDTA gestoppt (3,72 g EDTA H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> ad 200ml). Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Gele in Folie eingeschweißt oder getrocknet.

### 2.5.5 Coomassie-Färbung (Weber und Osborne, 1969)

Die Gele wurden für 30 min in Färbelösung (0,24% [w/v] Serva-Blau-R250, 22,7% [v/v] Methanol) inkubiert und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber (33% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) gewaschen.

### 2.5.6 Molekulargewichtsbestimmung

Als Marker-Kit zur Größenbestimmung von Proteinen wurde der „Low-Molecular-Weight-Calibration-Kit“ (Amersham Bioscience) verwendet. Um eine gute Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde die elektrophoretische Auftrennung erst gestoppt, nachdem die Lauffront ausgetreten war. Zur Bestimmung der molekularen Massen wurden die Laufstrecken der Markerproteine vom oberen Trenngelrand aus gemessen. Die gemessenen Laufstrecken wurden dann gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen. Die apparenten molekularen Massen der zu bestimmenden Proben wurden aus dieser Eichgeraden abgelesen.

### 2.5.7 Trypsinverdau der gereinigten $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii*

Das gereingte Enzym wurde mit Trypsin (Fluka) in den Verhältnissen [w/w] 900:1, 400:1 oder 100:1 bei 30° C, oder 37° C bis zu 2 Stunden inkubiert. Direkt nach Zugabe des Trypsin, nach 10, 30, 60 und 120 min wurde ein Aliquot entnommen und die Reaktion durch 8 mM Pefabloc gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gestellt, und anschließend wurde die ATPase-Aktivität bestimmt. Die restliche Probe wurde mit Auftragspuffer versetzt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Silbernitrat angefärbt.

Als Kontrolle diente eine Rinderserumalbuminlösung (RSA), die wie die ATPase mit Trypsin behandelt wurde. Das Trypsin wurde in 0,1 M Tris (pH 8,5) gelöst (1 mg/ml) und in gewünschter Konzentration zu den Ansätzen mit  $A_1A_0$ -ATPase bzw. RSA gegeben.

## 2.6 Immunologische Methoden

### 2.6.1 Expression von *malE*-Fusionsgenen

Zur Produktion der ATPase-Untereinheiten sollten die dafür kodierenden Gene an *malE* fusioniert werden und das Fusionsprotein über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die *malE*-Fusionsgene wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  in LB-Medium bei 37°C exprimiert. Die Proteinproduktion wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid) induziert. Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion geerntet und in einer „French-press“-Zelle aufgebrochen. Durch eine Affinitätschromatographie an einer Amylose-Matrix wurden die Fusionsproteine nach Angaben des Herstellers (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) über PD-10-Säulchen (Fa. Amersham Bioscience AB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt und zur Herstellung von Antisera verwendet.

### 2.6.2 Herstellung von Antisera

Zur Herstellung von Antisera wurde einem Kaninchen das gereinigte Protein injiziert (Fa. Biomol, Göttingen oder David's Biotechnology, Regensburg). Das Antiserum wurde nach 2-3 Monaten gewonnen.

### 2.6.3 Reinigung eines Antikörpers über Protein-A-Affinitätschromatographie

Die Reinigung eines Antikörpers erfolgte über eine Protein-A-Sepharose CL-4B Säule. Die Säule hatte ein Volumen von 2 ml. Der Säulenpuffer bestand aus 20 mM Phosphatpuffer. Die Flußrate wurde auf 0,5 ml/min eingestellt, 2 ml des Serums (Proteinkonzentration: 86 mg/ml) wurden auf die Säule aufgetragen, danach wurde die Säule solange gespült, bis im Durchfluß kein Protein mehr nachweisbar war ( $E_{280} < 0,1$  nm). Die Proteine wurden mit 0,1 M Citrat (pH 3,0) eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Um die säurelabilen Immunglobuline zu schützen, wurde das Eluat sofort mit 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,5, neutralisiert. Nach einer Auftrennung der Fraktionen im

SDS-Gel und einer Coomassie-Färbung wurden in der Fraktion 1 noch zwei distinkte Banden sichtbar, die die leichte und schwere Kette des Antikörpers repräsentieren. Für den immunologischen Nachweis der Polypeptide wurden die ersten Fraktionen in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet.

#### **2.6.4 Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979)**

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese in einer „Semidry-Elektroblottingkammer TransBlot SD“ (BioRad, München) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) transferriert. Dazu wurde Whatmann 3 MM-Filterpapier (Whatman, Maldstone) sowie die Membran auf Gelgröße zugeschnitten, dann in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% [v/v] Methanol) getränkt und auf der Anodenseite der Blot-Kammer in folgender Reihenfolge angeordnet: vier Lagen Whatmann-Papier, Nitrocellulosemembran, SDS-Polyacrylamidgel und weitere vier Lagen Filterpapier. Anschließend wurden Luftblasen und überschüssiger Transferpuffer mit Saugpapier entfernt. Die Kammer wurde geschlossen und der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 12-14 V gestartet. Nach 35 min wurde die Membran entnommen, und die Protein- und Markerbanden wurden mit Amidoschwarz (0,1% Amidoschwarz [v/v], 40% Methanol [v/v], 10% Eisessig [v/v]) sichtbar gemacht. Der Proteinstandard wurde angezeichnet und die Membran mit PBST-Puffer (40 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Tween 20) entfärbt. Wurde ein vorgefärbter Marker benutzt, (Fermentas GmbH, St. Leon Roth) entfiel das Anfärben mit Amidoschwarz. Es erfolgte eine einstündige Inkubation in „Blocking“-Lösung: 0,5% Milchpulver (Glücksklee, Nestle Deutschland AG, Frankfurt a. Main) in PBST-Puffer, dann wurde die Membran dreimal für 10 min in PBST-Puffer gewaschen und über Nacht oder für 2 Stunden in PBST-Puffer, der mit dem spezifischen Antikörper versetzt war, geschwenkt. Nicht gebundene und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges, 20minütiges waschen in PBST-Puffer entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden mit Protein-A-HRP-Konjugat (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege; 3:1000 in PBST) 1 h markiert. Nach drei weiteren, 10minütigen Waschschr

PBST-Puffer wurde die Membran für 1 min in Chemolumineszenzlösung (20 ml Tris/HCl (0,1M), pH 8,5; 1 ml Luminol-Lösung (0,04 g/ml); para-Coumarsäure (0,015 g/ml); H<sub>2</sub>O<sub>seradest.</sub> ad 200 ml; 10 ml dieser Lösung wurden kurz vor Gebrauch mit 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) versetzt) geschwenkt. Die Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung des Luminols, wodurch es zur Emission von Licht kommt, welches dann einen Röntgenfilm (X-OMAT-AR, Kodak AG, Stuttgart) schwärzt.

## **2.7 Extraktion des Proteolipids von *M. kandleri* durch Chloroform/Methanol**

Membranen von 45 g tiefgefrorenen *M. kandleri*-Zellen wurden in 7-10 ml Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,0) aufgenommen, mit 20 Volumenteilen eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1 [v/v]) versetzt und 21 h in einem Eisbad bei 4°C gerührt. Der Ansatz wurde anschließend über eine Glasfritte filtriert und mit 0,2 Volumenteilen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> im Eisbad für weitere 20 Stunden gerührt. Die Phasentrennung des Gemisches wurde durch eine anschließende Zentrifugation bei 2.000 x g für 10 min bei -4°C erreicht. Die organische Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und zweimal mit 0,5 Volumenteilen eines Gemisches aus Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O (3:47:48 [v/v/v]) im Scheidetrichter gewaschen, die Trennung der Phasen erfolgte dann durch eine Zentrifugation (2.000 x g, -4°C, 10 min). Die organische Phase wurde mit einem Volumen Chloroform versetzt und durch Zutropfen von Methanol aufgeklart. Die Suspension wurde unter Vakuum eingeeengt und in einem kleinen Volumen Chloroform/Methanol (2:1 [v/v]) aufgenommen. Zur Abtrennung von Lipiden wurden die Proteine zweimal mit 4 Volumen Diethylether (-20°C) präzipitiert und in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1 [v/v]) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

## 2.8 Isolierung der Ether-Lipide aus *M. jannaschii*

### 2.8.1 Herstellung des Lipid-Rohextraktes (Bligh und Dyer, 1959)

Für die Extraktion von Ether-Lipiden aus *M. jannaschii* in der Soxhlett-Apparatur wurden ganze, lyophilisierte Zellen eingesetzt. In einem Vorlauf mit 100 ml Methanol/Chloroform (1:1 [v/v]) wurden eventuelle Verunreinigungen aus der Extraktionshülse gewaschen (28 x 80 mm, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel). Anschließend wurden 1,5 g Zellen mit 400 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches (1:1 [v/v]) für 24 Stunden extrahiert. Der Rohextrakt wurde über einen Faltenfilter filtriert.

### 2.8.2 Fraktionierung der Lipide

Der Lipid-Rohextrakt wurde unter Vakuum bei einer Temperatur von 40°C getrocknet und in 20 ml eines Methanol/Wasser-Gemisches (1:1 [v/v]) gelöst. Zur besseren Dispersion der Lipide wurden Glaskugeln ( $\varnothing$  2-3 mm) in den Rundkolben gegeben, und das Gemisch wurde für 15 min in einem Ultraschallwasserbad (Transsonic 460/H, Fa. Elma, Übach Palenberg) beschallt. Zur vollständigen Homogenisierung wurde die zunächst milchig-trübe Lipid-Suspension unter konstanter Kühlung in 3 ml-Fractionen mit einem Probenultraschall-Gerät (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson Ultrasonics, USA) mit einem Mirotip-Limit von 2, 20 Watt und 30% „duty cycle“ 10 x für 10 sec mit jeweils 30 sec Pause behandelt, wodurch die Suspension aufklarte. Anschließend wurde sie auf eine C<sub>18</sub>-Säule (Waters Sep Pak Vac™20cc, Waters Millipore, England) aufgetragen. Die Säule wurde vor Benutzung mit 100 ml Methanol und 100 ml Wasser äquilibriert. Nachdem die Lipide in die Matrix eingetreten waren, wurden sie mit folgenden Lösungsmittelgemischen fraktioniert eluiert:

Fraktion 1	100 ml Methanol/Wasser	1:1	[v/v]
Fraktion 2	100 ml Chloroform/Methanol/Wasser	1:2,5:1	[v/v]
Fraktion 3	100 ml Chloroform/Methanol/Wasser	65:25:4	[v/v]

Durch die stufenweise Erhöhung der Apolarität des Elutionsgemisches ergab sich die Trennung der Lipide hinsichtlich ihrer Apolarität. Fraktion 2 enthielt die für die Rekonstitutionsexperimente erforderlichen Phospholipide. Sie wurden unter Vakuum bei 50°C bis zur Trocknung eingeengt, und unter Beachtung des Kolben-Leergewichtes wurde die Ausbeute bestimmt (etwa 80 mg). Die Lipide wurden zu einer Konzentration von 20 mg/ml in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4 [v/v/v]) aufgenommen und unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei -20°C gelagert.

## 2.9 Rekonstitutionsexperimente

### 2.9.1 Herstellung von Liposomen

Es wurden 4-10 mg der isolierten Lipide entnommen und bei einer Temperatur von 40°C getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden in 500 µl MOPS-Puffer (50 mM MOPS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0) aufgenommen, und mit Triton X-100 vorsolubilisiert. Dazu wurde eine 10%ige Triton X-100-Lösung zu der Lipidlösung getropft, bis eine Abnahme der Extinktion bei 560 nm erfolgte (Rigaud *et al.*, 1995). Die Lipide wurden dann je dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Die so vorbereiteten Lipide konnten dann für die Rekonstitutionsexperimente verwendet werden.

### 2.9.2 Rekonstitution der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase von *M. jannaschii* in Liposomen

Für die Rekonstitution der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase von *M. jannaschii* wurden 200 µl des Enzyms nach der Ultrafiltration (2,6 mg/ml) in Eppendorf-Reagiergefäßen vorgelegt und mit den Liposomen in den Verhältnissen 1:2, 1:5 oder 1:10 [w/w] für 30 min bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Der Einbau der ATPase erfolgte durch die Verringerung des Detergens im Verlauf der Rekonstitution, wodurch hydrophobe Proteine in die Liposomen inserieren. Die Orientierung des Enzyms ist dabei zufällig. Das Entfernen des Detergens wurde durch Zugabe von BioBeads SM2 (BioRad) erreicht. Die BioBeads mussten zunächst vorbereitet werden, wozu sie in eine PD-10

Leersäule (Amersham Bioscience) gegeben wurden und nacheinander mit 4 Säulenvolumen Methanol, 3 Säulenvolumen Ethanol und 6 Säulenvolumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{seradest.}}$  gespült wurden. Nach der 30 minütigen Vorinkubation des Rekonstitutionsansatzes bei RT wurden alle 60 min je 1 mg der BioBeads in den Ansatz gegeben. Nach 4 h wurden die Ansätze über Nacht im Kühlraum ohne weitere Zugabe von BioBeads inkubiert.

Die so erhaltenen Proteoliposomen wurden für die Messung der ATP-Synthese und -Hydrolyse verwendet.

### **2.9.3 Messen einer ATP-Synthese-Aktivität durch inkorporiertes $^{32}\text{P}$ , modifiziert nach (Kagawa und Sone, 1979)**

Um eine ATP-Synthese aus ADP und  $\text{P}_i$  durch die in Liposomen rekonstituierte ATPase aus *M. jannaschii* messen zu können, wurde der Einbau von  $^{32}\text{P}_i$  in ATP verfolgt, wobei das gebildete ATP im Anschluß über eine ATP-Falle abgefangen und in Glucose-6-phosphat überführt wurde (Hempfling und Hertzberg, 1979).

Die Versuche wurden in Eppendorf-Gefäßen, die mit einem Butylgummistopfen verschlossen waren, durchgeführt. 1,1 ml Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM  $\text{NaHSO}_3$ , 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 8 oder 7) wurden bei  $80^\circ\text{C}$  für 5 min vorinkubiert und mit 10  $\mu\text{Ci}$   $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  (0,165  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  Phosphat) versetzt. Nachdem 100  $\mu\text{l}$  für die Nullprobe entnommen wurden, wurde die ATP-Synthese-Reaktion durch Zugabe von 35-50  $\mu\text{l}$  der über Nacht in Beladungspuffer (100 mM Succinat, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 5 oder 4) inkubierten Proteoliposomen-Suspension gestartet. Proben wurden zu bestimmten Zeitpunkten (Entnahme der Proben in Abständen von 2, 5 oder 10 min) entnommen, und durch sofortigen Transfer auf Eis wurde die Reaktion gestoppt.

Um neu synthetisiertes ATP in Glucose-6-Phosphat umzuwandeln, wurden die Proben anschließend mit je 100  $\mu\text{l}$  einer 20 mM Glucose-Lösung mit 1,4 U Hexokinase versetzt. Diese Ansätze wurden für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Ansätze in Hungate-Gefäße, in denen 2 ml Ammonium-Molybdat-Lösung (2% [w/t],  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$  in 1,6 N  $\text{HClO}_4$ ) vorgelegt war, transferiert und so die Reaktion abgestoppt.

Die Zugabe von Triethylamin führte zur Präzipitation eines Phosphomolybdat-Protein-Komplexes, der durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4.000 Upm sedimentiert wurde. Der Überstand, der noch geringe Mengen an nicht verestertem  $^{32}\text{P}_i$  enthielt, wurde noch zwei mal mit je 2 ml eines Isobutanol/Benzol-Gemisches (1:1 [v/v]) extrahiert, wobei die Proben jeweils 3 x eine Minute auf einem Whirl-Mixer gemischt wurden. Das anorganische  $^{32}\text{P}_i$  löste sich in der organischen Phase, verestertes Phosphat wie Glucose-6-Phosphat verblieb in der wässrigen Phase. Nach der letzten Extraktion wurden 1,5 ml der wässrigen Phase in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Fa. Roth, Karlsruhe) überführt, und die Radioaktivität des veresterten  $^{32}\text{P}_i$  wurde in einem Szintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR, Fa. Packard, Dreieich) gemessen.

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1 Standardmethoden

Molekulare Standardmethoden wie Restriktion, Ligation, Fällen der DNS oder Gelelektrophorese wurden nach Sambrook durchgeführt (**Sambrook et al., 1989**). Restriktionsenzyme und andere Enzyme wurden von der Firma MBI-Fermentas (St. Leon Rot) und Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Plasmidisolierungen aus *E. coli* erfolgten entweder nach der Methode von Holmes und Quickley (**Holmes und Quigley, 1981**) oder mit dem „Mini-Prep“-System der Firma Quiagen (Hilden). DNS-Fragmente aus Agarose-Gelen wurden mit dem „QuiaexII Gel extraction“-Verfahren gereinigt. DNS-Fragmente nach der PCR wurden mit dem „Nucleotide removal kit“ der Firma Quiagen aufgereinigt. Die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte durch die  $\text{CaCl}_2$ -Methode (**Cohen et al., 1972; Inoue et al., 1990**). Die Transformation von *E. coli* wurde nach Hanahan durchgeführt (**Hanahan, 1983**). Die Ermittlung von DNS-Sequenzen erfolgte automatisch mit fluoreszenzmarkierter DNS an einem ABI Prism377 DNA Sequenzer.

### 2.10.2 Isolierung chromosomaler DNS (Marmur, 1961; Rahlfs und Müller, 1997)

Es wurden jeweils tiefgefrorene Zellen von *M. jannaschii* und *M. kandleri* eingesetzt. 0,5 g Zellen wurden in 8 ml EDTA/Tris-Puffer (100 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 7) aufgenommen, mit 1 ml 25%iger [w/v] SDS-Lösung versetzt und mit einer „French-press“-Zelle (Fa. Polytec, Waldbronn) aufgeschlossen. Dem Zelllysat wurden 100 µl Proteinase-K-Lösung (80 µg/ml) zugegeben, und der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei 65°C inkubiert. Um die DNS zu isolieren, wurde 12 ml einer 6 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung und 0,3-0,8 ml Glasmilch (Vogelstein und Gillespie, 1979) zugegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Umschwenken mit dem Proteinase-behandelten Zelllysat gemischt. Nach Zugabe von 20 ml Isobutanol und dem absetzen der an die Glasmilch gebundenen DNS wurde der Überstand verworfen, und das Sediment wurde anschließend mit 10 ml einer NaI-Lösung (16,5 M NaI, 90 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, filtriert und lichtgeschützt gelagert) versetzt. Das Sediment wurde mit 10 ml „new-wash“-Puffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7, 50% Ethanol [v/v]) vorsichtig gewaschen und dann in 10 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Durch eine 15-minütige Inkubation bei 50°C wurde die DNS von der Glasmilch gelöst. Eine anschließende Zentrifugation (4.000 x g, 4°C, 2 min) sedimentierte die Glasmilch, die DNS im Überstand wurde durch Zugabe von 1 ml einer 7,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat-Lösung und 30 ml kaltem Ethanol (reinst. 96% [v/v]) gefällt. Durch eine Zentrifugation des Ansatzes wurde die DNS sedimentiert, anschließend in 1-2 ml TE Puffer aufgenommen und über Nacht bei 37°C in Lösung gebracht.

### 2.10.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) wurde in 25, 50 oder 100 µl Ansätzen in einem Minicycler MJ (Fa. Biometra, Göttingen) mit den Komponenten des „Taq-PCR-Core-Kits“ (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Programme umfassten eine 5-minütige Denaturierung der DNS bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 1

min-2 min), Anlagerung (40°C-70°C, 1 min) und Synthese (72°C, die Temperatur und Länge der Syntheszeit stützte sich auf die Angaben des Herstellers der Polymerase). Um Abbruchfragmente aufzufüllen, wurde das Programm mit einer Inkubation bei 72°C für 10 min abgeschlossen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-BioTech (Ebersberg) oder der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bestellt.

## 2.11 Elektronenmikroskopie

Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Mayer, Institut für Mikrobiologie, Göttingen, durchgeführt. Die gereinigte ATPase wurde dazu mit Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0) auf eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml verdünnt. Die Aufnahmen der gereinigten ATPase erfolgte nach einer Negativkontrastierung (**Valentine und Chignell, 1968**). Als Kontrastierungslösung diente eine wässrige Uranylacetatlösung (4 % [w/v], pH 4,8), die Proben wurden in einem Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbar gemacht.

Die Strukturanalysen der ATPase erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Coskun und Herrn Dr. Grüber, Universität des Saarlandes, Homburg. Das gereinigte Enzym wurde auf Netze aufgebracht, mit 2% Uranylacetat angefärbt, und elektronenmikroskopische wurden mit einem stickstoffgekühlten Philips CM20FEG-Elektronenmikroskop angefertigt. Die Bilder wurden mit einer Gatan 4000 SP 4K „slow scan“ CCD Kamera aufgenommen und mit GRACE-Software ausgewertet. Einzelpartikelanalysen wurden mit dem GRIP-software Paket mit einem „PC-cluster“ analysiert. Die Auswertung der Aufnahmen wurde von Herrn Coskun durchgeführt (**Coskun et al., 2004**).

Die elektronenmikroskopischen Verfahren wie Negativkontrastierung der Proteoliposomen mit Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure und die Anfertigung der Quetschpräparate wurden nach Hoppert und Holzenburg durchgeführt (**Hoppert und Holzenburg, 1998**). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden an einem Philips EM 301 Elektronenmikroskop (Fa.

Philips, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV und wurden von Dr. Michael Hoppert, Göttingen erstellt.

## **2.12 Chemikalien, Enzyme und Gase**

Chemikalien wurden von den Firmen, Merck (Darmstadt), ICN Biomedicals (Costa Mesa, USA), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie stammten von MBI-Fermentas Deutschland GmbH (St. Leon Rot) und Roche (Mannheim). Standardproteine für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurden von Amersham Bioscience AB (Uppsala, Schweden) und MBI Fermentas bezogen. Acrylamid wurde als fertige Lösung von der Carl Roth GmbH bezogen. Detergenzien konnten bei Glycon Bioch. GmbH (Luckenwalde) bestellt werden. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) oder Biomers (biomers.net GmbH) synthetisiert. Gase stammten von Messer Griesheim (Kassel).

### 3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

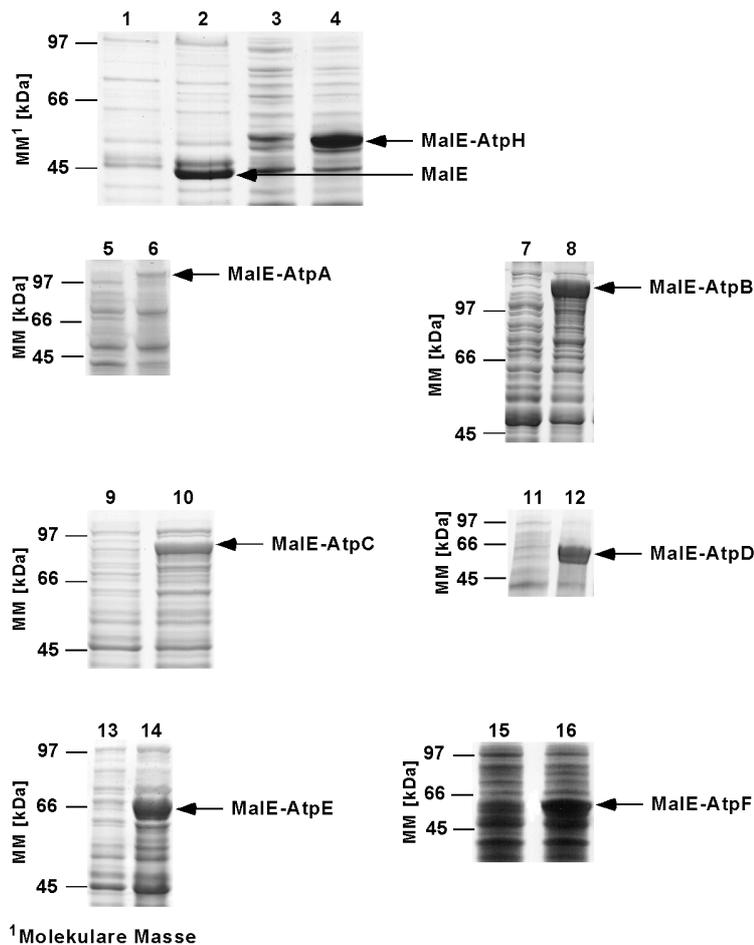
#### 3.1 Klonierung und Expression einzelner A<sub>1</sub>-Untereinheiten als MalE-Fusionsproteine zur Generierung von Antikörpern

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits die Antikörper gegen die membranständigen Untereinheiten *a* (AtpI) und *c* (AtpK) vor (Kavermann, 1999). Da die Produktion hydrophober Proteine oftmals zu Schwierigkeiten führen kann, wurde nur die cytoplasmatische Domäne der Untereinheit *a* als MalE-Fusionsprotein produziert und zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet. Für das Proteolipid wurden die Transmembranhelices 2 und 3 an MalE fusioniert, produziert und zur Antikörperherstellung einem Kaninchen injiziert.

Die Gene der hydrophilen Untereinheiten *atpA*, *atpB*, *atpC*, *atpD*, *atpE*, *atpF* und *atpH* wurden mittels PCR amplifiziert und an das für das Maltosebindeprotein kodierende Gen *malE* fusioniert. Da methanogenen Archäen kein Maltosebindeprotein besitzen, konnten die ATPase-Untereinheiten als MalE-Fusionen hergestellt werden. Die korrekte Insertion wurde durch die Wahl unterschiedlicher Schnittstellen an den Enden der zu klonierenden Fragmente gewährleistet, wobei die Erkennungssequenz für das „upstream“ Restriktionsenzym über das Start-Kodon gelegt wurde. Die Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert, und die Expression wurde durch IPTG induziert. Wie aus Abb. 4 ersichtlich, konnte von jeder der hydrophilen Untereinheiten A-F und H eine MalE-Fusion erzeugt und in *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgreich produziert werden. Im Fall von MalE-AtpC wurde *E. coli* BL21(RIL) als Produktionsstamm gewählt, da in *E. coli* DH5 $\alpha$  das Fusionsprotein nicht ausreichend produziert wurde. *E. coli* BL21(RIL) trägt ein Plasmid, das zusätzliche transfer-RNAs für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Leucin kodiert. Spezielle Basentriplets, die für diese Aminosäuren kodieren, werden in *E. coli* kaum verwendet, weshalb auch nur wenige t-RNAs für diese seltenen Codons zur Verfügung stehen (Kleber-Janke und Becker, 2000). Das kann bei der heterologen Produktion von Proteinen

zum Problem werden, wenn die m-RNA des zu produzierenden Proteins viele dieser seltenen Basentriplets enthält. Das zusätzliche Angebot an t-RNAs schafft einen Ausgleich und kann so die Produktion heterologer Proteine ermöglichen.

Jedes der überproduzierten Fusionsproteine wurde über eine Affinitätschromatographie gereinigt und direkt den Kaninchen injiziert.



**Abb. 4 Überproduktion der hydrophilen Untereinheiten AtpA, AtpB, AtpC, AtpD, AtpE und AtpF als MalE-Fusionen**

Die Fusionsproteine wurden wie beschrieben in *E. coli* produziert, 1 ml der Zellsuspension wurde abzentrifugiert, und die Zellen wurden entsprechend ihrer OD in Schägger-Auftragungspuffer resuspendiert (bei einer  $OD_{600}$  von 1 wurde das Zellsediment in 100  $\mu$ l Auftragungspuffer aufgenommen). Je 15  $\mu$ l der Proben vor Induktion und nach Induktion wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, und die Proteine wurden mit Coomassie-Lösung angefärbt. Spur 1, 2: MalE vor und nach Induktion; Spur 3, 4: MalE-AtpH vor und nach Induktion; Spur 5, 6: MalE-AtpA vor und nach Induktion; Spur 7, 8: MalE-AtpB vor und nach Induktion; Spur 9, 10: MalE-AtpC vor und nach Induktion; Spur 11, 12: MalE-AtpD vor und nach Induktion; Spur 13, 14: MalE-AtpE vor und nach Induktion; Spur 15, 16: MalE-AtpF vor und nach Induktion.

Die Spezifität der Antiseren wurde am gereinigten Enzym getestet (s. Abb. 16).

## **3.2 Anreicherung der $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii***

### **3.2.1 Vorversuche zur Solubilisierung der $A_1A_0$ -ATPase**

Ziel war die Isolierung eines  $A_1A_0$ -ATPase-Komplexes, in dem möglichst alle aus der Sequenzanalyse vorhergesagten Untereinheiten enthalten sein sollten. Einer der kritischen Punkte bei der Isolierung des Enzyms ist dessen Solubilisierung aus der Cytoplasmamembran durch Detergenzien. Schwierigkeiten, die dabei auftreten, sind, dass sich zum einen die unterschiedlichen membranständigen Untereinheiten nicht gleich gut solubilisieren lassen, zum anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen gestört werden und dadurch Verluste von Untereinheiten aus dem Komplex bewirken können.

Daher wurden zunächst unterschiedliche Detergenzien auf ihre Eignung zur schonenden und vollständigen Solubilisierung der  $A_1A_0$ -ATPase überprüft. Zum Einsatz kamen nicht-ionische vom Polyoxyethylen-Typus wie Triton X-100, nicht-ionische vom Alkylglucosid-Typus wie Octylglucosid oder Dodecylmaltosid oder ein zwitterionisches wie CHAPS. Die Detergenzien wurden allesamt in einer Konzentration von 1 g Detergens pro g Membranprotein eingesetzt. Die Membranen wurden für 30 min bei 35°C ohne Schütteln mit dem Detergens inkubiert. Danach erfolgte eine Abtrennung von Membranen und Überstand durch Ultrazentrifugation. Die unterschiedlichen Detergenzien führten in jedem Fall zu einer nur geringen Inaktivierung des Enzyms. Die Ausbeuten betragen 84-108 % (Tab. 5).

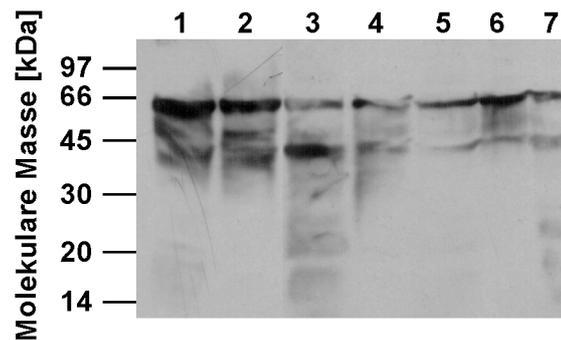
**Tab. 5: Solubilisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase mit unterschiedlichen Detergenzien**

Detergens <sup>1</sup>	ATPase-Aktivität			Ausbeute <sup>2</sup>	
	Überstand	Sediment	Gesamtaktivität		
	[mU]ges.	[%]	[mU]ges	[mU]ges	[%]
Octylglucosid	96	32	207	303	97
CHAPS	86	29	205	291	92
Dodecylmaltosid	105	40	156	261	84
Triton X-100	174	50	170	344	108

<sup>1</sup>Das Detergens wurde in einer Konzentration von 1 g/g Membranprotein bei einer Proteinkonzentration von 11-17 mg/ml eingesetzt. Das Volumen des Solubilisierungsansatzes betrug 0,3 ml. <sup>2</sup>Die Ausbeute bezog sich auf die in den Test eingesetzte Gesamtaktivität von 317 bzw. 310 mU, die 100% entsprach.

Vergleicht man den Anteil der Aktivität im Überstand zum Anteil nicht solubilisierter Aktivität fällt auf, dass mit Triton X-100 immerhin 50% der Aktivität in den Überstand gebracht wurden, während mit Dodecylmaltosid nur 40% und Octylglucosid oder CHAPS nur 30 % der Enzymaktivität solubilisiert wurde (Tab. 5).

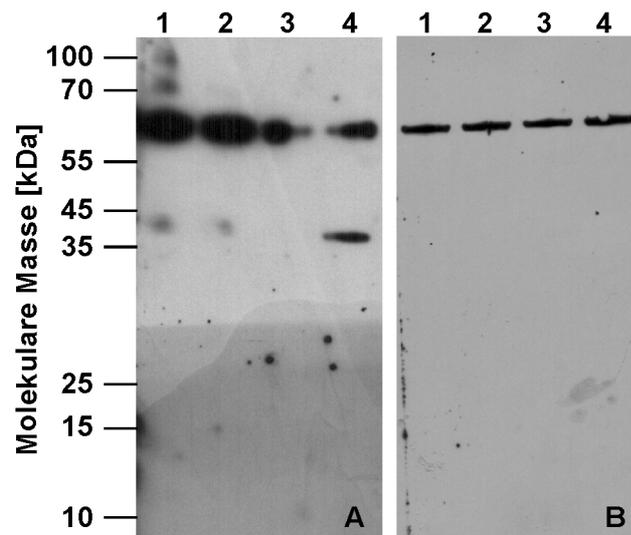
Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die membrangebundene Untereinheit *a*, die zuvor noch nie in einer A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase-Präparation gefunden wurde, durch die verwendeten Detergenzien aus der Membran gelöst werden konnte. Dazu wurden die solubilisierten Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und die Untereinheit *a* wurde durch eine Western-Blot-Analyse (2.6.4) mit Anti-Atpa<sub>CD</sub>-Antiserum detektiert. Quantitative Analysen wurden nicht durchgeführt, es ist aber aus Abb. 5 ersichtlich, dass jedes Detergens zur Solubilisierung der Untereinheit *a* führt. Die schon vorher beobachtete Degradation der Untereinheit *a* in ein 36 kDa-Produkt ist auch in Abb. 5 zu erkennen, allerdings bleiben substantielle Mengen an unprozessierter Untereinheit *a* erhalten (Kavermann, 1999). Die geschilderten Versuche belegen, dass im Prinzip jedes der getesteten Detergenzien zur schonenden Solubilisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase geeignet war. Aufgrund der besten Solubilisierung und aus Kostengründen wurde für die weiteren Versuche Triton X-100 gewählt.



**Abb.5 Solubilisierung der Untereinheit a durch Octylglucosid, Dodecylmaltosid oder Triton X-100.**

Membranen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben mit Octylglucosid (Spuren 2 und 3), Dodecylmaltosid (Spuren 4 und 5) oder Triton X-100 (Spuren 6 und 7) behandelt, nach einer Ultrazentrifugation erhielt man die Überstände (Spuren 2, 4 und 6) und die Sedimente (Spuren 3, 5 und 7). Aliquots wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einem Anti-Atpa<sub>CD</sub>-Antikörper hybridisiert. Spur 1: unbehandelte Membranen.

Um zu überprüfen, ob die membrangebundene Untereinheit a proteolytisch degradiert wird, wurden Membranen von *M. jannaschii* und *M. mazei* über 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, und nach 6 h, 24 h und 3 Tagen wurde ein Aliquot mit SDS-Auftragspuffer versetzt, gekocht und eingefroren. Am Ende des Versuchs wurden die Proben auf eine SDS-Page aufgetragen, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem Anti-Atpa<sub>CD</sub>-Antikörper bzw. dem Anti-Atpa -Antikörper (gegen die a-Untereinheit von *M. mazei*) hybridisiert. In Abb. 6 ist zu erkennen, dass lediglich die a - Untereinheit von *M. mazei* nach 3 Tagen prozessiert wird. Die Untereinheit a von *M. jannaschii* konnte nur in einer unprozessierten Form nachgewiesen werden. Möglicherweise war der Membranpuffer, der für die Solubilisierungstests der *M. jannaschii*-Membranen verwendet wurde, mit Proteasen verunreinigt, die zum Abbau der Untereinheit a führten (s. Abb. 5). Eine Prozessierung der Untereinheit a am gereinigten Enzym konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (diese Arbeit). Eine Degradation der Untereinheit a aus *M. mazei* könnte durch eine geringere Stabilität mesophiler Proteine erklärt werden.



**Abb. 6** Stabilität der membrangebundenen Untereinheit *a* von *M. mazei* und *M. jannaschii*

Um die Stabilität der Untereinheit *a* aus *M. mazei* und *M. jannaschii* zu testen, wurden Aliquots der Membransuspensionen mit SDS-Auftragspuffer versetzt, und die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Membranen mit den Antiseren (Verdünnung: 1:3000) gegen die Untereinheit *a* von *M. mazei* oder *M. jannaschii* inkubiert (2.6.4). In A wurden die Membranen von *M. mazei* aufgetragen, in B die von *M. jannaschii*. Spur 1: frische Membranen, Spur 2: nach 6 h, Spur 3: nach 24 h, Spur 4: nach 3 Tagen.

### 3.2.2 Herstellung der Membranfraktion

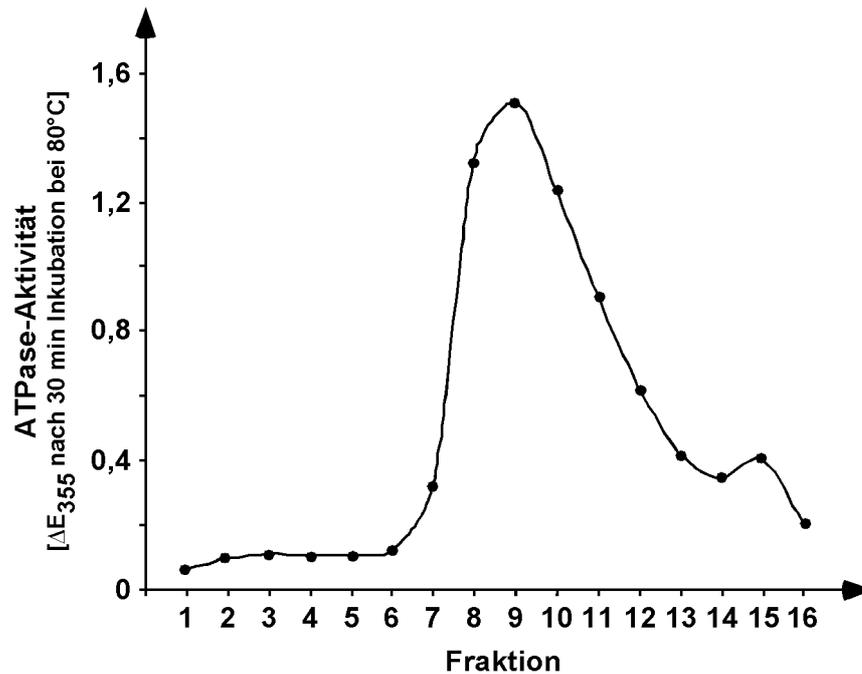
Vorversuche hatten gezeigt, dass 9-12 g Zellen für eine Anreicherung der ATPase zu wenig waren, da bereits nach dem zweiten Reinigungsschritt das Enzym zu stark verdünnt war. Daher wurde für alle folgenden Versuche eine Menge von 40-45 g Zellen eingesetzt. Die tiefgefrorenen Zellen wurden in 300 ml Lysepuffer aufgenommen, und die Membranfraktion wurde wie unter 2.3.1 beschrieben gewonnen. Die Membranen wurden dann in 80 ml Membranpuffer gewaschen und in etwa 10 ml Membranpuffer resuspendiert. Die Membranfraktion hatte eine Proteinkonzentration von 40-49 mg/ml, die spezifische Aktivität betrug 150-217 mU/mg.

### 3.2.3 Solubilisierung des ATPase-Gesamtkomplexes

Für die Solubilisierung des Gesamtkomplexes mit Triton X-100 wurden 9-12 ml der Membransuspension mit 1 g Detergens pro g Membranprotein versetzt und wie unter 2.3.2 beschrieben inkubiert. Es wurden insgesamt 588 mg Protein für die Solubilisierung eingesetzt. Nach der Ultrazentrifugation wurden 110% der eingesetzten Gesamtaktivität im Überstand und dem resuspendierten Pellet gefunden. Bezogen auf eine Gesamtaktivität von 11,7 U/ml (setzte sich zusammen aus der Aktivität des Solubilisats von 4,5 U/ml plus der Aktivität des resuspendierten Sediments von 7,2 U/ml) konnten 38% der Enzymaktivität im Überstand nachgewiesen werden. Bezogen auf eine Aktivität von 10,65 U/ml der unbehandelten Membranen konnten 42% der Enzymaktivität im Solubilisat gefunden werden.

### 3.2.4 Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten

Zur weiteren Anreicherung der ATPase wurde das Solubilisat im Saccharosegradienten (20-66% Saccharose) aufgetrennt. Je 1,75 ml des Solubilisats wurden auf vier Saccharosegradienten aufgetragen und mit Membranpuffer ohne Glycerin überschichtet (s. 2.3.3). Nach einer 18-20stündigen Zentrifugation wurden die Gradienten in 22 Fraktionen mit einem jeweiligen Volumen von 2 ml aliquotiert. Die ATPase-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde in einem „ATPase-Schnelltest“ bestimmt (s. 2.4.1). Die Extinktion bei 355 nm nach 30 min wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Ein typisches „Aktivitätsprofil“ der Fraktionen eines Saccharosegradienten ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7** Auftrennung der ATPase durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

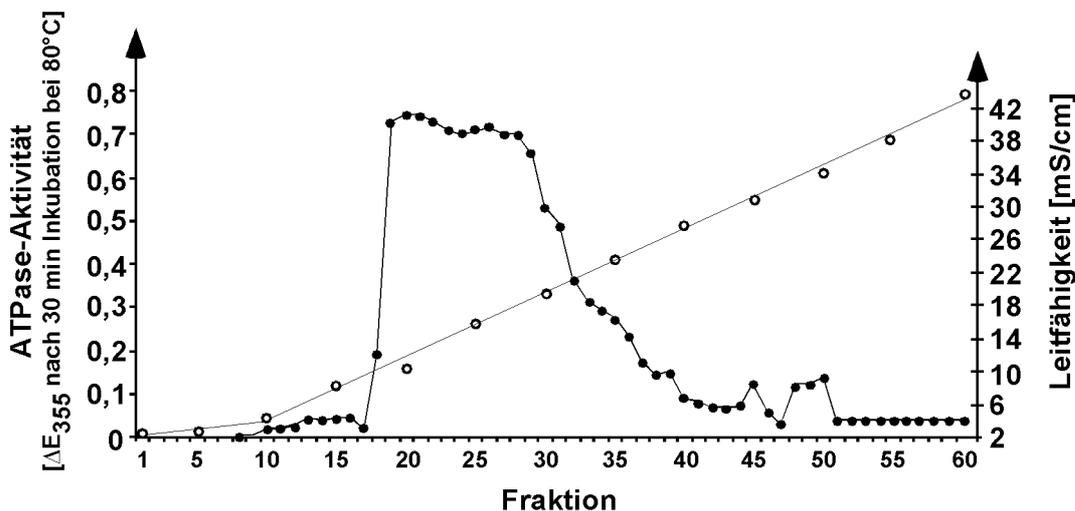
1,75 ml des Solubilisats wurden auf einen Saccharosegradienten (26 ml, 20-66% Saccharose [w/v]) aufgetragen und 20 h im TV850-Rotor (43.000 Upm, 4°C) zentrifugiert. Der Gradient wurde in 16 Fraktionen zu 2 ml aliquotiert, die ATPase-Aktivität wurde im „ATPase-Schnelltest“ (s. 2.4.1) ermittelt und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

Die ATPase-Aktivität wurde in den Fraktionen 7-13 im unteren Drittel des Gradienten detektiert. Für die weitere Auftrennung wurden diese Fraktionen mit der höchsten relativen ATPase-Aktivität vereinigt. Die vereinigten Fraktionen des Saccharosegradienten hatten einen Proteingehalt von 0,8 mg/ml, eine spezifische Aktivität von 1,63 mU/mg und ein Gesamtvolumen von 21 ml.

### 3.2.5 Anionenaustausch-Chromatographie

Die vereinigten Fraktionen der Saccharosegradienten-Dichtezentrifugation wurden durch eine Anionenaustausch-Chromatographie an Macro-Prep-DEAE-Support weiter aufgetrennt. Die Chromatographie wurde wie unter 2.3.4 beschrieben durchgeführt. Das Elutionsprofil wurde wieder mit Hilfe der relativen Aktivität (Extinktion nach 30minütiger Inkubation bei 80°C), die durch einen „ATPase-Schnelltest“ (s. 2.4.1) ermittelt wurde,

dargestellt (Abb. 8). Nach Äquilibration der Säule wurde die Probe aufgetragen und ungebundenes Protein mit Niedrigsalzpuffer entfernt. Die gebundenen Proteine wurden dann mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-1 M NaCl) in Fraktionen von 1,5 ml aufgetrennt. Die Flußrate wurde auf 0,5 ml/min eingestellt. Das Elutionsprofil (Abb. 8) zeigt einen breiten Peak mit mindestens zwei Maxima. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Fraktionen 19-28 verwendet. Die vereinigten Fraktionen (Volumen: 12 ml, Proteingehalt: 0,43 mg/ml, spezifische Aktivität: 3,42 U/mg) wurden auf ein Volumen von 1 ml über Centrex UF-2-Röhrchen (s. 2.3.7) eingeeengt (Proteingehalt: 2,2 mg/ml, spezifische Aktivität: 3,36 U/mg) und weiter über eine Gelfiltration aufgereinigt.

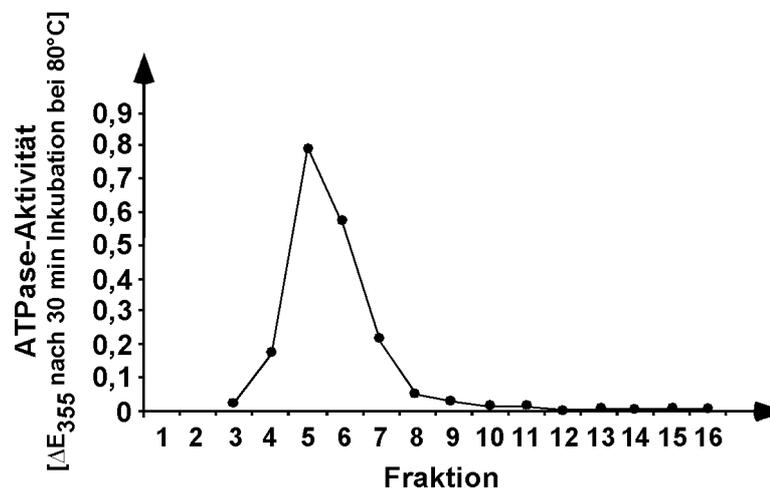


**Abb. 8 Anionenaustausch-Chromatographie der vereinigten Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten**

21 ml der vereinigten Fraktionen des Saccharosegradienten (16,8 mg Protein) wurden auf eine Anionenaustausch-Chromatographie-Säule (Macro-Prep-DEAE- Support) aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-1 M NaCl über 90 ml in Säulenpuffer eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1,5 ml, die Flußrate betrug 0,5 ml /min. Die im „ATPase-Schnelltest“ (s. 2.4.1) ermittelte ATPase-Aktivität der Fraktionen wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (●). Die Leitfähigkeit [mS/cm] jeder fünften Fraktion ist dargestellt (○).

### 3.2.6 Gelfiltration

Eine SE-1000/17 Gelfiltrationssäule wurde dreimal hintereinander mit je 0,3 ml des Ultrafiltrats beladen. Die Flußrate betrug 0,1 ml/min und das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Die relative ATPase-Aktivität wurde im „ATPase-Schnelltest“ (s. 2.4.1) bestimmt und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (Abb. 9). In diesem letzten Reinigungsschritt eluierte die ATPase in einem scharfen Peak, die höchste ATPase-Aktivität wurde in Fraktion 5 nachgewiesen. Diese hatte eine Aktivität von 1,15 U/ml, die spezifische Aktivität betrug 3,45 U/mg. Das entsprach einer 16fachen Anreicherung und einer Ausbeute von 4% am Ende der Reinigung.



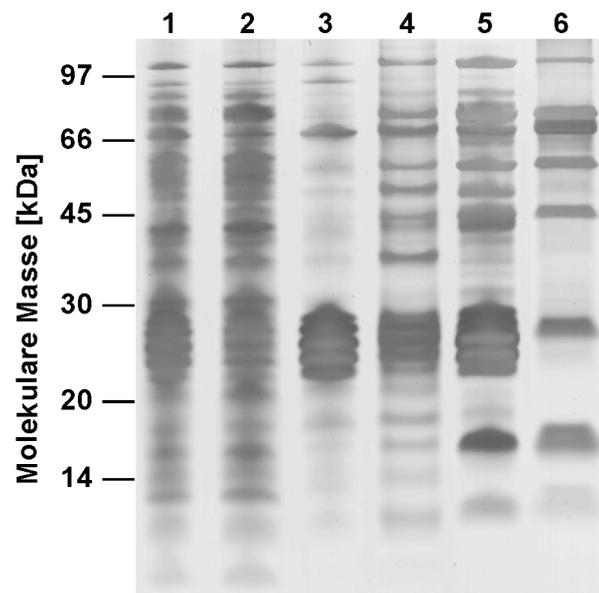
**Abb.9 Gelfiltration der vereinigten Fraktionen nach der DEAE-Chromatographie**

0,3 ml der vereinigten Fraktionen nach DEAE-Chromatographie wurden auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Flußrate betrug 0,1 ml/min, es wurden Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt. Die ATPase-Aktivität wurde im „ATPase-Schnelltest“ (s. 2.4.1) ermittelt und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

### 3.2.7 Übersicht der Reinigung des ATPase-Gesamtkomplexes

Die Reinigung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase wurde ausgehend von den gewaschenen Membranen über eine Solubilisierung mit Triton X-100, einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, einer Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE und einer Gelfiltration erreicht. Ein

Anreicherungsprotokoll für den Gesamt-ATPase-Komplex ist in Tab. 6 wiedergegeben. Dabei ergab sich eine Anreicherung um den Faktor 16, bei einer Ausbeute von 4%. Die Ausbeute nach der Solubilisierung betrug 25%, nach dem Saccharosegradienten wurden weitere 20% der Aktivität eingebüßt. In Abb. 10 wurden je 20  $\mu\text{g}$  Protein der verschiedenen Anreicherungsschritte gelelektrophoretisch aufgetrennt, und durch eine Silberfärbung wurden die Proteine sichtbar gemacht.



**Abb. 10 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine der ATPase-Aktivität- enthaltenden Fraktionen während der Anreicherung**

Die ATPase wurde wie im Text beschrieben gereinigt. Aus den Proben oder vereinigten Fraktionen wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Protein in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Spur 1: Membranen; Spur 2: resuspendiertes Sediment nach Solubilisierung mit Triton X-100; Spur 3: Solubilisat (Triton X-100); Spur 4: vereinigte Fraktionen nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation; Spur 5: vereinigte Fraktionen nach Anionenaustausch-Chromatographie; Spur 6: Fraktion 5 nach Gelfiltration.

**Tab. 6 Anreicherung des ATPase-Komplexes aus *M. jannaschii***

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	Aktivität [U/ml]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherungs- faktor [x-fach]	Ausbeute [%]
Membranen	12	588	10,65	213	1	100
Solubilisat	7	56	4,5	562	2,6	24,6
Saccharosegradient	21	16,8	1,3	1.630	7,6	21,4
Anionenaustausch- Chromatographie	12	5,2	1,47	3.420	14,8	13,8
Ultrafiltration	1	2,2	7,4	3.360	15,7	5,7
Gelfiltration	4,5	1,5	1,7	3.450	16,2	4

### 3.3 Charakterisierung der $A_1A_0$ -ATPase

#### 3.3.1 Gelelektrophoretische Analyse und Untereinheitenzusammensetzung

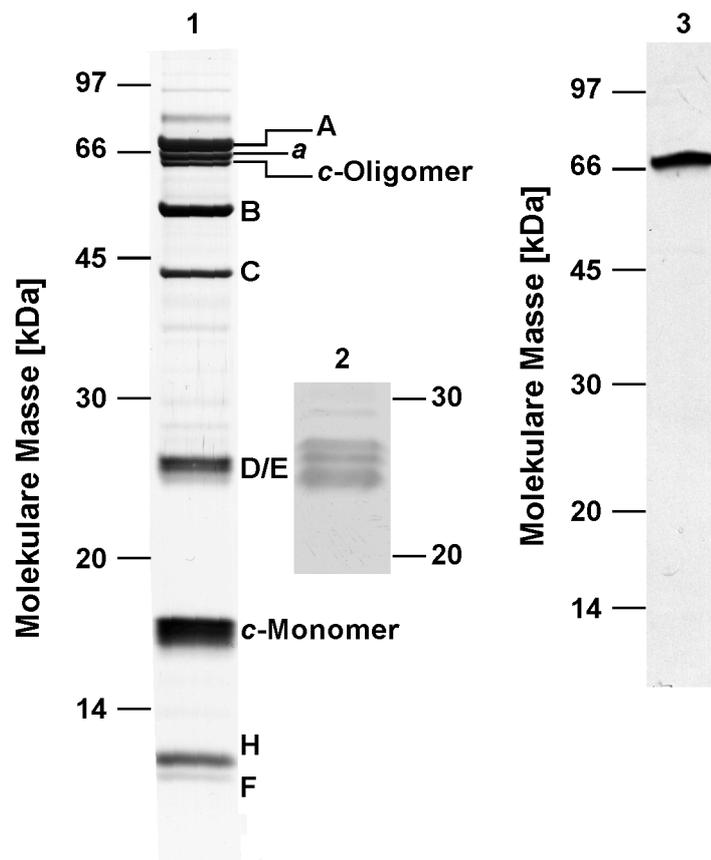
Nach dem letzten Reinigungsschritt, der Gelfiltration, enthielt die Präparation 11 Polypeptide mit apparenten molekularen Massen von 90, 82, 76, 72, 70, 54, 45, 28, 16, 11 und 10 kDa (Abb. 11). Um eine bessere Auflösung der niedermolekularen Polypeptide zu erzielen, wurde das gereinigte Enzym auf ein 16%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, wodurch eine Auftrennung der Polypeptide im Bereich von 28 kDa möglich war (Abb. 11). Im Bereich von 30 bis 20 kDa wurden drei Polypeptide mit apparenten molekularen Massen von 27, 26 und 24 kDa sichtbar.

**Tab. 7 Zuordnung der Polypeptide der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase Präparation anhand der aus den Aminosäuresequenzen abgeleiteten molekularen Massen**

Untereinheit	vorausgesagte molekulare Masse (kDa)	apparente molekulare Masse (kDa)
A	66	66-68
B	51	54
C	45	43-45
D	25	24-27
E	23	24-27
F	11	12-13
G	6	-
H	12	12-13
a	76	68-76
c	21	nur nachweisbar in der oligomeren Form (68-76 kDa) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Der Nachweis erfolgte aufgrund von Western-Blot-Analysen.

Die in der ATPase-Präparation enthaltenen Proteine wurden über eine N-terminale Sequenzierung und immunologische Verfahren identifiziert. Für die N-terminale Sequenzierung wurde 80 µg der gereinigten A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase auf ein 12%iges Acrylamidgel aufgetragen und für 14 h bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet, Coomassie gefärbt und N-terminal sequenziert. Das 16-kDa-Protein färbte sich nur sehr schwach an, konnte aber auf dem Blot als sehr schwache blaue Bande identifiziert werden. Abb. 12 zeigt ein Coomassie gefärbtes Gel, das nicht geblottet wurde, die N-terminalen Sequenzen sind neben den entsprechenden Proteinbanden angegeben. In dem Coomassie gefärbten Gel sind lediglich zwei Polypeptide im Bereich von 66-70 kDa sichtbar (s. Abb. 12). Es ist nicht auszuschließen, dass das c-Oligomer von den anderen Polypeptiden in diesem Bereich verdeckt wird. Bei der N-terminalen Sequenzierung konnte das c-Oligomer ebenfalls nicht detektiert werden, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass der extrem hydrophobe Ring nicht auf die PVDF-Membran transferiert wurde.



**Abb. 11 Gelelektrophoretische Analyse der gereinigten ATPase**

Die ATPase-Präparation nach der Gelfiltration wurde im 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Silber angefärbt (Spur 1). Nach einer verlängerten gelelektrophoretischen Auftrennung wurden im Bereich von 20-30 kDa drei Polypeptide sichtbar (Spur 2). Die Untereinheiten der  $A_1A_O$ -ATPase sind angegeben. In Spur 3 wurde die gereinigte ATPase im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und gegen den Anti-Atpc<sub>TM23</sub>-Antikörper hybridisiert.

Das 72-kDa-Polypeptid repräsentiert die Untereinheit *a*, das Polypeptid mit der apparenten Masse von 68 kDa entspricht der Untereinheit A. Das Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 54 kDa konnte als Untereinheit B identifiziert werden. Das Polypeptid im Bereich von 43 kDa repräsentiert die Untereinheit C. Im Bereich zwischen 20 und 30 kDa waren zwei Untereinheiten, D und E, enthalten, die in dem 12%igen SDS-Gel nicht voneinander getrennt wurden. Obwohl in der Silberfärbung drei Polypeptide sichtbar waren, konnte kein weiteres Protein nachgewiesen werden, wahrscheinlich handelt es sich bei dem dritten Polypeptid um ein Abbauprodukt oder eine Kontamination, die abhängig von der Präparation auftrat. Das 16-kDa-Polypeptid entspricht der Untereinheit *c*, dem Proteolipid.

Weitere Polypeptide mit apparenten molekularen Massen von 11 und 10 kDa repräsentieren die Untereinheiten F und H. Damit konnten die aus der molekularen Analyse vorhergesagten hydrophilen Untereinheiten A, B, C, D, E, F, H und die hydrophoben Untereinheiten *a* und *c* in der Präparation nachgewiesen werden. Das dritte Polypeptid im Bereich von 70 kDa ist ein Oligomer der Untereinheit *c* (siehe unten). Die Polypeptide bei 97 und 87 kDa wurden nicht weiter analysiert, auch hier könnte es sich um eine Kontamination oder eine Proteinaggregation handeln. Ansonsten konnten keine weiteren Proteine in der Präparation nachgewiesen werden. Die Untereinheit G (6 kDa), die zwar im Operon kodiert zu sein scheint, aber deren Produktion und Funktion noch nicht nachgewiesen werden konnte (Ruppert *et al.*, 1998), war in der Präparation nicht vorhanden. In Tabelle 8 sind die DNA-Sequenzen der ATPase Untereinheiten mit den experimentell ermittelten Aminosäuresequenzen zusammengefasst.

**Tab. 8 Gensequenz und experimentell ermittelte Polypeptidsequenzen der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase-Untereinheiten aus *M. jannaschii***

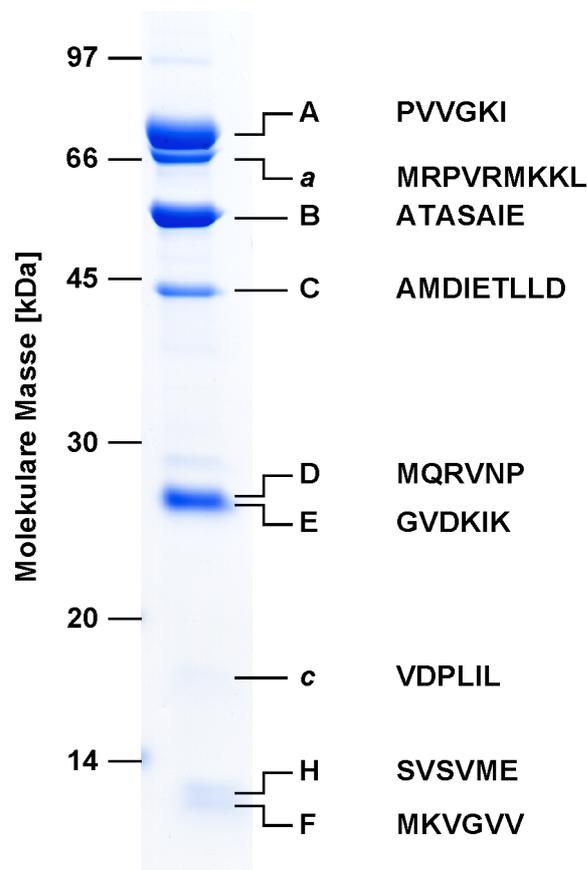
UE										
A	DNA <sup>a</sup>	ATG	CCA	GTT	GGT	AAG	ATT	ATT		
	Protein <sup>b</sup>		P	V	V	G	K			
B	DNA	ATG	GCT	ACA	GCA	GCA	TCA	GCA	ATT	
	Protein		A	T	A	A	S	A	I	
C	DNA	ATG	GCG	ATG	GAT	ATQ	GAG	ACA	TTG	TTA
	Protein		A	M	D	I	E	T	L	L
D	DNA	ATG	CAG	AGA	GTG	AAT	CCA			
	Protein		M	Q	R	V	N	P		
E	DNA	ATG	GGA	GTT	GAT	AAG	ATA	AAG		
	Protein		G	V	D	K	I	K		
F	DNA	ATG	AAA	GTT	GGC	GTT	GTT			
	Protein		M	K	V	G	V	V		
H	DNA	ATG	AGC	GTT	AGT	GTT	ATG	GAA		
	Protein		S	V	S	V	M	E		
<i>a</i>	DNA	GTG	AGA	CCC	GTA	AGA	ATG	AAG	AAG	
	Protein		M	R	P	V	R	M	K	K
<i>c</i>	DNA	ATG	GTA	GAT	CCT	TTA	ATC	TTA		
	Protein		V	D	P	L	I	L		

<sup>a</sup>Die DNS-Sequenzen starten bei folgenden Basenpaaren im *M. jannaschii*-Genom: A 208947, B 207137, C 210514, D 564344, E 211232, F 209304, H 214471, *a* 214142 und *c* 211957

<sup>b</sup>Experimentell ermittelte N-terminale Sequenzen

Alle Untereinheiten nutzen ATG als Startcodon, nur das Gen für die Untereinheit *a*, *atpI*, startet mit GTG. Das N-terminale Methionin der

Untereinheiten A, B, C, E, H und c wurde prozessiert. Die in der Datenbank angegebenen Startcodons unterschieden sich von denen, die experimentell ermittelt wurden. *AtpA* startet 21 Basenpaare unterhalb des festgelegten Startcodons, für *atpE* wurde ein GTG als Startcodon festgelegt, tatsächlich startet die Sequenz aber 6 Basenpaare nach diesem Startcodon mit einem ATG, und *atpI* startet mit einem GTG zwei Tripletts nach dem in der Datenbank angegebenen GTG.

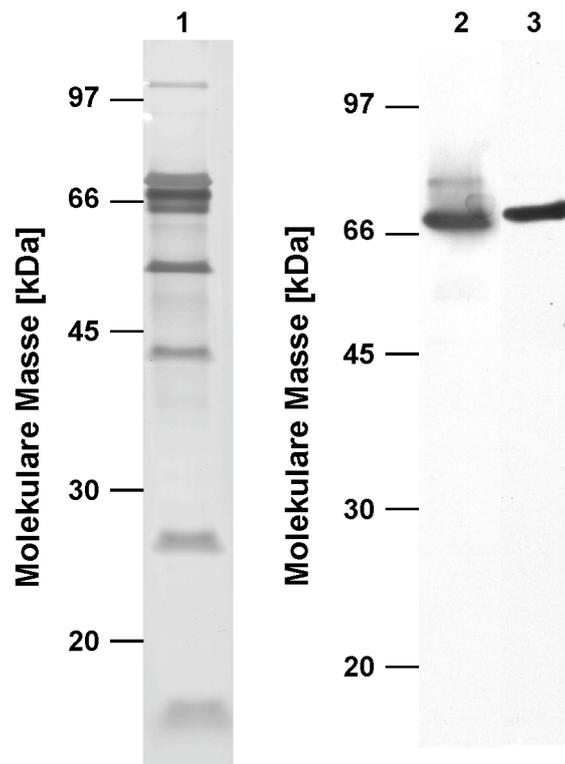


**Abb.12** Coomassie-Färbung und N-terminale Sequenzen der Untereinheiten der  $A_1A_0$ -ATP-Synthase von *M. jannaschii*

80  $\mu$ g ATPase wurden in einem 12%igen SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Die N-terminalen Sequenzen der einzelnen Proteine sind neben den entsprechenden Proteinbanden angegeben.

Für den immunologischen Nachweis der ATPase-Untereinheiten wurde das gereinigte Enzym im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferriert. In Abb. 13 ist der Nachweis der beiden membranständigen Untereinheiten a und c dargestellt. Der Antikörper

Atpc<sub>TM23</sub> reagierte nicht, wie erwartet, mit dem 16 kDa-Proteolipid, sondern mit einem Polypeptid im Bereich von 70 kDa. Dabei könnte es sich um ein unter den Denaturierungsbedingungen stabiles Oligomer der Untereinheit K, dem Proteolipid handeln. SDS-resistente Proteolipid-Oligomere wurden zuvor in *P. modestum* (Laubinger und Dimroth, 1988), *Acetobacterium woodii* (Reidlinger et al., 1994) und *I. tartaricus* (Neumann et al., 1998) gefunden.

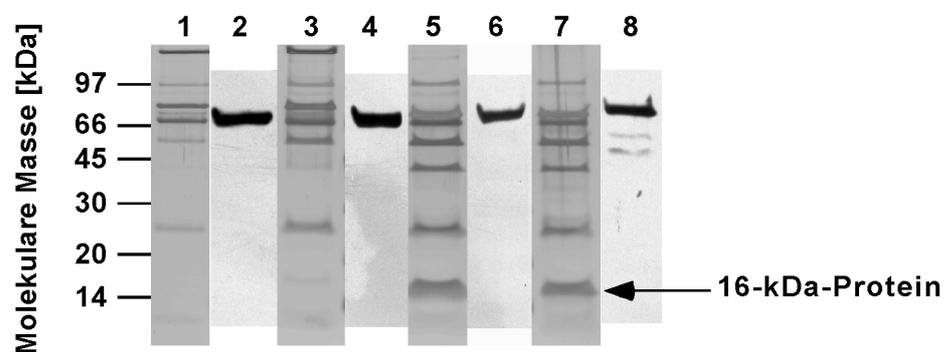


**Abb. 13 Immunologischer Nachweis der Untereinheiten a und c in der gereinigten A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase**

Die gereinigte ATPase wurde im SDS-Gel aufgetrennt und die Untereinheiten mit Silber angefärbt (Spur 1) oder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und gegen den Anti-Atpa<sub>CD</sub>-Antikörper (Spur 2) oder den Anti-Atpc<sub>TM23</sub>-Antikörper hybridisiert (Spur 3). Der Transfer der Proteine wurde für 35 min bei 14 V durchgeführt, und die Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:5000 zusammen mit der Membran über Nacht inkubiert.

Um das Proteolipid in seine monomere Form zu überführen, wurden unterschiedliche Bedingungen auf ihre Eignung zur Denaturierung des Oligomers überprüft. In den vorangegangenen Experimenten wurde das Enzym stets 10 min in SDS-Denaturierungspuffer (50 mM Tris, 4% SDS [w/v], 12% Glycerin [v/v], 0,01% Servablau G 250 [w/v], pH 6,8) gekocht und dann

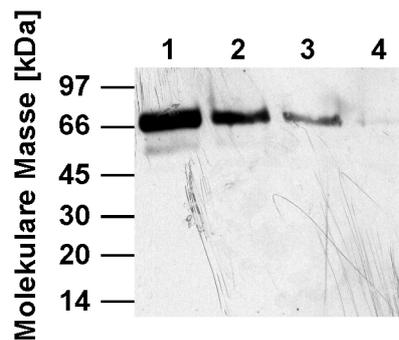
gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nun wurden zusätzlich folgende Denaturierungsbedingungen getestet: Inkubation in SDS-Denaturierungspuffer für eine Stunde bei RT, 30 min bei 37°C, und 2 min bei 120°. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Nachweis des Proteolipids mittels Western-Blot-Analyse. In dem Silber-gefärbten Gel (Abb. 14) wird deutlich, dass mit steigender Temperatur die Intensität des 16-kDa-Proteins zunimmt. Wiederum konnte jedoch keine Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem 16-kDa-Polypeptid detektiert werden (Abb. 14).



**Abb. 14** Versuche zur Denaturierung des Proteolipid-Oligomers von *M. jannaschii*

Je 50 µg der gereinigten ATPase wurde nach unterschiedlich durchgeführten Denaturierungen im SDS-Gel aufgetrennt und mit Silber angefärbt (Spuren 1, 3, 5 und 7) oder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und gegen den Anti-Atpc<sub>TM23</sub>-Antikörper hybridisiert (Spuren 2, 4, 6 und 8). Der Antikörper wurde 1:5000 in PBST-Puffer verdünnt. Die Inkubation in Denaturierungspuffer erfolgte für 1 h bei RT (Spur 1 und 2), für 30 min bei 37°C (Spur 3 und 4), für 10 min bei 100°C (Spur 5 und 6) und für 2 min bei 120°C (Spur 7 und 8).

Die Proteolipid-Oligomere aus *P. modestum* und *A. woodii* werden durch autoklavieren in SDS-Puffer denaturiert, daher sollte dieses Verfahren auch auf die A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase von *M. jannaschii* angewandt werden. Nach Inkubation der ATPase-Präparation aus *M. jannaschii* in SDS-Denaturierungspuffer für 2, 5, 10 und 15 min im Autoklaven war zwar die Menge des Oligomers verringert, das Monomer oder andere Formen konnten immunologisch aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 15).

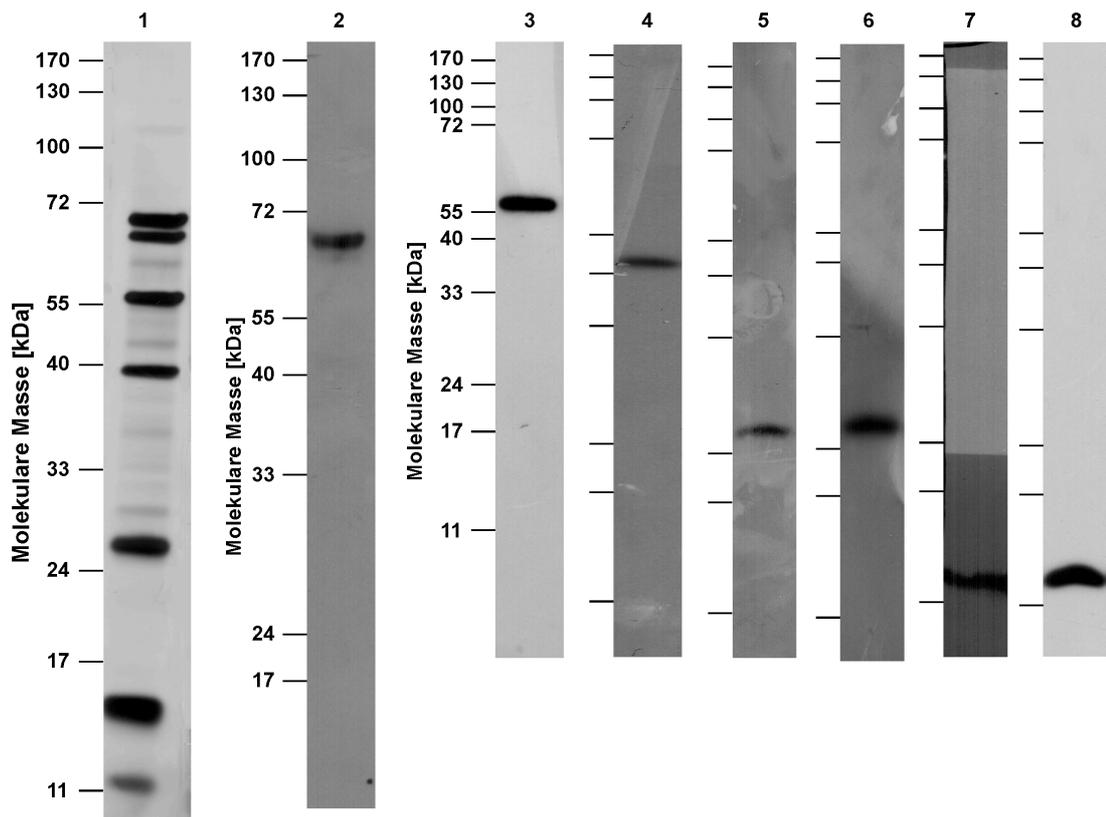


**Abb. 15 Versuche zur Denaturierung des Proteolipid-Oligomers**

Die gereinigte ATPase wurde nach unterschiedlich durchgeführten Denaturierungen im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und gegen den Anti-Atpc<sub>TM23</sub>-Antikörper hybridisiert. Der Antikörper wurde 1:5000 in PBST-Puffer verdünnt. Die Inkubation in Denaturierungspuffer erfolgte für 2 (Spur 1), 5 (Spur 2); 10 (Spur 3) oder 15 min (Spur 4) im Autoklaven.

Da das Monomer der Untereinheit *c* immunologisch nicht nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass die Epitope (Transmembranhelices 2 und 3 des Proteolipids), gegen die der Antikörper gerichtet ist, nach der Denaturierung durch eine Konformationsänderung nicht mehr zugänglich oder zerstört waren. Da der Antikörper Atpc<sub>TM23</sub> nur gegen zwei der insgesamt sechs vorhandenen Transmembranhelices gerichtet ist, könnte eine fehlende Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem monomeren Proteolipid aufgrund einer Konformationsänderung erklärt werden. Durch die N-terminale Sequenzierung und eine Chloroform/Methanol-Extraktion konnte das 16-kDa-Polypeptid aber zweifelsfrei als Proteolipid identifiziert werden (Ruppert *et al.*, 2001).

Die hydrophilen Untereinheiten wurden mit den Antikörpern, die als MalE-Fusionsproteine zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden, nachgewiesen (Abb. 16).

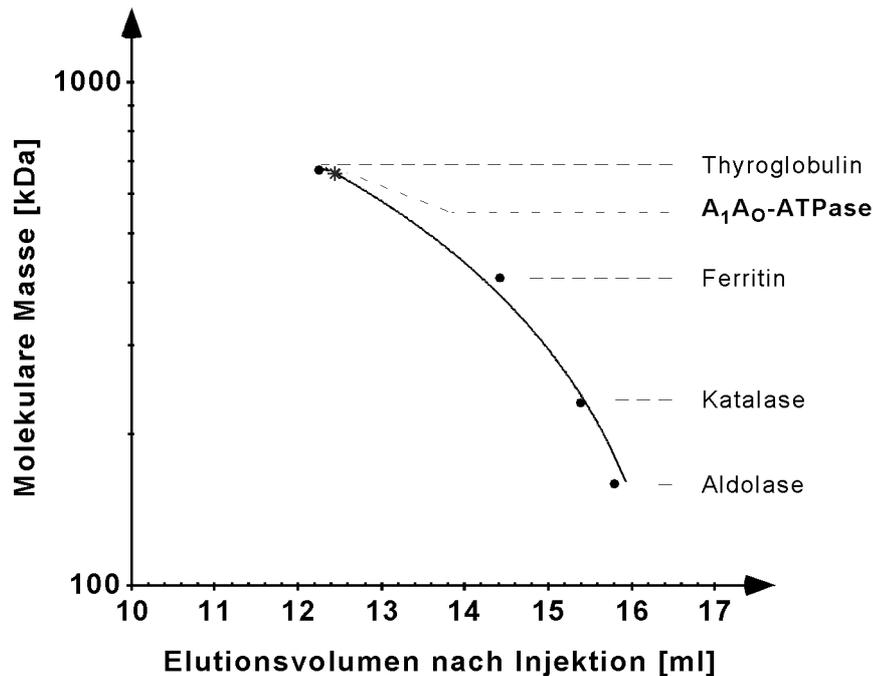


**Abb. 16 Nachweis der hydrophilen Untereinheiten der  $A_1A_0$ -ATPase**

Die gereinigte ATPase wurde im SDS-Gel aufgetrennt und mit Silber angefärbt (Spur 1), oder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und gegen die Anti-AtpA, Anti-AtpB, Anti-AtpC, Anti-AtpD, Anti-AtpE, Anti-AtpF und Anti-AtpH-Antikörper hybridisiert (Spur 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8). Der Transfer der Proteine wurde für 40 min ( $2 \text{ mA/cm}^2$  Membran) durchgeführt, und die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:2000 zusammen mit der Membran für 3 h inkubiert.

### 3.3.2 Bestimmung der molekularen Masse des $A_1A_0$ -ATPase Komplexes

Die molekulare Masse der gereinigten  $A_1A_0$ -ATPase von *M. jannaschii* wurde mittels Gelfiltration bestimmt. Dazu wurden die Standardproteine Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa) und Aldolase (158 kDa) als Marker verwendet. Die Elutionsvolumina der einzelnen Proteine wurde bestimmt, und die molekularen Massen wurden logarithmisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Daraus ergab sich eine Eichgerade, anhand derer die Masse der ATPase bestimmt werden konnte (Abb. 17).



**Abb. 17 Bestimmung der molekularen Masse der  $A_1A_0$ -ATPase mittels Gelfiltration**

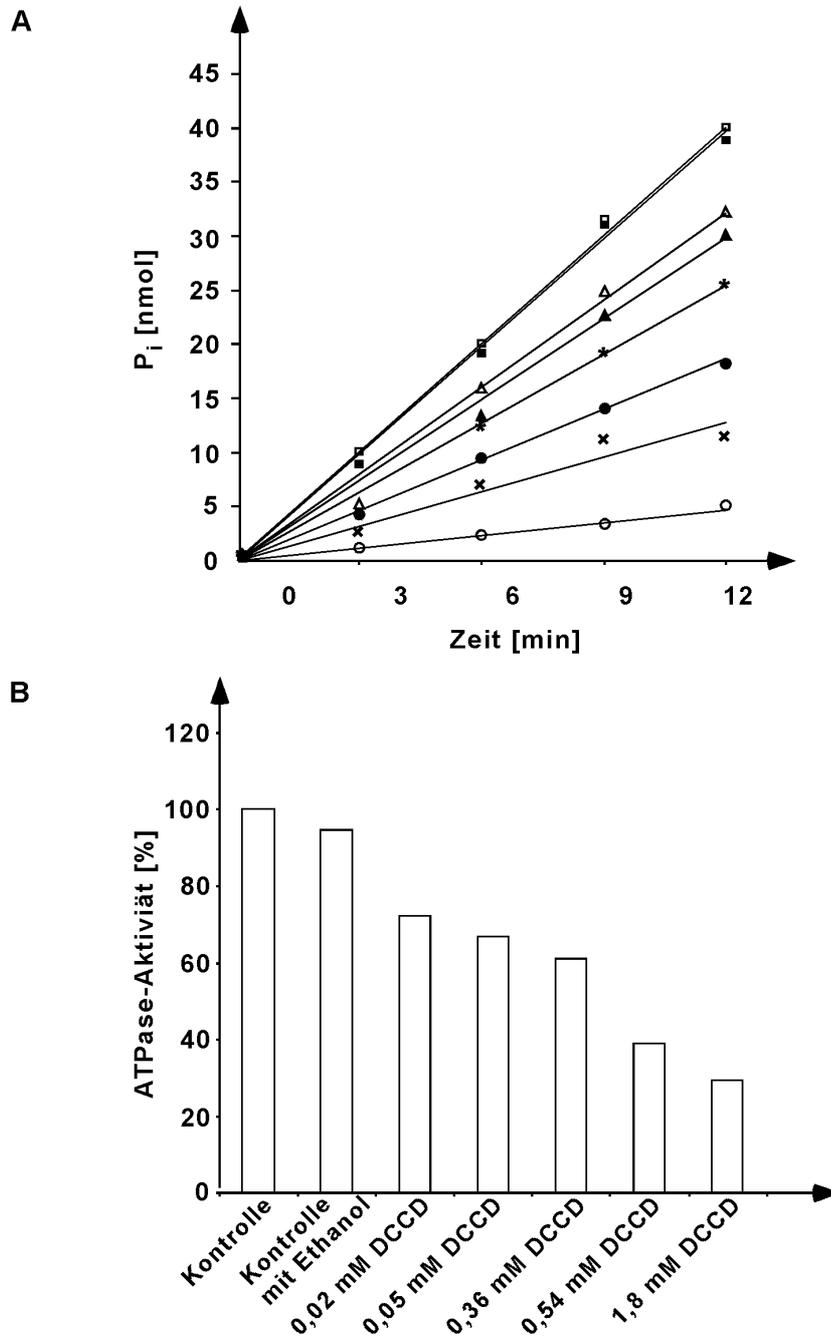
Es sind die molekularen Massen der Standardproteine logarithmisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Das Elutionsvolumen und das daraus resultierende Molekulargewicht der ATPase sind angegeben. Als Standard wurde der Amersham Bioscience „Gelfiltration Calibration Kit“ verwendet.

Der ATPase-Komplex eluierte bei 12,4 ml, was einer Masse von etwa 670 kDa entspricht. Geht man von einer  $A_3B_3CDEHIF$ -Stöchiometrie aus, erhält man eine molekulare Masse von 543 kDa für die hydrophilen Proteine und die membranständige Untereinheit  $a$ . Die restlichen 127 kDa könnten sich dann auf sechs  $c$ -Untereinheiten verteilen. Allerdings könnten auch die kleineren Untereinheiten in mehr als nur einer Kopie vorkommen.

### 3.3.3 Nachweis der funktionellen Kopplung der $A_1$ - und $A_0$ -Domäne

DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) bindet kovalent an die für die Ionentranslokation essentielle Aminosäure (Glu oder Asp) des Proteolipids der ATPase und führt damit zur Hemmung der Ionentranslokation in  $A_0$ ,  $F_0$  oder  $V_0$ . In einer gekoppelten ATPase führt diese Hemmung nachfolgend zu einer Hemmung der ATP-Hydrolyse in  $A_1$ ,  $F_1$  oder  $V_1$ . Dieses Verhalten kann genutzt werden, um eine funktionelle Kopplung der  $A_1$ - und  $A_0$ -Domäne

nachzuweisen. DCCD wurde in Ethanol gelöst und in Endkonzentrationen von 0,02, 0,05, 0,36, 0,54, oder 1,8 mM zum Testansatz gegeben. Nach einer 20minütigen Inkubation der Testansätze bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Die Enzymaktivität wurde im Vergleich zu einem Ansatz ohne Inhibitor bestimmt. Die Kontrollen ohne Inhibitor enthielten die entsprechende Menge Ethanol oder Testpuffer. Dargestellt ist exemplarisch ein Versuch, weitere Inhibitorversuche mit DCCD bestätigten das Ergebnis, dass DCCD die ATPase-Aktivität sehr effizient hemmte (s. Abb. 18). Die maximale Hemmung betrug bis zu 71%, eine vollständige Hemmung wurde nicht beobachtet. Dies war aber auch nicht zu erwarten, da solche Präparationen auch immer einen Anteil an freiem  $A_1$  enthalten. Dies wurde später auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Diese Experimente belegen, dass die  $A_1$ - und  $A_0$ -Domäne in den  $A_1A_0$ -ATPase-Partikeln funktionell gekoppelt sind. Dies setzt eine Erhaltung der Struktur voraus.



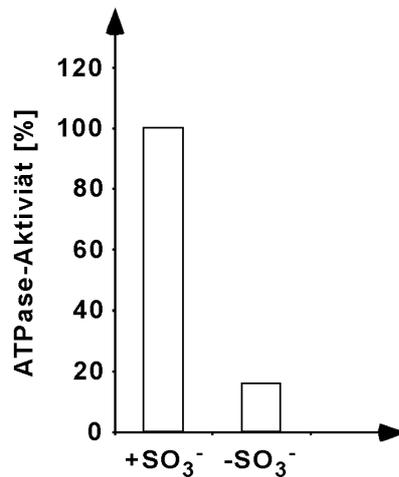
**Abb. 18 Hemmung der gereinigten  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* durch DCCD**

30  $\mu$ l der gereinigten ATPase (0,4 mg/ml) wurde in den Inkubationsansätzen (1040  $\mu$ l Puffer: 50 mM Tris<sub>ultrapur</sub>, 40 mM  $K_2SO_3$ , 5 mM  $MgCl_2$ , pH 6,0) mit dem Hemmstoff DCCD in unterschiedlichen Konzentrationen für 20 min bei RT vorinkubiert, die Reaktion wurde mit 2,5 mM  $Na_2$ -ATP gestartet und anschließend die ATPase-Aktivität bestimmt. (□) Kontrolle, (■) Zugabe von Ethanol, (Δ) 0,02 mM DCCD, (▲) 0,05 mM DCCD, (★) 0,36 mM DCCD, (●) 0,54 mM DCCD, (✕) 1,8 mM DCCD, (○) physikalische Hydrolyse von ATP. In Abb. B sind die relativen Aktivitäten dargestellt. 100% entspricht einer Aktivität von 568 mU/ml.

### 3.3.4 Untersuchungen zur Ionenspezifität

Nachdem gezeigt worden war, dass die  $A_1$ - und die  $A_0$ -Domäne funktionell gekoppelt sind, sollte der Frage nachgegangen werden, ob die ATP-Hydrolyse von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration abhängig ist. Da die  $\text{Na}^+$ -Ionenbindestelle in der  $A_0$ -Domäne lokalisiert ist, können solche Untersuchungen nur mit „gekoppelten“ Enzymen durchgeführt werden. Unbedingte Voraussetzung zum Nachweis einer  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der Reaktion sind aber  $\text{Na}^+$ -freie Puffer. Der bisher verwendete Puffer enthielt 100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM  $\text{NaHSO}_3$  und 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , und die Reaktion wurde durch  $\text{Na}_2$ -ATP gestartet.  $\text{Na}^+$ -arme Bedingungen sollten wie folgt hergestellt werden: 1. möglichst geringe Konzentrationen aller Verbindungen einsetzen, damit Kontaminationen so gering wie möglich gehalten werden und 2. alle  $\text{Na}^+$ -Salze gegen andere Salze austauschen. Dabei mußte auch die pH-Wert-Einstellung berücksichtigt werden.  $\text{Na}_2$ -ATP konnte gegen  $\text{K}_2$ -ATP ausgetauscht werden.  $\text{NaHSO}_3$  konnte aber nicht gegen ein anderes Salz ausgetauscht werden. Daher wurde zunächst der Effekt von  $\text{NaHSO}_3$  auf die Enzymaktivität überprüft. Wie aus Abb. 19 ersichtlich, war  $\text{NaHSO}_3$  für eine gute Enzymaktivität notwendig, die Aktivität war in Abwesenheit von  $\text{NaHSO}_3$  um 83% verringert.

In einem weiteren Test wurde dem MES-Puffer  $\text{K}_2\text{SO}_3$  in einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben. Dadurch wurden 91% der Aktivität des Enzyms erhalten. Da jedoch das Kaliumsulfid stark mit  $\text{Na}^+$ -Ionen verunreinigt ist, sollte getestet werden, inwieweit das Kaliumsulfid durch Methanol ersetzt werden kann. Dazu wurde der MES-Puffer mit 1, 2, 3 oder 8% Methanol versetzt und anschließend die Aktivität bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Kaliumsulfid. In keinem der Testansätze konnte auch nur annähernd die Aktivität erreicht werden, die die Kontrolle zeigte. Bezogen auf die ATPase-Aktivität der Kontrolle von 548 mU/ml konnten nur noch 20% der Aktivität in den Ansätzen mit Methanol gemessen werden. Dadurch kann gefolgert werden, daß das  $\text{SO}_3^{2-}$  essentiell für die Aktivität des Enzyms ist. Eine Stimulierung der  $A_1A_0$ -ATPasen durch Hydrogensulfid oder Sulfid wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Scheel und Schäfer, 1990; Inatomi *et al.*, 1993; Chen und Konisky, 1993; Wilms *et al.*, 1996).



**Abb. 19** Einfluß von NaHSO<sub>3</sub> auf die Aktivität der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase von *M. jannaschii*

Die Aktivität der Kontrolle wurde in ATPase-Testpuffer mit 10 µl gereinigtem Enzym bestimmt. Die ATPase-Aktivität der Kontrolle (596 mU/ml) wurde als 100% Aktivität definiert. Die Aktivität in MES-Puffer wurde ebenfalls mit 10 µl gereinigtem Enzym bestimmt. Der MES-Puffer (pH 6,0) enthielt 100 mM MES, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und keine weiteren Salze. Die Reaktionen wurden mit 2,5 mM ATP gestartet, und anschließend wurde die ATPase-Aktivität bestimmt.

Als weitere Alternative wurde der MES-Puffer durch einen Maleinsäure-Puffer (40 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0) ersetzt. Erneut wurde NaHSO<sub>3</sub> oder K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> als stimulierende Agentien getestet. Mit diesem Testpuffer konnten nur 42% der Ausgangsaktivität der ATPase mit Kaliumsulfid gemessen werden (nicht gezeigt). Natriumhydrogensulfid und Kaliumsulfid wurde dann durch 1, 2, 4 oder 6% Methanol ersetzt, als Kontrolle diente ein Ansatz mit NaHSO<sub>3</sub>. Bezogen auf die Kontrolle (502 mU/ml) konnten noch 8 bis 20% der Enzymaktivität bestimmt werden. Wiederum konnte die Ausgangsaktivität nicht annähernd erreicht werden. In weiteren Versuchen wurden einzelne Pufferkomponenten unterschiedlich miteinander kombiniert. Als Zusätze wurden Ethanol, Acetat, Methanol, Maleinsäure oder Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> getestet, diese Ergebnisse sind in der Tab. 9 zusammengefasst.

**Tab. 9 ATPase-Aktivitäten des gereinigten Enzyms in unterschiedlichen Testpuffern<sup>1</sup>****A) MES-Puffer: 100 mM MES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0**

Zusatz	Aktivität [mU/ml]	Aktivität [%]
K <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	783	100
5% Ethanol	316	40
10% Ethanol	316	40
40 mM Acetat	398	51
5% Methanol	261	33

**B) Maleinsäurepuffer: 40 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0**

Zusatz	Aktivität [mU/ml]	Aktivität [%]
NaHSO <sub>3</sub>	412	100
5 % Ethanol	165	40
10 % Ethanol	137	33
40 mM Acetat	220	53
--	137	33

**C) Tris-Puffer: 40 mM Tris, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5**

Zusatz	Aktivität [mU/ml]	Aktivität [%]
40 mM NaHSO <sub>3</sub>	331	100
40 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	242	73
40 mM Acetat	57	17
40 mM Maleinsäure	108	33
5% Ethanol	38	11
5% Methanol	38	11

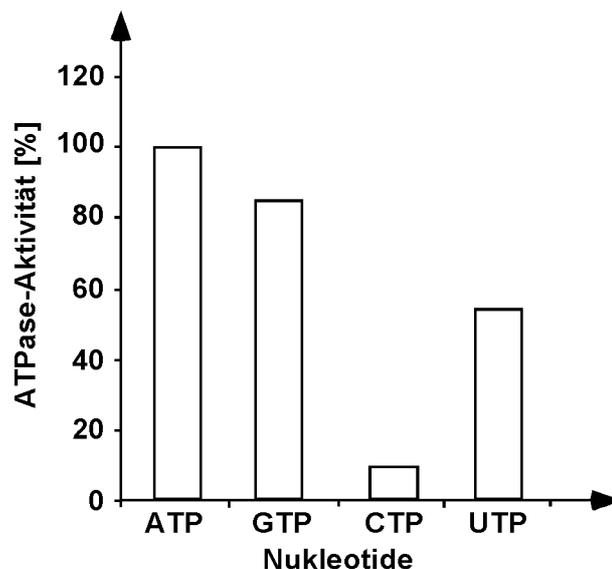
<sup>1</sup>Die Testansätze setzten sich zusammen aus 1200 µl Testpuffer, 30 µl gereinigtem Enzym, Na<sub>2</sub>-ATP wurde in einer Konzentration von 2,5 mM zugegeben. Als Kontrollen dienten die Ansätze mit NaHSO<sub>3</sub> oder K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Die ATPase-Tests wurden wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt, die Vorinkubation bei RT wurde auf 10 min verlängert.

In allen Versuchen wurde deutlich, dass das Sulfid durch keine der getesteten Substanzen effektiv substituiert werden konnte. Weitere

Substanzen wurden nicht mehr getestet. Da das Sulfit nicht ersetzt werden konnte, konnte die  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit nicht überprüft werden.

### 3.3.5 Substratspezifität der ATPase

Neben ATP konnte das gereinigte Enzym auch andere Nukleotide umsetzen, wobei die Hydrolyse von GTP noch 86% betrug (Abb. 20). Sogar mit UTP konnte noch eine Hydrolyseaktivität von 54% erreicht werden, lediglich CTP wurde schlecht hydrolysiert (9%). Die ATPase von *M. jannaschii* ist also eine gute GTPase, was schon für die ATPase aus *Methanococcus voltae* (Chen und Konisky, 1993) und *M. mazei* gezeigt wurde (Wilms *et al.*, 1996). Der  $\text{A}_1$ -Teil der *M. mazei* ATPase zeigte allerdings lediglich 50% Hydrolyseaktivität mit GTP als Substrat (Lemker *et al.*, 2003).

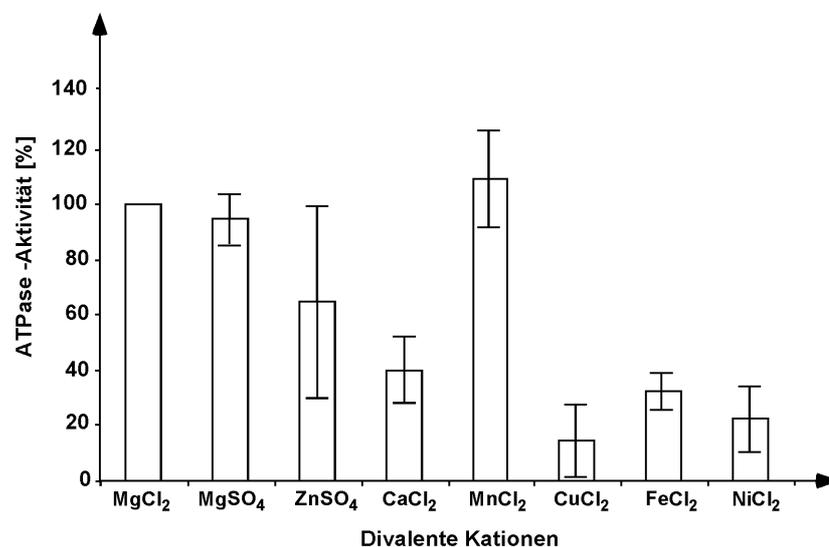


**Abb. 20 Substratspezifität der  $\text{A}_1\text{A}_0$ -ATPase**

Die ATPase-Aktivität wurde wie unter 2.4.1 beschrieben bestimmt, die Reaktion wurde mit je 5 mM der verschiedenen Nukleotide gestartet und die Aktivität über einen Zeitraum von 12 min bestimmt. Exemplarisch ist das Ergebnis einer Messung dargestellt, das in anderen Tests bestätigt werden konnte. 100% Aktivität entspricht hier 2,7 U/mg mit ATP als Substrat.

### 3.3.6 Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität von divalenten Kationen

Mg<sup>2+</sup>-Ionen dienen häufig als Metallkomponente in ATP-Metallionen-Komplexen, allerdings können auch andere Metalle in dem Komplex vorliegen. Im folgenden Versuch wurden verschiedene divalente Kationen wie Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> in einer Konzentration von 5 mM auf ihre Eignung für die A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase von *M. jannaschii* überprüft. Da Zn<sup>2+</sup> nicht als Chloridsalz zur Verfügung stand, wurde das Sulfatsalz eingesetzt. Um einen Effekt von Sulfat auf den Test auszuschliessen, diente ein Ansatz mit MgSO<sub>4</sub> als Kontrolle. Die ATPase-Aktivität änderte sich nicht, wenn MgSO<sub>4</sub> anstelle von MgCl<sub>2</sub> in den Test eingesetzt wurde. Die höchste Aktivität konnte mit Mn<sup>2+</sup> gemessen werden, diese Beobachtung wurde schon bei anderen archäellen ATPase beobachtet (Inatomi, 1986; Inatomi *et al.*, 1993; Steinert *et al.*, 1997). Mit Zn<sup>2+</sup> waren, je nach Enzymcharge, sowohl hohe ATP-Hydrolyseaktivitäten als auch deutlich verringerte ATPase-Aktivitäten zu verzeichnen. Die anderen divalenten Kationen konnten Mg<sup>2+</sup> nur begrenzt ersetzen (Abb. 21).

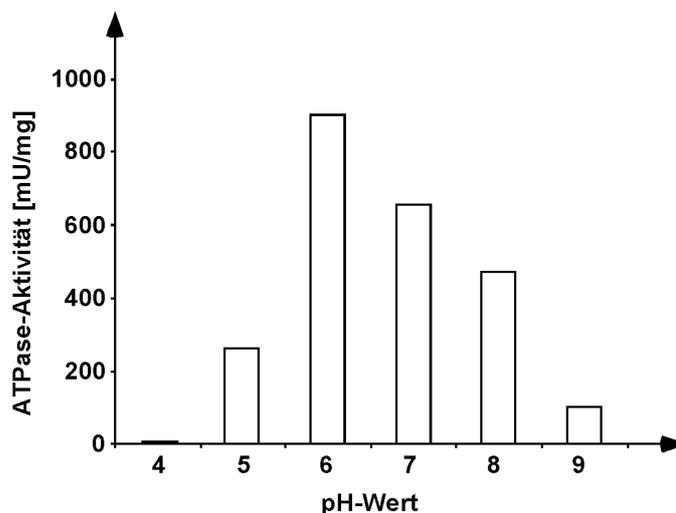


**Abb. 21** Effekt verschiedener divalenter Kationen auf die Aktivität der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase von *M. jannaschii*

Die Kationen wurden in einer Konzentration von 5 mM in Testpuffer (s. 2.4.1) eingesetzt. 100% Aktivität entspricht der Aktivität mit MgCl<sub>2</sub> im Testansatz. Die Enzymaktivität wurde mit drei verschiedenen Enzymchargen in jeweils 2 Parallelen bestimmt.

### 3.3.7 pH-Optimum der ATPase

Das pH-Optimum der Hydrolyseaktivität wurde in Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO<sub>3</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bestimmt. Dazu wurde der Testpuffer bei Raumtemperatur auf pH 4, 5, 6, 7, 8 oder 9 eingestellt. Der Test wurde wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt. Das pH-Optimum lag bei einem pH-Wert von 6, niedrigere pH-Werte führten zu einer starken Inaktivierung des Enzyms, dagegen war die Inaktivierung bei höheren pH-Werten nicht so extrem (Abb. 22). In dem dargestellten Versuch betrug die Aktivität bei pH 6 901 mU/mg, bei pH 7 oder 8 konnten noch 655 und 470 mU/mg Hydrolyseaktivität gemessen werden. Erst bei pH 9 sank die Aktivität um 89% auf 100 mU/mg.



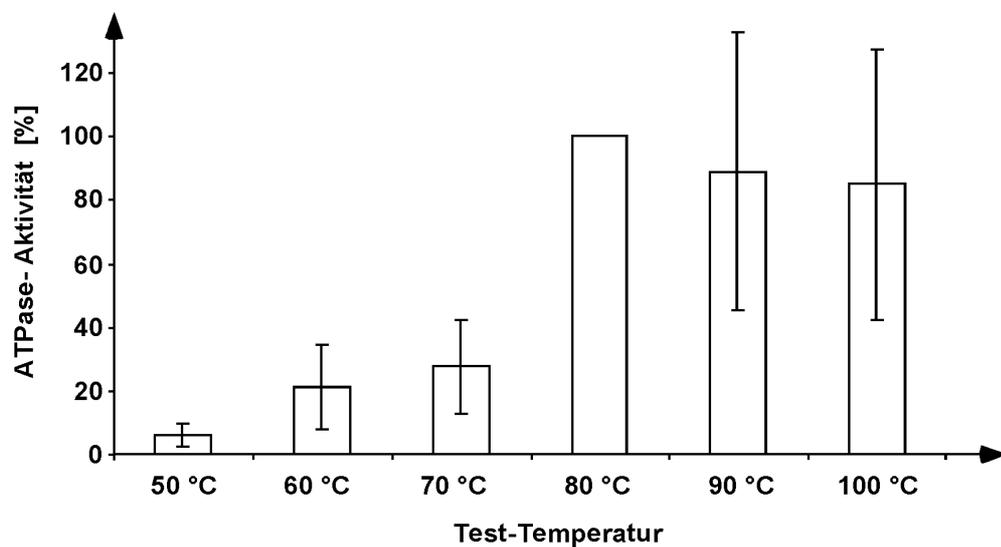
**Abb. 22** Abhängigkeit der ATPase-Aktivität vom pH-Wert

Der Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO<sub>3</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde bei Raumtemperatur auf pH-Werte von 4, 5, 6, 7, 8 und 9 eingestellt. Nach einer Vorinkubation bei RT und 80°C wurde der Test wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt. Exemplarisch dargestellt ist einer von drei Datensätzen.

### 3.3.8 Temperaturoptimum der ATPase

Das Temperaturoptimum der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase wurde in Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM NaHSO<sub>3</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bestimmt. Die Ansätze wurden zunächst 3 min bei Zimmertemperatur inkubiert und dann

bei 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100°C weitere 3 min inkubiert, bevor die Zugabe von ATP erfolgte (Abb. 23). Die höchsten Hydrolyseaktivitäten konnten im Mittel bei Temperaturen zwischen 80 und 100°C bestimmt werden. Aus Abb. 23 wird ersichtlich, dass Temperaturen von über 80°C teilweise zu Aktivitätssteigerungen führten. Allerdings waren starke Schwankungen und auch sehr geringe Aktivitäten zu verzeichnen. Daher wurde im Folgenden die ATPase-Aktivität in Anlehnung an das von Wimmers 1997 an Membranen bestimmte Temperaturoptimum von 80°C (Wimmers, 1997) bei 80°C gemessen.

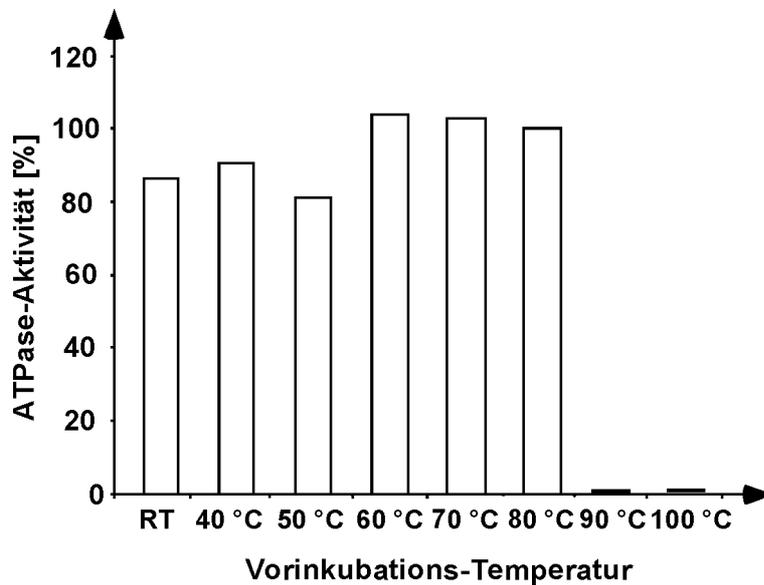


**Abb. 23 Einfluss der Temperatur auf die Hydrolyseaktivität der ATPase**

Die gereinigte ATPase wurde in Testpuffer zuerst bei Raumtemperatur für 3 min und dann weitere 3 min bei 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100°C vorinkubiert. Der Test wurde wie unter 2.4.1 beschrieben bei den entsprechenden Temperaturen durchgeführt. 100% Aktivität entsprach der ATPase-Aktivität bei 80°C. Die Enzymaktivität wurde mit drei verschiedenen Enzymchargen in jeweils 2 Parallelen bestimmt.

Es sollte nun getestet werden, welchen Einfluss die Vorinkubationstemperatur auf die Aktivität hat. Dazu wurden die Testansätze mit dem Enzym nicht mehr bei Raumtemperatur sondern bei RT, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100°C für mindestens 10 min vorinkubiert und dann wurde der ATPase-Test bei 80°C durchgeführt. Wurde das Enzym bei 100°C vorinkubiert, war keine Aktivität mehr zu verzeichnen, die Vorinkubation bei RT, 40, 50, 60, 70 oder 80°C beeinflusste die Enzymaktivität bei 80°C nicht

wesentlich (Abb. 24). Bei 90°C war das Bild allerdings nicht einheitlich, bei unterschiedlichen Enzym-Chargen waren sowohl Aktivierung als auch Kompletterverluste der ATP-Hydrolyse zu verzeichnen.



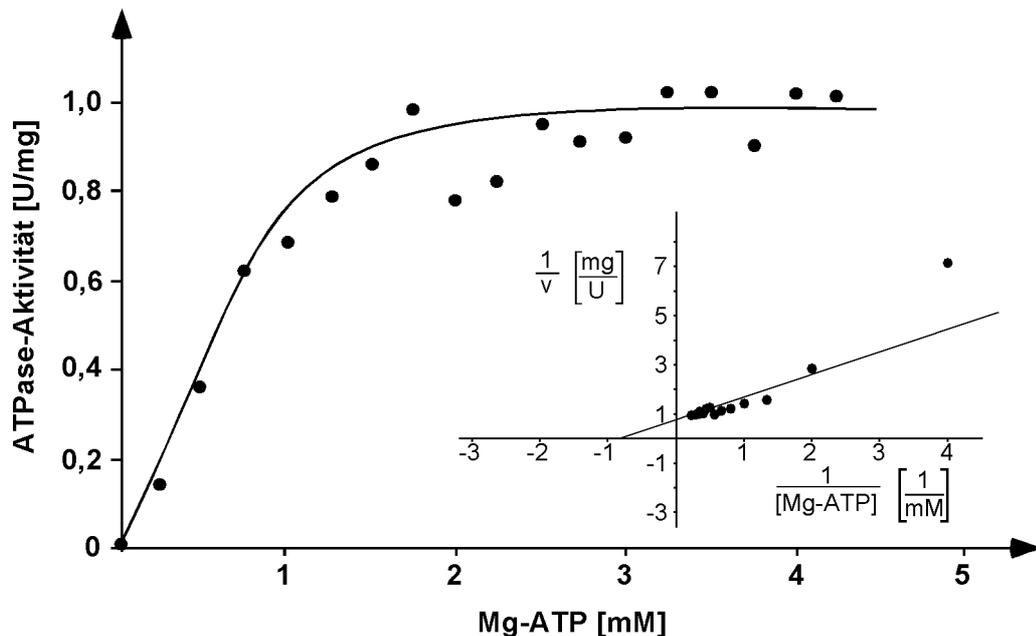
**Abb. 24 Einfluss der Vorinkubationstemperatur auf die Hydrolyse-Aktivität der ATPase**

Die gereinigte ATPase wurde in Testpuffer für 10 min bei Raumtemperatur, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100°C vorinkubiert. Der Test wurde dann wie unter 2.4.1 beschrieben bei 80°C durchgeführt. Dargestellt ist exemplarisch ein Versuch.

### 3.3.9 Ermittlung des $K_M$ -Wertes der ATPase für [Mg-ATP]

Zunächst wurde die optimale  $MgCl_2$  Konzentration für den zur  $K_M$ -Wert-Bestimmung verwendeten Testpuffer ermittelt. Das eigentliche Substrat für die ATPase ist ein Komplex aus  $Mg^{2+}$  und  $ATP^{4-}$  in einer Stöchiometrie von 2:1. In Abhängigkeit des pH-Wertes liegt ATP in unterschiedlichen Protonierungszuständen vor, deshalb wurde für die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes die  $MgCl_2$ -Konzentration bestimmt, bei der die Hydrolyseaktivität am höchsten war. Dazu wurde der Puffer ohne  $MgCl_2$  hergestellt, und dann wurde  $MgCl_2$  in einer Konzentration von 2,5, 5, 7,5, 10 oder 12,5 mM zu den Ansätzen pipettiert. Dabei ergab sich eine optimale  $MgCl_2$ -Konzentration von 2,5 mM. Da die Reaktion mit 2,5 mM ATP gestartet wurde, entsprach das einem Verhältnis von 1:1 für  $Mg^{2+}$ :ATP in dem

gewählten Testpuffer. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante wurden dann ATP und  $\text{MgCl}_2$  im Verhältnis 1:1 gelöst, und mit 0 bis 4,25 mM [Mg-ATP] wurde die Reaktion gestartet. Eine Substratsättigung wurde bei etwa 2,5 mM [Mg-ATP] erzielt (Abb. 25). Aus der doppelt reziproken Auftragung ließ sich ein  $K_M$ -Wert für [Mg-ATP] von  $1,2 \pm 0,2$  mM bestimmen (Abb. 25).



**Abb. 25** Abhängigkeit der Hydrolyseaktivität von der Mg-ATP-Konzentration

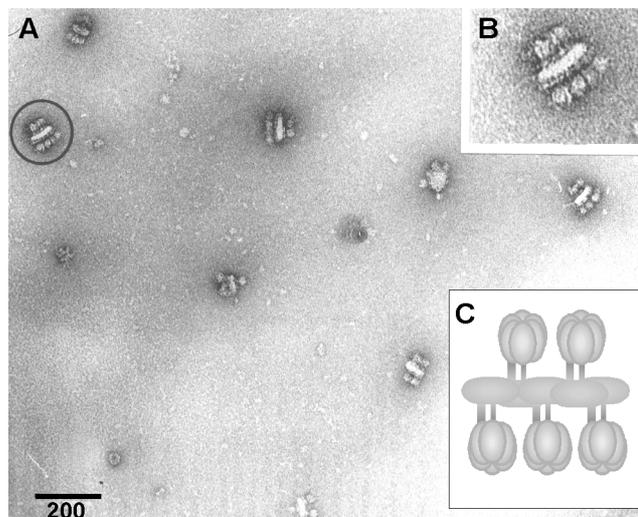
Die Enzymaktivität wurde in Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 40 mM  $\text{NaHSO}_3$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 6) mit steigender Substratkonzentration bestimmt. Die ermittelten Daten wurden dann zur Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit und des  $K_M$ -Wertes reziprok aufgetragen (Lineweaver-Burk-Plot). Exemplarisch dargestellt ist einer von drei Datensätzen.

### 3.4 Strukturelle Analyse der $A_1A_0$ -ATPase

Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der ATPase wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Mayer, Göttingen, angefertigt. Eine Probe des aufgereinigten ATPase-Gesamtkomplexes wurde mit einer 4%igen Uranylacetat-Lösung negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht. In der elektronenmikroskopischen Darstellung (Abb. 26A)

waren der ATPase Gesamtkomplex, aber auch einzelne  $A_1$ -Domänen zu sehen.

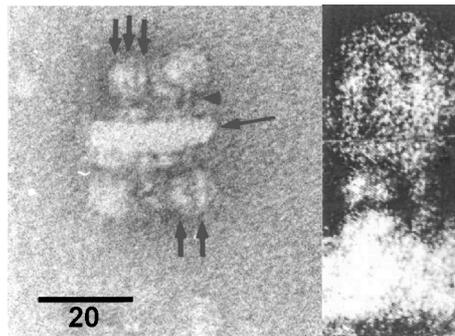
Der umkreiste Bereich, der auch in einer Vergrößerung (Abb. 26B) dargestellt wurde, zeigt die an den Membrandomänen verknüpften ATPase-Gesamtkomplexe. Die alternierende Anordnung resultiert aus der sterischen Behinderung der Kopfteile zueinander, eine schematische Darstellung dieser Anordnung ist in Abb. 26C dargestellt.



**Abb.26 Elektronenmikroskopische Aufnahme der  $A_1A_0$ -ATPase und schematische Darstellung der Anordnung der ATPasen**

Die gereinigte ATPase wurde nach einer Negativkontrastierung mit Uranylacetat im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht. Abb. A zeigt die Übersicht, Abb. B eine Ausschnittsvergrößerung und Abb. C eine Schemazeichnung von B. In der Aufnahme sind Konglomerate der ATPase-Moleküle zu erkennen, die unten rechts noch einmal schematisch dargestellt sind. Die Dimension ist in nm angegeben.

Im Komplex konnte ein Fuß, ein Stiel und ein Kopfteil identifiziert werden. Die drei Pfeile in Abb. 27 zeigen auf Massen am Kopf der ATPase, die an Scheiben einer Orange erinnern. Diese Masse wird von den Untereinheiten A und B gebildet, von denen jeweils drei alternierend  $(AB)_3$  angeordnet sind. Die Pfeilspitze zeigt auf eine Masse, die die Verbindung zwischen dem Kopf und dem Fuß der ATPase ausbildet, den sogenannten zentralen Stiel. Am Rand des Komplexes zeigt sich eine weitere Verbindung zwischen den beiden großen Massen, bei dem es sich um einen peripheren Stiel handeln könnte.

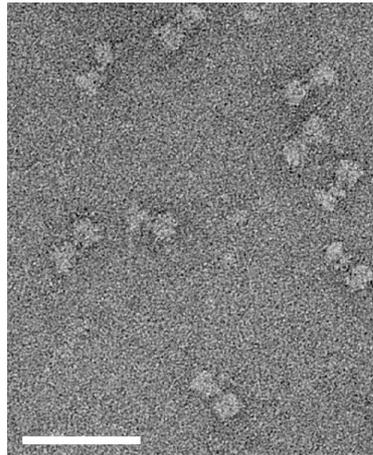


**Abb. 27** Vergrößerte Darstellung der EM-Aufnahme der  $A_1A_0$ -ATPase

Die Dimension ist in nm angegeben. Die Gruppe von Pfeilen zeigt auf den  $A_1$ -Teil, der eine deutliche Segmentierung aufweist, die von je drei alternierend angeordneten Untereinheiten A und B gebildet wird. In der rechten Bildhälfte ist bereits deutlich zu erkennen, dass ein zweiter Stiel neben dem zentralen Schaft vorhanden ist.

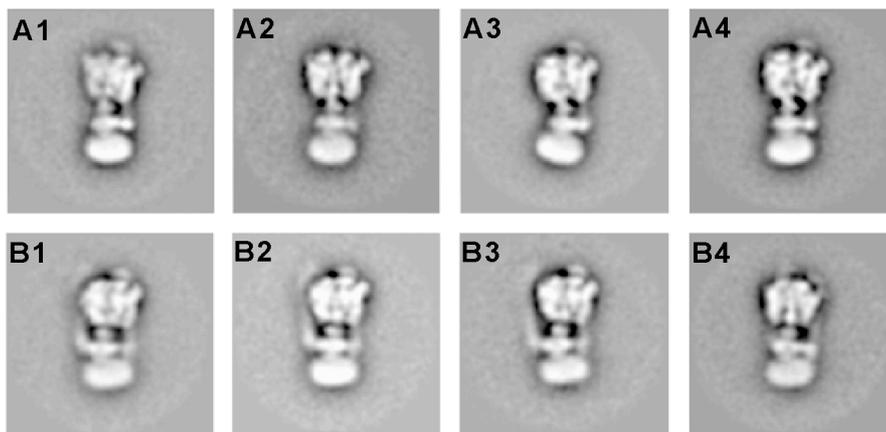
Um detaillierte Aussagen über die Struktur der ATPase zu machen, wurde eine Bildrekonstruktion von Einzelbildern durchgeführt. Diese Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Coskun und Herrn Dr. Grüber (Homburg) durchgeführt.

Das gereinigte Enzym wurde mit 2% Uranylacetat negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Präparation zeigte, dass die analysierte ATPase-Präparation kaum Verunreinigungen enthielt (Abb. 28). Es konnten 17.238 Einzelpartikel analysiert werden. Die Einzelpartikel wurden in verschiedene Klassen von ATPase-Molekülen eingeteilt, die wiederum in zwei Klassen von Molekülen eingeordnet wurden (Abb. 29). 12.555 der analysierten Einzelpartikel ließen sich in die Gruppe der Moleküle einteilen, die über einen peripheren Stiel verfügen (Abb. 29A1-A4). Die restlichen 4.638 ATPasen hatten neben dem zentralen und dem peripheren Stiel eine weitere periphere Verbindung zwischen  $A_1$  und  $A_0$  (Abb. 29B1-B4). Zur weiteren Auswertung der ATPase wurden ATPase-Moleküle mit zwei und drei Stielen ausgewählt, um aus 410 (A), 497 (B) und 316 (C) Einzelprojektionen ein Summenbild zu generieren (Abb. 30).



**Abb. 28 Elektronenmikroskopische Aufnahme der monodispersen ATPase-Präparation**

Der Balken unten links entspricht einer Größe von 50 nm. Die Präparation zeigt, dass die ATPase-Präparation nicht mit Fremdprotein verunreinigt ist, sondern nur  $A_1A_0$ -Partikel enthält.

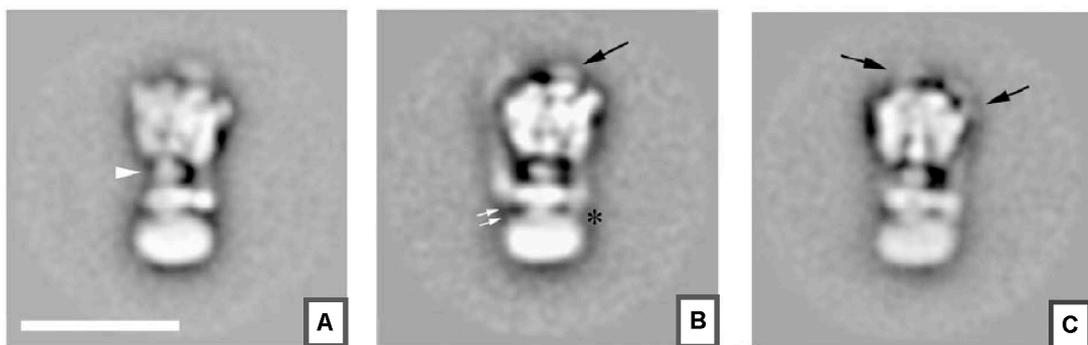


**Abb. 29 Bildergalerie der verschiedenen ATPase-Moleküle**

Aus 17.238 Partikeln wurden nach multivariaten statistischen Analysemethoden und der Klassifizierungen acht Klassen von Molekülen unterschieden und dargestellt. Die Bilder A1-4 zeigen eine Auswahl von Partikeln, die einen peripheren Stiel haben, während in den Bildern B1-4 vier Klassen von ATPasen zu sehen sind, die über zwei periphere Stiele verfügen.

Die ATPase wurde anhand der Summenbilder vermessen. Der Gesamtkomplex hat eine Länge von 25,9 nm, wobei der  $A_1$ -Teil 9,4 nm in der Breite und 11,5 nm in der Länge misst. Der zentrale Stiel hat eine Länge von 8 nm und ist 3,9 nm breit. Die Membrandomäne hat eine Länge von 6,4 nm und ist mit 10,6 nm etwas schmaler als der Kopfteil der ATPase. Die  $A_1$ -Domäne ist eine kugelförmigen Masse, die sich deutlich vom zentralen Stiel

abgesetzt (Abb. 30B). Vom zentralen Stiel lassen sich entweder einer (Abb. 30A) oder ein zweiter peripherer Stiel (Abb. 30B, C) unterscheiden. Der zentrale Stiel ist direkt über der Membrandomäne von einer Kragenähnlichen Struktur umgeben. An der Ausbildung dieser Kragenstruktur sind verschiedene Massen beteiligt, wobei die Massen am Rand dieses Kragens mit den peripheren Stielen eine Verbindung ausbilden (Abb. 30B). Beide peripheren Stiele sind mit der  $A_1$ -Domäne verbunden, einer davon scheint zwei Kontaktstellen mit dem Kopfteil zu haben (Abb. 30B, C), einmal auf der Aussenseite und einmal am oberen Ende (Abb. 30, C schwarze Pfeile). Einer der peripheren Stiele ist vom Kragen nach unten hin verlängert (Abb. 30B mit Sternchen gekennzeichnet) und bildet so den Kontakt mit  $A_0$ . In B wird deutlich, dass der zweite Stiel nicht direkt mit der  $A_0$ -Domäne verbunden ist. Von der Membrandomäne ragt eine kleine Masse heraus, die wiederum eine Verbindung zu diesem zweiten Stiel herstellen könnte (Abb. 30B, die weißen Pfeile zeigen die beiden Massen die eine Verbindung darstellen könnte).



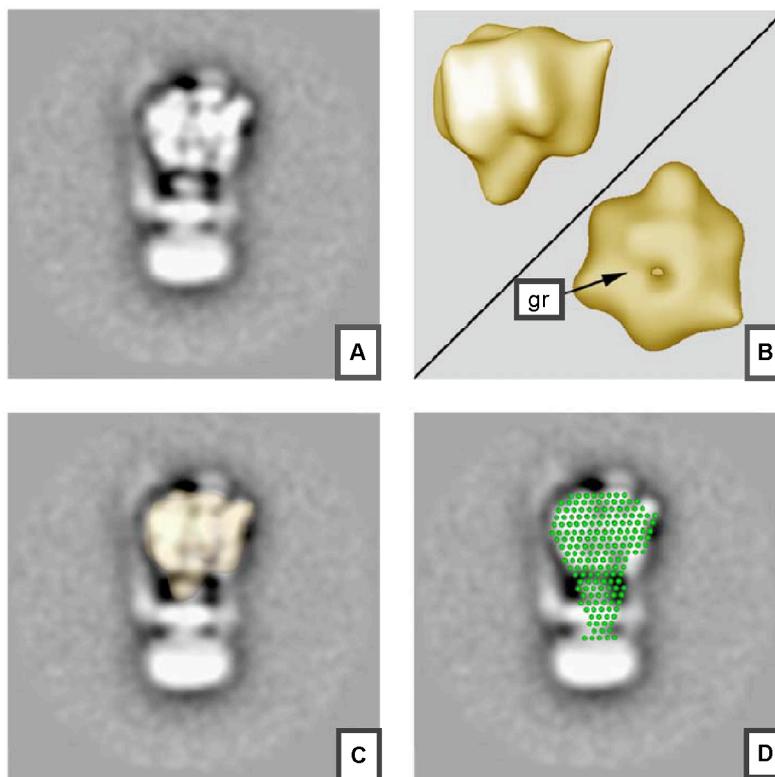
**Abb. 30** Summenbilder der verschiedenen Klassen von ATPasen

Das Summenbild der ATPasen mit zwei Stielen wurde aus 410 Bildern erstellt (A), das der ATPase mit drei Stielen aus 497 Bilder (B). C zeigt eine Projektion, die  $40^\circ$  gedreht ist verglichen mit B. Der Balken in Bild A entspricht 20 nm.

Die erst kürzlich aufgeklärte 3D-Rekonstruktion eines  $A_1$ -Subkomplexes aus *M. mazei* (Coskun *et al.*, 2004) wurde über eine Projektion der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* gelegt. Dazu wurde die Projektion des Subpartikels in  $5^\circ$  Schritten um seine eigene Achse gedreht, bis eine Projektion des  $A_3B_3D$ -Partikels mit der  $A_1A_0$ -Projektion zur Deckung gebracht werden konnte (Abb. 31). Durch diese Überlagerung kann eindeutig

gezeigt werden, dass die Massen an der Spitze der  $A_1$ -Domäne (Abb. 30B, schwarzer Pfeil; Abb. 31C) nicht von einer der Untereinheiten A oder B, sondern von einer anderen Masse, offensichtlich von einem der peripheren Stiele, stammen muss.

Die durch Röntgenkleinwinkelstreuung aufgeklärte Struktur eines  $A_3B_3$ DCF-Subkomplexes aus *M. mazei* konnte ebenfalls mit der Projektion des Gesamtkomplexes aus *M. jannaschii* zur Deckung gebracht werden. Durch diese Untersuchungen konnte zum ersten Mal eine archäelle ATP-Synthase mit einer Auflösung von 1,8 nm dargestellt werden.



**Abb. 31** Vergleich der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* mit der  $A_1$ -ATPase aus *M. mazei*

Bild A zeigt die Projektion des Gesamtkomplexes, der mit der 3D-Rekonstruktion (B, C) und der durch Röntgenkleinwinkelstreuung aufgeklärten Struktur des  $A_3B_3$ DCF-Subkomplexes aus *M. mazei* (D) verglichen wurde. Der Pfeil zeigt auf eine Furche, die von den Untereinheiten A und B ausgebildet wird und in der die Untereinheit D lokalisiert ist.

Um weitere Aufklärung über die Lokalisation der Untereinheiten im Gesamtkomplex zu bekommen, können Subkomplexe von Nutzen sein.

Daher sollten Subkomplexe der  $A_1A_0$ -ATPase von *M. jannaschii* hergestellt werden.

### 3.5 Versuche zur Isolierung von Subkomplexen der $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii*

Die Anordnung der hydrophilen Untereinheiten im ATPase-Komplex ist noch unklar. Die Untereinheiten A, B, C, D und F sind in  $A_1$  lokalisiert, c und a in  $A_0$ . Wie die Untereinheiten H und E angeordnet sind, ist unklar, ebenso ist die Kopienzahl im Komplex nicht bekannt. Subkomplexe der ATPase könnten helfen, Aussagen über die Lage der Untereinheiten zueinander zu treffen. Es sollte deshalb versucht werden, Subkomplexe der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* zu isolieren.

Dazu wurden 500  $\mu$ l (2 mg/ml Protein) des Enzyms nach der Ultrafiltration (s. 2.3.7) mit 2 mg LDAO über Nacht bei 8°C inkubiert. Anschließend wurden 300  $\mu$ l der Probe über eine Gelfiltration in Säulenpuffer (s. 2.3.5) mit 0,05% LDAO anstelle von Triton X-100 aufgetrennt und aliquotiert. Danach wurden 300  $\mu$ l einer unbehandelten Probe über eine Gelfiltration aufgetrennt. Die Elutionsprofile, die Aktivitätsprofile und die Auftrennung in einer SDS-PAGE zeigten keine Unterschiede in der mit LDAO inkubierten und der unbehandelten Probe. LDAO ist ein nicht-ionisches Detergens, das bereits erfolgreich zur Isolierung von  $V_1$ -Subkomplexen der *Manduca sexta*  $V_1$ -ATPase eingesetzt wurde.

In weiteren Versuchen wurde ein Puffer mit geringer Ionenstärke (25 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,0) eingesetzt, der zur Ablösung von  $F_1$  der *Bacillus*- $F_1F_0$ -ATPase verwendet wurde (Mitome et al., 2004). Dazu wurden wieder 500  $\mu$ l der ATPase nach der Ultrafiltration auf 50  $\mu$ l eingeeengt und über Nacht in dem oben genannten Puffer inkubiert. Nach der Auftrennung über die Gelfiltration (s. 2.3.5) waren das Elutionsprofil, das Aktivitätsprofil und das Gelmuster identisch zur unbehandelten ATPase. In diesen Versuchen wurde deutlich, dass der ATPase-Komplex eine hohe Stabilität hat, und in den gewählten Puffern keine Ablösung einzelner Subkomplexe zu erreichen war.

Im Fall der A/V-Typ-ATPase aus *Thermus thermophilus* war es gelungen, verschiedenste Subkomplexe durch Säurebehandlung zu isolieren. Anhand dieser Subkomplexe konnte eine Übersicht über die Lage der Untereinheiten im Gesamtkomplex getroffen werden (Yokoyama *et al.*, 2003). Daher wurde versucht, die Ablösung eines A<sub>1</sub>-Partikels durch saure Bedingungen direkt aus den Membranen zu erreichen. Dazu wurden aus 2 g *M. jannaschii*-Zellen Membranen präpariert (s. 2.3.1) und in Membranpuffer ohne Glycerin gewaschen. Die Membranen wurden dann in Acetat-Puffer (0,1 M Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 4,0) über Nacht bei 8°C unter Rühren inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation wurde die Aktivität des Sediments und des Überstandes bestimmt. Es konnte weder im Überstand noch im Sediment ATP-Hydrolyseaktivität bestimmt werden. Nach der Auftrennung des Überstandes in einer SDS-PAGE konnte auch nach einer Silberfärbung kein Protein detektiert werden. Die Inkubation in Acetatpuffer führte zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms, und es konnte kein Protein von den Membranen abgelöst werden. Daher wurden keine weiteren Tests mit diesem Puffer durchgeführt.

Der proteolytische Verdau der gereinigten ATPase kann ebenfalls Aufschluss über die Lage einzelner Untereinheiten im Komplex liefern, da exponierte Untereinheiten eher verdaut werden als solche, die im Inneren angeordnet sind. Durch den Trypsinverdau des A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>CDF-Komplex der A<sub>1</sub>-ATPase aus *M. mazei* konnte gezeigt werden, dass die Untereinheit D nicht tryptisch verdaut wird, was zu der Annahme führt, dass die Untereinheit D tatsächlich den zentralen Stiel der ATPase bildet (Grüber *et al.*, 2001). Es sollte nun versucht werden, den Gesamtkomplex tryptisch zu verdauen, um weitere Aussagen über die Lage der Untereinheiten im Komplex zu treffen. Dazu wurde die gereinigte ATPase wie unter 2.5.7 beschrieben mit Trypsin inkubiert und anschließend die Hydrolyseaktivität bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit RSA, das RSA wurde in dem gleichen Puffer (50 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% TritonX-100, 10% Glycerin, pH 7) gelöst wie die ATPase. Es konnte in keinem Fall eine Proteolyse des Enzyms oder der Kontrolle gezeigt werden. Die Aktivität des Enzyms von 4,6 U/ml veränderte sich im Verlauf der 90minütigen Inkubation nicht. Da in den Puffern 0,1%

Triton X-100 gelöst war, könnte das zu einer Inaktivierung des Trypsins geführt haben. Es wurden keine weiteren Verdauungen mit Trypsin durchgeführt.

### **3.6 Rekonstitution der $A_1A_0$ ATPase aus *M. jannaschii* in Liposomen**

Der Einbau von Proteinen in Liposomen kann durch verschiedene Verfahren erreicht werden (Rigaud *et al.*, 1995). Die Rekonstitution durch organische Lösungsmittel, durch mechanische Verfahren wie Ultraschallbehandlung oder Nutzung von destabilisierenden Agenzien wurde hier nicht getestet. Da die Enzymreinigung in Anwesenheit von Triton X-100 erfolgte, wurde eine durch das Detergens vermittelte Rekonstitution gewählt.

#### **3.6.1 Herstellung von Liposomen aus Lipiden von *M. jannaschii***

Die Lipide mesophiler Organismen sind nicht geeignet für die Rekonstitution eines Enzyms, dessen Temperaturoptimum bei 80°C liegt. In einer vorangegangenen Arbeit (Weidner, 2003) wurden Lipide aus *S. acidocaldarius* verwendet. Diese Lipide wurden zunächst ausgewählt, da zum einen die Extraktion der Lipide aus *S. acidocaldarius* und die Rekonstitution von Enzymen in diese Lipide gut etabliert sind (Elferink *et al.*, 1993; Gleissner *et al.*, 1994; Gleissner *et al.*, 1997). Wie *M. jannaschii* ist auch *S. acidocaldarius* ein thermophiles Archaeon (Brock *et al.*, 1972), das bei einer Temperatur von 70°C sein Wachstumsoptimum hat. Da das *M. jannaschii*-Enzym sein Temperaturoptimum ebenfalls bei solch hohen Temperaturen hat, erschien dieser Ansatz als geeignet. Da diese Rekonstitutionsexperimente allerdings nicht zur ATP-Synthese führten (Weidner, 2003), wurden die folgenden Experimente mit Liposomen aus *M. jannaschii* durchgeführt, die analog den *S. acidocaldarius*-Lipiden hergestellt wurden. Da die Anwesenheit spezifischer Lipide für die Funktionalität und Aktivität eines Enzyms eine entscheidende Rolle spielen kann, wurden die Lipide aus *M. jannaschii* isoliert (Opekarova und Tanner, 2003).

Lipide von *M. jannaschii* wurden jeweils aus 1,5 g lyophilisierten Zellen für 24 h mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (1:1) in einer

Soxhlett-Apparatur wie unter 2.9.1 beschrieben extrahiert. Die in diesem Lipid-Rohextrakt enthaltenen Phospholipide wurden durch eine Reversed-Phase-Chromatographie von den anderen Lipiden getrennt. Die Lipide wurden bis zur Trockne eingeengt, gewogen (etwa 80 mg Phospholipide /1,5 g lyophilisierte Zellen) und in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4 [v/v/v]) zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml aufgenommen und bei -20°C gelagert. Um die Liposomen zu präparieren, wurden zwischen 6 und 10 mg Lipid entnommen, und das Lösungsmittelgemisch wurde abgedampft. Die Lipide wurden in Rekonstitutionspuffer aufgenommen und je dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis aufgetaut (s. 2.9.1).

### 3.6.2 Rekonstitution der $A_1A_0$ ATPase aus *M. jannaschii*

Einer der wichtigsten Parameter zur Beschreibung von Detergenzien ist die kritische Mizellenkonzentration (cmc: „critical micell concentration“), die angibt, ab welcher Konzentration des Detergens Mizellen ausgebildet werden. Triton X-100 hat bei 20°C bis 25°C einen cmc-Wert von 0,22 - 0,24 mM. Bei der Enzymreinigung wurde 0,1% Triton X-100 (entspricht 1,7 mM) verwendet, es lagen also in jedem Fall Mizellen vor. Allerdings können Detergenzien mit einem niedrigen cmc-Wert nicht durch Dialyse entfernt werden, da diese großen Mizellen die Poren des Dialyseschlauchs nicht passieren können.

Detergenzien mit niedrigem cmc-Wert können durch die Adsorption an hydrophobe Matrizes aus Lösungen entfernt werden (**Holloway, 1973**). BioBeadsSM2 sind poröse, mit Divinylbenzol vernetzte Polystyrolkugeln, deren Oberfläche hydrophobes Material aus wässrigen Lösungen adsorbieren kann. Triton X-100 wird gut durch diese BioBeads entfernt (**Rigaud et al., 1995**).

Für den Einbau der ATPase wurde Triton X-100 zu den Liposomen gegeben, bis die  $OD_{560}$  abnahm. Dadurch werden die Liposomen vorgelöst und der Einbau des Proteins wird erleichtert (**Rigaud et al., 1995**). Die Liposomen zur Rekonstitution wurden dann durch drei maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis hergestellt. Unterschiedliche Mengen Lipid wurden mit 270 µg Protein (455 mU ATPase) gemischt und 30

min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden stündlich nur je 1 mg BioBeads zugegeben, um das Detergens möglichst langsam zu entfernen und so Umlagerungen der Liposomen und Aggregation der ATPase-Moleküle zu verhindern. Über Nacht wurden die Rekonstitutionsansätze im Kühlraum weiter inkubiert. Die Ansätze wurden so lange mit BioBeads inkubiert, bis die Lösung trüb wurde, was auf die Entfernung des Detergens und die Ausbildung von Proteoliposomen hindeutete. Anschließend wurden die Proteoliposomen bei  $175.000 \times g$  für 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert und in  $50 \mu\text{l}$  Beladungspuffer aufgenommen. Die Ansätze wurden auf ATP-Hydrolyse, ATP-Synthese und elektronenmikroskopisch untersucht. Die sedimentierten und resuspendierten Proteoliposome wiesen ATP-Hydrolyse-Aktivität auf, allerdings konnten von den eingesetzten 455 mU letztlich nur noch etwa 50% wiedergefunden werden. Diese Beobachtung wurde auch bei der Rekonstitution in die *S. acidocaldarius*-Liposomen gemacht (Weidner, 2003).

Darüberhinaus sank die Aktivität an den Proteoliposomen mit steigender Lipidkonzentration, stieg aber im Überstand, was auf einen geringeren Erfolg des Einbaus der ATPase in die Liposomen deuten kann.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die ATPase in richtiger Orientierung in die Liposomen inserierten (Abb. 32). In Abhängigkeit der Lipidmenge haben die Liposomen einen Durchmesser zwischen 50 und 100 nm beziehungsweise 100 bis 500 nm (Abb. 32). Die EM-Aufnahmen ergaben, dass die kleineren Liposomen sehr dicht mit  $A_1A_0$ -Molekülen besetzt sind, so dass die Liposomenmembran nicht mehr als Grenze zu erkennen ist.

Die ATPase konnte also erfolgreich in Liposomen rekonstituiert werden. Um die Synthese von ATP nachzuweisen, wurden die Liposomen zunächst in Succinatpuffer bei pH 5 über Nacht mit Protonen beladen. Durch den Transfer in einen ATP-Synthese Puffer mit pH 8, der  $^{32}\text{PO}_4^-$  enthielt, sollte es nun zum Ausstrom von Ionen durch die ATPase kommen, wodurch radioaktiv markiertes ATP synthetisiert werden sollte. Dieser Ansatz führte jedoch nicht zur Synthese von ATP.

Nachdem keine ATP-Synthese gemessen werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob die ATPase-Aktivität einer thermodynamischen

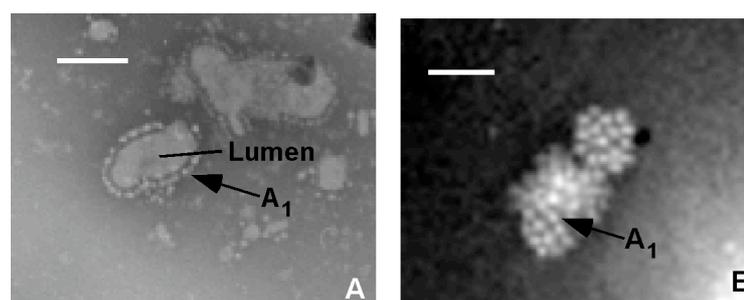
Hemmung unterlag, was auf einen funktionellen Einbau der ATPase hindeuten würde. Die Hydrolyse von ATP ist an das Einströmen von Protonen in das Lumen der Vesikel gekoppelt, wodurch ein elektrochemischer Gradient entsteht. Dieser Gradient hemmt den weiteren Transport von Protonen und damit die ATP-Hydrolyse. Die Hemmung muss jedoch aufhebbar sein, wenn die Lipide für Protonen durchlässig gemacht werden. Das kann durch die Zugabe eines Detergens wie Triton X-100 erreicht werden. Um den Anteil an nicht eingebautem Enzym möglichst gering zu halten, wurden für weitere Rekonstitutionen die Umdrehungszahl und die Zentrifugationszeit verringert.

Für die folgende Rekonstitution wurden 400 µl der vorbereiteten Liposomen mit 1 mg ATPase mit einer Aktivität von 2,4 U inkubiert. Nach Entfernen des Detergens wurden die Proteoliposomen für 30 min bei 100.000 xg abzentrifugiert und anschließend in 150 µl Succinat-Puffer aufgenommen. Die ATPase-Aktivität an den sedimentierten Proteoliposomen war 520 mU, im Überstand verblieben 410 mU. Wieder gingen etwa 60% der Gesamtaktivität während der Rekonstitution verloren. Durch die Zugabe von 1% Triton X-100 ließ sich die thermodynamische Kopplung aufheben und die ATPase-Aktivität um den Faktor 2,2 von 0,52 U auf 1,16 U steigern, was auf den richtigen Einbau des Enzyms in ein intaktes Membransystem hindeutet. Nachdem eine Kopplung von ATP-Hydrolyse und Ionenpotential indirekt gezeigt werden konnte, sollte ein weiterer Versuch zum Nachweis der ATP-Synthese unternommen werden. Da bei der  $F_1F_0$ -ATPase aus *Paracoccus denitrificans* Sulfid die Hydrolyse-Aktivität stimuliert, andererseits aber die Synthese von ATP hemmt (Pacheco-Moises *et al.*, 2002), wurde der Einfluss von Sulfid auf die ATP-Synthese durch die  $A_1A_0$ -ATP-Synthase aus *M. jannaschii* überprüft. Wie bereits erwähnt, war Sulfid für die Hydrolyseaktivität essentiell, ATP-Synthese konnte aber weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Sulfid gemessen werden. Es sollte nun in weiteren Versuchen das Lipid:Protein Verhältnis optimiert werden, dazu wurden 220 µg der  $A_1A_0$ -ATPase mit 40, 200, 400 oder 800 µg Liposomen inkubiert und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 µl Testpuffer aufgenommen und wieder die Hydrolyseaktivität der Proteoliposomen und des Überstandes bestimmt. Wieder konnten von den eingesetzten 428 mU nur noch 50% der

Gesamthydrolyseaktivität gefunden werden und wieder fiel die Hydrolyseaktivität der Proteoliposomen mit steigender Lipidkonzentration.

Bei einem Verhältnis 1:6 von Lipid zu Protein ist wieder eine sehr dichte Besetzung der Proteoliposomen zu sehen, die runden bis ovalen Vesikel haben einen Durchmesser von 50-200 nm. Bei einem Verhältnis 1:2 von Lipid zu Protein sind die Vesikel nur noch zu 30-50% besetzt. Mit diesen Vesikeln wurden weitere Versuche zur Aufhebung der thermodynamischen Hemmung der Proteoliposomen durchgeführt. Wieder konnte eine Stimulierung der Hydrolyseaktivität in Anwesenheit von Triton X-100 und Dodecylmaltosid beobachtet werden. Mit anderen Protonophoren wie SF und TCS in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M oder 20  $\mu$ M konnte allerdings keine Stimulierung der Hydrolyseaktivität beobachtet werden. Lediglich durch Monensin, ein Natriumionophor, konnte die Hydrolyseaktivität um den Faktor 1,8 von 280 mU auf 508 mU gesteigert werden.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* in Lipide aus *S. acidocaldarius* (Weidner, 2003) und *M. jannaschii* in der gewünschten Orientierung rekonsituiert werden konnte. Die ATP-Hydrolyse war essentiell an den Aufbau eines Potentials gekoppelt, allerdings ist es nicht gelungen, Versuchsbedingungen zu finden, in denen das Enzym ATP synthetisiert.



**Abb. 32 EM-Aufnahme der ATPase-enthaltenden Proteoliposomen**

Die Aufnahmen zeigen die Proteoliposomen nach der Entfernung des Detergens durch BioBeads SM2. In A ist ein Quetschpräparat der negativ kontrastierten Proteoliposomen gezeigt. Der Balken in A entspricht 100 nm, der in B 50 nm.

### **3.7 Versuche zur Extraktion und Klonierung des Proteolipids aus *M. kandleri***

Eine der Besonderheiten der archaeellen ATPase aus *M. kandleri* ist die Verdreizehnfachung der Rotoruntereinheit *c* (Slesarev *et al.*, 2002; Lolkema und Boekema, 2003; Müller, 2004). Anhand der Genomsequenz kann man davon ausgehen, dass der Rotor hier von einem einzigen Protein aufgebaut wird, das eine aus der Sequenz abgeleitete Masse von etwa 98 kDa hat. Der Rotor würde damit aus 26 Transmembranhelices aufgebaut, in jeder Haarnadel ist ein ionentranslozierender Glutamatrest konserviert.

Biochemische Experimente sollten zeigen, ob das mature Proteolipid tatsächlich ein 13mer darstellt. Zum einen sollte nun versucht werden, das native Protein aus den Membranen von *M. kandleri* zu isolieren, einen Antikörper gegen das Proteolipid zu gewinnen, sowie das vollständige Gen zu klonieren und das Protein zu produzieren und zu reinigen.

#### **3.7.1 Versuche zur Reinigung des Proteolipids durch Chloroform/Methanol -Extraktion**

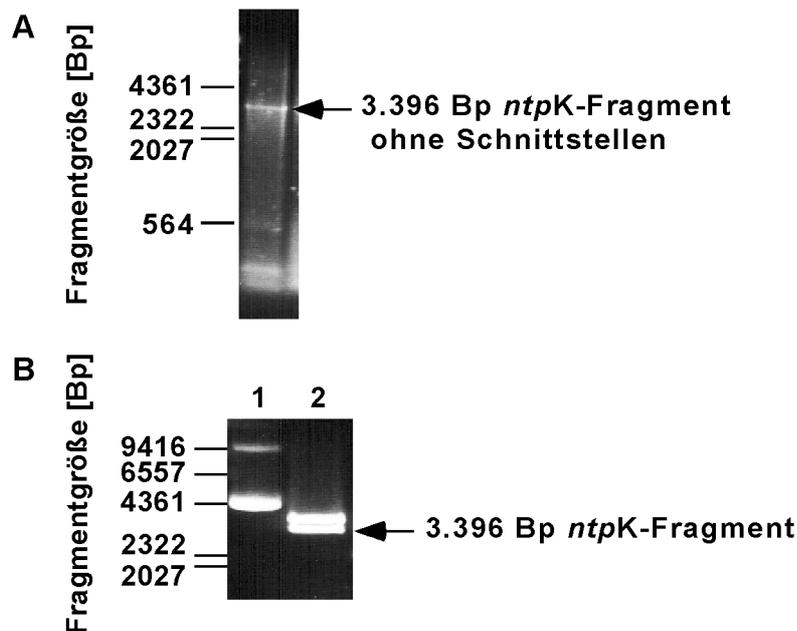
Da das Proteolipid sehr hydrophob ist und deshalb in organischen Lösungsmitteln löslich ist, wurden Membranen aus 45 g Zellen mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1) extrahiert und mehrfach in H<sub>2</sub>O gewaschen (s. 2.7). Nach zweimaliger Fällung mit Diethylether zur Abtrennung von Lipiden wurde der Niederschlag in Chloroform/Methanol aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Lösung war klar und hatte eine rötlich-braune Farbe. Um den Extrakt in einer SDS-Page zu analysieren, wurden 90 µl Aliquots in einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre abgedampft und in einfach konzentriertem Schägger-Auftragspuffer aufgenommen, für 2 h bei 37°C denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es konnten lediglich zwei Proteine im Bereich von ca. 14 kDa aufgetrennt werden. Eine N-terminale Sequenzierung war nur von einem der beiden Proteine möglich. Über die Sequenz (AEYLHAIGTL) wurde das Protein als MK0262 identifiziert, das als Binde- und Transportprotein eines nicht genauer definierten Transporters aus *M. kandleri* annotiert ist. Da die Chloroform-Methanol-Extraktion nicht zur

Isolierung des Proteolipids führte, wurde versucht, zunächst das Gen für die Untereinheit *c* (*ntpK*) zu isolieren.

### 3.7.2 Klonierung von *ntpK* aus *M. kandleri*

Zunächst wurden Starteroligonukleotide gewählt, die 187 Bp vor dem Startcodon und 143 Bp nach dem Stopcodon von *ntpK* ansetzten. Die PCR wurde mit isolierter chromosomaler DNA durchgeführt, und nach der PCR wurden 5 µl des Ansatzes in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Es konnte ein Produkt mit der erwarteten Größe von 3396 Bp amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde erneut in einem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und für die Klonierung eingesetzt. Das Fragment wurde in den TOPO<sup>®</sup>2.1-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Nach der Testrestriktion mit *EcoRI* konnte das PCR-Fragment mit 3,4 kBp aus dem Vektor geschnitten werden, im Gel wurden der Vektor und das PCR-Fragment voneinander getrennt (TOPO<sup>®</sup>-Vektor 3,6 kB, Abb. 33). Eine Sequenzierung bestätigte, dass *ntpK* mit den flankierenden Sequenzen kloniert wurde. Der TOPO<sup>®</sup>-*ntpK* Klon sollte für spätere Amplifizierungen verwendet werden.

Es wurde versucht *ntpK*, ohne die zusätzlichen 187 und 143 Bp, in *pMal*, *iBA3* oder *pET21a+* zu klonieren, dazu wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* gewählt. Da mit dem intakten TOPO<sup>®</sup>-Klon wider Erwarten kein Produkt amplifiziert werden konnte, wurde wieder chromosomale DNA eingesetzt. Das PCR-Produkt von etwa 3000 Bp wurde mit den verschiedenen Vektoren ligiert, es konnten jedoch in keinem der Fälle positive Klone isoliert werden.



**Abb. 33** PCR chromosomaler DNA von *M. kandleri* zur Amplifizierung von *NtpK* mit flankierenden Sequenzen, und Klonierung in TOPO<sup>®</sup>2.1

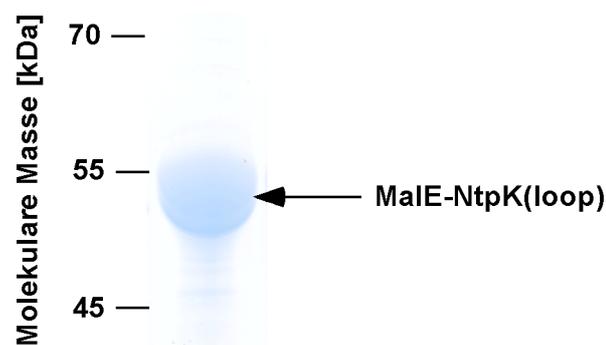
Für die PCR wurden ein Starteroligonukleotid gewählt, das 187 Bp vor dem Startkodon und ein Starteroligonukleotid das 143 Bp nach dem Stopkodon ansetzte. Das Amplifikat (A) wurde aus dem Gel eluiert und in TOPO<sup>®</sup>2.1-kloniert. In B ist das isolierte Plasmid eines positiven Klon vor der Restriktion (Spur 1) und nach der Restriktion mit *EcoRI* (Spur 2) aufgetragen.

Es sollte nun versucht werden, *ntpK* in den TOPO<sup>®</sup>ptrc-His zu inserieren. Dieses TOPO<sup>®</sup>-Expressionssystem hat einen C-terminalen His-tag, über den ein produziertes Protein aufgereingt werden kann. Da *ntpK* bereits erfolgreich in einen TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert werden konnte, schien das ein geeignetes System für die Klonierung des Fragments zu sein. Als Matrize diente chromosomale DNS oder das TOPO<sup>®</sup>-*ntpK* Plasmid. Starteroligonukleotide ohne Schnittstellen, die dem 5'- und 3'-Ende von *ntpK* homolog waren, wurden in die PCR eingesetzt. Es war jedoch nicht möglich, *ntpK* zu amplifizieren. Frisch isolierte DNA und neu synthetisierte Starteroligonukleotide führten ebenfalls nicht zur Amplifizierung eines 3.066 Bp großen Fragments, es konnten lediglich kleinere Fragmente amplifiziert werden, die auch schon in Abb. 33 zu sehen waren. Da *ntpK* als eine verdreizehnfache Kopie eines etwa 240 Bp großen Fragmentes anzusehen ist, sind die Homologien innerhalb der Sequenz sehr groß (s. Abb. 34). Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass die Starteroligonukleotide auch



### 3.7.3 Herstellung eines Antikörpers gegen das Proteolipid

Da die Versuche, *ntpK* in einen Expressionsvektor zu klonieren, nicht erfolgreich waren, sollte zur Herstellung eines Antikörpers lediglich eine membranspannende Helix mit der folgenden Schleife kloniert werden. Dieses 122-Bp-Fragment wurde als MalE-Fusion kloniert, das Protein in *E. coli* DH5 $\alpha$  produziert und über eine Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 35). Das Protein wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, und ein Western-Blot mit Anti-MalE-Antikörpern bestätigte, dass die aufgereinigten Proteine tatsächlich nur MalE-Fusionen waren (Daten nicht gezeigt). Das Protein wurde einem Kaninchen injiziert und das erhaltene Antiserum wurde auf seine Spezifität untersucht.

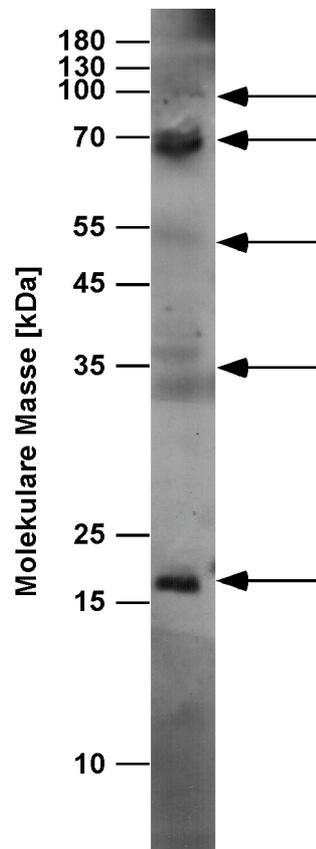


**Abb. 35** MalE-NtpK-Fusion nach der Affinitätschromatographie

Das Fusionsprotein wurde wie beschrieben in *E. coli* produziert und aufgereinigt. 50  $\mu$ g des gereinigten Proteins wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

Die Spezifität des Antikörpers wurde mit Membranfraktionen tiefgefrorener *M. kandleri*-Zellen getestet. Der Antikörper reagierte mit mehreren Proteinen unterschiedlicher Größe (Abb. 36). Das Proteolipidmonomer sollte eine Größe von 98 kDa haben. Die Signale bei 70 kDa und 17 kDa sind stärker als die Signale bei 100 und 55 kDa und die verschiedenen Signale im Bereich von 35 kDa. Die vielen Signale könnten unspezifische Reaktionen des Antikörpers mit anderen Membranproteinen sein. Eine andere Möglichkeit könnte ein proteolytischer Verdau des Proteolipids sein, wodurch Fragmente unterschiedlicher Größe entstanden

sind. Der Antikörper wurde noch nicht an wachsenden *M. kandleri*-Zellen getestet. Möglicherweise ist in frischen Zellen mehr unprozessiertes Proteolipid vorhanden, vorausgesetzt die Antikörpersignale sind spezifisch für NtpK.



**Abb.36** Test des Anti-NtpK(loop)-Antiserums an Membranen von *M. kandleri*

100  $\mu$ g Membranprotein wurden in einem 12%igen Acrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit dem Anti-NtpK(loop)-Antiserum inkubiert. Die stärksten Signale nach der Entwicklung des Blots sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Genetische Organisation bekannter A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPasen

Archäelle ATPasen bestehen aus 9 Untereinheiten und die kodierenden Gene sind meist in einem Operon organisiert (Abb. 38). Eine Ausnahme bilden die Operone von *M. jannaschii*, *M. kandleri* und *Halobacterium* NRC-1, deren ATPase-Gene in zwei Operonen organisiert sind, die 334, 692 bzw. 2 kBp voneinander getrennt sind. Bei *M. kandleri* sind *atpB* und *atpD* vom ersten Operon getrennt, in *M. jannaschii* und *Halobacterium* NRC-1 ist nur *atpD* abgetrennt. Die meisten der bisher bekannten Operone enthalten am 5'-Ende ein Gen, das für ein kleines hydrophiles Protein kodiert, *atpH*. Anschließend folgen die Gene für die beiden membranständigen Untereinheiten *atpK* (Untereinheit *c*) und *atpI* (Untereinheit *a*). Die folgenden Gene *atpE*, *atpC*, *atpF*, *atpA*, *atpB* und *atpD* kodieren hydrophile Untereinheiten. Die Peptide weisen Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten E, d, F, A, B und D der vakuolären ATPasen auf. AtpA, B und D sind den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  der F-Typ-ATPasen ähnlich. Die Gene im Operon von *M. mazei* wurden als *aha* annotiert, und sind als synonym für *atp* anzusehen.

Ein offener Leserahmen stromabwärts von *atpD* in *M. jannaschii*, *M. thermautotrophicus* und *M. mazei* kodiert ein hydrophiles Peptid. In *M. mazei* konnte lediglich gezeigt werden, dass dieses Gen heterolog exprimiert wird, es konnte jedoch noch kein entsprechendes Peptid aus dem Zellextrakt von *M. mazei* gereinigt werden. Im Operon der V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>-ATPase aus *E. hirae* ist ein homologes Gen zu finden, dessen Genprodukt als Teil eines K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschsystems fungiert (Takase *et al.*, 1994). In *S. acidocaldarius* (Denda *et al.*, 1990), *S. solfataricus* (She *et al.*, 2001) und *Sulfolobus tokodaii* (Kawarabayasi *et al.*, 2001) befindet sich an dieser Stelle im Operon das Gen *atpG*, dessen Produkt Ähnlichkeiten zu NtpH aus *E. hirae* aufweist.

Die genomische Sequenz der bisher bekannten Crenarchaeota, *Pyrobaculum aerophilum* (Fitz-Gibbon *et al.*, 2002), *S. tokodaii* (She *et al.*, 2001), *S. solfataricus* (Kawarabayasi *et al.*, 2001) und *Aeropyrum pernix* (Kawarabayasi *et al.*,

1999) zeigt, dass die Organisation der ATPase-Gene weit weniger konserviert ist als bei den Euryarchaeota. Im Vergleich mit den euryarchäellen Sequenzen fällt auf, dass die Gene für die ATPase nicht in einem Operon organisiert sind, sondern auf dem gesamten Genom verteilt liegen.

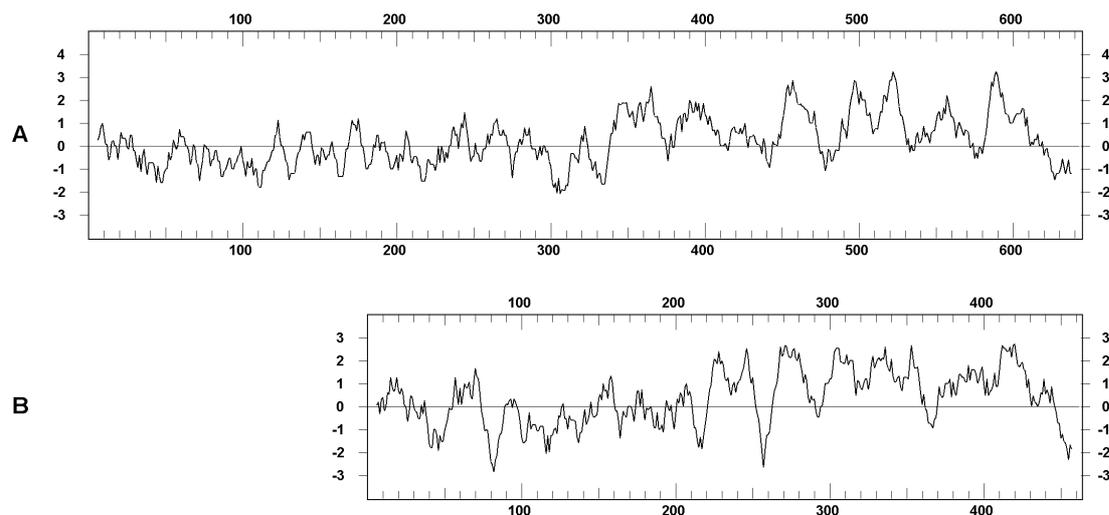
Die Korarchaeota bilden ein weiteres Phylum, deren Vertreter bisher nicht kultivierbar sind, lediglich DNA-Sequenzen aus Bodenproben ermöglichten die Zuordnung dieser Archäen zu einem neuen Phylum innerhalb der Archaea (Woese, 1990; Barns *et al.*, 1996).

Ein weiteres vor kurzem entdecktes Phylum bilden die Nanoarchäen (Hohn *et al.*, 2002), deren einziger Vertreter *Nanoarchaeum equitans* zusammen mit *Ignicoccus* vergesellschaftet vorkommt (Huber *et al.*, 2002). Mit 0,5 MBp ist das Genom von *N. equitans* das bisher kleinste bekannte archäelle Genom (Waters *et al.*, 2003). Interessanterweise fehlen dem Nanoarchaeon sämtliche Gene des Metabolismus und primärer Synthesewege, was auf eine Symbiose oder Parasitismus mit seinem Wirtsorganismus schließen lässt (Huber *et al.*, 2002). *N. equitans* ist damit das erste obligat parasitische/symbiontische Archaeon, das bisher kultiviert wurde. Fünf Gene, die für Untereinheiten einer  $A_1A_0$ -ATPase kodieren, wurden im Genom verteilt gefunden. Die Gene NEQ103, NEQ263, NEQ166, NEQ410 und NEQ217 kodieren die Untereinheiten A, B, D, a und c. Gene für die Untereinheiten C, E, F und H konnten noch nicht gefunden werden. In Tab. 10 sind die Gene mit ihren Genprodukten und deren Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Untereinheiten der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. mazei* zusammengefasst.

**Tab. 10** Gene und Peptide der  $A_1A_0$ -ATPase aus *N. equitans*

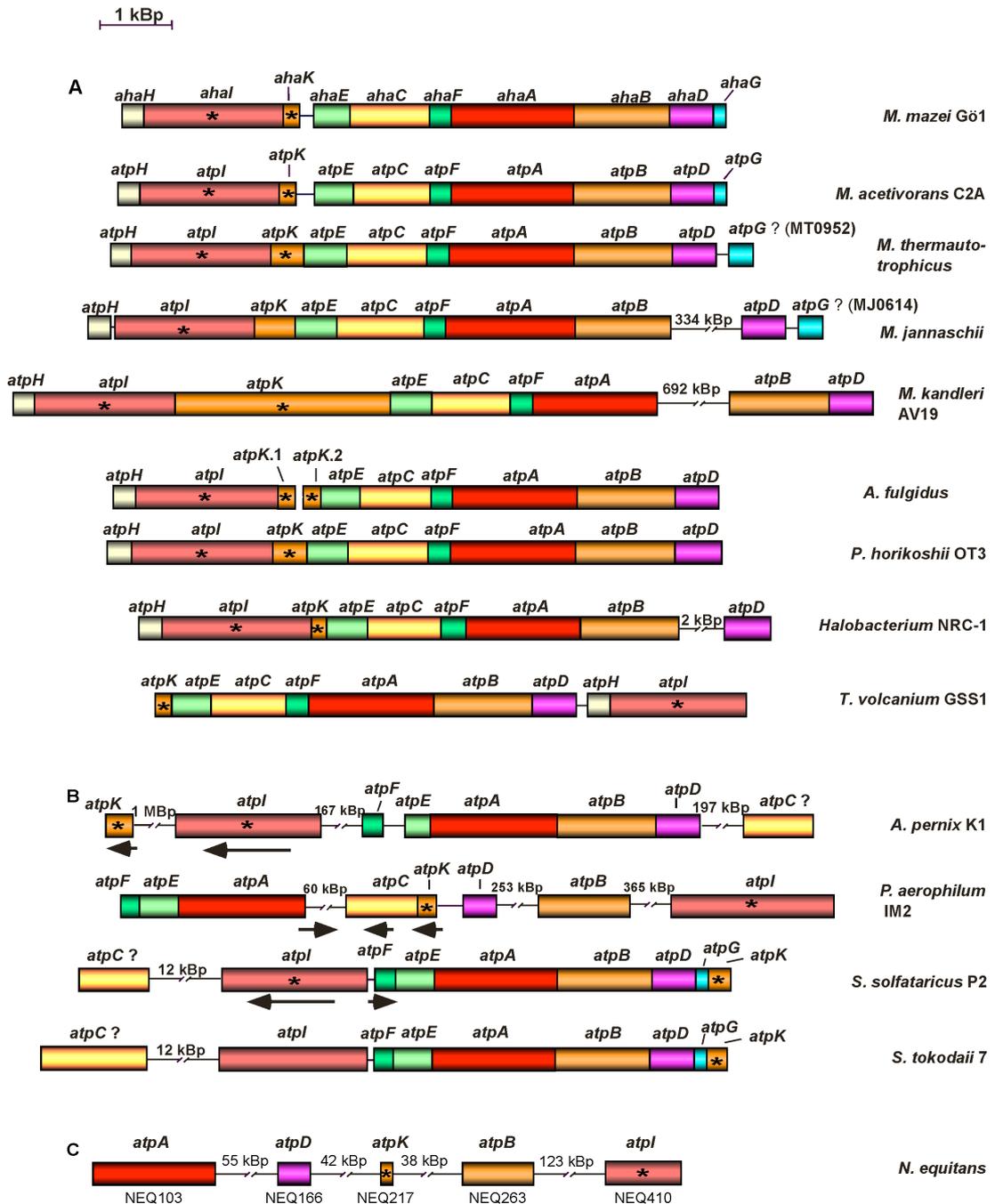
	Gen [Bp]	Peptid [kDa]	Untereinheit	Ähnlichkeiten zum entsprechenden Peptid aus <i>M. mazei</i> Gö1
NEQ103	1713	62,8	AtpA	71%
NEQ263	1251	45,9	AtpB	65%
NEQ166	597	21,9	AtpD	50%
NEQ410	1389	51	AtpI	47%
NEQ217	210	7,7	AtpK	62%

Die beiden katalytischen Untereinheiten A und B haben eine Größe von 62,8 bzw. 45,9 kDa. Damit ist die Untereinheit B gegenüber der Untereinheit B der methanoarchäellen Enzyme etwas kleiner. Beide Untereinheiten haben eine Ähnlichkeit von 71% zu AhaA und 65% zu AhaB aus *M. mazei*. Die Untereinheit *a* der  $A_1A_0$ -ATPase von *N. equitans* ist mit 55 kDa deutlich kleiner als die Untereinheit *a* der ATPase der Methanogenen. Im Hydrophobizitäts-Plot sieht man aber auch hier eine Gliederung des Peptids in einen hydrophilen N-terminalen und einen hydrophoben C-terminalen Bereich (s. Abb. 37). Die Ähnlichkeit zur Untereinheit *a* aus *M. mazei* liegt bei 47%. Mit 21,9 kDa entspricht die Größe der Untereinheit D von *N. equitans* der D-Untereinheit methanoarchäeller ATPasen. Das Proteolipid von *N. equitans* ist ein 8-kDa-Protein, das eine Ähnlichkeit von 62% zum Proteolipid von *M. mazei* hat.



**Abb.37 Hydrophobizitäts-Plots (nach Kyte und Doolittle) der *a*-Untereinheiten aus *M. mazei* und *N. equitans***

Die Untereinheit *a* aus *N. equitans* ist gegenüber der Untereinheit *a* aus *M. mazei* deutlich verkürzt. Beide Peptide gliedern sich in einen hydrophilen N-Terminus und einen hydrophoben C-Terminus, mit 7 Transmembranhelices.



**Abb.38** Physikalische Karten der  $A_1A_0$ -ATPase-Gene verschiedener Archaea

**A:** ATPase-Operone der Euryarchäota *M. mazei* Gö1, *M. acetivorans*, *M. thermotrophicus*, *M. jannaschii*, *M. kandleri*, *A. fulgidus*, *P. horikoshii* und *Halobacterium* NCR-1 **B:** ATPase-Operone der Crenarchäota *A. pernix*, *P. aerophilum*, *S. solfataricus* und *S. tokodaii* **C:** ATPase-Gene von *N. equitans*.

## 4.2 Struktur und Funktion der Untereinheiten der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus *M. jannaschii*

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit eine funktionell gekoppelte A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase gereinigt werden. Das gereinigte Enzym enthielt alle Untereinheiten, die anhand der Operonstruktur vorausgesagt wurden. Zusätzlich waren weitere Polypeptide (bei 97 kDa und im Bereich von 24-28 kDa) sichtbar, die eine Aggregation niedermolekularer Untereinheiten bzw. Abbauprodukte hochmolekularer Untereinheiten oder eine Verunreinigung darstellen könnten. Eine genaue Charakterisierung der zusätzlichen Polypeptide wurde nicht unternommen. Die hydrophoben Untereinheiten *a* und *c*, die an der Ausbildung der Membrandomäne beteiligt sind, konnten in Western-Blot-Analysen als Peptide mit einer apparenten molekularen Masse von 72 bzw. 66 kDa nachgewiesen werden. Die Untereinheit *c* hat eine vorhergesagte Masse von 21 kDa, zeigt in der SDS-PAGE jedoch eine apparente Masse von 16 kDa (Ruppert *et al.*, 1999). Das 16-kDa-Polypeptid konnte anhand der N-terminalen Sequenzierung eindeutig als Untereinheit K identifiziert werden, eine Reaktion mit dem Anti-Atpc<sub>TM23</sub>-Antikörper konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Da der Antikörper nur gegen die zwei Transmembranhelices der Untereinheit *c* gerichtet ist, wäre es aufgrund der gewählten Denaturierungsbedingungen möglich, dass eine Konformationsänderung des Proteolipids die Epitope für den Antikörper unzugänglich machte. Eine Änderung der Denaturierungsbedingungen mit anderen Agenzien wie Trichloressigsäure (Neumann *et al.*, 1998) wurde auf Grund der eindeutigen Identifizierung anhand der N-terminalen Sequenzierung nicht unternommen. Die Reaktion des Antikörpers mit einem 66-kDa-Polypeptid führt zu der Annahme, dass es sich hier um ein SDS-resistentes Oligomer handeln könnte. Diese hohe Stabilität wäre für spätere Strukturanalysen des Proteolipidrings von Vorteil. Da die Anzahl der Monomere im Ring nicht bekannt ist, könnten Rasterkraft-Aufnahmen Aufschluss über die Struktur des Rings geben. Solche SDS-resistenten Oligomere wurden zuvor bereits in *A. woodii* (Reidlinger und Müller, 1994), *P. modestum* (Laubinger und Dimroth, 1988) und *I. tataricus* (Neumann *et al.*, 1998) nachgewiesen.

Die zweite membranständige Untereinheit *a* besteht aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne, wobei ihr hydrophiles N-terminales Ende dem löslichen Teil der Untereinheit *b* der F-Typ-ATPasen ähnlich ist. Es wird deshalb angenommen, dass die Untereinheit *a* eine Fusion aus *a* und *b* der  $F_1F_0$ -ATPasen darstellt und somit an der Protonentranslokation beteiligt sein könnte (Müller *et al.*, 1999). Das Polypeptid mit einer apparenten molekularen Masse von 66 kDa wurde als Untereinheit A identifiziert. Sie trägt die Nukleotidbindestellen mit den Walker-Motiven A und B (Walker *et al.*, 1982). Das Polypeptid mit einer apparenten molekularen Masse von 54 kDa entspricht der Untereinheit B, die, wie auch die Untereinheit  $\alpha$  der F-Typ-ATPasen und die Untereinheit B der V-Typ-ATPasen, nicht katalytisch ist (Müller *et al.*, 1999). Die beiden Untereinheiten A und B liegen in je drei Kopien vor und bilden den hexameren Kopfteil der  $A_1$ -Domäne.

Die Untereinheit C hat eine apparente Masse von 43 kDa. Sie entspricht der Untereinheit *d* der V-Typ-ATPasen aus Hefe. Die Untereinheiten C und *d* weisen keine Homologien zu einer Untereinheit der F-Typ-ATPasen auf. Obwohl die Untereinheit *d* aus Hefen zusammen mit der Membrandomäne gereinigt wurde, deutet die Sequenz des Polypeptids nicht darauf hin, dass es sich hierbei um ein integrales Membranprotein handelt, vielmehr ist sie mit der Membrandomäne assoziiert (Bauerle *et al.*, 1993). Die Struktur der Untereinheit C der A/V-Typ-ATPase aus *T. thermophilus* wurde erst kürzlich von zwei japanischen Arbeitsgruppen aufgeklärt (Iwata *et al.*, 2004; Numoto *et al.*, 2004). Die Struktur der C-Untereinheit besteht aus 20 Helices, die sich in drei Domänen aufteilen. Die erste Domäne besteht aus den N-terminalen Resten 5-77 und den Resten 282-323 des C-Terminus. Die Domänen zwei und drei bestehen aus den Resten 78-178 und 186-281, während die Reste 1-4 und 179-185 ungeordnet vorliegen (Numoto *et al.*, 2004). Der Sequenzvergleich der Untereinheit C von *T. thermophilus* mit der Untereinheit C aus *A. fulgidus*, *Desulfurococcus* sp., *E. hirae* und *S. cerevisiae* zeigte verschiedene konservierte Aminosäurereste (Numoto *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenz der C-Untereinheit methanoarchäeller ATPasen weist Ähnlichkeiten zwischen 43-47% mit der C-Untereinheit von *T.*

*thermophilus* auf, und auch hier sind die meisten der konservierten Reste wieder zu finden (Abb. 39).

Die Untereinheiten D und E konnten aufgrund ihrer ähnlichen molekularen Massen von 24 und 23 kDa in der SDS-PAGE nicht voneinander getrennt werden. Proteolytische Verdauung mit Trypsin zeigte, dass die Untereinheit D der *M. mazei*-A<sub>1</sub>-ATPase nicht ganz zentral zwischen dem A-B-A-Triplett lokalisiert ist und somit in Analogie zur Untereinheit  $\gamma$  der F-Typ-ATPasen die Funktion der zentralen Verbindung zwischen Kopf- und Fußteil übernehmen könnte (Coskun *et al.*, 2002; Coskun *et al.*, 2004). Die Untereinheit E der A-Typ-ATPasen zeigt in ihrer Sekundärstruktur und Größe Homologien zur Untereinheit  $\delta$  der F-Typ-ATPasen. Analog der Untereinheit  $\delta$ , die zusammen mit dem *ab*<sub>2</sub>-Komplex den Stator der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase ausbildet (Wilkins und Capaldi, 1998; Dunn *et al.*, 2000; Del Rizzo *et al.*, 2002), könnte die Untereinheit E ebenfalls an der Ausbildung des Stators beteiligt sein. In der A/V-Typ-ATPase aus *T. thermophilus* ist die Untereinheit E ebenfalls an der Ausbildung des Stators beteiligt (Imamura *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2004).

Das 12-kDa-Protein wurde als Untereinheit F identifiziert. Sie bildet zusammen mit den Untereinheiten A, B und D einen funktionsfähigen Subkomplex der A<sub>1</sub>-ATPase aus *M. mazei* (Lemker *et al.*, 2003), und die Untereinheit F kann mit der Untereinheit B quervernetzt werden (Coskun *et al.*, 2004). In der Anwesenheit von MgATP wird der Grad der Quervernetzung geringer, was zu der Annahme führt, dass die Untereinheit in Abhängigkeit von der Bindung des Substrates im Kopfteil rotiert (Coskun *et al.*, 2004). Dieser Befund wird durch die Untersuchungen an der verwandten *T. thermophilus* A/V-ATPase unterstützt, da hier die Untereinheit F zusammen mit der D-Untereinheit den zentralen Schaft ausbildet (Imamura *et al.*, 2003). Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Yoshida zeigten jedoch, dass die F-Untereinheit nicht zur Rotation gebraucht wird, jedoch als intrinsischer Aktivator des A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>D-Subkomplexes dient (Imamura *et al.*, 2004). Die F-Untereinheit gleicht der D-Untereinheit der V-Typ-ATPasen und der  $\epsilon$ -Untereinheit der F-Typ-ATPasen. In F-Typ-ATPasen dient die  $\epsilon$ -Untereinheit als Schalter, der die Richtung der Rotation des zentralen Stiels beeinflusst,

was durch Konformationsänderung im C-Terminus der Untereinheit bedingt wird (Kato-Yamada *et al.*, 2000; Tsunoda *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003).

		10		20		
1	M	A	D	D	-	<i>T. thermophilus</i>
1	M	R	L	-	-	<i>M. mazei</i>
1	M	A	D	S	I	<i>M. thermautotrophicus</i>
1	M	A	M	D	I	<i>M. jannaschii</i>
1	M	-	-	-	-	<i>M. kandleri</i>
		30		40		
5	-	-	-	-	-	<i>T. thermophilus</i>
13	S	-	-	-	-	<i>M. mazei</i>
19	S	F	I	G	-	<i>M. thermautotrophicus</i>
20	T	Y	F	D	N	<i>M. jannaschii</i>
9	D	Y	-	-	T	<i>M. kandleri</i>
		50		60		
5	-	-	-	-	-	<i>T. thermophilus</i>
14	-	-	-	R	K	<i>M. mazei</i>
34	I	V	V	I	A	<i>M. thermautotrophicus</i>
40	I	V	I	V	W	<i>M. jannaschii</i>
27	I	L	S	I	P	<i>M. kandleri</i>
		70		80		
10	A	R	V	R	V	<i>T. thermophilus</i>
31	T	R	V	R	A	<i>M. mazei</i>
54	A	R	V	R	A	<i>M. thermautotrophicus</i>
60	A	R	I	R	S	<i>M. jannaschii</i>
47	P	R	A	K	A	<i>M. kandleri</i>
		90		100		
30	D	L	S	-	-	<i>T. thermophilus</i>
51	N	M	G	-	I	<i>M. mazei</i>
74	E	T	E	S	M	<i>M. thermautotrophicus</i>
80	E	S	G	S	L	<i>M. jannaschii</i>
67	D	A	-	P	V	<i>M. kandleri</i>
		110		120		
45	Y	G	G	E	L	<i>T. thermophilus</i>
69	D	V	D	E	L	<i>M. mazei</i>
94	Y	I	-	-	-	<i>M. thermautotrophicus</i>
99	Y	V	I	E	V	<i>M. jannaschii</i>
86	A	A	R	A	V	<i>M. kandleri</i>
		130		140		
63	R	T	Q	A	K	<i>T. thermophilus</i>
89	R	N	L	A	L	<i>M. mazei</i>
106	S	Q	L	A	E	<i>M. thermautotrophicus</i>
119	M	Y	L	A	D	<i>M. jannaschii</i>
105	R	A	V	E	S	<i>M. kandleri</i>
		150		160		
83	A	V	R	L	L	<i>T. thermophilus</i>
109	L	I	V	A	Y	<i>M. mazei</i>
126	P	F	R	A	N	<i>M. thermautotrophicus</i>
139	V	L	K	V	F	<i>M. jannaschii</i>
125	L	A	R	A	L	<i>M. kandleri</i>
		170		180		
103	K	A	T	G	R	<i>T. thermophilus</i>
129	K	I	Y	N	A	<i>M. mazei</i>
146	K	A	A	G	L	<i>M. thermautotrophicus</i>
159	K	F	V	G	L	<i>M. jannaschii</i>
145	R	H	A	G	-	<i>M. kandleri</i>
		190		200		
120	R	E	E	V	W	<i>T. thermophilus</i>
149	T	Y	T	S	M	<i>M. mazei</i>
166	-	Y	E	I	I	<i>M. thermautotrophicus</i>
179	P	V	E	K	L	<i>M. jannaschii</i>
162	G	A	E	T	W	<i>M. kandleri</i>
		210		220		
140	L	A	V	P	G	<i>T. thermophilus</i>
169	L	-	-	K	H	<i>M. mazei</i>
185	L	-	-	E	A	<i>M. thermautotrophicus</i>
199	L	-	-	D	G	<i>M. jannaschii</i>
182	L	-	-	R	G	<i>M. kandleri</i>

	230	240	
157	E T Q D L A R V E A L L A K R F F E D V		<i>T. thermophilus</i>
183	G T N - L A Y I E N E L D K I Y Y A D L		<i>M. mazei</i>
203	E T G M L L P I E A A L D R K F L E G L		<i>M. thermautotrophicus</i>
217	Q T S N I I G F E L A L D K Y Y L E S L		<i>M. jannaschii</i>
200	E T G S L L P L E L A L D R A Y Y E H L		<i>M. kandleri</i>
	250	260	
177	A K A - - - A K G L D Q P A L R D Y L A		<i>T. thermophilus</i>
202	F E A I G K P R S K D R K L F A Q V V R		<i>M. mazei</i>
223	I R T V G S P S D D N T K I L H T Y F G		<i>M. thermautotrophicus</i>
237	R K T I M T E G K E E D - I F R E F V G		<i>M. jannaschii</i>
220	W D L V V S E K V D E E - - L A R L V G		<i>M. kandleri</i>
	270	280	
194	L E V D A E N L R T A F K L Q G S G - L		<i>T. thermophilus</i>
222	L E V D V K N L I N L F R L K K A G V M		<i>M. mazei</i>
243	T M V D I S N L K I I L R A K A D G - L		<i>M. thermautotrophicus</i>
256	T I I D V E N L K V I L K G K A D G - L		<i>M. jannaschii</i>
238	L E I D L Y N V E V A L R G A I L N - L		<i>M. kandleri</i>
	290	300	
213	A P D - - - A F F L K G G R F V D R V R		<i>T. thermophilus</i>
242	Q P D E I M P L M I E G G L E L K I E K		<i>M. mazei</i>
262	S Y D D I S P Y I V P H G Y Q I R E W K		<i>M. thermautotrophicus</i>
275	S A E E L S K Y V T L T G Y E L A D W K		<i>M. jannaschii</i>
257	D P E R V L E A M A E G G W E L A E W R		<i>M. kandleri</i>
	310	320	
230	F A R L M E G D - - Y A V L D E L S G T		<i>T. thermophilus</i>
262	L A A L P Y D E - - - F V N E L Q R T		<i>M. mazei</i>
282	L K D L M E S E D V S G V V S G L E G T		<i>M. thermautotrophicus</i>
295	L K D L M S A G G I E G V L S G L E G T		<i>M. jannaschii</i>
277	K R E L A E A E D P L E V V E R L S G T		<i>M. kandleri</i>
	330	340	
248	P F S G L - - - - - - - S G V R D L R		<i>T. thermophilus</i>
278	Q Y W E A I S G V V G - - P D M I S L T		<i>M. mazei</i>
302	D Y G Q M L S E A L S E Y T S T G S V A		<i>M. thermautotrophicus</i>
315	S Y A E V L A E A M E E Y E K T K S I Y		<i>M. jannaschii</i>
297	S L G P Y L E E A A E E Y S E G R G V Q		<i>M. kandleri</i>
	350	360	
260	A L E R G L R C V L L K E A K K - G V Q		<i>T. thermophilus</i>
296	T L E S R L T R Y Y L E S S T I L S H V		<i>M. mazei</i>
322	V F E R V L E D N L N R M A R N F A L K		<i>M. thermautotrophicus</i>
335	A F E K A L D K F V L E K G K K L S T R		<i>M. jannaschii</i>
317	V F D E A L R K A R Y E L A R E I A G S		<i>M. kandleri</i>
	370	*	380
279	D P L G V G L V L A Y V K E R E W E A V		<i>T. thermophilus</i>
316	S P I T V V P I L D Y I I H K N N E A T		<i>M. mazei</i>
342	K P F G V G P M I G F L S R K E V V K		<i>M. thermautotrophicus</i>
355	K P F G V G P I I G L I V S K E L E V K		<i>M. jannaschii</i>
337	D L I G A P A V V H A V Y E K Q R E V D		<i>M. kandleri</i>
	390	400	
299	R L R L L A R R A Y F G L P R A Q V E E		<i>T. thermophilus</i>
336	N L R I I F R G K E T G L S D E L I K D		<i>M. mazei</i>
362	N L K V I A R S K R E P G F P E A M V K		<i>M. thermautotrophicus</i>
375	N L K A I I K G K I E N L K P E E I R S		<i>M. jannaschii</i>
357	N V I S L V N A K V A D V - - - - -		<i>M. kandleri</i>
319	E V V C P		<i>T. thermophilus</i>
356	Q L V I I		<i>M. mazei</i>
382	E M L A		<i>M. thermautotrophicus</i>
395	L L I S L		<i>M. jannaschii</i>
370	E T M L V		<i>M. kandleri</i>

**Abb. 39 Sequenzvergleich der C-Untereinheit methanogener Archaea mit der C-Untereinheit aus *T. thermophilus***

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der Untereinheit C von *T. thermophilus*, *M. mazei*, *M. thermautotrophicus*, *M. jannaschii* und *M. kandleri*. Der konservierte Glutamatrest ist schwarz umrahmt und mit einem Stern gekennzeichnet. Die Boxen zeigen konservierte Aminosäuren, die in der Untereinheit C aus *A. fulgidus*, *Desulfurococcus* sp., *E. hirae* und *S. cerevisiae* ebenfalls zu finden waren (Numoto et al., 2004).

Die Untereinheit H, die durch das erste Gen im ATPase-Operon der Euryarchaeota kodiert wird, hatte im SDS-Gel eine apparente Masse von 11 kDa. Dieser Untereinheit könnte, wie die Untereinheit G (im ATPase-Operon von *T. thermophilus* ebenfalls das erste Gen (Yokoyama *et al.*, 2000)) der *T. thermophilus*-ATPase ein „lösliches“ *b* (F-Typ-ATPasen) darstellen und an der Ausbildung des sekundären Stiels beteiligt sein (Müller *et al.*, 1999).

### 4.3 Die Proteolipide der Archaea

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Proteolipide der Archaea wie die Proteolipide der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasen ebenfalls eine molekulare Masse von 8 kDa haben und aus zwei transmembranen Helices mit einer hydrophilen Schleife aufgebaut sind. Analog den F-Typ-ATPasen sollte das die Fähigkeit zur ATP-Synthese mit sich bringen.

In den Genomen von *M. jannaschi* und *M. maripaludis* wurden Proteolipidgene entdeckt, die für ein tripliziertes Proteolipid mit einer molekularen Masse von 21,3 und 21,5 kDa kodieren, die zu 85,7% identisch sind. Die Proteolipide bestehen aus drei Haarnadeln, deren Sequenz hoch konserviert ist (Abb. 40A, B). Für *M. jannaschii* ist die Haarnadel MJATPK1 zu MJATPK2 zu 58% identisch, MJATPK2 zu MJATPK3 zu 57% und MJATPK3 zu MJATPK1 zu 46%, was für die Verfielfachung und anschließende Fusion des Gens spricht (Ruppert *et al.*, 1999). Die Haarnadeln 1-3 von *M. maripaludis* zeigen zueinander etwas weniger Übereinstimmung, was aber immer noch für die Triplizierung des Proteolipids spricht. Die Teile MMPATPK1 zu MMPATPK2 sind zu 45,8% identisch, MMPATPK2 zu MMPATPK3 zu 46,3% und MMPATPK3 zu MMPATPK1 zu 39,8%. Das für die Ionentranslokation essentielle Carboxylat ist bei *M. jannaschii* wie auch bei *M. maripaludis* in den Transmembranhelices vier und sechs lokalisiert. In der Transmembranhelix zwei wurde das Carboxylat gegen einen Glutaminrest substituiert.

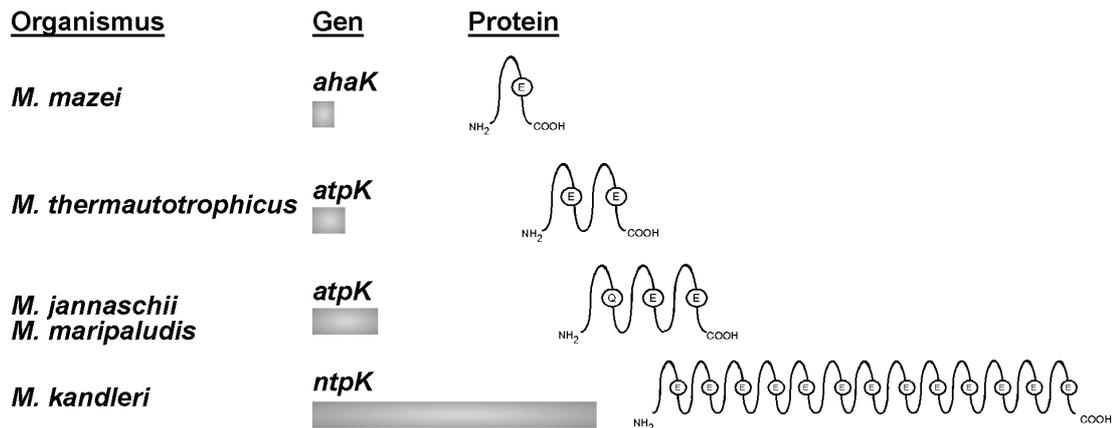
A		1	M	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	P	L	I	L	G	A	V	G	A	G	L	A	V	G	I	A	G	L	G	S	G	I	G	A	G	I	T	G	A	S	G	A	G	G	MJATPK1
		68	L	I	L	F	-	V	F	K	T	-	-	-	V	S	P	W	A	M	F	A	A	G	L	A	A	G	L	A	G	L	-	S	A	I	G	Q	G	I	A	A	S	A	G	L	G	MJATPK2			
		140	L	L	L	V	G	V	F	K	G	N	A	G	A	E	T	V	A	A	L	G	A	G	F	A	V	G	F	A	G	L	-	S	G	I	G	Q	G	I	T	A	A	G	A	I	G	MJATPK3			
		37	V	V	A	E	D	P	N	K	F	G	T	A	I	V	F	Q	A	L	P	Q	T	Q	G	L	Y	G	F	L	V	A	I													MJATPK1					
		108	A	V	A	E	D	N	S	I	F	G	K	A	M	V	F	S	V	L	P	E	T	Q	A	I	Y	G	L	L	I	A	I													MJATPK2					
		185	A	T	A	R	D	P	D	A	M	G	K	G	L	V	L	A	V	M	P	E	T	F	A	I	F	G	L	L	I	A	I	L	I	M	L	M	I	K							MJATPK3				
B		1	M	V	F	E	N	P	L	L	-	-	-	-	-	-	G	A	I	G	A	G	L	A	V	G	I	A	G	L	G	S	G	I	G	A	G	I	T	G	A	S	G	A	G	G	MMPATPK1				
		70	L	I	L	-	-	F	V	F	K	S	A	P	E	W	A	M	L	A	A	G	I	G	T	G	L	A	G	L	-	S	A	I	G	Q	G	I	A	S	A	A	G	L	G	MMPATPK2					
		140	L	L	L	V	G	V	F	A	S	P	G	V	T	I	A	A	L	G	A	G	L	A	V	G	F	A	G	L	-	S	G	I	G	Q	G	I	T	A	A	G	A	I	G	MMPATPK3					
		39	V	V	A	E	D	P	N	K	F	G	T	A	I	V	F	Q	A	L	P	Q	T	Q	G	L	Y	G	F	L	V	A	I													MMPATPK1					
		110	A	V	A	E	D	D	G	I	F	G	K	A	M	V	F	S	V	L	P	E	T	Q	A	I	Y	G	L	L	V	A	I													MMPATPK2					
		183	A	T	A	R	D	P	D	A	M	G	K	G	L	V	L	A	V	M	P	E	T	F	A	I	F	G	L	L	I	A	I	L	I	M	L	G	I	M	F					MMPATPK3					

**Abb. 40 Sequenzvergleich des triplizierten Proteolipids aus *M. jannaschii* und *M. maripaludis***

Die 21-kDa-Proteolipide von *M. jannaschii* (A) und *M. maripaludis* (B) wurden in drei „8-kDa-Proteolipide“ unterteilt, und deren Primärsequenzen wurden miteinander verglichen.

Weitere Genomsequenzen methanogener Archäen ergaben, dass eine Vervielfachung der Proteolipide in der Gruppe der Methanogenen weit verbreitet ist (Abb. 41). Das für das Proteolipid kodierende *atpK* aus *M. thermotrophicus* (Smith *et al.*, 1997) ist dupliziert, in *M. kandleri* ist das Proteolipid kodierende Gen *ntpK* sogar verdreizehnfacht (Slesarev *et al.*, 2002). Das Peptid von *M. thermotrophicus* hat eine abgeleitete Masse von 15,6 kDa, die beiden Haarnadeln sind zu 67% identisch und das für die Ionentranslokation essentielle Carboxylat ist in beiden Haarnadeln konserviert. Die 13 Haarnadeln, die das Proteolipid von *M. kandleri* bilden, sind in ihrer Aminosäuresequenz von 55,9 bis 86,3% identisch, und der aktive Carboxylatrest ist in jeder Haarnadel konserviert (Lolkema und Boekema, 2003). Die Proteolipide von *M. thermotrophicus*, *Methanothermobacter marburgensis* und *M. jannaschii* konnten durch eine Chloroform/Methanol-Extraktion gereinigt werden (Ruppert *et al.*, 1999; Ruppert *et al.*, 2001). Nachfolgende SDS-PAGE oder MALDI-TOF-Analysen belegten, dass die Peptide tatsächlich als verdoppelte beziehungsweise verdreifachte Peptide vorliegen.

Eine Reinigung des Proteolipids von *M. kandleri* ist bisher noch nicht gelungen, lediglich das *ntpK*-Gen mit einer Länge von 3063 Basenpaaren konnte amplifiziert werden.



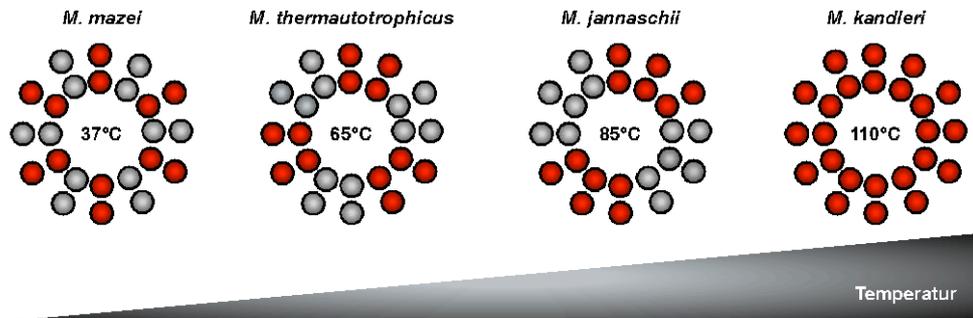
**Abb. 41 Methanoarchäelle Proteolipide**

Die Proteolipidmonomere von *M. mazei*, *M. thermautotrophicus*, *M. jannaschii*, *M. maripaludis* oder *M. kandleri* haben abgeleitete molekulare Massen von 8, 16, 21, 21 oder 98 kDa. Die Vervielfachung führte bei *M. jannaschii* und *M. maripaludis* zu einem Verlust des ionentranslozierenden Glutamats in Helix 2, in den anderen Methanogenen blieben die aktiven Aminosäurereste in jeder Haarnadel erhalten.

Welchen Vorteil könnte diese Vergrößerung der Proteolipide mit sich bringen? Die Proteolipid-Monomere treten in einer höheren Kopienzahl als andere ATPase-Untereinheiten auf. Es gibt wenige Mechanismen, die eine erhöhte Synthese des Proteolipids ermöglichen. In *E. coli* wird die Translation der Proteolipids gesteigert (McCarthy *et al.*, 1985), im Fall von *M. mazei* wird das Proteolipid-Gen zusätzlich transkribiert (Ruppert *et al.*, 1998). Eine weitere Möglichkeit wäre die Multiplikation des Proteolipid-Gens, woraus sich automatisch eine höhere Kopienzahl ergeben würde.

Für thermophile Organismen könnte die Vergrößerung des Proteolipids einen weiteren Vorteil mit sich bringen. Der Proteolipidring besteht aus einer verschiedenen Anzahl von Monomeren, die durch Wechselwirkungen miteinander in Kontakt stehen. Bei der Rotation des Proteolipidrings kann die Struktur eines großen Rings, der aus einer Untereinheit aufgebaut wird, leichter erhalten werden. Das ist gerade bei einem Organismus wie *M. kandleri*, der sein Wachstumsoptimum bei etwa 95°C hat, entscheidend. Betrachtet man die verschiedenen Proteolipide der Methanoarchäen, fällt ins Auge, dass die Vervielfachung des Proteolipid-Gens mit der Wachstumstemperatur korreliert (Abb. 42). *M. mazei* wächst optimal bei 37°C und hat ein 8 kDa-Proteolipid, *M. thermautotrophicus*

wächst bei 65°C und hat ein verdoppeltes Proteolipid, das Proteolipid des thermophilen *M. jannaschii* ist verdreifacht und das hyperthermophile Archaeon *M. kandleri* verfügt über ein einziges Monomer, das den Ring aufbauen könnte.

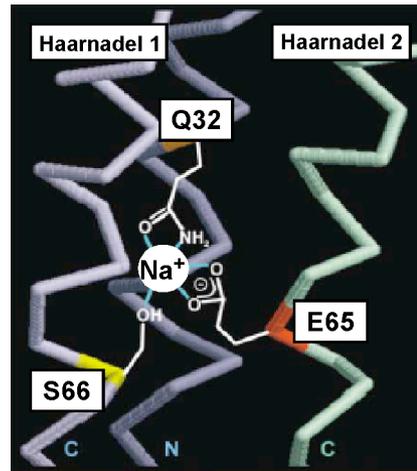


**Abb. 42 Korrelation zwischen Wachstumstemperatur und Anzahl der Monomeren im c-Ring einiger methanogener A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthasen**

Die Anzahl der kovalent verknüpften Haarnadeln in den Rotoren der methanogenen Archaea korreliert mit der Wachstumstemperatur. Ausgehend von 24 Transmembranhelices, die einen Rotor bilden, wird der c-Ring von *M. mazei* aus 12 Monomeren aufgebaut. Die Rotoren von *M. thermautotrophicus*, *M. jannaschii* und *M. kandleri* wären dann analog aus 6, 4 oder 1 Monomer aufgebaut.

#### 4.4 Das Na<sup>+</sup>-Bindemotiv verschiedener Proteolipide

Die Ionenspezifität der bakteriellen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen wird allein durch die c-Untereinheit bestimmt. Das Na<sup>+</sup>-Bindemotiv der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase aus *P. modestum* (Kaim *et al.*, 1997) und *I. tataricus* (Vonck *et al.*, 2002) wird durch 3 Aminosäurereste bestimmt. Jede c-Untereinheit hat die Form einer Haarnadel, die beiden Helices sind über eine cytoplasmatische Schleife, die von Arg45, Gln46 und Pro47 gebildet wird, miteinander verbunden (Meier *et al.*, 2005). Die N-terminalen Helices der c-Untereinheit bilden den inneren Ring des Proteolipid-Oligomers, während die C-Termini der c-Untereinheiten einen äußeren Ring bilden (Vonck *et al.*, 2002). Die Na<sup>+</sup>-Bindetasche wird durch Gln32 in Helix1, Ser66 in Helix2 und Glu65 der benachbarten Helix ausgebildet (Abb. 43) (Kaim *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 2005).

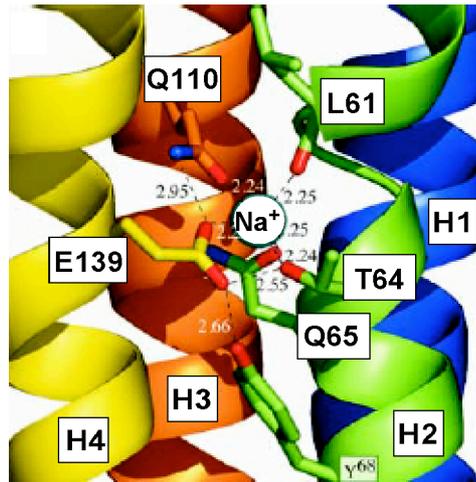


**Abb. 43** Strukturmodell des Na<sup>+</sup>-Bindemotivs von *I. tartaricus* (Meier und Dimroth, 2002)

Q32 und S66 einer Haarnadel komplexieren zusammen mit E65 der benachbarten Haarnadel das Na<sup>+</sup>-Ion.

Dieses Na<sup>+</sup>-Bindemotiv wurde auch in der Na<sup>+</sup>-abhängigen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase von *A. woodii* gefunden (Rahlfs und Müller, 1997). Daraus ergibt sich ein Na<sup>+</sup>-Bindemotiv für die bakteriellen ATPasen von *P. modestum*, *I. tartaricus* und *A. woodii*, von Q in Helix1 und dem Motiv ES/T in Helix2 (Abb. 43, Abb. 45A). Zudem ist ein Prolin in Helix1, vier Aminosäuren vor Q32, hoch konserviert, sie trägt aber nicht zur Na<sup>+</sup>-Bindung bei, die Funktion dieser Aminosäure ist nicht bekannt.

Die Struktur des Rotors und des Na<sup>+</sup>-Bindemotivs der V-ATPase aus *E. hirae* wurde ebenfalls erst kürzlich aufgeklärt (Murata *et al.*, 2005). Das Proteolipid besteht aus fünf  $\alpha$ -Helices, wovon die Helices 1-4 die Membran durchspannen, und die Helix0 periplasmatisch, außerhalb des Rings liegt (Murata *et al.*, 2005). Der äußere Ring wird von den Helices 2 und 4 gebildet, während an der Ausbildung des inneren Rings die Helices 1 und 3 beteiligt sind (Murata *et al.*, 2005). Die Komplexierung des Na<sup>+</sup>-Ions wird von L61, T64 und Q65 in Helix 2, Q110 in Helix 3 und dem aktiven Carboxylat E139 in Helix 4 übernommen (s. Abb. 44, Abb. 45B) (Murata *et al.*, 2005). Die Na<sup>+</sup>-Bindetasche wird sowohl im bakteriellen Proteolipid, als auch im Proteolipid von *E. hirae* von drei Helices gebildet.



**Abb. 44** Modell des Na<sup>+</sup>-Bindemotivs von *E. hirae* (Murata *et al.*, 2005)

An der Ausbildung der Na<sup>+</sup>-Bindetasche sind drei der vier membranspannenden Helices beteiligt. L61, T64 und Q65 sind in Helix2 lokalisiert, Q110 und E139 liegen in Helix3 bzw. Helix4.

Das Proteolipid der H<sup>+</sup>-abhängigen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase aus *E. coli* hat die Na<sup>+</sup>-bindenden Liganden nicht (Abb. 45C) (Kaim *et al.*, 1997).

In Abb. 45D sind die Sequenzvergleiche der methanoarchäellen Proteolipide von *M. mazei*, *M. thermautotrophicus*, *M. jannschii*, *M. maripaludis* und *M. kandleri* dargestellt. Die vervielfachten Proteolipidsequenzen aus *M. thermautotrophicus*, *M. jannschii*, *M. maripaludis* und *M. kandleri* wurden für den Sequenzvergleich in einzelne, einer Haarnadel entsprechende Sequenz aufgeteilt. Für das 13mer des Proteolipids aus *M. kandleri* wurden nur die ersten beiden Haarnadeln für den Sequenzvergleich herangezogen. In allen Proteolipiden der Methanogenen ist das konservierte Prolin der F-ATPasen, gegen ein Serin ausgetauscht. In *M. mazei* ist anstelle des Glutamins, das in Helix1 der bakteriellen Na<sup>+</sup>-abhängigen ATPasen vorkommt, ein Glutamat zu finden, das aber ebenfalls an der Komplexbildung eines Na<sup>+</sup> beteiligt sein könnte. Haarnadel1 des triplizierten Proteolipids von *M. jannschii* oder *M. maripaludis* besitzt anstelle von Glu/Gln ein Alanin in Helix1. Zudem ist das konservierte Carboxylat gegen ein Glutamin substituiert, somit kann diese Helix nicht an der Komplexbildung eines Na<sup>+</sup>-Ions beteiligt sein. Das LTQ/Q/E-Motiv des *E. hirae*-Proteolipids scheint ebenfalls in den Methanogenen konserviert zu



	70	80	90	
40	V E S V A R Q P E A K G D I I S T M V L G Q A I A E S T G I		Pm	
40	V E S V A R Q P E A K G D I I S T M V L G Q A V A E S T G I		It	<b>A</b>
37	A E A V G R Q P E A Q S D I I R T M L L G A A V A E T T G I		Aw	
42	A A L T T S Q P - - - - E K F G Q A L I L Q L P G T Q G L		Eh H1	<b>B</b>
119	I Q I L A K K P - - - - E H A T K G I I F A A M V E T Y A I		Eh H2	
36	L E G A A R Q P D L I P L L R T Q F F I V M G L V D A I P M		Ec	<b>C</b>
44	I G A M A E N E - - - - G L F G K G L I L T V I P E T I V I		Mm	
38	V G A V A E N S - - - - D M F A R G I I F S T L P E T Q A I		Mt H1	
120	V G A V V E D P - - - - D M F A R G I I F S A L S E T Q A I		Mt H2	
35	A G V V A E D P - - - - N K F G T A I V F Q A L P Q T Q G L		Mj H1	
107	L G A V A E D N - - - - S I F G K A M V F S V L P E T Q A I		Mj H2	<b>D</b>
183	I G A T A R D P - - - - D A M G K G L V L A V M P E T F A I		Mj H3	
37	A G V V A E D P - - - - N K F G T A I V F Q A L P Q T Q G L		Mmp H1	
109	L G A V A E D D - - - - G I F G K A M V F S V L P E T Q A I		Mmp H2	
184	I G A T A R D P - - - - D A M G K G L V L A V M P E T F A I		Mmp H3	
36	A G A V A E D E - - - - A T F G K A I V F S V L P E T Q A I		Mk H1	
117	I G A V L K D E - - - - A L F G R A I V Y A V L P E T Q A I		Mk H2	
61	V G A I A E D R - - - - S N F G T A L I F L L L P E T L V I		Tt	<b>E</b>
34	A G A V A E D E - - - - K N F R N A L I L Q G L P M T Q S I		Pa H1	
118	I G A V S K N P - - - - R T F T Q N L I F A A M A E T M A I		Pa H2	<b>F</b>
34	A G A V A E D E - - - - R N F R N A L I L E G L P M T Q S I		Pf H1	
122	I G A V S K N P - - - - K T F T Q N L I F A A M A E T M A I		Pf H2	
37	A G A V A E D E - - - - R N F R N A L I L E G L P M T Q S I		Ph H1	
122	I G A V S K N P - - - - R T F T Q N L I F A A M A E T M A I		Ph H2	

	100	110		
70	Y S L V I A L I L L Y A N P - F V - G L L G		Pm	
70	Y S L V I A L I L L Y A N P - F V - G L L G		It	<b>A</b>
67	Y G L I V A L I L L F G K P I F L K T V T D R		Aw	
68	Y G F V I A F L I F I N		Eh H1	<b>B</b>
145	L G F V I S F L L V L - - - - - - - - N A		Eh H2	
66	I A V G L G L Y V M F A V A		Ec	<b>C</b>
70	F G L V V A L L I - - - - - - - - - - N Q		Mm	
64	Y G F L I A I L L L V F S G L L G		Mt H1	
146	Y G F L I A I L L M V F G G I L G G		Mt H2	
61	Y G F L V A I		Mj H1	
133	Y G L L I A I		Mj H2	<b>D</b>
209	F G L L I A I L I M L M I K		Mj H3	
63	Y G F L V A I		Mmp H1	
135	Y G L L V A I		Mmp H2	
210	F G L L I A I L I M L G I M F		Mmp H3	
62	Y G L L T A I L I M V G I G L L G A A K A V T		Mk H1	
143	Y G L L V A I I I M V G S G L L G G A - G G K		Mk H2	
87	F G L L I A F I L - - - - - - - - N G R L		Tt	<b>E</b>
60	Y G L I T L F L I G M T A G I I G G		Pa H1	
144	F G L V G A I I L I M - - - - - - - - S L		Pa H2	<b>F</b>
60	Y G L I T L F L I G M T A G V I G G		Pf H1	
148	F G L V G A I L L I M - - - - - - - - S L		Pf H2	
63	Y G L I T L F L I G M A A G I I G G		Ph H1	
148	F G L V G A I I L I M - - - - - - - - S L		Ph H2	

**Abb. 45 Sequenzvergleich verschiedener Proteolipide**

Die Aminosäuresequenzen der vervielfachten Proteolipide von *E. hirae*, *M. jannaschii*, *M. maripaludis*, *M. thermautotrophicus*, *M. kandleri*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus* und *Pyrococcus horikoshii* wurden für den Sequenzvergleich in einzelne Haarnadeln aufgeteilt. Für *M. kandleri* wurden nur die ersten beiden Haarnadeln für den Sequenzvergleich herangezogen. Pm: *P. modestum*; It: *I. tartaricus*; Aw: *A. woodii*; Eh H1, H2: *E. hirae* Haarnadel 1, 2; Ec: *E. coli*; Mm: *M. mazei*, Mt H1, H2: *M. thermautotrophicus* Haarnadel 1, 2; Mj H1, 2, 3: *M. jannaschii* Haarnadel 1, 2, 3; Mmp H1, 2, 3: *M. maripaludis* Haarnadel 1, 2, 3; Tt *T. thermophilus*; Pa H1, H2: *P. abyssi* Haarnadel1, 2; Pf H1, H2: *P. furiosus* Haarnadel1, 2; Ph H1, H2: *P. horikoshii* Haarnadel1, 2.

Das Proteolipid der  $A_1A_0$ -ATPase von *T. thermophilus* hat interessanterweise auch ein  $\text{Na}^+$ -Bindemotiv, das dem der bakteriellen ATPasen ähnelt. An die Stelle des konservierten Prolins der bakteriellen ATPasen ist ein Threonin gerückt (Abb. 45E).

Die Proteolipide der Pyrococcen haben ein  $\text{Na}^+$ -Bindemotiv, das mit dem Motiv LTQ-Q-E des Proteolipids von *E. hirae* weitgehend übereinstimmt. Wie auch bei den Methanogenen findet ist das Leucin um eine Position verschoben (s. Abb. 45F).

Ob die Methanogenen die ATP-Synthese an einen Natriumgradienten und einen Protonengradienten koppeln, bleibt nach wie vor ungeklärt.

Die Rekonstitution der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* in Liposomen war zwar erfolgreich, allerdings wurde keine ATP-Synthese beobachtet, lediglich eine ATP-Hydrolyse wurde an den Proteoliposomen nachgewiesen.

Ein alternativer Ansatz zur Untersuchung der Ionenspezifität ist die Analyse der heterolog produzierten  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. mazei*. Das gesamte *aha*-Operon von *M. mazei* Gö1 wurde in den Vektor pVSBAD2 kloniert (Weidner, 2003). Nach der Expression des *aha*-Operons in *E. coli* DK8 konnten die Proteine AhaA, AhaB, AhaC, AhaD, AhaE, AhaF, AhaH, AhaI und AhaK im Rohextrakt und in der Membranfraktion immunologisch nachgewiesen werden (Weidner, 2003; Maischak, 2004). Lediglich AhaG konnte nicht nachgewiesen werden, wobei allerdings nach wie vor unklar ist, ob dieses Protein überhaupt einen Teil des ATP-Operons darstellt. Die ATPase-Aktivität konnte mit DCCD gehemmt werden, was auf eine funktionelle Kopplung des Enzyms schließen lässt (Weidner, 2003). Die ersten Versuche an Zellsuspensionen des komplementierten *E. coli* DK8 zeigten lediglich eine  $\text{H}^+$ -Abhängigkeit der heterolog produzierten  $A_1A_0$ -ATPase, eine  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit konnte noch nicht gezeigt werden (Maischak, 2004).

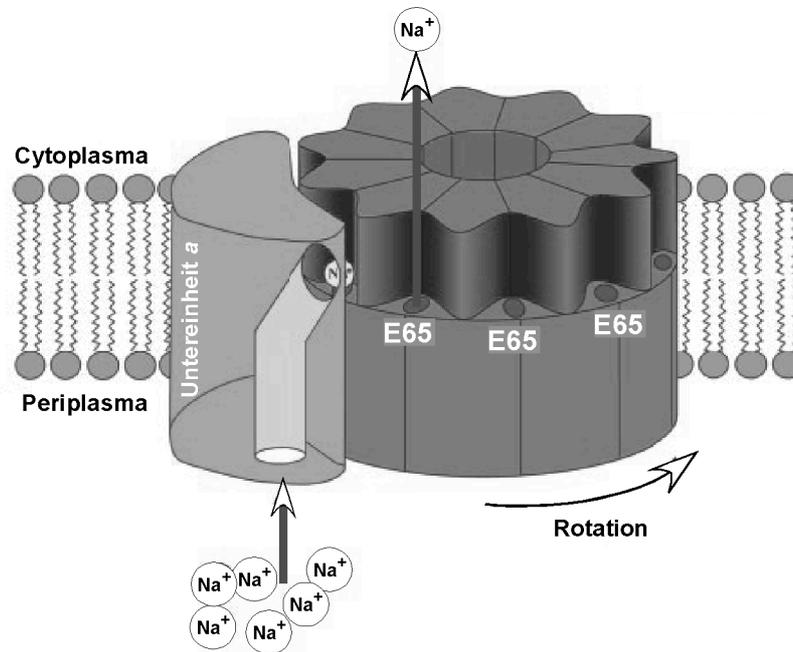
Da *E. coli* gentechnisch zugänglich ist, ist es auch möglich, zum Beispiel durch Deletion eine Minimalzusammensetzung einer archäellen ATPase zu bestimmen oder durch Mutationsstudien die Ionenspezifität zu verändern.

## 4.5 Aufbau verschiedener Rotoren der ATP-Synthasen/ATPasen

Die Analyse der Proteolipidringe aus *E. hirae* (Murata *et al.*, 2005), Spinatchloroplasten (Seelert *et al.*, 2003), *E. coli* (Jiang *et al.*, 2001), *I. tartaricus* (Stahlberg *et al.*, 2001; Vonck *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2005) und *Spirulina platensis* (Pogoryelov *et al.*, 2005) ergaben folgende Anzahl von Monomeren im Ring: 10 in *E. hirae*, 14 in Spinatchloroplasten, 10 in *E. coli* und 11 in *I. tartaricus* und 15 in *S. platensis*, damit ergeben sich 40, 28, 20, 22 oder 30 Transmembranhelices, die den Rotor aufbauen. Die Zusammensetzung des Rings der F-Typ-ATPase aus *E. coli* scheint je nach Wachstumsbedingungen zu variieren (Schemidt *et al.*, 1995; Schemidt *et al.*, 1998).

Der *c*-Ring von *I. tartaricus* ist aus 11 Monomeren aufgebaut. Die Monomere lagern sich zu zwei Ringen zusammen, wobei die N-Termini den dicht gepackten inneren Ring und die C-Termini den äußeren Ring bilden (Meier *et al.*, 2005). Für die Ionentranslokation werden die Reste Gln32, Glu65 und Ser66 von zwei benachbarten Helices benötigt (s. Abb. 43). Die Arbeitsgruppe um Dimroth stellte ein Konzept vor, wie im Falle der ATP-Hydrolyse ein Ion, das durch den  $F_0$ -Teil transportiert wird, die Rotation des *c*-Rings gegen die *a*-Untereinheit vorantreibt (Dimroth *et al.*, 1998; Kaim *et al.*, 1998). Die Bindestellen der Ionen im *c*-Oligomer sind in der Mitte der Membran gelegen und nur von der cytoplasmatischen Seite her zugänglich. Eine Ausnahme bilden die Bindestellen, die an der Grenzfläche zum Stator liegen. Die Ionen können durch einen Kanal in der Untereinheit *a* ins Periplasma treten. Für die komplette Passage eines Ions durch die Membran wird die Rotation des *c*-Rings gegen *a* benötigt. Im Fall der ATP-Synthese werden die Ionen vom Periplasma an eine Bindestelle weitergeleitet und im Cytoplasma freigesetzt. Ein unbesetzter Carboxylatrest (*c*65E) ist negativ geladen und wird vom positiv geladenen Argininrest in der Untereinheit *a* (R227) angezogen. Die negative Ladung wird durch die Beladung des Rotors mit einem Ion ausgeglichen und der Rotor dreht in die hydrophobe Umgebung, der angrenzende negativ geladene Carboxylatrest wird dann vom Arginin wieder angezogen. Fehlt ein elektrochemisches Potential, werden die Ionen lediglich ausgetauscht, indem der Rotor ungerichtet am

Stator hin und her gleitet (Kaim *et al.*, 1998; Kaim und Dimroth, 1998). Abb. 46 zeigt ein Modell des Rotors von *P. modestum*.

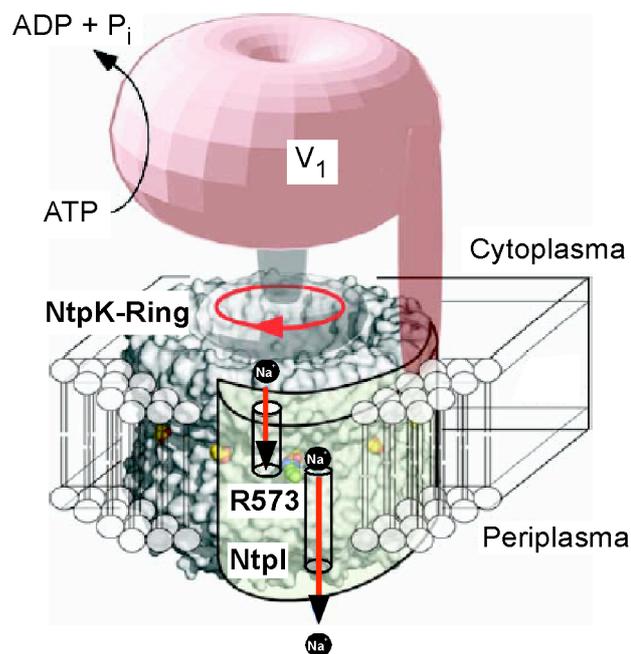


**Abb. 46** Der Rotor der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase von *P. modestum* (von Ballmoos *et al.*, 2002)

Auf dem Rotor bilden die negativen Ladungen des konservierten Carboxylatrestes eine Art negativ geladenes Band, das ungerichtet am Stator (a) hin und her gleitet. Getrieben wird die Rotation vom elektrochemischen Potential, das an der Membran anliegt. Das positiv geladene Arginin zieht einen negativen Rest an, der sich nach einer Beladung weiterdreht.

Für die Struktur des *E. hirae* Proteolipid-Oligomers ist die Anordnung der Monomere ähnlich wie für *I. tartaricus*. Das verdoppelten Proteolipide sind so angeordnet, dass die Helices 1 und 3 im inneren liegen und die Helices 2 und 4 am Aufbau des äußeren Rings beteiligt sind (Murata *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2005). Insgesamt sind 10 Monomere am Aufbau des Rotors von *E. hirae* beteiligt, was zu einer erstaunlichen Zahl von 40 Transmembranhelices führt, die den Ring ausbilden (Murata *et al.*, 2005). Die Reste Leu61, Thr64, und Gln65 in Helix2, Gln110 in Helix3 und Glu139 in Helix4 sind an der Ionentranslokation beteiligt (Murata *et al.*, 2005). Für die Ionentranslokation durch den Rotor wird ein anderes Konzept als das der Arbeitsgruppe um Dimroth vorgeschlagen. Ein sogenanntes „Zwei-Kanal-Modell“, das bereits früher für F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasen postuliert wurde (Junge *et al.*,

1997), rückt hier wieder in den Vordergrund. Die Untereinheit *a* bildet zwei Halbkanäle aus, wovon der eine Halbkanal mit dem Cytoplasma in Kontakt steht und der andere mit dem Periplasma. Ein  $\text{Na}^+$ -Ion aus dem Cytoplasma gelangt durch den einen Halbkanal zur  $\text{Na}^+$ -Bindestelle und wird komplexiert. Nach einer Umdrehung des Rotors wird das Arg573 (Kawano *et al.*, 2002) und damit der zweite Halbkanal erreicht. Dort wird das  $\text{Na}^+$ -Ion aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen, zwischen dem Arg573 der Untereinheit *a* und dem Glu139 des Proteolipids, in den zweiten Halbkanal, der mit dem Periplasma in Kontakt steht, freigesetzt (s. Abb. 47).



**Abb. 47 Modell der Ionentranslokation durch die V-ATPase von *E. hirae* (Murata *et al.*, 2005)**

Die Untereinheit *a* bildet einen Halbkanal aus durch den die  $\text{Na}^+$ -Ionen zur  $\text{Na}^+$ -Bindestelle im Zentrum des Rotors gelangen. Nach einer Umdrehung des Rotors wird das  $\text{Na}^+$ -Ion über einen zweiten Halbkanal in der Untereinheit *a* ins Periplasma transportiert. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen R573 und E139 ermöglichen die Freisetzung des  $\text{Na}^+$ -Ions.

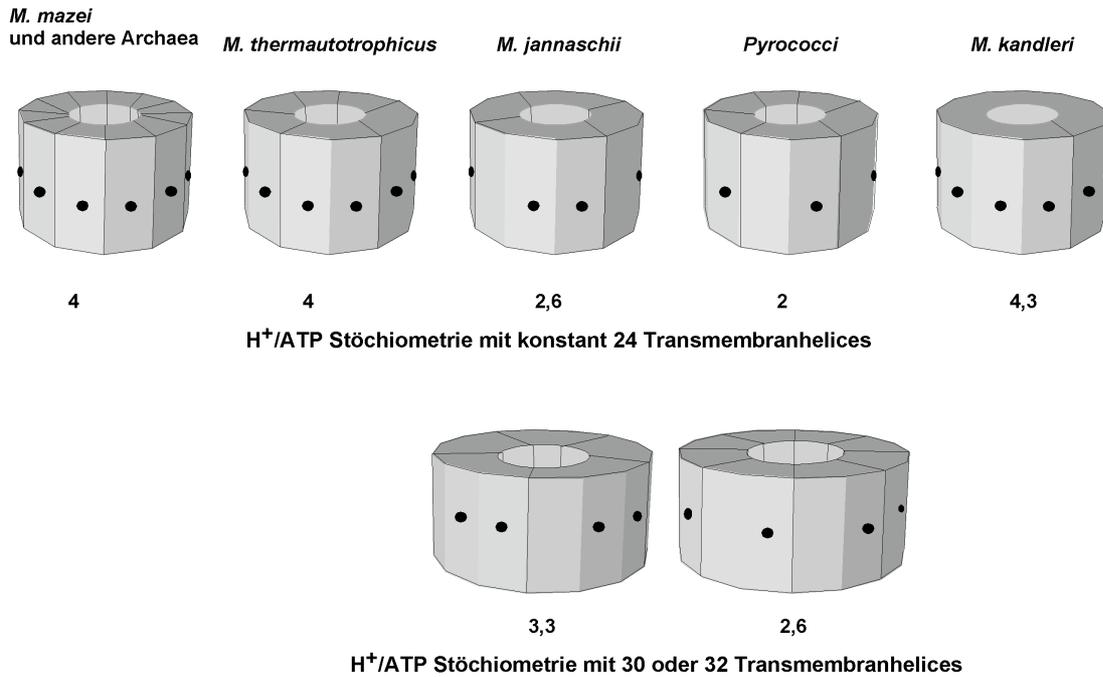
Es wird aufgrund der immer weiter fortschreitenden Aufklärung der Membrandomänen verschiedener ATPasen deutlich, dass die bisher angenommene Teilbarkeit der Transmembranhelices durch drei (entspricht den katalytischen Untereinheiten im Köpfchen) in kaum einer ATPase

zutreffend ist. Daraus ergeben sich weitreichende Konsequenzen für  $H^+$ /ATP-Stöchiometrie und somit auch für Fähigkeit, ATP zu synthetisieren.

Die Fähigkeit, ATP zu synthetisieren, ist von der Anzahl der Ionen, die pro synthetisiertem ATP transloziert werden, direkt abhängig. Gemäß der Gleichung  $\Delta G_p = -n \cdot F \cdot \Delta p$ , wird ein Phosphorylierungspotential ( $\Delta G_p$ ) von  $\sim 50$ - $70$  kJ/mol bei einem physiologischen elektrochemischen  $H^+$ -Potentials von  $-180$  mV ( $\Delta p$ ) durch  $n = 3$ - $4$  ( $H^+/Na^+$ )/ATP erreicht. Ist die Anzahl an Ionen geringer, kann kein ATP mehr synthetisiert werden. Die Proteolipidoligomere der F-Typ-ATPasen bestehen aus 10 bis 14 Monomeren mit 10 bis 14 Ionen-translozierenden Gruppen. Nimmt man drei ATP-synthetisierende/-hydrolysierende Zentren an, würde das zu einer  $Ion^+/ATP$ -Stöchiometrie von 3,3 bis 4,7 führen.

Geht man für die archäellen Rotoren weiter von einem Ring mit 24 Transmembranhelices aus, ergibt sich für die  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* eine Stöchiometrie von 2,6  $H^+/ATP$ , was gerade noch eine ATP-Synthese ermöglichen könnte (Abb. 48). Wäre die Anzahl der Monomere im Ring 5, würde sich die Stöchiometrie auf 3,3  $H^+/ATP$  erhöhen. Bei den A-Typ-ATPasen aus Pyrococcen, deren Fähigkeit zur Synthese von ATP erst kürzlich nachgewiesen wurde (**Sapra et al., 2003**), ergäbe sich bei 24 Transmembranhelices lediglich ein  $H^+/ATP$ -Verhältnis von 2. Um auf ein Verhältnis von mindesten 2,6 zu kommen, müssten mindestens 8 Untereinheiten den Ring ausbilden. Angesichts der neuen Struktur des *E. hirae*-Proteolipidrings scheint das durchaus möglich. Allerdings stellt sich die Frage, ob ein solcher Ring aus 30 beziehungsweise 32 Transmembranhelices stabil bleibt bei Temperaturen um die  $100^\circ C$ .

Eine andere Möglichkeit, den Transport von Ionen über die Membran durch die ATPase zu erhöhen, besteht in der Möglichkeit einen weiteren Kanal einzubauen, durch den die Protonen gepumpt werden (**Müller, 2004**).



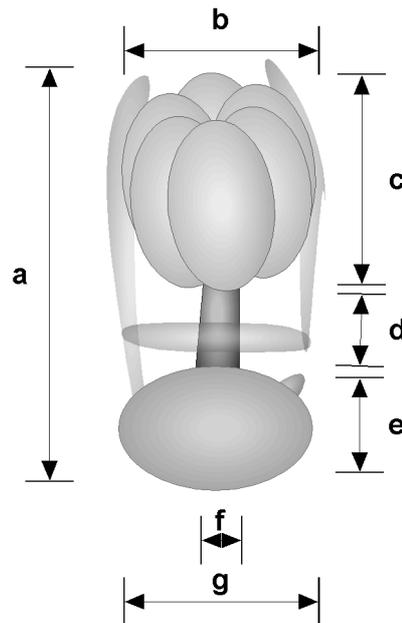
**Abb. 48 Modell verschiedener A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase-Rotoren**

Ausgehend von einer konstanten Anzahl von 24 Transmembranhelices ergeben sich die angegebenen H<sup>+</sup>/ATP-Stöchiometrien. Die Punkte kennzeichnen die konservierten ionentranslozierenden Gruppen in den Proteolipiden. Gezeigt sind auch mögliche Rotoren von *M. jannaschii*- und *Pyrococci* mit 5 bzw. 8 Monomeren, woraus sich eine Anzahl von 30 bzw. 32 Transmembranhelices ergeben würde. Dies würde eine ATP-Synthese erlauben.

## 4.6 Elektronenmikroskopische Struktur der ATPase-Familien

Die übergeordnete Architektur der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-, F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>- und V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>-ATPasen ist auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen (s. 4.9). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus *M. jannaschii* zeigen die Drei-Gliederung, die in allen ATPase-Familien zu finden ist. Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass sich die ATPase-Moleküle an ihren Membrandomänen alternierend aneinandertagern. Diese Aggregationen sind immer dann zu beobachten, wenn die Detergenskonzentration in den Proben verringert wird (Böttcher *et al.*, 1995; Boekema *et al.*, 1998). Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase aus Chloroplasten zeigen ebenfalls diese Aggregation der ATPase-Monomere (Boekema *et al.*, 1997). Die alternierende Anordnung entsteht durch

die sterische Behinderung der hydrophilen Domänen zueinander. Detergensmoleküle lagern sich an die Enden der Aggregate am hydrophoben Teil der ATPasen an (Böttcher und Gräber, 2000). In der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Gräber entstanden die ersten Einzelpartikelanalysen der intakten  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* mit einer Auflösung von 1,8 nm (Coskun *et al.*, 2004).



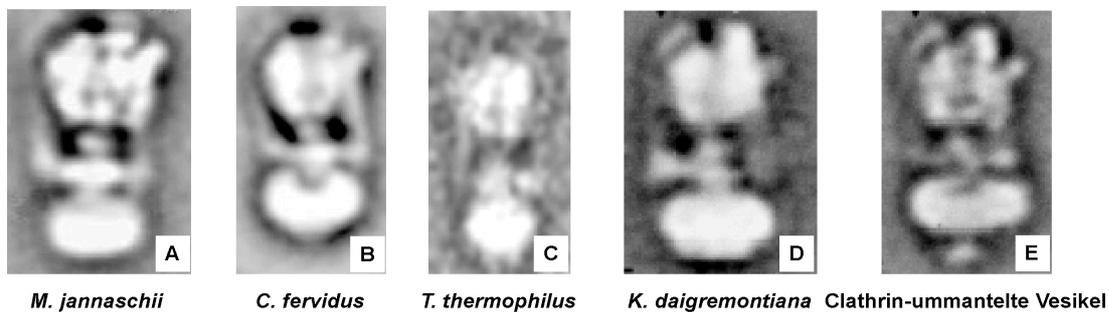
**Abb. 49 Schematische Darstellung der Abmessungen der  $A_1A_0$ -ATPase**

Der Gesamtkomplex hat eine Länge von 25,9 nm (a), wobei der  $A_1$ -Teil 9,4 nm breit (b) und 11,5 nm (c) lang ist. Der zentrale Stiel ist 8 nm lang (d) und 3,9 nm breit (f). Die Membrandomäne hat eine Länge von 6,4 nm (e) und misst in der Breite 10,6 nm (g).

Die ATPase wurde anhand der Summenbilder vermessen (Coskun *et al.*, 2004). Der Gesamtkomplex hat eine Länge von 25,9 nm, wobei der  $A_1$ -Teil 9,4 nm in der Breite und 11,5 nm in der Länge misst (Abb. 49 a, b, c). Der zentrale Stiel hat eine Länge von 8 nm und ist 3,9 nm breit (Abb. 49 d, f). Die Membrandomäne hat eine Länge von 6,4 nm und ist mit 10,6 nm etwas schmaler als der Kopfteil der ATPase (Abb. 49 e, g). Die  $A_1$ -Domäne ist eine kugelförmigen Masse, die sich deutlich vom zentralen Stiel absetzt. Vom zentralen Stiel lassen sich zwei periphere Stiele unterscheiden. Der zentrale Stiel ist direkt über der Membrandomäne von einer Kragen-ähnlichen Struktur (s. Abb. 50A) umgeben. Beide peripheren Stiele sind mit der  $A_1$ -

Domäne verbunden. Einer der peripheren Stiele ist vom Kragen nach unten hin verlängert und bildet so den Kontakt mit  $A_0$ .

Dass neben dem zentralen Stiel eine weitere Verbindung, ein peripherer Stiel, vorhanden ist, konnte bereits für die V-ATPasen aus *C. fervidus* (Boekema *et al.*, 1997; Ubbink-Kok *et al.*, 2000) und Clathrin-ummantelten Vesikeln (Wilkens *et al.*, 1999) sowie für die F-ATPase aus Rinderherzmitochondrien (Karrasch und Walker, 1999; Rubinstein *et al.*, 2003), *E. coli* (Wilkens und Capaldi, 1998) und Chloroplasten (Böttcher *et al.*, 1998) gezeigt werden. Die bisher bekannten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von ATPase-Gesamtkomplexen aus Clathrin-ummantelten Vesikeln (Wilkens *et al.*, 1999), Tonoplasten von *Kalanchoë daigremontiana* (Domgall *et al.*, 2002), Vakuolen von *Vigna radiata* (Li und Zhang, 2004), *C. fervidus* (Boekema *et al.*, 1997; Ubbink-Kok *et al.*, 2000), *T. thermophilus* (Bernal und Stock, 2004) und *M. jannaschii* zeigten die Existenz eines zweiten peripheren Stiels (Abb. 50). Welche Funktion könnte dieser zweite Stiel übernehmen?



**Abb. 50 Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener ATPasen**

**A:**  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii*; **B:** A-Typ-ATPase aus *C. fervidus* (Ubbink-Kok *et al.*, 2000); **C:**  $A_1A_0$ -ATPase aus *T. thermophilus* (Bernal und Stock, 2004); **D:**  $V_1V_0$ -ATPase aus *K. daigremontiana* (Domgall *et al.*, 2002); **E:**  $V_1V_0$ -ATPase aus Clathrin-ummantelten Vesikeln (Wilkens *et al.*, 1999).

In *C. fervidus* wurde die Untereinheitenstöchiometrie der Untereinheit *a* mit zwei bestimmt, was zu der Annahme führt dass zwei dieser Untereinheiten im Gesamtkomplex vorliegen (Ubbink-Kok *et al.*, 2000). Damit wäre eventuell ein zweiter Kanal für den Durchtritt von Protonen geschaffen, was die  $H^+$ /ATP-Stöchiometrie verdoppeln würde (Cross und Müller, 2004). Das wäre für z. B. für Pyrococcen, die ein vakuoläres Proteolipid besitzen, von

entscheidender Bedeutung für die Fähigkeit, ATP zu synthetisieren. Solange die Anzahl der Proteolipidmonomere in den verschiedenen Rotoren jedoch nicht bekannt ist, ist diese Annahme rein spekulativ. Die nächste Frage, die sich stellt ist, welche Untereinheiten sind am Aufbau der peripheren Stiele beteiligt.

Die einfachste Untereinheitenzusammensetzung der bakteriellen F-ATPasen ist  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c$ . Der periphere Stiel wird von den Untereinheiten  $b_2\delta$  gebildet (Foster und Fillingame, 1982; Böttcher und Grüber, 2000; Stock *et al.*, 2000). Eukaryontische F-Typ-ATPasen sind weit komplexer aufgebaut. Die ATPase aus Rinderherzmitochondrien besteht aus den 16 Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon b_2c_9-14d:e:f:g:A_6:L:F_6:I:OSCP$  (Müller und Grüber, 2003). Die Untereinheit  $\delta$  der mitochondrialen ATPasen entspricht dem  $\epsilon$  der bakteriellen ATPasen. Die bakterielle Untereinheit  $\delta$  dagegen weist Ähnlichkeiten zum OSCP („oligomycin sensitivity conferral protein“) der Mitochondrien auf. Der Stator der mitochondrialen F-ATPasen ist wahrscheinlich aus den Untereinheiten  $b$ ,  $d$  und OSCP aufgebaut, die Stöchiometrie ist umstritten (Devenish *et al.*, 2000). In Tab. 11 sind die Untereinheiten der bakteriellen ATPase und der aus Rinderherzmitochondrien zusammengefasst.

Die  $V_1V_O$ -ATPase ist aus den 13 Untereinheiten  $A_3B_3CDEFG_xH_xadcc'c'$  aufgebaut (Müller und Grüber, 2003). Die Untereinheiten C-H und der hydrophile Teil der Untereinheit  $a$  sind an der Ausbildung der Stielregion beteiligt. Kontrovers diskutiert wird, welche der Untereinheiten an der Ausbildung des zentralen Stiels beteiligt ist. Ein Polypeptid, das in Analogie zu  $\epsilon$  den zentralen Stiel bildet, ist die Untereinheit F (Tomashek *et al.*, 1997). Für die Untereinheit D als zentralen Stiel sprechen verschiedene Quervernetzungsstudien (Xu *et al.*, 1999; Xu und Forgac, 2000; Arata *et al.*, 2002). In der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Grüber wurde jedoch gezeigt, dass die Untereinheit E proteolytisch nicht angegriffen wird, im Gegensatz zur Untereinheit D, die wohl exponierter im Komplex vorliegt (Grüber *et al.*, 2000; Grüber *et al.*, 2001; Schäfer *et al.*, 2001). Quervernetzungsexperimente weisen jedoch darauf hin, dass die Untereinheiten E und G an der Ausbildung des einen peripheren Stiels beteiligt sind (Arata *et al.*, 2002). Der zweite periphere Stiel könnte von der hydrophilen Domäne der Untereinheit  $a$  zusammen mit der Untereinheit H ausgebildet werden (Landolt-Marticorena *et al.*, 2000). Eine

Schwierigkeit im Vergleich der Strukturen und der Zuordnung der Untereinheiten liegt wohl darin begründet, dass manche Strukturen an isolierten  $V_1$ -Komplexen vorgenommen wurden, andere wiederum an den Gesamtkomplexen.

Die erst vor kurzem bekannt gewordenen Dreidimensionale Struktur (Bernal und Stock, 2004), der A/V-ATPase von *T. thermophilus* (Yokoyama *et al.*, 1990; Yokoyama *et al.*, 1994; Yokoyama *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2004), weist sehr große Ähnlichkeit mit der Struktur der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* auf. Durch Abscherversuche wurde das Enzym in verschiedene Subkomplexe zerlegt, die erste gute Hinweise auf die Lokalisation der einzelnen Untereinheiten im Gesamtkomplex gaben (Yokoyama *et al.*, 2003). Anhand dieser Versuche und der bisher bekannten Studien anderer ATPase-Familien ergibt sich folgendes Bild für die A/V-ATPase aus *T. thermophilus*. Die Gesamtlänge des Komplexes entspricht mit 25 nm der Gesamtgröße des  $A_1A_0$ -Partikels von *M. jannaschii*. Der Kopfteil und die Membrandomäne sind mit einer Länge von 11,5 nm und 10 nm etwas länger als  $A_1$  und  $A_0$  von *M. jannaschii*. Wie in der archäellen ATPase aus *M. jannaschii* sind zwei periphere Stiele sichtbar, wovon nur einer über die gesamte Länge zwischen Kopf- und Membranteil reicht.

Der zentrale Stiel der *T. thermophilus*-ATPase wird von den Untereinheiten D und F gebildet, was aufgrund der Rotation der D und F-Untereinheit relativ zu dem  $(AB)_3$ -Hexamer gezeigt wurde (Imamura *et al.*, 2003). Quervernetzungsstudien an der  $A_1$ -ATPase aus *M. mazei* konnten ebenfalls zeigen, dass die Untereinheit F in unmittelbarer Nähe zu B und D liegt (Lemker *et al.*, 2003). Die Membrandomäne besteht aus den Untereinheiten a und L (Proteolipid) (Bernal und Stock, 2004).

Die Untereinheit C bildet zusammen mit dem Proteolipidring der *T. thermophilus* ATPase einen Subkomplex (Yokoyama *et al.*, 2003), zusammen mit den elektronenmikroskopischen Studien von Chaban *et al.* (Chaban *et al.*, 2002) an *C. fervidus* wird die Untereinheit C als eine Art Verbindungsstück zwischen  $(A/V)_1$  und  $(A/V)_0$  angesehen.

Unklarheit herrscht weiterhin über die Topologie der Untereinheiten E und G. Es könnte ein *T. thermophilus*-Subkomplex mit den Untereinheiten G,

E und I isoliert werden, wobei diese Untereinheiten scheinbar zusammen in einem Stiel vorkommen (Yokoyama *et al.*, 2003). Quervernetzungsstudien an vakuolären ATPasen haben gezeigt, dass E sowohl mit den N-Termini als auch mit den C-Termini der Untereinheit B und dem hydrophilen Teil von *a* reagiert (Arata *et al.*, 2002). G konnte ebenfalls mit dem AB<sub>3</sub>-Hexamer quervernetzt werden, was auf die periphere Lage hindeutet (Xu *et al.*, 1999). Zudem liegen die Untereinheiten E und G in der vakuolären ATPase der Hefen in unmittelbarer Nachbarschaft (Arata *et al.*, 2002). Überträgt man diese Ergebnisse auf die ATPase von *M. jannaschii*, würden die Untereinheiten *a*, E und H einen peripheren Stiel ausbilden, womit sich die Frage stellt, welche Untereinheiten sind dann an der Ausbildung des zweiten Stiels beteiligt. Nach diesem Bild müssten weitere Kopien hydrophiler Untereinheiten vorliegen, die diesen Stiel ausbilden und zusätzlich die Masse des über der Membrandomäne liegenden Kragens füllen. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass die Untereinheit *a* den einen, die Untereinheiten E und H den anderen Stiel ausbilden. Weitere Kopien der Untereinheiten *a*, E und H sind aber nicht auszuschließen. In Tab. 11 ist die Untereinheitenzusammensetzung verschiedener ATPasen aufgeführt, die Untereinheiten, die in einer Zeile stehen, sind als homolog zu betrachten. Nach wie vor herrscht noch Unklarheit über die Stöchiometrie der ATPase-Untereinheiten. Die Abscherversuche und Trypsinverdauung, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten keine Aufschlüsse über die Lokalisation der Untereinheiten im Gesamtkomplex der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase geben. Subkomplexe wären ein hilfreiches Mittel, um die Struktur weiter aufzuklären, da die Bilder von Subpartikeln über die Zwei-Dimensionale Struktur des Gesamtkomplexes gelegt werden könnten und somit die Lokalisation einzelner Untereinheiten genau zu bestimmen wäre.

**Tab.11 Vergleich der Untereinheitszusammensetzung verschiedener Klassen von ATPasen**

<b>A<sub>1</sub>A<sub>0</sub></b>		<b>V<sub>1</sub>V<sub>0</sub></b>		<b>F<sub>1</sub>F<sub>0</sub></b>	
<i>M. jannaschii</i>	<i>T. thermophilus</i>	<i>M. sexta</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	Mitochondrien
A	A	A	A (Vma1p)	β	β
B	B	B	B (Vma2p)	α	α
C	C	C	d (Vma6p)		
		D			
D	D	E	D (Vma8p)	γ	γ
E	E		E (Vma4p)	δ	OSCP
F	F	F	F (Vma7p)	ε	δ
			H (Vma13p)		
			C (Vma5p)		
H	G		G (Vma10p)		
a	I	a	a (VpH1p/Stv1p)	a + b?	UE6 + b?
c	L	c	c (Vma3p)	c	UE9
			c' (Vma11p)		
			c'' (Vma16p)		
		d			
		e			
					d
					e
					f
					g
					F <sub>6</sub>
					IF <sub>1</sub>

#### 4.7 Biochemische Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus *M. jannaschii*

Die biochemische Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase ergab, dass Hydrogensulfit oder Sulfit für eine optimale Enzymaktivität notwendig sind. Das zunächst dem Testpuffer zugesetzte Natriumhydrogensulfit konnte durch Kaliumsulfit ersetzt werden, weshalb angenommen werden kann, dass nicht nur Hydrogensulfit sondern auch Sulfit das Enzym stimuliert. Die stimulierende Wirkung der Sulfitionen wurde bereits für andere A-Typ-ATPasen beschrieben, allerdings konnte eine Stimulierung durch Ethanol, wie sie ebenfalls beschrieben wurde, nicht nachgewiesen werden (Inatomi, 1986; Lübben *et al.*, 1987; Scheel und Schäfer, 1990; Yokoyama *et al.*, 1990; Inatomi *et al.*, 1993; Chen und Konisky, 1993; Inatomi, 1996; Wilms *et al.*, 1996). Auch mitochondriale und bakterielle ATPasen werden durch Hydrogensulfit stimuliert, allerdings ist die Wirkung dieser Substanz nicht verstanden (Ebel

und Lardy, 1975; Adolfsen und Moudrianakis, 1978). Im Gegensatz dazu wurde die  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. thermotrophicus* durch Sulfit nicht beeinflusst (Roth und Bachofen, 1994).

Die Versuche, das Sulfit durch andere Substanzen wie Methanol, Acetat oder Maleinsäure zu ersetzen, ergaben, dass das Enzym zwar ATP-Hydrolyse-Aktivität zeigt, diese jedoch deutlich verringert ist.

Die funktionelle Kopplung der ATPase konnte durch Inhibitorstudien mit DCCD gezeigt werden. DCCD ist ein effektiver Inhibitor aller ATPasen, der kovalent an die aktiven Carboxylate des Proteolipids bindet und somit die Protonentranslokation und ATP-Hydrolyse/Synthese blockiert (Sebald und Hoppe, 1981). Die ATPase-Aktivität der gereinigten  $A_1A_0$ -ATPase wurde bei einer DCCD-Konzentration von etwa 450  $\mu$ M zu 50% gehemmt. Dieser Befund lässt die Annahme zu, dass die meisten der gereinigten ATPase-Moleküle funktionelle gekoppelt vorlagen.

Eine optimale ATPase-Aktivität wurde bei pH 6 erreicht, höhere Protonenkonzentrationen führten zu einem starken Abfall der Aktivität, während eine Erhöhung des pH-Wertes die Aktivität des Enzyms nicht so stark beeinflusste. Das Enzym hatte bei Temperaturen von 60 und 70°C lediglich noch 20% Hydrolyseaktivität, bezogen auf die optimale Aktivität bei 80°C. Bei höheren Temperaturen verringerte sich die ATPase-Aktivität lediglich um 20%. Die höchsten Hydrolyseaktivitäten konnten im Mittel bei Temperaturen zwischen 80 und 100°C bestimmt werden. Die Inkubation bei Temperaturen von über 80°C führte teilweise zu Aktivitätssteigerungen, oder auch sehr geringen Aktivitäten. Vorinkubationstemperaturen von 25°C bis 80°C hatten keinen Effekt auf die Hydrolyseaktivität der ATPase. Neben ATP hydrolysierte das Enzym auch GTP (86% Aktivität) und UTP (54% Aktivität), nur CTP scheint kein gutes Substrat für die ATPase zu sein, das hier lediglich noch 9% der Hydrolyse-Aktivität gemessen werden konnten. Die hohe GTP-Hydrolyseaktivität wurde bereits für die ATPase aus *M. voltae* gezeigt (Chen und Konisky, 1993). Manganchlorid wurde gegenüber Magnesiumchlorid bevorzugt, was schon bei anderen A-Typ-ATPasen (Inatomi, 1986; Inatomi et al., 1993; Steinert et al., 1997) und der A/V-Typ ATPase aus *T. thermophilus* (Yokoyama et al., 1990) beobachtet wurde. Andere

zweiwertige Kationen wie Kalzium, Kupfer, Eisen und Nickel konnten Magnesium nicht ersetzen.

Der  $K_M$ -Wert für Mg-ATP betrug  $1,2 \pm 0,2$  mM. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem  $K_M$ -Wert für Mg-ATP verschiedener A-Typ-ATPasen aus *S. acidocaldarius* (0,2 mM), *M. barkeri* (0,31 mM), *H. volcanii* (1,0 mM) und *M. thermophila* (1,2 mM) und der heterolog produzierten  $A_1$ -ATPase aus *M. mazei* (Lemker et al., 2001). Der  $K_M$ -Wert von 1,1 mM der *T. thermophilus* A/V-ATPase liegt ebenfalls in demselben Bereich wie der  $K_M$ -Wert der *M. jannaschii*-ATPase (Yokoyama et al., 1990).

#### 4.8 Verbreitung der ATP-Synthasen/ATPasen

Es wird immer deutlicher, dass die verschiedenen Klassen von ATPasen nicht auf bestimmte Domänen des Lebens beschränkt sind.

Die erste Entdeckung einer  $V_1V_O$ -ATPase in *E. hirae* zeigte, dass eine strikte Einteilung der ATPasen nicht mehr möglich ist (Heefner und Harold, 1982; Kakinuma et al., 1993; Kakinuma und Igarashi, 1994). Dieses als V-Typ-ATPase bezeichnete Enzym scheint jedoch eher zu den A-Typ-ATPase zu zählen, wie phylogenetische Untersuchungen anhand der A-Untereinheit zeigten (Hilario und Gogarten, 1998). *E. hirae* ist ein strikt fermentatives, anaerobes Bakterium und kann ATP nur durch eine Substratkettenphosphorylierung bilden. Die V/A-Typ-ATPase wird dabei nicht konsitutiv gebildet, sondern nur unter alkalischen Bedingungen (Kakinuma, 1987; Kakinuma und Igarashi, 1990). Die  $Na^+$ -abhängige ATPase ist unter diesen Protonen-limitierten Bedingungen für die Energetisierung der Membran verantwortlich. Aufgrund des Aufbaus des Proteolipidrings von *E. hirae*, aus 10 Monomeren ergibt sich eine  $Na^+$ /ATP-Stöchiometrie von 3,3 was theoretisch für die Synthese eines ATP-Moleküls ausreicht. Möglicherweise dient die V/A-Typ-ATPase aus *E. hirae* nicht nur als  $Na^+$ -Pumpe, sondern kann auch zur Synthes von ATP genutzt werden.

Weitere als V-Typ-ATPasen bezeichnete Enzyme wurden in *Caloramator* (früher *Clostridium*) *fervidus* und in verschiedenen Vertretern der Gattung *Thermus* gefunden. Die ATPase aus *T. thermophilus* HB8 gruppierte in phylogenetischen Untersuchungen ebenfalls mit den A-Typ-

ATPasen (Hilario und Gogarten, 1998). Ebenso kann dieses Enzym ATP synthetisieren (Yokoyama *et al.*, 1998), wozu die V-Typ-ATPasen unter physiologischen Bedingungen nicht fähig sind, wodurch ein archäeller Ursprung deutlich wird. Die  $V_1V_0$ -ATPase aus *C. fervidus*, einem anaeroben, thermophilen Bakterium ist  $\text{Na}^+$ -abhängig (Höner zu Bentrup *et al.*, 1997). Der  $\text{Na}^+$ -Gradient, der durch die ATPase aufgebaut wird, ist zur Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden nötig, die *C. fervidus* als Substrat verwendet (Ubbink-Kok *et al.*, 2000). Die Klassifizierung der ATPase als V-Typ ATPase erfolgte aufgrund von Hemmstoffanalysen, immunologischer Analysen und der N-terminalen Sequenzierung einzelner Untereinheiten (Höner zu Bentrup *et al.*, 1997). Weitere als V-Typ-ATPasen klassifizierte Enzyme wurden aus *T. thermophilus* HB27, *T. aquaticus* YT-1 und *Meiothermus* (früher *Thermus*) *chliarophilus* ALT-8 isoliert (Yokoyama *et al.*, 1994; Radax *et al.*, 1998).

Es wurden einige Arbeiten veröffentlicht, in denen Anhaltspunkte für die Verbreitung von F-Typ-ATPasen im Reich der Archaea beschrieben wurden. Hemmstoffanalysen an Membranvesikeln von *Halorubrum saccharovorum* (Schobert, 1991; Hochstein, 1992) führten zu der Annahme, dass eine  $F_1F_0$ -ATPase die Synthese von ATP betreibt. Die Genomsequenz zeigt jedoch nur die A-Typ-ATPase (Ng *et al.*, 2000), woraus geschlossen werden muss, dass die Hemmstoffdaten anders interpretiert werden müssen.

Auch in Methanogenen wie *Methanosarcina barkeri* MS und *Methanosarcina mazei* Gö1 wurde vermutet, dass  $F_1F_0$ -ATPasen an der ATP-Synthese beteiligt sind. Im Laufe der Methanogenese aus  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  wird sowohl ein Protonengradient als auch ein Natriumgradient aufgebaut (Müller *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1990; Müller und Gottschalk, 1993). Durch die Zugabe von Ionophoren zu invertierten Membranvesikeln von *M. mazei* Gö1 konnte gezeigt werden, dass die Synthese von ATP an beide Gradienten gekoppelt ist. Da die Synthesereaktion sowohl von  $F_1F_0$ -spezifischen als auch von  $A_1A_0$ -spezifischen Inhibitoren hemmbar war, wurde angenommen, dass zwei ATPase-Typen in diesem Organismus vorkommen, eine  $\text{Na}^+$ -abhängige  $F_1F_0$ -ATPase und eine  $\text{H}^+$ -abhängige  $A_1A_0$ -ATPase (Becher und Müller, 1994).

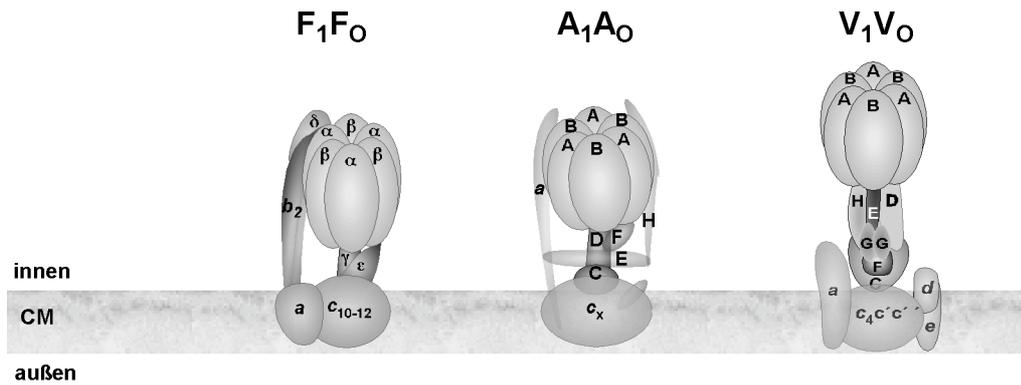
Auch in *M. thermotrophicus* (Smigan *et al.*, 1988; Smigan *et al.*, 1994) und *Methanococcus voltae* (Crider *et al.*, 1985) wurden  $\text{Na}^+$ -translozierende

ATPasen vermutet. In *M. thermautotrophicus* sollte die Produktion des jeweiligen ATPase-Typs vom pH-Wert des Mediums abhängig sein (Smigan et al., 1994; Smigan et al., 1995).

Bisher konnte aber weder eine  $F_1F_0$ -ATPase aus einem methanogenen Archaeon gereingt werden, noch konnten in den bekannten Genomsequenzen von *M. mazei* Gö1 (Deppenmeier, 2002) und *M. thermautotrophicus* (Smith et al., 1997) Gene gefunden werden, die für eine F-Typ-ATPase kodieren.

In den Genomen andere Archaea wie *M. jannaschii*, *Methanopyrus kandleri* AV19, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus abyssi* GE5, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Pyrobaculum aerophilum*, *Aeropyrum pernix*, *Halobacterium* Spezies NRC-1 und *Sulfolobus solfataricus* P2 konnten neben den archäellen ATPasen keine anderen ATPase-Synthasen detektiert werden (Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997; Kawarabayasi et al., 1998; Kawarabayasi et al., 1999; Ng et al., 2000; Robb et al., 2001; She et al., 2001; Fitz-Gibbon et al., 2002; Slesarev et al., 2002; Cohen et al., 2003).

Der Arbeitsgruppe um Yoshida gelang es, ein Operon aus *Methanosarcina barkeri* MS zu klonieren, das für eine  $F_1F_0$ -ATPase kodieren könnte (Sumi et al., 1992; Sumi et al., 1997). Es konnten aber weder Expression noch  $F_1F_0$ -ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (Lemker, 1997), was die Vermutung zulässt, dass es sich hier um ein kryptisches Operon handelt. Im Genom von *Methanosarcina acetivorans* liegen neben den Genen für eine  $A_1A_0$ -ATPase auch Gene für ein F-Typ-ATPase vor (Galagan et al., 2002), deren Expression ebenfalls noch nicht nachgewiesen werden konnte.



<b>Funktion:</b>	ATP-Synthese ATP-Hydrolyse	ATP-Synthese ATP-Hydrolyse	ATP-Hydrolyse
<b>Hemmstoffe:</b>	DCCD, Azid, Tributylzinn, Venturicidin, NBD-Cl	DCCD, DES, Nitrat, Bafilomycin A <sub>1</sub>	DCCD, NBD-Cl, Nitrat, NEM Bafilomycin A <sub>1</sub>
<b>Verbreitung:</b>	Bakterien Chloroplasten Mitochondrien (Archäen)	Archäen (Bakterien)	Eukaryoten (Bakterien)

**Abb. 51** Verbreitung der ATP-Synthasen/ATPasen

## 4.9 Evolution der ATPasen

Den Aufbau aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne, die über mindestens 2 Stiele miteinander verbunden sind, ist den A-, V- und F-ATPase gemein. Man kann daher davon ausgehen, dass alle ATPasen einen gemeinsamen Ursprung haben (Nelson und Taiz, 1989; Gogarten und Taiz, 1992). Die Untereinheiten A und B beziehungsweise  $\alpha$  und  $\beta$  sind durch eine Genduplikation entstanden. Nach einer Reihe von Deletions- und Insertionsereignissen verloren die B- beziehungsweise  $\alpha$ -Untereinheit ihre katalytische Aktivität. Die katalytische Untereinheit der A/V-ATPasen wurde vergrößert, während sich die katalytische Untereinheit der F-Typ-ATPasen verkleinerte, die Folge war die Abtrennung der A- und V-Typ-ATPasen von den F-Typ-ATPasen (Cross und Taiz, 1990; Nelson, 1992; Müller und Grüber, 2003).

Die Annahme, dass die Trennung der A- und V-Typ-ATPasen mit der Duplikation und nachfolgenden Fusion eines 8 kDa Proteolipids einherging (**Nelson, 1992**), kann aufgrund verschiedener Tatsachen angezweifelt werden.

Die ersten Zweifel an der Hypothese, dass ein 16 kDa-Proteolipid lediglich in den V-ATPasen vorkommt, war die Entdeckung einer extremen Diversität der archäellen Proteolipide. Im ATPase-Operon von *A. fulgidus* sind zwei Gene enthalten, die für ein 8 kDa-Proteolipid kodieren, was wohl eine Zwischenstufe in der Evolution darstellt (**Klenk et al., 1997**).

Im Gegensatz zu den vakuolären Proteolipiden sind die ionentranslozierenden Aminosäuren der archäellen Proteolipide nicht nur in einer Transmembranhelix konserviert. *M. thermotrophicus* hat ein 16 kDa Proteolipid, das sowohl in Helix 2 als auch in Helix 4 einen Glutamatrest aufweist (**Ruppert et al., 2001**). Das *M. jannaschii*- und *M. maripaludis*-Proteolipid mit sechs Transmembranhelices hat das Glutamat in den Helices 4 und 6 konserviert (**Ruppert et al., 1999**). Im verdreizehnfachen Proteolipid von *M. kandleri* ist das Glutamat in allen 13 Haarnadeln vorhanden (**Lolkema und Boekema, 2003; Müller, 2004**).

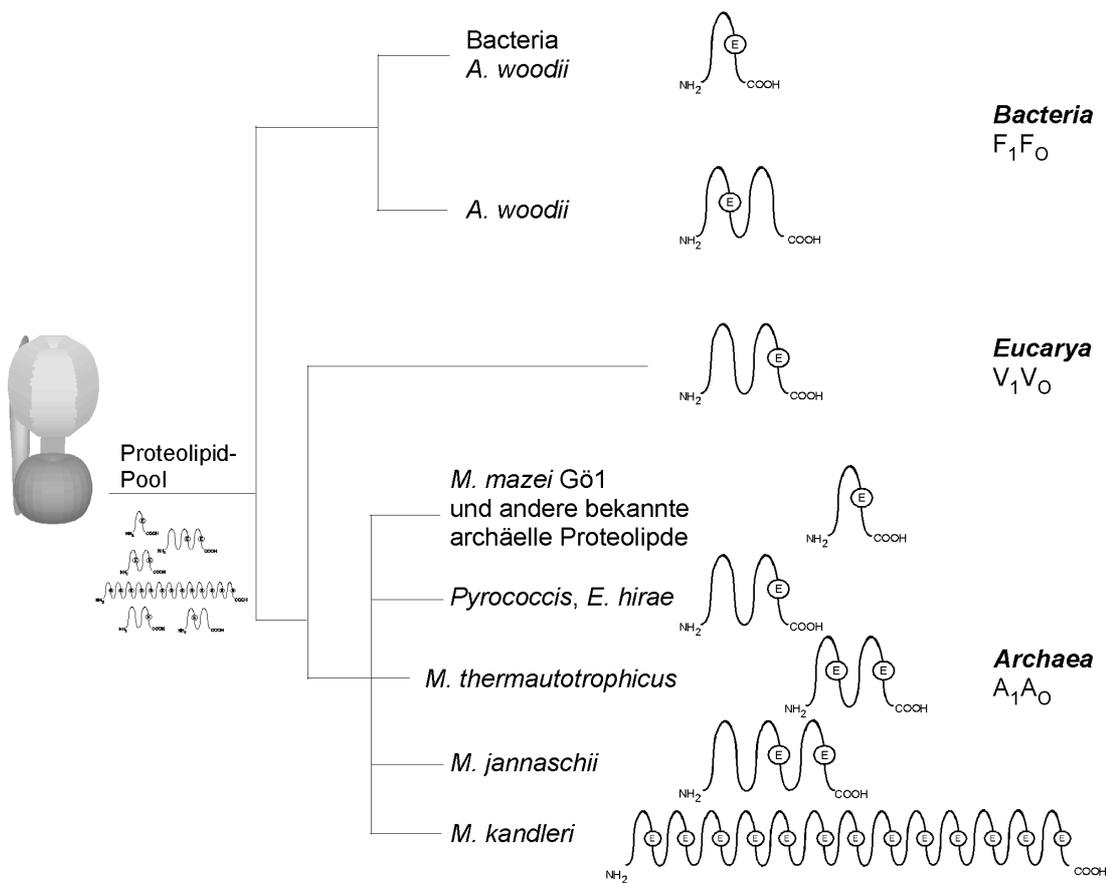
Eine Ausnahme stellen die Proteolipide der Pyrococcen dar. Sequenzanalysen zeigten, dass die Gene für die großen Untereinheiten der ATPase zum archäellen Typ gehören (**Senejani et al., 2001**). Damit sind die Pyrococcen die bisher einzig bekannten Archaea, die ein typisch eukaryontisches Proteolipid besitzen.

Bisher wurde angenommen, dass die Pyrococcen strikt fermentativ sind (**Adams, 1994**). Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Adams zeigen jedoch, dass beim Wachstum auf Zuckern eine einfache Atmungskette vorhanden ist, die mit der Generation eines Protonenpotentials verbunden ist (**Sapra et al., 2003**). Dieses Potential wird wiederum von der  $A_1A_0$ -ATPase zur Energiekonservierung benutzt. Damit fällt nun auch die Hypothese, dass ATPasen mit einem 16 kDa-Proteolipid lediglich zur ATP-Hydrolyse fähig sind.

Auch in der bakteriellen F-Typ-ATPase aus *A. woodii* wurde ein Proteolipid von 16 kDa gefunden. Im ATPase-Operon gibt es zwei Gene für 8-kDa-Proteolipide, die in ihrer Sequenz identisch sind, und ein Gen für ein 16-kDa-Proteolipid (**Müller et al., 2001**). Das aktive Carboxylat ist auch hier nur

in der zweiten Helix konserviert. Damit ist auch in einer  $F_1F_0$ -ATPase ein V-Typ-Proteolipid aufgetaucht, womit wieder deutlich wird, dass 16-kDa-Proteolipide nicht auf V-Typ-ATPasen beschränkt sind.

Alle heute bekannten Formen der Proteolipide wurden schon in den Archäen angelegt. Die  $A_1A_0$ -ATPasen bilden damit ein Reservoir an Möglichkeiten, aus denen die F- und V-Typ ATPasen gespeist wurden (Abb. 52).



**Abb. 52** Diversität der Proteolipide

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

- I. Die  $A_1A_0$ -ATPase wurde aus Membranen von *M. jannaschii* unter Erhalt der Struktur isoliert. Das Enzym wurde durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE und eine Gelfiltration zur Homogenität gereinigt.
- II. Alle 9 aus der Operon-Struktur vorhergesagten Untereinheiten konnten mittels Western-Blot-Analyse oder einer N-terminalen Sequenzierung identifiziert werden.
- III. Die funktionelle Kopplung der  $A_1$ - und  $A_0$ -Domäne wurde durch Studien mit dem Inhibitor DCCD nachgewiesen.
- IV. Das gereinigte Enzym hatte eine Masse von 670 kDa. Die ATP-Hydrolyseaktivität war bei einer Temperatur von 80°C und einem pH-Wert von 6 optimal. Der  $K_M$ -Wert für MgATP wurde zu  $1,2 \pm 0,2$  mM bestimmt.
- V. Bei den Versuchen zur Entwicklung eines  $Na^+$ -freien Testpuffers trat die strikte Abhängigkeit des Enzyms von Hydrogensulfit oder Sulfit als Problem zu Tage.
- VI. Aus Membranen von *M. jannaschii* wurden durch Chloroform/Methanol Lipide extrahiert, aus denen dann Liposomen hergestellt wurden. Die  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* wurde in diese Liposomen erfolgreich rekonstituiert, eine ATP-Synthese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.
- VII. Die elektronenmikroskopischen Analysen zeigten einen für ATPasen charakteristischen Aufbau, aus einer hydrophilen Domäne, die durch mindestens zwei Stiele mit der Membrandomäne verbunden ist.
- VIII. Anhand der Bildrekonstruktion von 17.238 Einzelpartikeln konnten zwei Klassen von ATPase-Molekülen unterschieden werden, die

entweder über einen oder zwei periphere Stiele verfügten. Aus verschiedenen Einzelprojektionen wurden Summenbilder generiert, anhand dieser 2D-Rekonstruktion wurde die ATPase vermessen. Der Kopfteil, die Membrandomäne und der zentrale Stiel haben eine Größe von 11,5 x 9,4 nm, 10,6 x 6,4 nm und 8 x 3,9 nm (Länge x Breite). Die Gesamtlänge des Enzyms betrug 25,9 nm. Der zentrale Stiel der ATPase ist über der Membran von einer Kragen-ähnlichen Struktur umgeben, die wiederum mit den peripheren Stielen in Kontakt steht. Scheinbar steht nur einer der peripheren Stiele in direktem Kontakt mit der  $A_0$ -Domäne. Die Überlagerung der 3D-Rekonstruktion eines  $A_1$ -Subkomplexes aus *M. mazei* mit der 2D-Rekonstruktion der  $A_1A_0$ -ATPase aus *M. jannaschii* zeigen deutlich, dass die peripheren Stiele mit dem oberen Ende der  $A_1$ -Domäne in Kontakt stehen.

Durch diese Analysen konnte erstmals die Struktur einer  $A_1A_0$ -ATPase mit einer Auflösung von 1,8 nm dargestellt werden.

- IX. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass das Proteolipid-Gen von *M. kandleri* verdreizehnfacht ist. Das Gen wurde mittels PCR vervielfacht und in einen TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert. Versuche das Gen in einen Expressionsvektor umzuklonieren, waren noch nicht erfolgreich.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. und Walker, J.E.** 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. und Kinoshita, K., Jr.** 2000. Stepping rotation of F<sub>1</sub>-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7243-7247.
- Adams, M.W.** 1994. Biochemical diversity among sulfur-dependent, hyperthermophilic microorganisms. *FEMS. Microbiol. Rev.* **15**: 261-277.
- Adolfson, R. und Moudrianakis, E.N.** 1978. Kinetic mechanisms of ionic activation and inhibition of the adenosine triphosphatase of the 13 S coupling factor of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **253**: 4380-4388.
- Aggeler, R., Ogilvie, I. und Capaldi, R.A.** 1997. Rotation of a  $\gamma$ - $\epsilon$  subunit domain in the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase complex - The  $\gamma$ - $\epsilon$  subunits are essentially randomly distributed relative to the  $\alpha_3\beta_3\delta$  domain in the intact complex. *J. Biol. Chem.* **272**: 19621-19624.
- Al-Mahrouq, H.A., Carper, S.W. und Lancaster, J.R., Jr.** 1986. Discrimination between transmembrane ion gradient-driven and electron transfer-driven ATP synthesis in the methanogenic bacteria. *FEBS Lett.* **207**: 262-265.
- Angevine, C.M. und Fillingame, R.H.** 2003. Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **278**: 6066-6074.
- Arai, H., Terres, G., Pink, S. und Forgac, M.** 1988. Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* **263**: 8796-8802.
- Arata, Y., Baleja, J.D. und Forgac, M.** 2002. Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B. *Biochemistry* **41**: 11301-11307.
- Armbrüster, A., Bailer, S.M., Koch, M.H., Godovac-Zimmermann, J. und Grüber, G.** 2003. Dimer formation of subunit G of the yeast V-ATPase. *FEBS Lett.* **546**: 395-400.
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., Dawson, S.C., Hershberger, K.L. und Pace, N.R.** 1996. Phylogenetic perspective on microbial life in hydrothermal ecosystems, past and present. In: *Evolution of Hydrothermal Eco* (Bock, G.R. und Goode, J.A., Ed.). S 24-39. John

Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England PO19 1UD.

- Bauerle, C., Ho, M.N., Lindorfer, M.A. und Stevens, T.H.** 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase membrane sector. *J. Biol. Chem.* **268**: 12749-12757.
- Becher, B. und Müller, V.** 1994.  $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$  drives the synthesis of ATP via an  $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ -translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Bacteriol.* **176**: 2543-2550.
- Becher, B., Müller, V. und Gottschalk, G.** 1992. The methyl-tetrahydromethanopterin - coenzymeM methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is a primary sodium pump. *FEMS. Microbiol. Lett.* **91**: 239-244.
- Beifuss, U., Tietze, M., Bäumer, S. und Deppenmeier, U.** 2000. Methanophenazine: structure, total synthesis and function of a new cofactor from methanogenic archaea. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 2470-2473.
- Bernal, R.A. und Stock, D.** 2004. Three-dimensional structure of the intact *Thermus thermophilus* H<sup>+</sup>-ATPase/synthase by electron microscopy. *Structure* **12**: 1789-1798.
- Birkenhäger, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F. und Altendorf, K.** 1995. The F<sub>0</sub>-complex of the *Escherichia coli* ATP synthase - Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy. *Eur. J. Biochem.* **230**: 58-67.
- Bligh, E.G. und Dyer, W.J.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Boekema, E.J., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J.S., Brisson, A. und Konings, W.N.** 1997. Visualization of a peripheral stalk in V-type ATPase: Evidence for the stator structure essential for rotational catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 14291-14293.
- Boekema, E.J., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J.S., Brisson, A. und Konings, W.N.** 1998. Structure of V-type ATPase from *Clostridium fervidus* by electron microscopy. *Photosyn. Research* **57**: 267-273.
- Böttcher, B. und Gräber, P.** 2000. The structure of the H<sup>+</sup>-ATP synthase from chloroplasts and its subcomplexes as revealed by electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**: 404-416.

- Böttcher, B., Gräber, P., Boekema, E.J. und Lucken, U.** 1995. Electron cryomicroscopy of two-dimensional crystals of the H<sup>+</sup>-ATPase from chloroplasts. *FEBS Lett.* **373**: 262-264.
- Böttcher, B., Schwarz, L. und Graber, P.** 1998. Direct indication for the existence of a double stalk in CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>. *J. Mol. Biol.* **281**: 757-762.
- Boyer, P.D.** 1993. The binding change mechanism for ATP synthase - some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**: 215-250.
- Boyer, P.D.** 1997. The ATP synthase - A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 717-749.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breitung, J. und Thauer, R.K.** 1990. Formylmethanofuran-Tetrahydromethanopterin Formyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - Identification of N<sup>5</sup>-Formyltetrahydromethanopterin as the product. *FEBS Lett.* **275**: 226-230.
- Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T. und Weiss, R.L.** 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**: 54-68.
- Brodersen, J., Gottschalk, G. und Deppenmeier, U.** 1999. Membrane-bound F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-dependent heterodisulfide reduction in *Methanococcus voltae*. *Arch. Microbiol.* **171**: 115-121.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Roberts, K.M., Hurst, M.A., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. und Venter, C.J.** 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.
- Cain, B.D.** 2000. Mutagenic analysis of the F<sub>0</sub> stator subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**: 365-371.
- Carper, S.W. und Lancaster, J.R., Jr.** 1986. An electrogenic sodium-translocating ATPase in *Methanococcus voltae*. *FEBS Lett.*: 177-180.
- Chaban, Y., Ubbink-Kok, T., Keegstra, W., Lolkema, J.S. und Boekema, E.J.** 2002. Composition of the central stalk of the Na<sup>+</sup>-pumping V-ATPase from *Caloramator fervidus*. *EMBO Rep* **3**: 982-987.

- Chen, W. und Konisky, J.** 1993. Characterization of a membrane-associated ATPase from *Methanococcus voltae*, a methanogenic member of the archaea. *J. Bacteriol.* **175**: 5677-5682.
- Cohen, G.N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Querellou, J., Ripp, R., Thierry, J.C., Van der Oost, J., Weissenbach, J., Zivanovic, Y. und Forterre, P.** 2003. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1495-1512.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**: 2110-2114.
- Coskun, Ü., Chaban, Y.L., Lingl, A., Müller, V., Keegstra, W., Boekema, E.J. und 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.
- Coskun, Ü., Grüber, G., Koch, M.H., Godovac-Zimmermann, J., Lemker, T. und Müller, V.** 2002. Crosstalk in the A<sub>1</sub>-ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1 due to nucleotide-binding. *J. Biol. Chem.* **277**: 17327-17333.
- Coskun, Ü., Radermacher, M., Müller, V., Ruiz, T. und Grüber, G.** 2004. Three-dimensional organization of the archaeal A<sub>1</sub>-ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* **279**: 22759-22764.
- Crider, B.P., Carper, S.W. und Lancaster, J.R.** 1985. Electron transfer-driven ATP synthesis in *Methanococcus voltae* is not dependent on a proton electrochemical gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 6793-6796.
- Cross, R.L.** 1981. The mechanism and regulation of ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPases. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 681-714.
- Cross, R.L. und Müller, V.** 2004. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* **576**: 1-4.
- Cross, R.L. und Taiz, L.** 1990. Gene duplication as a means for altering H<sup>+</sup>/ATP ratios during the evolution of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPases and synthases. *FEBS Lett.* **259**: 22227-22229.
- Del Rizzo, P.A., Bi, Y., Dunn, S.D. und Shilton, B.H.** 2002. The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase: Structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry* **41**: 6875-6884.
- Denda, K., Konishi, J., Hajiro, K., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M.** 1990. Structure of an ATPase operon of an acidothermophilic

- Archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* **265**: 21509-21513.
- Deppenmeier, U.** 2002. Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1513-1533.
- Deppenmeier, U.** 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**: 223-283.
- Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R.A., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Bäumer, S., Jacobi, C., Brüggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Bömeke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H.-P., Gunsalus, R.P., Fritz, H.-J. und Gottschalk, G.** 2002. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 453-461.
- Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X. und Nagley, P.** 2000. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**: 428-442.
- Diez, M., Zimmermann, B., Borsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekyan, S., Kudryavtsev, V., Seidel, C.A. und Graber, P.** 2004. Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound  $F_0F_1$ -ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 135-141.
- Dimroth, P., Kaim, G. und Matthey, U.** 1998. The motor of the ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 87-92.
- Dmitriev, O.Y., Altendorf, K. und Fillingame, R.H.** 2004. Subunit *a* of the *E. coli* ATP synthase: reconstitution and high resolution NMR with protein purified in a mixed polarity solvent. *FEBS Lett.* **556**: 35-38.
- Domgall, I., Venzke, D., Lüttge, U., Ratajczak, R. und Böttcher, B.** 2002. Three-dimensional map of a plant V-ATPase based on electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **277**: 13115-13121.
- Duncan, T.M., Zhou, Y., Bulygin, V.V., Hutcheon, M.L. und Cross, R.L.** 1995. Probing interactions of the *Escherichia coli*  $F_0F_1$  ATP synthase  $\beta$  and  $\gamma$  subunits with disulphide cross-links. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 736-741.
- Dunn, S.D.** 1992. The polar domain of the  $\beta$ -Subunit of *Escherichia coli*  $F_1F_0$ -ATPase forms an elongated dimer that interacts with the  $F_1$  Sector. *J. Biol. Chem.* **267**: 7630-7636.
- Dunn, S.D., McLachlin, D.T. und Revington, M.** 2000. The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**: 356-363.

- Dybas, M. und Konisky, J.** 1992. Energy transduction in the methanogen *Methanococcus voltae* is based on a sodium current. *J. Bacteriol.* **174**: 5575-5583.
- Ebel, R.E. und Lardy, H.A.** 1975. Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* **250**: 191-196.
- Elferink, M.G., De Wit, J.G., Driessen, A.J. und Konings, W.N.** 1993. Energy-transducing properties of primary proton pumps reconstituted into archaeal bipolar lipid vesicles. *Eur. J. Biochem.* **214**: 917-925.
- Enssle, M., Zirngibl, C., Linder, D. und Thauer, R.K.** 1991. Coenzyme-F<sub>420</sub> dependent N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in methanol grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **155**: 483-490.
- Ermler, U., Merckel, M., Thauer, R. und Shima, S.** 1997. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* **5**: 635-646.
- Escalante-Semerena, J.C., Rinehart, K.L., Jr. und Wolfe, R.S.** 1984. Tetrahydromethanopterin, a carbon carrier in methanogenesis. *J. Biol. Chem.* **259**: 9447-9455.
- Fillingame, R.H., Angevine, C.M. und Dmitriev, O.Y.** 2002. Coupling proton movements to c-ring rotation in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**: 29-36.
- Fillingame, R.H., Girvin, M.E. und Zhang, Y.** 1995. Correlations of structure and function in subunit c of *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 760-766.
- Fitz-Gibbon, S.T., Ladner, H., Kim, U.J., Stetter, K.O., Simon, M.I. und Miller, J.H.** 2002. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 984-989.
- Flannery, A.R., Graham, L.A. und Stevens, T.H.** 2004. Topological characterization of the c, c', and c'' subunits of the vacuolar ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**: 39856-39862.
- Foster, D.L. und Fillingame, R.H.** 1982. Stoichiometry of subunits in the proton-translocating ATPase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**: 2009-2015.
- Galagan, J.E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M.G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano,**

- K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R.D., Cann, I., Graham, D.E., Grahame, D.A., Guss, A.M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H.C., Krzycki, J.A., Leigh, J.A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J.N., Smith, K., Springer, T.A., Umayam, L.A., White, O., White, R.H., Conway de Macario, E., Ferry, J.G., Jarrell, K.F., Jing, H., Macario, A.J., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K.R., Swanson, R.V., Zinder, S.H., Lander, E., Metcalf, W.W. und Birren, B. 2002. The genome of *Methanosarcina acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* **12**: 532-542.
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. und Walker, J.E. 2000. The structure of the central stalk in bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1055-1061.
- Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L. und Fillingame, R.H. 1998. Solution structure of the transmembrane H<sup>+</sup>-transporting subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *Biochemistry* **37**: 8817-8824.
- Gleissner, M., Elferink, M.G., Driessen, A.J., Konings, W.N., Anemüller, S. und Schäfer, G. 1994. Generation of proton-motive force by an archaeal terminal quinol oxidase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* **224**: 983-990.
- Gleissner, M., Kaiser, U., Antonopoulos, E. und Schäfer, G. 1997. The archaeal SoxABCD complex is a proton pump in *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* **272**: 8417-8426.
- Gogarten, J.P. und Taiz, L. 1992. Evolution of proton pumping ATPases - rooting the tree of life. *Photosynth. Res.* **33**: 137-146.
- Gottschalk, G. und Thauer, R.K. 2001. The Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochim Biophys Acta.* **1505**: 28-36.
- Grabarse, W., Vaupel, M., Vorholt, J.A., Shima, S., Thauer, R.K., Wittershagen, A., Bourenkov, G., Bartunik, H.D. und Ermler, U. 1999. The crystal structure of methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri*. *Structure Fold. Des.* **7**: 1257-1268.
- Greie, J.C., Heitkamp, T. und Altendorf, K. 2004. The transmembrane domain of subunit b of the Escherichia coli F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase is sufficient for H<sup>+</sup>-translocating activity together with subunits a and c. *Eur. J. Biochem.* **271**: 3036-3042.
- Grüber, G., Radermacher, M., Ruiz, T., Godovac-Zimmermann, J., Canas, B., Kleine-Kohlbrecher, D., Huss, M., Harvey, W.R. und Wiczorek, H. 2000. Three-dimensional structure and subunit

topology of the  $V_1$  ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochemistry* **39**: 8609-8616.

**Grüber, G., Svergun, D.I., Coskun, Ü., Lemker, T., Koch, M.H., Schägger, H. und Müller, V.** 2001. Structural insights into the  $A_1$  ATPase from the archaeon, *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* **40**: 1890-1896.

**Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R. und Müller, V.** 2001. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **204**: 2597-2605.

**Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

**Heefner, D.L. und Harold, F.M.** 1982. ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 2798-2802.

**Heinonen, J.E. und 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.

**Hempfling, W.P. und Hertzberg, E.L.** 1979. Techniques for measurement of oxidative phosphorylation in intact bacteria and in membrane preparations of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **55**: 164-175.

**Hermolin, J., Dmitriev, O.Y., Zhang, Y. und Fillingame, R.H.** 1999. Defining the domain of binding of  $F_1$  subunit epsilon with the polar loop of  $F_0$  subunit c in the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**: 17011-17016.

**Hilario, E. und 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. und 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.

**Hochstein, L.I.** 1992. ATP synthesis in *Halobacterium saccharovorum* - evidence that synthesis may be catalysed by an  $F_0F_1$ -ATP synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**: 155-159.

**Hochstein, L.I., Kristjansson, H. und Altekar, W.** 1987. The purification and subunit structure of a membrane-bound ATPase from the archaeobacterium *Halobacterium saccharovorum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 295-300.

- Hochstein, L.I. und Stanlotter, H.** 1992. Purification and properties of an ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**: 153-160.
- Hohn, M.J., Hedlund, B.P. und Huber, H.** 2002. Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Syst Appl. Microbiol.* **25**: 551-554.
- Holloway, P.W.** 1973. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* **53**: 304-308.
- Holmes, D.S. und Quigley, M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Höner zu Bentrup, K., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J.S. und Konings, W.N.** 1997. An Na<sup>+</sup>-pumping V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>-ATPase complex in the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. *J. Bacteriol.* **179**: 1274-1279.
- Hoppert, M. und Holzenburg, A.** 1998. *Electron Microscopy in Microbiology*, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. und Stetter, K.O.** 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Ihara, K., Watanabe, S., Sugimura, K. und 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.
- Imamura, H., Ikeda, C., Yoshida, M. und Yokoyama, K.** 2004. The F subunit of *Thermus thermophilus* V<sub>1</sub>-ATPase promotes ATPase activity but is not necessary for rotation. *J. Biol. Chem.* **279**: 18085-18090.
- Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M. und Yokoyama, K.** 2003. Evidence for rotation of V<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 2312-2315.
- Inatomi, K.** 1996. ATP-dependent H<sup>+</sup>-pump activity in inverted vesicles of *Methanosarcina mazei* Gö1 and characterization of membrane ATPase. *J. Bacteriol.* **178**: 2424-2426.
- Inatomi, K.I.** 1986. Characterization and purification of the membrane-bound ATPase of the archaebacterium *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **167**: 837-841.

- Inatomi, K.I., Kamagata, Y. und Nakamura, K.** 1993. Membrane ATPase from the acetoclastic methanogen *Methanotheroxiphila thermophila*. *J. Bacteriol.* **175**: 80-84.
- Inatomi, K.I., Maeda, M. und Futai, M.** 1989. Dicyclohexylcarbodiimide-binding protein is a subunit of the *Methanosarcina barkeri* ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 1585-1590.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinosita, K.** 2004. Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **427**: 465-468.
- Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M., Yokoyama, K. und Iwata, S.** 2004. Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 59-64.
- Jiang, W., Hermolin, J. und 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, W.J., Leigh, J.A., Mayer, F., Woese, C.R. und Wolfe, R.S.** 1983. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **136**: 254-261.
- Junge, W., Lill, H. und Engelbrecht, S.** 1997. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 420-423.
- Kaesler, B. und Schönheit, P.** 1989. The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> and 2 H<sub>2</sub> in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na<sup>+</sup> translocation at a stoichiometry of 2 - 3 Na<sup>+</sup>/CO<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* **184**: 223-232.
- Kaesler, B. und Schönheit, P.** 1989. The sodium cycle in methanogenesis. CO<sub>2</sub> reduction to the formaldehyde level in methanogenic bacteria is driven a primary electrochemical potential of Na<sup>+</sup> generated by formaldehyde reduction to CH<sub>4</sub>. *Eur. J. Biochem.* **186**: 309-316.
- Kagawa, Y. und Sone, N.** 1979. DCCD-sensitive ATPase TF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> from a thermophilic bacterium: purification, dissociation into functional subunits, and reconstitution into vesicles capable of energy transformation. *Methods Enzymol.* **55**: 364-372.

- Kaim, G. und Dimroth, P.** 1998. Voltage-generated torque drives the motor of the ATP synthase. *Embo J.* **17**: 5887-5895.
- Kaim, G., Matthey, U. und Dimroth, P.** 1998. Model of interaction of the single *a* subunit with the multimeric *c* subunits during the translocation of the coupling ions by  $F_1F_0$  ATPases. *Embo J.* **17**: 688-695.
- Kaim, G., Prummer, M., Sick, B., Zumofen, G., Renn, A., Wild, U.P. und Dimroth, P.** 2002. Coupled rotation within single  $F_0F_1$  enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis. *FEBS Lett.* **525**: 156-163.
- Kaim, G., Wehrle, F., Gerike, U. und Dimroth, P.** 1997. Molecular basis for the coupling ion selectivity of  $F_1F_0$  ATP synthases: Probing the liganding groups for  $Na^+$  and  $Li^+$  in the *c* subunit of the ATP synthase from *Propionigenium modestum*. *Biochemistry* **36**: 9185-9194.
- Kakinuma, Y.** 1987. Lowering the cytoplasmic pH is essential for growth of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **169**: 4403-4405.
- Kakinuma, Y. und Igarashi, K.** 1990. Release of the Component of *Streptococcus faecalis*  $Na^+$ -ATPase from the Membranes. *FEBS Lett.* **271**: 102-105.
- Kakinuma, Y. und Igarashi, K.** 1994. Purification and characterization of the catalytic moiety of vacuolar-type  $Na^+$ -ATPase from *Enterococcus hirae*. *J Biochem* **116**: 1302-1308.
- Kakinuma, Y., Kakinuma, S., Takase, K., Konishi, K., Igarashi, K. und Yamato, I.** 1993. A gene encoding the 16 kDa proteolipid subunit of *Enterococcus hirae*  $Na^+$ -ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 1063-1069.
- Kane, P.M.** 1995. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar  $H^+$ -ATPase *in vivo*. *J. Biol. Chem* **270**: 17025-17032.
- Kane, P.M.** 2000. Regulation of V-ATPases by reversible disassembly. *FEBS Lett.* **469**: 137-141.
- Karrasch, S. und 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. und Yoshida, M.** 1998. Direct observation of the rotation of epsilon subunit in  $F_1$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 19375-19377.
- Kato-Yamada, Y., Yoshida, M. und Hisabori, T.** 2000. Movement of the helical domain of the epsilon subunit is required for the activation of thermophilic  $F_1$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 35746-35750.

- Kavermann, H.** 1999. Überexpression, Reinigung und immunologischer Nachweis der Lokalisation der ATPase-Untereinheit Ahal in *Methanosarcina mazei* Gö1. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Kawano, M., Igarashi, K., Yamato, I. und Kakinuma, Y.** 2002. Arginine residue at position 573 in *Enterococcus hirae* vacuolar-type ATPase Ntpl subunit plays a crucial role in Na<sup>+</sup> translocation. *J. Biol. Chem.* **277**: 24405-24410.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima, T. und Kikuchi, H.** 2001. Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. *DNA Res.* **8**: 123-140.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Kikuchi, H. und et al.** 1999. Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res* **6**: 83-101, 145-152.
- Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. und Kikuchi, H.** 1998. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res* **5**: 55-76.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. und 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.
- Kleber-Janke, T. und Becker, W.M.** 2000. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr. Purif.* **19**: 419-424.
- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenny, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H.,**

- Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. und Venter, J.C. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Kohl, T., Heinze, K.G., Kuhlemann, R., Koltermann, A. und Schwille, P. 2002. A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 12161-12166.
- Kuhle, V. 2000. Die  $A_1A_0$ -ATPase aus *Methanococcus jannaschii*: Funktion, Ionenspezifität und immunologischer Nachweis der zellulären Lokalisation der Untereinheiten I und K. Diplomarbeit. Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J.K. und Stetter, K.O. 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* **156**: 239-247.
- Landolt-Marticorena, C., Williams, K.M., Correa, J., Chen, W. und Manolson, M.F. 2000. Evidence that the  $NH_2$ -terminus of Vph1p, an integral subunit of the  $V_0$  sector of the yeast V-ATPase, interacts directly with the Vma1p and Vma13p subunits of the  $V_1$  sector. *J. Biol. Chem* **275**: 15449-15457.
- Laubinger, W. und Dimroth, P. 1988. Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* **27**: 7531-7537.
- Leigh, J.A., Rinehart, K.L. und Wolfe, R.S. 1985. Methanofuran (carbon dioxide reducing factor), a formyl carrier in methane production from carbon dioxide in *Methanobacterium*. *Biochemistry* **24**: 995-999.
- Lemker, T. 1997. Untersuchungen zur Transkription und Verbreitung von ATPase-Genen in methanogenen Archaea. Diplomarbeit. Georg-August-Universität, Göttingen.
- Lemker, T., Grüber, G., Schmid, R. und Müller, V. 2003. Defined subcomplexes of the  $A_1$  ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1: biochemical properties and redox regulation. *FEBS Lett.* **544**: 206 - 209.
- Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S. und Müller, V. 2001. Overproduction of a functional  $A_1$ -ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3744-3750.

- Leng, X.H., Nishi, T. und Forgac, M.** 1999. Transmembrane topography of the 100-kDa *a* subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**: 14655-14661.
- Li, Z. und Zhang, X.** 2004. Electron-microscopic structure of the V-ATPase from mung bean. *Planta* **219**: 948-954.
- Lolkema, J.S. und Boekema, E.J.** 2003. The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. *FEBS Lett.* **543**: 47-50.
- Long, J.C., Wang, S. und Vik, S.B.** 1998. Membrane topology of subunit *a* of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **273**: 16235-16240.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lübben, M., Lunsdorf, H. und Schäfer, G.** 1987. The plasma membrane ATPase of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification and immunological relationships to F<sub>1</sub>-ATPases. *Eur. J. Biochem.* **167**: 211-219.
- Lübben, M., Lunsdorf, H. und Schäfer, G.** 1987. A plasma membrane ATPase of the thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification and immunological relationships to F<sub>1</sub>-ATPases. *Eur. J. Biochem.* **167**: 211-219.
- Lübben, M. und Schäfer, G.** 1989. Chemiosmotic energy conservation of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: oxidative phosphorylation and the presence of an F<sub>0</sub>-related N',N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid. *J. Bacteriol.* **171**: 6106-6116.
- Ma, K.S. und Thauer, R.K.** 1990. N5, N10-Methylenetetrahydromethanopterin Reductase from *Methanosarcina barkeri*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **70**: 119-124.
- Maischak, H.** 2004. Biochemische Charakterisierung der in *Escherichia coli* DK8 heterolog produzierten A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase aus dem Archäon *Methanosarcina mazei* Gö1. Diplomarbeit. Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y.-C.E., Nelson, H. und Nelson, N.** 1988. cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H<sup>+</sup>-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 5521-5524.

- Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- McCarthy, J.E.G., Schairer, H.U. und 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.
- McLachlin, D.T. und Dunn, S.D.** 1997. Dimerization interactions of the *b* subunit of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 21233-21239.
- Meier, T. und Dimroth, P.** 2002. Intersubunit bridging by Na<sup>+</sup> ions as a rationale for the unusual stability of the c-rings of Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases. *EMBO Rep* **3**: 1094-1098.
- Meier, T., Matthey, U., von Ballmoos, C., Vonck, J., Krug von Nidda, T., Kuhlbrandt, W. und 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., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. und Dimroth, P.** 2005. Structure of the rotor ring of F-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* **308**: 659-662.
- Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S. und Yoshida, M.** 2004. Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H<sup>+</sup>/ATP ratio and permissive elastic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 12159-12164.
- Mukohata, Y. und Yoshida, M.** 1987. Activation and inhibition of ATP synthesis in cell envelope vesicles of *Halobacterium halobium*. *J. Biochem.* **101**: 311-318.
- Mukohata, Y. und Yoshida, M.** 1987. The H<sup>+</sup>-translocating ATP synthase in *Halobacterium halobium* differs from F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/synthase. *J. Biochem.* **102**: 797-802.
- Müller, M., Gumbiowski, K., Cherepanov, D.A., Winkler, S., Junge, W., Engelbrecht, S. und Panke, O.** 2004. Rotary F<sub>1</sub>-ATPase: Is the C-terminus of subunit  $\gamma$  fixed or mobile? *Eur. J. Biochem.* **271**: 3914-3922.
- Müller, V.** 2004. An exceptional variability in the motor of archaeal A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPases: from multimeric to monomeric rotors comprising 6-13 ion binding sites. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**: 115-125.
- Müller, V., Aufurth, S. und Rahlfs, S.** 2001. The Na<sup>+</sup> cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na<sup>+</sup> translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**: 108-120.

- Müller, V., Blaut, M. und Gottschalk, G.** 1988. The transmembrane electrochemical gradient of Na<sup>+</sup> as driving force for methanol oxidation in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 601-606.
- Müller, V., Blaut, M., Heise, R., Winner, C. und Gottschalk, G.** 1990. Sodium bioenergetics in methanogens and acetogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 373-377.
- Müller, V. und Gottschalk, G.** 1993. Na<sup>+</sup> translocation in the course of methanogenesis from methanol or formaldehyde. In: *Alkali cation transport systems in prokaryotes* (Bakker, E.P., Ed.). S 155-177. CRC Press, Boca Raton.
- Müller, V. und Grüber, G.** 2003. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 474-494.
- Müller, V., Ruppert, C. und Lemker, T.** 1999. Structure and function of the A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPases from methanogenic archaea. *J. Bioenerg. Biomembrane* **31**: 15-28.
- Müller, V., Winner, C. und Gottschalk, G.** 1988. Electron transport-driven sodium extrusion during methanogenesis from formaldehyde + H<sub>2</sub> by *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **178**: 519-525.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 263-273.
- Murata, T., Arechaga, I., Fearnley, I.M., Kakinuma, Y., Yamato, I. und Walker, J.E.** 2003. The membrane domain of the Na<sup>+</sup>-motive V-ATPase from *Enterococcus hirae* contains a heptameric rotor. *J. Biol. Chem* **278**: 21162-21167.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G. und Walker, J.E.** 2005. Structure of the rotor of the V-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* **308**: 654-659.
- Nanba, T. und Mukohata, Y.** 1987. A membrane-bound ATPase from *Halobacterium halobium*: purification and characterization. *J. Biochem.* **102**: 591-598.
- Nelson, H. und Nelson, N.** 1989. The progenitor of ATP synthases was closely related to the current vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Lett.* **247**: 147 - 153.
- Nelson, N.** 1992. Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1100**: 109-124.
- Nelson, N. und Taiz, L.** 1989. The evolution of H<sup>+</sup>-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 113 - 116.

- Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G. und Dimroth, P.** 1998. Purification and properties of the  $F_1F_0$  ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump. *J. Bacteriol.* **180**: 3312-3316.
- Ng, W.V., Kennedy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H.D., Lasky, S.R., Baliga, N.S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T.A., Welti, R., Goo, Y.A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M.J., Hough, D.W., Maddocks, D.G., Jablonski, P.E., Krebs, M.P., Angevine, C.M., Dale, H., Isenbarger, T.A., Peck, R.F., Pohlschroder, M., Spudich, J.L., Jung, K.W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C.J., Dennis, P.P., Omer, A.D., Ebhardt, H., Lowe, T.M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. und DasSarma, S.** 2000. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 12176-12181.
- Nishi, T. und Forgac, M.** 2002. The vacuolar  $H^+$ -ATPases - Nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**: 94-103.
- Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. und Forgac, M.** 2003. The first putative transmembrane segment of subunit *c*" (Vma16p) of the yeast V-ATPase is not necessary for function. *J. Biol. Chem.* **278**: 5821-5827.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinosita, K.** 1997. Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase. *Nature* **386**: 299-302.
- Numoto, N., Kita, A. und Miki, K.** 2004. Structure of the C subunit of V-type ATPase from *Thermus thermophilus* at 1.85 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**: 810-815.
- Opekarova, M. und Tanner, W.** 2003. Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**: 11-22.
- Pacheco-Moises, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. und Garcia, J.J.** 2002. Sulfite inhibits the  $F_1F_0$ -ATP synthase and activates the  $F_1F_0$ -ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**: 269-278.
- Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W. und Engelbrecht, S.** 2000.  $F_1$ -ATPase: specific observation of the rotating *c* subunit oligomer of  $EF_0EF_1$ . *FEBS Lett.* **472**: 34-38.
- Pogoryelov, D., Yu, J., Meier, T., Vonck, J., Dimroth, P. und Müller, D.J.** 2005. The  $c_{15}$  ring of the *Spirulina platensis*  $F_1$ -ATP synthase:  $F_1F_0$  symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO Rep.*
- Powell, B., Graham, L.A. und Stevens, T.H.** 2000. Molecular characterization of the yeast vacuolar  $H^+$ -ATPase proton pore. *J. Biol. Chem.* **275**: 23654-23660.

- Radax, C., Sigurdsson, O., Hreggvidsson, G.O., Aichinger, N., Grüber, C., Kristjansson, J.K. und Stan-Lotter, H.** 1998. F- and V-ATPases in the genus *Thermus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 12-22.
- Radermacher, M., Ruiz, T., Harvey, W.R., Wieczorek, H. und Grüber, G.** 1999. Molecular architecture of *Manduca sexta* midgut V<sub>1</sub> ATPase visualized by electron microscopy. *FEBS Lett.* **453**: 383-386.
- Rahlfs, S. und Müller, V.** 1997. Sequence of subunit *c* of the Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase of *Acetobacterium woodii*: Proposal for determinants of Na<sup>+</sup> specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS Lett.* **404**: 269-271.
- Reidlinger, J., Mayer, F. und Müller, V.** 1994. The molecular structure of the Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of *Acetobacterium woodii*, as revealed by electron microscopy, resembles that of H<sup>+</sup>-translocating ATPases. *FEBS Lett.* **356**: 17-20.
- Reidlinger, J. und Müller, V.** 1994. Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type enzyme. *Eur. J. Biochem.* **223**: 275-283.
- Rigaud, J.L., Pitard, B. und Levy, D.** 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246.
- Robb, F.T., Maeder, D.L., Brown, J.R., DiRuggiero, J., Stump, M.D., Yeh, R.K., Weiss, R.B. und Dunn, D.M.** 2001. Genomic sequence of hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods Enzymol.* **330**: 134-157.
- Romesser, J.A. und Wolfe, R.S.** 1982. Coupling of methyl coenzyme M reduction with carbon dioxide activation in extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **152**: 840-847.
- Roth, R. und Bachofen, R.** 1994. Characterization and partial purification of an ATPase and inorganic pyrophosphatase of the archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1201**: 271-283.
- Rubinstein, J.L., Walker, J.E. und Henderson, R.** 2003. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *Embo J.* **22**: 6182-6192.
- Ruppert, C., Kavermann, H., Wimmers, S., Schmid, R., Kellermann, J., Lottspeich, F., Huber, H., Stetter, K.O. und Müller, V.** 1999. The proteolipid of the A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> 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., Schmid, R., Hedderich, R. und Müller, V.** 2001. Selective extraction of subunit D of the Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase and subunit c of the A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATPase from the cytoplasmic membrane of methanogenic archaea by chloroform/methanol and characterization of subunit c of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* as a 16-kDa proteolipid. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 47-51.
- Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. und Müller, V.** 1998. The A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> 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.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. und Futai, M.** 1999. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): direct observation. *Science* **286**: 1722-1724.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA.
- Sapra, R., Bagramyan, K. und Adams, M.W.** 2003. A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 7545-7550.
- Schäfer, H.J., Coskun, U., Eger, O., Godovac-Zimmermann, J., Wieczorek, H., Kagawa, Y. und Grüber, G.** 2001. 8-N<sub>3</sub>-3'-biotinyl-ATP, a novel monofunctional reagent: differences in the F<sub>1</sub>- and V<sub>1</sub>-ATPases by means of the ATP analogue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**: 1218-1227.
- Schägger, H., Cramer, W.A. und von Jagow, G.** 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**: 220-230.
- Schägger, H. und von Jagow, G.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Scheel, E. und Schäfer, G.** 1990. Chemiosmotic energy conservation and the membrane ATPase of *Methanlobus tindarius*. *Eur. J. Biochem.* **187**: 727 - 735.
- Schemidt, R.A., Hsu, D.K.W., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K. und Brusilow, W.S.A.** 1995. The effects of an *atpE* ribosome-binding site mutation on the stoichiometry of the c subunit in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**: 423-428.

- Schmidt, R.A., Qu, J., Williams, J.R. und 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.
- Schneider, E. und Altendorf, K.** 1984. Subunit  $b$  of the membrane moiety ( $F_0$ ) of ATP synthase ( $F_1F_0$ ) from *Escherichia coli* is indispensable for  $H^+$ -translocation and binding of the water-soluble  $F_1$  moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **81**: 7279-7283.
- Schobert, B.** 1991.  $F_1$ -Like Properties of an ATPase from the Archaeobacterium *Halobacterium saccharovorum*. *J. Biol. Chem.* **266**: 8008-8014.
- Sebald, W. und Hoppe, J.** 1981. On the structure and genetics of the proteolipid subunit of the ATPase complex. *Curr. Top. Bioenerg.* **12**: 1-64.
- Seelert, H., Dencher, N.A. und Muller, D.J.** 2003. Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **333**: 337-344.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. und Müller, D.J.** 2000. Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**: 418-419.
- Senejani, A.G., Hilario, E. und Gogarten, J.P.** 2001. The intein of the Thermoplasma A-ATPase A subunit: structure, evolution and expression in *E. coli*. *Biochem.* **2**: 13.
- She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P.M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W. und Van der Oost, J.** 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7835-7840.
- Shima, S., Warkentin, E., Grabarse, W., Sordel, M., Wicke, M., Thauer, R.K. und Ermler, U.** 2000. Structure of coenzyme  $F_{420}$  dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea. *J. Mol. Biol.* **300**: 935-950.
- Singh, S., Turina, P., Bustamante, C.J., Keller, D.J. und Capaldi, R.** 1996. Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli*  $F_1F_0$  ATP synthase in aqueous buffer. *FEBS Lett.* **397**: 30-34.

- Skulachev, V.P.** 1994. Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 271-284.
- 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. und 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.
- Smigan, P., Horovska, L. und Greksak, M.** 1988. Na<sup>+</sup>-driven ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* can be modulated with sodium ion concentrations in the growth medium. *FEBS Lett.* **242**: 85-88.
- Smigan, P., Majernik, A. und Greksak, M.** 1994. Na<sup>+</sup>-driven ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its differentiation from H<sup>+</sup>-driven ATP synthesis by rhodamine 6G. *FEBS Lett.* **347**: 190-194.
- Smigan, P., Majernik, A., Polak, P., Hapala, I. und Greksak, M.** 1995. The presence of H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-translocating ATPases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and their possible function under alkaline conditions. *FEBS Lett.* **371**: 119-122.
- Smigan, P., Rusnak, P., Greksak, M., Zhilina, T.N. und Zavarzin, G.A.** 1992. Mode of sodium ion action on methanogenesis and ATPase of the moderate halophilic methanogenic bacterium *Methanohalophilus halophilus*. *FEBS Lett.* **300**: 193-196.
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J.N. und et al.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135-7155.
- Sorgen, P.L., Bubb, M.R., McCormick, K.A., Edison, A.S. und Cain, B.D.** 1998. Formation of the *b* subunit dimer is necessary for interaction with F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* **37**: 923-932.
- Stahlberg, H., Müller, D.J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U. und Dimroth, P.** 2001. Bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Rep* **2**: 229-233.
- Steffens, K., Schneider, E., Deckers-Hebestreit, G. und Altendorf, K.** 1987. F<sub>0</sub> portion of *Escherichia coli* ATP synthase. Further resolution

of trypsin-generated fragments from subunit *b*. *J. Biol. Chem.* **262**: 5866-5869.

**Steinert, K. und Bickel-Sandkötter, S.** 1996. Isolation, characterization, and substrate specificity of the plasma membrane ATPase of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Z. Naturforsch.* **51**: 29-39.

**Steinert, K., Wagner, V., Kroth-Pancic, P.G. und 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., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G. und Walker, J.E.** 2000. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 672-679.

**Stock, D., Leslie, A.G. und Walker, J.E.** 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700-1705.

**Sumi, M., Sato, M.H., Denda, K., Date, T. und Yoshida, M.** 1992. A DNA fragment homologous to  $F_1$ -ATPase-beta subunit was amplified from genomic DNA of *Methanosarcina barkeri* - indication of an archaebacterial F-Type ATPase. *FEBS Lett.* **314**: 207-210.

**Sumi, M., Yohda, M., Koga, Y. und Yoshida, M.** 1997.  $F_0F_1$ -ATPase genes from an archaebacterium *Methanosarcina barkeri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 427-433.

**Sumner, J.P., Dow, J.A., Earley, F.G., Klein, U., Jager, D. und Wieczorek, H.** 1995. Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* **270**: 5649-5653.

**Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y. und Yoshida, M.** 2003.  $F_0F_1$ -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *J. Biol. Chem.* **278**: 46840-46846.

**Svergun, D.I., Konrad, S., Huss, M., Koch, M.H., Wieczorek, H., Altendorf, K., Volkov, V.V. und Grüber, G.** 1998. Quaternary structure of  $V_1$  and  $F_1$  ATPase: significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* **37**: 17659-17663.

**Takase, K., Kakinuma, S., Yamato, I., Konishi, K., Igarashi, K. und Kakinuma, Y.** 1994. Sequencing and characterization of the *ntp* gene cluster for vacuolar-type  $Na^+$ -translocating ATPase of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 11037-11044.

**Takeyasu, K., Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Iwamotokihara, A. und Futai, M.** 1996. Molecular imaging of *Escherichia coli*  $F_0F_1$ -

- ATPase in reconstituted membranes using atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **392**: 110-113.
- Thauer, R.K.** 1998. Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Thauer, R.K., Hedderich, R. und Fischer, R.** 1993. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. In: *Methanogenesis* (Ferry, J.G., Ed.). S 209-252. Chapman & Hall, New York, NY, USA.
- Tomashek, J.J., Graham, L.A., Hutchins, M.U., Stevens, T.H. und Klionsky, D.J.** 1997. V<sub>1</sub>-situated stalk subunits of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 26787-26793.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
- Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M. und Capaldi, R.A.** 2001. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 898-902.
- Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M. und Capaldi, R.A.** 2001. Large conformational changes of the ε subunit in the bacterial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 6560-6564.
- Ubbink-Kok, T., Boekema, E.J., van Breemen, J.F., Brisson, A., Konings, W.N. und Lolkema, J.S.** 2000. Stator structure and subunit composition of the V<sub>1</sub>V<sub>0</sub> Na<sup>+</sup>-ATPase of the thermophilic bacterium *Caloramator fervidus*. *J. Mol. Biol.* **296**: 311-321.
- Valentine, R.C. und Chignell, D.A.** 1968. Electron microscopy of muscle phosphorylase molecules: significance of a rhombic shape. *Nature* **218**: 950-953.
- Valiyaveetil, F.I. und Fillingame, R.H.** 1997. On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 32635-32641.
- Van Beelen, P., de Cock, R.M., Guijt, W., Haasnoot, A.G. und Vogels, G.D.** 1984a. Isolation and identification of 5,10-methenyl- 5,6,7,8-tetrahydromethanopterin, a coenzyme involved in methanogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**: 159-163.
- Vaupel, M. und Thauer, R.K.** 1998. Two F<sub>420</sub>-reducing hydrogenases In *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **169**: 201-205.
- Vik, S.B., Long, J.C., Wada, T. und Zhang, D.** 2000. A model for the structure of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**: 457-466.

- Vogelstein, B. und Gillespie, D.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 615-619.
- von Ballmoos, C., Appoldt, Y., Brunner, J., Granier, T., Vasella, A. und Dimroth, P.** 2002. Membrane topography of the coupling ion binding site in Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **277**: 3504-3510.
- Vonck, J., von Nidda, T.K., Meier, T., Matthey, U., Mills, D.J., Kuhlbrandt, W. und Dimroth, P.** 2002. Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **321**: 307-316.
- Wada, T., Long, J.C., Zhang, D. und Vik, S.B.** 1999. A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**: 17353-17357.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J.** 1982. Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J.* **1**: 945-951.
- Wang, S.Y., Moriyama, Y., Mandel, M., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Danho, W., Nelson, H. und Nelson, N.** 1988. Cloning of cDNA encoding a 32-kDa protein. An accessory polypeptide of the H<sup>+</sup>-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* **263**: 17638-17642.
- Waters, E., Hohn, M.J., Ahel, I., Graham, D.E., Adams, M.D., Barnstead, M., Beeson, K.Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kretz, K., Lin, X., Mathur, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G.G., Simon, M., Soll, D., Stetter, K.O., Short, J.M. und Noordewier, M.** 2003. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 12984-12988.
- Watts, S.D., Tang, C.L. und Capaldi, R.A.** 1996. The stalk region of the *Escherichia coli* ATP synthase - Tyrosine 205 of the gamma subunit is in the interface between the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> parts and can interact with both the epsilon and *c* oligomer. *J. Biol. Chem.* **271**: 28341-28347.
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H. und Capaldi, R.A.** 1995. The gamma subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) extends through the stalk and contacts the *c* subunits of the F<sub>0</sub> part. *FEBS Lett.* **368**: 235-238.
- Weber, J. und Senior, A.E.** 2003. ATP synthesis driven by proton transport in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *FEBS Lett.* **545**: 61-70.
- Weber, K. und Osborne, M.** 1969. The reliability of the molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.

- Weidner, C.** 2003. Die außergewöhnlicher Diversität der Proteolipide in Archaea: Multimere und monomere Rotoren mit sechs bis dreizehn Ionenbindestellen in  $A_1A_0$ -ATPasen. Dissertation. Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Weiss, D.S. und Thauer, R.K.** 1993. Methanogenesis and the unity of biochemistry. *Cell* **72**: 819-822.
- Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W.R., Huss, M., Merzendorfer, H. und Zeiske, W.** 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane  $H^+$ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**: 127-135.
- Wilkens, S. und Capaldi, R.A.** 1998. ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* **393**: 29.
- Wilkens, S. und Forgac, M.** 2001. Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **276**: 44064-44068.
- Wilkens, S., Vasilyeva, E. und Forgac, M.** 1999. Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **274**: 31804-31810.
- Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F. und Müller, V.** 1996. Subunit structure and organization of the genes of the  $A_1A_0$  ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* **271**: 18843-18852.
- Wimmers, S.** 1997. Expression der  $A_1$ -Domäne der  $A_1A_0$ -ATPase von *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli* und Charakterisierung der  $A_1A_0$ -ATPase aus *Methanococcus jannaschii*. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen.
- Woese, C.R.** 1990. Evolutionary questions: the "progenote". *Science* **247**: 789.
- Woese, C.R., Winker, S. und Gutell, R.R.** 1990. Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 8467-8471.
- Xu, T. und Forgac, M.** 2000. Subunit D (Vma8p) of the yeast vacuolar  $H^+$ -ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **275**: 22075-22081.
- Xu, T., Vasilyeva, E. und Forgac, M.** 1999. Subunit interactions in the clathrin-coated vesicle vacuolar  $H^+$ -ATPase complex. *J. Biol. Chem.* **274**: 28909-28915.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr. und Yoshida, M.** 1998.  $F_1$ -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* **93**: 1117-1124.

- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Motojima, F. und Yoshida, M.** 1997. Rotation of the  $\gamma$  subunit in  $F_1$ -ATPase; Evidence that ATP synthase is a rotary motor enzyme. *J. Bioenerg. Biomembrane* **29**: 207-209.
- Yokoyama, K., Akabane, Y., Ishii, N. und Yoshida, M.** 1994. Isolation of prokaryotic  $V_0V_1$ -ATPase from a thermophilic Eubacterium *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **269**: 12248-12253.
- Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M. und 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., Nagata, K., Imamura, H., Ohkuma, S., Yoshida, M. und Tamakoshi, M.** 2003. Subunit arrangement in V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **278**: 42686-42691.
- Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M. und 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. und Yoshida, M.** 2000. V-Type  $H^+$ -ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* **275**: 13955-13961.
- Yokoyama, K., Oshima, T. und Yoshida, M.** 1990. *Thermus thermophilus* membrane-associated ATPase - Indication of a eubacterial V-Type ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**: 21946-21950.



---

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Müller bedanken, der mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht hat. Danke auch für die Unterstützung und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Huber und seinem Team, die mir die Zellen bereitstellten und so die Arbeit erst möglich machten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Grüber und Herrn Dr. Coskun, für die tolle Zusammenarbeit und die EM-Aufnahmen der ATPase.

Bei Brigitte und Heike möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit und für die Freundschaft bedanken.

Claudia, Sascha und Thorsten danke ich für die Einführung in die Welt der ATPasen und die immerwährende Unterstützung. Für das überaus angenehme Arbeitsklima und die manchmal mehr und manchmal weniger ernsthaften Diskussionen danke ich allen Doktoranden und Diplomanden, die mich in München begleitet haben: Smurf, Volker, Nadine, Iris, Eva, Ulli, Heidi, Henrik, Xaver, Pesel, Sabine, Christiane, Steffi, Vanessa, Tina, Jasmin, Kerstin, Babaryka und Dengl (sollte ich jemanden vergessen haben, war das keine Absicht).

Ganz besonderes bedanken möchte ich mich bei Kathi für ihre Freundschaft, Unterstützung und die gemeinsamen Diskussionen in unserem 2-Frauen Labor.

Gesondert bedanke ich mich ganz herzlich bei Frank, Heidi, Stephan, die aus München mit nach Frankfurt umgezogen sind, Mike, Judit, Conny und Iris für das gute Arbeitsklima und die Freundschaft.

Den Frankfurtern, vor allem Kim, Melanie, Rene, Olli S., Olli K., Jörg und Michael danke ich für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern der Institute in München und Frankfurt für ihre Unterstützung.

Robert, der immer für mich da ist und meiner Familie ein besonders großes und herzliches Dankeschön.

## LEBENS LAUF

Name	Astrid Anna Christina Lingl
Geburtsort	München
Geburtsdatum	27. Januar 1973
Familienstand	Verheiratet seit Januar 2002
1979-1983	Besuch der Grundschule an der Pfarrer-Grimm-Strasse in München
1983-1993	Besuch des Louise-Schroeder-Gymnasiums in München
Mai 1993	Abitur
Oktober 1993	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Studienfach Biologie
Oktober 1999-April 2000	Diplomprüfung in den Fächern Pharmakologie und Toxikologie, Biochemie, Physiologische Botanik und Mikrobiologie
Mai 2000-März 2001	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. Volker Müller mit dem Thema „Reinigung und Charakterisierung der $A_1A_0$ ATPase aus <i>Methanococcus jannaschii</i> “
Mai 2001	Weiterführung der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
Februar 2004	Umzug der Arbeitsgruppe nach Frankfurt