

Untersuchungen zur Stöchiometrie der Untereinheit *c* der
ATP-Synthase aus *Escherichia coli*

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereiches Biologie/Chemie
an der Universität Osnabrück

Ingo Aldag

Osnabrück im April 2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aufgabenstellung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien und Materialien	17
2.1.1 Antikörper	18
2.2 Stämme und Plasmide	19
2.2.1 Stämme	19
2.2.2 Plasmide	19
2.3 Medien und Anzuchtbedingungen.....	19
2.3.1 Luria Bertani-Vollmedium (LB-Medium).....	19
2.3.2 Minimalmedium	20
2.3.3 Fermentation.....	20
2.4 Restriktion, Modifikation und elektrophoretische Auftrennung von DNA	20
2.5 Klonierung des Plasmids pIA1	21
2.6 Klonierung der Plasmide pBWU13NOC und pIA1NOC	21
2.7 Präparation von F _o	22
2.8 Präparation von F _o F ₁	24
2.9 Präparation von F ₁	24
2.10 Präparation von gereinigter Untereinheit <i>c</i>	25
2.11 Rekonstitution von F _o in Liposomen	26
2.11.1 Herstellung vorgeformter Liposomen	26
2.11.2 Herstellung vorgeformter Liposomen mit gereinigter Untereinheit <i>c</i>	27
2.11.3 Rekonstitution	27
2.12 Bestimmung der Protonentranslokation	27
2.12.1 Messung der Protonentranslokation	27
2.12.2 Datenerfassung und Auswertung.....	28
2.13 Bindung von F ₁ an F _o -Proteoliposomen und Messung der ATPase Aktivität	28
2.14 Toluol/Ether Fällung.....	29
2.15 Proteinbestimmung.....	29
2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	29
2.17 Immunoblotanalyse	30
2.18 Quantifizierung mittels ¹²⁵ I Protein A	30
2.19 Quantifizierung mittels Sypro Ruby.....	31
2.20 Minizellmarkierung mit ³⁵ S-Methionin	31
2.20.1 Präparation der Minizellen	31

2.20.2 Markierung der Minizellen.....	31
2.21 ELISA.....	32
2.22 Reinigung von <i>E. coli</i> Lipid (Avanti).....	33
2.23 Phosphatbestimmung nach Ames.....	33
2.24 Fettsäureextraktion und qualitative Analyse.....	33
2.25 Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide.....	34
2.26 Quervernetzung der Untereinheit <i>c</i>	34
2.26.1 Quervernetzung der Untereinheit <i>c</i> auf Membranebene.....	34
2.26.2 Quervernetzung der Untereinheit <i>c</i> auf Liposomenebene.....	35
2.27 Gefrierbruchuntersuchungen.....	35
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Quantifizierung der einzelnen Untereinheiten in F ₀ Präparationen.....	37
3.1.1 Quantifizierung der Untereinheiten <i>a</i> und <i>c</i> von pWSB30.0-F ₀ und pRPG54-F ₀ mit ¹²⁵ I Protein A.....	38
3.1.2 Quantifizierung der Untereinheiten <i>a</i> , <i>b</i> und <i>c</i> von verschiedenen F ₀ Präparationen mittels Sypro Ruby™.....	40
3.1.3 Quantifizierung der Untereinheiten α , β , γ , δ und <i>c</i> aus Minizellen mit den Plasmiden pWSB30.0 und pRPG54.....	41
3.2 Rekonstitution.....	43
3.3 Vergleich der Protonentranslokation von (TIR-WT)-F ₀ und (TIR-Mut)-F ₀	49
3.4 ATPase-Aktivität nach Bindung von F ₁ an F ₀ Proteoliposomen.....	50
3.5 Protonentranslokation nach Titration von gereinigter Untereinheit <i>c</i>	51
3.6 ATPase-Aktivität nach Bindung von F ₁ an F ₀ Liposomen und Titration von gereinigter Untereinheit <i>c</i>	53
3.7 Reinigung von <i>E. coli</i> Lipid (Avanti).....	54
3.7.1 Vergleich der Lipide vor und nach der Reinigung durch Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie.....	55
3.7.2 Rekonstitution mit gereinigtem <i>E. coli</i> Lipid (Avanti).....	57
3.8 Verteilung der <i>c</i> Untereinheiten auf die F ₀ -Komplexe.....	58
3.8.1 Quantifizierung der Untereinheiten <i>a</i> , <i>b</i> und <i>c</i> von pWSB30.0-F ₀ und pRPG54-F ₀ mittels ELISA.....	58
3.8.2 Quantifizierung von pBWU13NOC- und pRPG54NOC-Membranen mittels ECL und alkalischer Phosphatase.....	59
3.8.3 Cystein Quervernetzung der Untereinheit <i>c</i> auf Membranebene.....	60
3.8.4 Cystein Quervernetzung der Untereinheit <i>c</i> auf Liposomenebene.....	62
3.8.5 Gefrierbruchuntersuchungen.....	63

4 Diskussion	65
5 Zusammenfassung	76
6 Literatur	77
7 Anhang	90
7.1 Das Programm prt17.bas	90
7.2 Das Formblatt Lipoaus3-25-2.xlt.....	97

1 Einleitung

Nach der chemiosmotischen Theorie (Mitchell, 1961) ist der von den Enzymen der Atmungskette durch den vektoriellen Protonentransport aufgebaute elektrochemische Gradient an die Synthese von ATP gekoppelt. Das Enzym, das die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien synthetisiert, ist die ATP-Synthase (F_0F_1). Obwohl zwischen den ATP-Synthasen einzelner Spezies hinsichtlich der Untereinheitenzusammensetzung eine große Heterogenität besteht, so setzt sich die ATP-Synthase von Mitochondrien aus 16 verschiedenen Untereinheiten zusammen (Karrasch & Walker, 1999), während das Enzym in *Escherichia coli* aus nur 8 verschiedenen Untereinheiten besteht (Senior, 1990), sind die wesentlichen Strukturmerkmale bei allen Organismen weitgehend gleich. Das Enzym gliedert sich in einen cytoplasmatischen F_1 Teil, der über eine als „Stalk“ bezeichnete Struktur mit dem membranintegralen F_0 Teil verbunden ist. Der F_0 Teil des Enzyms ist für die Ionentranslokation zuständig, wobei meist Protonen transloziert werden (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996). In einigen Organismen wie z. B. *Propionigenium modestum*, *Iliobacter tartaricus* (Laubinger & Dimroth, 1987; Neumann *et al.*, 1998) oder *Acetobacterium woodii* (Reidlinger & Müller, 1994) transloziert die ATP-Synthase Natrium-Ionen (Na^+). Da die ATP-Synthase von *P. modestum* bei einer Na^+ Konzentration von weniger als 1 mM auch Protonen pumpt (Laubinger & Dimroth, 1989) und wie das Enzym aus *E. coli* auch durch DCCD inhibiert wird (Laubinger & Dimroth, 1987) kann man davon ausgehen, dass sich die Mechanismen von Na^+ - und Protonentranslokation nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Ein weiterer Hinweis auf die nahe Verwandtschaft der ATP-Synthasen von *P. modestum* und *E. coli* konnte mit der Konstruktion eines Hybridenzym erbracht werden, in dem die Untereinheiten des F_0 Teils und die Untereinheit δ aus *P. modestum* und die Untereinheiten α , β , γ und ϵ aus *E. coli* stammten und, zusammen in *E. coli* exprimiert, ein Na^+ abhängiges Wachstum auf Succinat ermöglichten (Kaim & Dimroth, 1993).

Die Gene für die Untereinheiten der ATP-Synthase sind bei *E. coli* im *atp*-Operon organisiert, welches bei min 84 auf dem Chromosom lokalisiert ist (Blattner *et al.*, 1997) und mit einer Länge von 6,8 kb für neun Proteine codiert (Schneider & Altendorf 1987). Die Gene codieren in der Reihenfolge *atpIBEFHAGDC* für die Proteine *i*, *a*, *c*, *b*, δ , α , β und ϵ . Das Genprodukt des *atpI* Gens ist das 14,183 kDa große Protein *i*, welches in substöchiometrischen Mengen

synthetisiert wird und dessen Funktion bisher unbekannt ist (Solomon *et al.*, 1989; Schneppe *et al.*, 1991). Die anderen Proteine werden in einer Stöchiometrie von 1:10±1:2:1:3:1:3:1 (Foster & Fillingame, 1982) exprimiert, was eine differenzierte Regulation der entsprechenden Gene erforderlich macht. Prinzipiell existieren drei Möglichkeiten für die Regulation der Expression einzelner Untereinheiten in einem Operon. Die Regulation der Translation ist im *atp*-Operon von *E. coli* verwirklicht (McCarthy *et al.*, 1985), während bei *Methanosarcina mazei* eine Regulation auf Transkriptionsebene stattfindet (Müller *et al.*, 1999). Die dritte Möglichkeit besteht in einer Genmultiplikation, wie sie beispielsweise im *atp*-Operon von *A. woodii* vorkommt, wo das stark exprimierte *atpE* Gen dreifach vorhanden ist (Müller *et al.* 1999). Translationelle Kopplung z.B. über die Störung der mRNA Sekundärstruktur durch ein Ribosom, welches ein vorangestelltes Gen abliest und dadurch die Initiation des folgenden Gens vereinfacht, spielt zwischen den Genen *atpEFHAG* im *atp*-Operon von *E. coli* eine gewisse Rolle. Für das Genpaar *atpH-atpA* konnte sogar eine strikte Kopplung gezeigt werden (McCarthy, 1990; Hellmuth *et al.*, 1991; Rex *et al.*, 1994). Die Stabilität der mRNA hat nur für die ersten beiden Gene im *atp*-Operon *atpI* und *atpB* eine Bedeutung, sie wird im Vergleich zur mRNA der restlichen Gene signifikant schneller abgebaut (McCarthy *et al.*, 1991). Die funktionelle Halbwertszeit der *atp*-mRNA liegt mit 5-6 min etwas über dem Durchschnitt der bisher untersuchten mRNA Spezies aus *E. coli* (Schramm *et al.*, 1996). Des Weiteren führte die Entfernung einer Ribosomenbindestelle innerhalb des *atpB* Gens zu einer 4-5fachen Verstärkung seiner Expression (Matten *et al.*, 1998). Für die Regulation auf Translationsebene, wie sie im *atp*-Operon von *E. coli* verwirklicht ist, hat die Initiation der Translation den entscheidenden Einfluss auf die Translationsrate und ist damit der ratenkontrollierende Schritt. Elongation und Termination spielen hier nur eine untergeordnete Rolle (McCarthy *et al.*, 1988). Brusilow *et al.* (1982) stellten fest, dass die einzelnen Gene des *atp*-Operons entsprechend ihrer Stöchiometrie im ATP-Synthase Komplex synthetisiert werden und dass weder Codonbenutzung noch differenzielle Proteolyse eine Rolle spielen. Dieser Befund wird durch Untersuchungen gestützt, in denen die Gene für Interleukin 2 und β -Interferon hinter die TIR des *atpE*-Gens von *E. coli* kloniert wurden (McCathy *et al.*, 1986). Eine Regulationsmöglichkeit der *c*-Stöchiometrie ganz anderer Art wird für *A. woodii* diskutiert. Das *atp*-Operon des acetogenen Bakteriums *A. woodii* verfügt über drei direkt hintereinander liegende *atpE* Gene, nämlich *atpE₁*, *atpE₂* und *atpE₃*. Während *atpE₂* und *atpE₃* für normale Proteolipide mit jeweils einer protonierbaren Carboxylgruppe codieren, ist das Genprodukt von *atpE₁* als ein genetisch fusioniertes Doppelproteolipid zu sehen, welches allerdings nur über eine protonierbare

Carboxylgruppe verfügt (Rahlfs *et al.*, 1999). Alle drei Proteolipide werden im *c*-Oligomer der ATP-Synthase von *A. woodii* gefunden (Aufurth *et al.*, 2000). Es erscheint daher möglich, dass physiologische Anpassungen über eine Variation des Verhältnisses von *atpE*₁ zu *atpE*₂ und *atpE*₃ vorgenommen werden. Als entscheidend wird dabei nicht die Anzahl der Proteolipide, sondern die Anzahl protonierbarer Carboxylgruppen im *c*-Oligomer angesehen (Aufurth *et al.*, 2000).

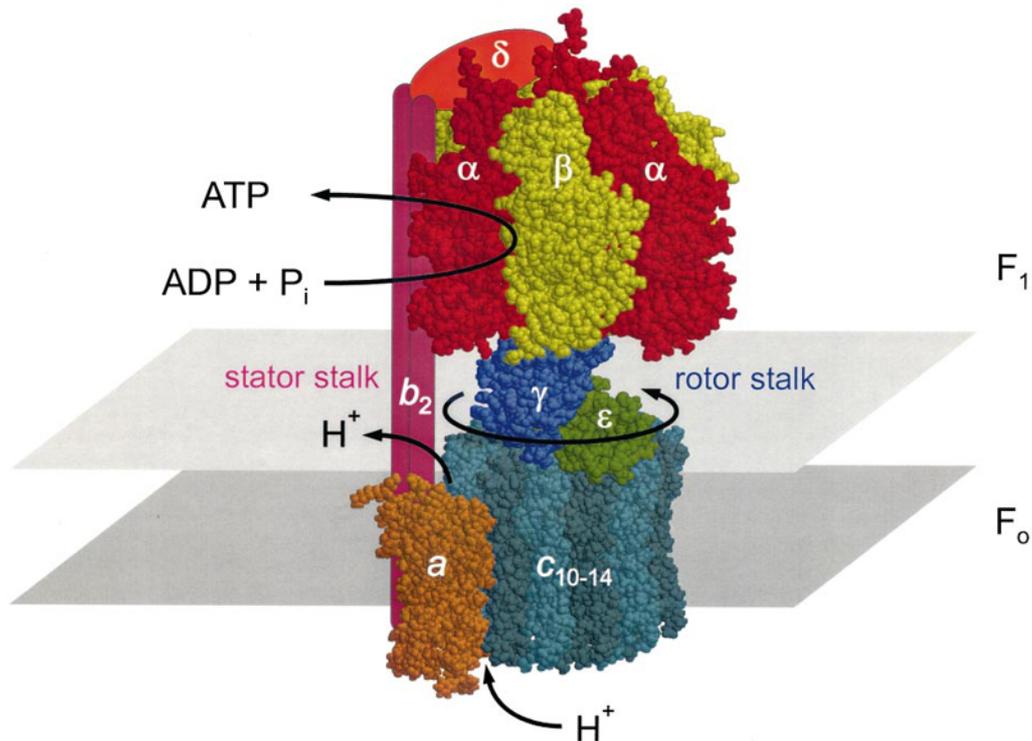


Abb. 1: Modell der ATP-Synthase nach Senior *et al.* (2002).

Die Struktur großer Teile der Untereinheiten α und β , sowie die N- und C-terminalen α -Helices der Untereinheit γ aus Rinderherzmitochondrien konnten 1994 von Abrahams *et al.* durch eine Röntgenstrukturuntersuchung mit einer Auflösung von 0,28 nm aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass die drei α und β Untereinheiten alternierend hexagonal wie die Segmente einer Apfelsine angeordnet sind und die N- und C-terminalen α -Helices der Untereinheit γ , leicht umeinander gewunden, einen zentralen Hohlraum im α/β Hexagon fast vollständig durchspannen (Abrahams *et al.*, 1994). In neuerer Zeit konnte die Auflösung durch Kristallisation mit Aluminiumfluorid auf 0,2 nm erhöht werden (Menz *et al.*, 2001). In dieser Kristallstruktur waren alle drei katalytischen Zentren in den β Untereinheiten durch ATP bzw. ADP besetzt. Zuvor war von Boyer (1993) der Bindungswechselmechanismus beschrieben worden, in dem davon ausgegangen wurde, dass die Katalysereaktion in den drei

β Untereinheiten in drei Schritten abläuft, wobei sich die drei katalytischen Zentren zu jedem Zeitpunkt in verschiedenen Stadien befinden. In kinetischen Untersuchungen (Weber & Senior, 2000) zeigte sich, dass im zeitlichen Mittel nicht, wie zunächst von Boyer postuliert, eine Bindestelle frei ist, sondern alle Bindestellen besetzt sind. Für eine simultane Besetzung aller drei Bindestellen unter ATPase-Bedingungen sprechen ebenfalls Messungen der drei möglichen K_d -Werte, welche mit ~ 1 nM für die erste, $1 \mu\text{M}$ für die zweite und $30 \mu\text{M}$ für die dritte Bindestelle mindestens zwei Größenordnungen unter der physiologischen ATP Konzentration von ca. 3 mM in der Zelle liegen (Senior *et al.*, 2002). Die Energieübertragung von den katalytischen Zentren geschieht dabei über Konformationsänderungen in den Untereinheiten α und β , die mit der Untereinheit γ interagieren (Schemidt *et al.*, 1996; Gibbons *et al.*, 2000). Rein mechanistisch kann man die N- und C-terminale Helix der Untereinheit γ als Pleuelstange in einem Dreizylinder-Motor (β Untereinheiten) ansehen (Oster & Wang, 1999), die entweder die chemische Energie der Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i in eine mechanische umwandelt, oder im Falle der ATP Synthese die umgekehrte Reaktion mit einer Effizienz von 100 % umwandelt (Oster & Wang, 2000). Eine derart hohe Effizienz wird auch für andere motorisch aktive Proteine, wie z.B. Kinesin oder den Flagellenmotor postuliert (Junge, 1999). Während die Katalyse der ATP-Synthase in Richtung Hydrolyse von ATP sehr genau untersucht ist, gibt es für den Mechanismus der ATP Synthese nur Hypothesen. Senior *et al.* (2002) gehen davon aus, dass zunächst P_i , gefolgt von ADP und Mg^+ , in einem freien katalytischen Zentrum bindet. Dabei wird die Bindung von ATP durch die Konformation der Bindungstasche sterisch verhindert. Für die Bildung eines pentakovalenten Übergangszustandes werden dann ADP und P_i in direkte räumliche Nähe zueinander gebracht und damit die Bildung einer kovalenten Bindung erzwungen. Das gebildete ATP ist zunächst instabil, wird aber durch eine erneute Konformationsänderung des katalytischen Zentrums stabilisiert, wodurch eine Hydrolyse unwahrscheinlich wird. Danach öffnet sich das katalytische Zentrum und ATP wird freigesetzt. Die Energie für die Konformationsänderungen stammt dabei aus der Ionentranslokation und wird durch die Rotation des c -Oligomers zusammen mit den Untereinheiten γ und ϵ auf das $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer übertragen.

Die Untereinheiten α und β sind mit 55 kDa bzw. 50 kDa die größten Untereinheiten im F_1 -Komplex und enthalten je eine Nucleotidbindestelle (Lundari *et al.*, 1987). Nur die Nucleotidbindestellen der drei β Untereinheiten sind katalytisch aktiv (Weber & Senior, 1997; Boyer, 1997), während die Bindung von ATP in den Nucleotidbindestellen der drei α

Untereinheiten lediglich regulatorische Funktionen hat, indem sie den Übergang von einer inhibierten zu einer nichtinhibierten Form der ATPase unterstützen (Hara *et al.*, 2001). Sie werden daher als nichtkatalytische Zentren bezeichnet.

Die 31 kDa große Untereinheit γ stellt die Verbindung zwischen dem katalytisch aktiven $\alpha_3\beta_3$ Hexamer und dem ionentranslozierenden F_o Teil her. Ihre N- und C-terminale α -Helix reicht bis in die Spitze des $\alpha_3\beta_3$ Hexamers. Dieses konnte sowohl durch Röntgenstrukturanalyse (Stock *et al.*, 1999) als auch durch Quervernetzungen zwischen der Untereinheit γ und der Untereinheit β belegt werden (Aggeler *et al.*, 1995; Gumbiowski *et al.*, 2001). Auch die Wechselwirkungen zwischen der Untereinheit γ und der Untereinheit c konnten durch zahlreiche Quervernetzungen belegt werden (Watts *et al.*, 1995; Watts *et al.*, 1996, Schulenberg *et al.*, 1999).

Die Untereinheit δ (19 kDa) spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung des F_1 -Komplexes an den F_o -Komplex (Sternweis & Smith, 1977). Es konnte gezeigt werden, dass ohne diese Untereinheit eine Bindung von F_1 an F_o nicht erfolgen kann (Jounouchi *et al.*, 1992). Die Struktur der Aminosäurereste 1 bis 134 der Untereinheit δ konnte durch NMR Untersuchungen aufgeklärt werden (Wilkens *et al.*, 1997). Sie besteht aus einem Bündel von sechs α -Helixen. Die Lokalisation der Untereinheit δ an der oberen Peripherie des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons (Abb. 1) konnte sowohl durch zahlreiche Quervernetzungen in diesem Bereich (Lill *et al.*, 1996; Ogilvie *et al.*, 1997) sowie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen belegt werden (Wilkens *et al.*, 1998; Wilkens *et al.*, 2000). Außerdem besteht im C-terminalen Bereich eine Wechselwirkung mit der Untereinheit b des F_o -Komplexes (Rodgers *et al.*, 1997; McLachlin *et al.*, 1998; Dunn & Chandler, 1998).

Die Untereinheit ϵ (14 kDa) interagiert mit vier weiteren Untereinheiten im ATP-Synthase-Komplex. Durch Quervernetzungsexperimente konnten Wechselwirkungen mit den Untereinheiten α und β (Mendel-Hartvig & Capaldi, 1991; Aggeler *et al.*, 1995; Capaldi & Schulenberg, 2000), der Untereinheit γ (Tang & Capaldi 1996; Schulenberg *et al.*, 1997) und der Untereinheit c (Zhang *et al.*, 1994; Zhang & Fillingame, 1995; Hermolin *et al.*, 1999) nachgewiesen werden. Allein diese Lokalisation legt eine regulatorische Funktion dieser Untereinheit nahe. Klionsky *et al.* (1984) konnten zeigen, dass die Untereinheit ϵ die ATPase-Aktivität der ATP-Synthase inhibiert. Durch NMR Untersuchungen konnte die Struktur dieser

Untereinheit aufgeklärt werden, ihr N-terminaler Bereich besteht aus einem 10 strängigen β -Sandwich, während der C-terminale Bereich eine antiparallele α -helicale Haarnadel bildet (Wilkins & Capaldi, 1998). Die Tatsache, dass sich zwei direkt benachbarte Reste in der α -helicalen Haarnadel mit zwei Resten in der Untereinheit c und der Untereinheit γ quervernetzen lassen, welche 5 nm auseinander liegen, lässt eine starke Konformationsänderung der α -helicalen Haarnadel im Reaktionszyklus vermuten. Dieser Konformationsänderung kommt möglicherweise eine Bedeutung bei der regulatorischen Funktion der Untereinheit ε zu (Tsunoda *et al.*, 2001).

Eine Rotation bestimmter Untereinheiten analog zum Flagellenmotor war von Cox *et al.* (1984) erstmals postuliert worden. Nach Veröffentlichung der ersten Kristallstruktur (Abrahams *et al.*, 1994) wurde eine Rotation der Untereinheit γ relativ zum $\alpha_3\beta_3$ Hexagon für wahrscheinlich gehalten. Ein erster Nachweis für diese Rotation gelang durch Quervernetzungsexperimente (Duncan *et al.*, 1995). Sabbert *et al.* (1996) konnten durch „polarized absorption relaxation after photobleaching“ eine Drehung der Untereinheit γ um mindestens 200 Grad nachweisen. Der endgültige Nachweis einer Drehung der Untereinheit γ während der ATP Hydrolyse gelang durch Bindung eines fluoreszenzmarkierten biotinylierten Actinfilaments über Streptavidin an die biotinylierte Untereinheit γ (Noji *et al.*, 1997). Dabei konnte die Rotation der fluoreszierenden Filamente direkt im Epifluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Bei nanomolaren ATP Konzentrationen ist die Drehung extrem verlangsamt und deutlich in 120° Einzelschritte aufgeteilt (Hara *et al.*, 2001). Durch die direkte Beobachtung einer an die Untereinheit γ gebundenen 4 nm großen Nanogold Kugel gelang eine weitere Aufteilung dieser Einzelschritte in einen 90° Zwischenschritt, der mit der ATP Bindung gekoppelt ist und einen 30° Zwischenschritt, der an die Entlassung von ADP und Phosphat gekoppelt ist (Yasuda *et al.*, 2001). Das durch die ATP Hydrolyse hervorgerufene Drehmoment konnte über die Krümmung des Actinfilaments berechnet werden (Pänke *et al.*, 2001). Ein Wert von 50 pN nm deutet auf eine nahezu verlustlose Energieumwandlung hin; dabei dient die Untereinheit γ als Torsionsfeder und kann die anfallende Hydrolyseenergie somit zwischenspeichern (Pänke *et al.*, 2001).

Der für die Ionentranslokation zuständige F_0 -Komplex beinhaltet bei *E. coli* die Untereinheiten a , b und c und gehört damit bezüglich seiner Untereinheitenzahl zu den einfachsten bisher beschriebenen F_0 -Komplexen. Für einen funktionsfähigen Komplex werden alle drei Untereinheiten benötigt (Schneider & Altendorf, 1985b). Rasterkraft-,

immuno- und elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten auf eine asymmetrische Anordnung der Untereinheiten hin, bei der die Untereinheiten *a* und *b* außerhalb eines Ringes aus *c*-Untereinheiten liegen (Singh *et al.*, 1996; Takeyasu *et al.*, 1996; Birkenhäger *et al.*, 1995; Wilkens & Capaldi, 1998). Außerdem belegen Markierungsstudien, dass Untereinheit *a* für das hydrophobe 3-(Trifluoromethyl)-3-(*m*-¹²⁵I)iodophenyl)diazerin von der Membranphase aus zugänglich ist (Hoppe *et al.*, 1984), was eine Lokalisation dieser Untereinheit im *c*-Oligomer unwahrscheinlich macht.

Die sehr hydrophobe Untereinheit *a* ist (30 kDa) direkt an der Protonentranslokation beteiligt (Deckers-Hebestreit *et al.*, 2000) und integriert ohne die anderen beiden Untereinheiten *b* und *c* nicht in die Membran (Hermolin & Fillingame, 1995). Während über die Sekundärstruktur des C-terminalen Bereichs bis zur Aminosäure *a*K66 in der neueren Literatur weitgehende Einigkeit herrscht (Deckers-Hebestreit *et al.*, 2000), gibt es für den N-terminalen Bereich zwei verschiedene Strukturvorschläge. Auf der Grundlage von Antikörper-Bindungsstudien wurde ein Modell mit insgesamt sechs Transmembranhelices vorgeschlagen, bei dem der N-Terminus im Cytoplasma lokalisiert ist (Yamada, *et al.*, 1996; Jäger *et al.*, 1998; Deckers-Hebestreit *et al.*, 2000). Die Auswertung der Zugänglichkeit von in die Untereinheit *a* eingefügten Cysteinresten ergab ein Modell mit insgesamt fünf Transmembranhelices (Valiyaveetil *et al.*, 1998; Long *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1999); hier liegt der N-Terminus im Periplasma. In Quervernetzungsstudien nach Cysteininsertionen konnte gezeigt werden, dass ein Bereich von 19 Aminosäuren in der Untereinheit *a* in engem Kontakt weitgehend parallel zur zweiten Transmembranhelix der Untereinheit *c* liegt (Jiang & Fillingame, 1998). Dieser Bereich bildet sowohl im Strukturmodell mit sechs als auch im Strukturmodell mit fünf Transmembranhelices die Vorletzte Transmembranhelix. In diesen Studien konnte auch die räumliche Nähe des einzigen, für eine gekoppelte Protonentranslokation essentiellen Restes *a*R210 (Valiyaveetil *et al.*, 1997) zum Rest *c*D61, welcher in der Protonentranslokation ebenfalls eine zentrale Rolle spielt (siehe unten), gezeigt werden (Jiang & Fillingame, 1998). Der Rest *a*R210 scheint eine wichtige Rolle bei der Kopplung der Protonentranslokation an die ATP Synthese zu spielen, da die Mutante *a*R201A kein Wachstum auf Succinat mehr zeigte, während eine passive Protonentranslokation noch möglich war (Valiyaveetil & Fillingame, 1997). Die Funktion von *a*R210 könnte in einer Erniedrigung des pK_a Wertes von *c*D61 zur Aufnahme von Protonen im Protonentranslokationszyklus liegen (Valiyaveetil & Fillingame, 1997).

Untereinheit *b* (17 kDa) verbindet Untereinheit *a* im F_0 Teil (Aris & Simoni, 1983; Hermolin *et al.*, 1983; Fillingame *et al.*, 2000; Greie *et al.*, 2000) und die Untereinheiten α , β und δ im F_1 Teil des ATP-Synthase Komplexes miteinander (Aris & Simoni, 1983; Dunn & Chandler, 1998). Dabei überspannt sie von der Membranoberfläche bis zur Spitze des $\alpha_3\beta_3$ Hexagons eine Distanz von 11 nm (Rodgers & Capaldi, 1998). Durch Proteolyse der Untereinheit *b* konnte gezeigt werden, dass der hydrophile Teil dieser Untereinheit essentiell für die Bindung von F_1 ist (Steffens *et al.*, 1987). Außerdem konnte durch Quervernetzungen des N-terminalen Bereichs der Untereinheit *b* mit dem C-terminalen Bereich der Untereinheit *c* gezeigt werden, dass auch diese beiden Untereinheiten in räumlicher Nähe zueinander stehen (Jones *et al.*, 2000). Damit kommt dieser Untereinheit entscheidende Bedeutung bei der Verbindung zwischen F_0 und F_1 im Stator zu. Da für den rotierenden Komplex aus *c*-Oligomer und den Untereinheiten γ und ϵ in der ATP-Synthase ein Widerlager benötigt wird, muss es parallel zum ersten Stalk, der aus den Untereinheiten γ und ϵ besteht, noch einen zweiten Stalk geben, der fest mit dem $\alpha_3\beta_3$ Hexagon verbunden ist. Mehrere elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser zweite Stalk tatsächlich vorhanden ist (Wilkens & Capaldi, 1998; Capaldi *et al.*, 2000; Böttcher *et al.*, 1998; 2000). Durch NMR Untersuchungen an einem Fragment aus den 34 N-terminalen Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die Reste 4-22 eine kontinuierliche α -Helix bilden (Dmitriev *et al.*, 1999b) die α -helicale Struktur wird im Bereich der Aminosäurereste 23-26 unterbrochen und mit den Resten 27-34 fortgesetzt (Dmitriev *et al.*, 1999b). Auch der hydrophile Teil der Untereinheit *b* ist weitgehend α -helical, was durch CD spektroskopische Untersuchungen an gereinigter, rekonstituierter Untereinheit *b* gezeigt werden konnte (Greie *et al.*, 2000), die einen α -helicalen Anteil von 80 % und einen β -turn Anteil von 14 % ergaben. Funktionell ist die Untereinheit *b* als Homodimer anzusehen (Dunn *et al.*, 1992; Rodgers *et al.*, 1997; Sorgen *et al.*, 1998), welches zusammen mit der Untereinheit γ als Speicher für elastische Energie dient (Cherepanov *et al.*, 1999). Für eine gewisse Flexibilität der Untereinheit *b* sprechen sowohl Untersuchungen, bei denen eine Deletion von bis zu 11 Aminosäuren im Bereich von *bA50* bis *bI75* ohne Funktionsverlust entfernt werden konnten (Sorgen *et al.*, 1998), sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen, die eine Kontraktion des gesamten ATP-Synthase Komplexes im Reaktionszyklus um ca. 10 % zeigen (Capaldi *et al.*, 2000).

Die Untereinheit *c* (8 kDa), oft auch als Proteolipid bezeichnet, ist das kleinste Protein im F_0 -Komplex. Die Sekundärstruktur der Untereinheit *c* von *E. coli* konnte durch NMR Untersuchungen an gereinigtem, in Chloroform/Methanol/Wasser (4/4/1) gelöstem Protein

aufgeklärt werden und zeigt eine Haarnadelstruktur mit zwei ausgedehnten α -Helices, die über eine hydrophile Schleife miteinander verbunden sind (Girvin & Fillingame, 1995; Girvin *et al.*, 1998). Die N-terminale Helix erstreckt sich von Aminosäurerest cL8 bis cG33, die C-terminale Helix von cF54 bis cF76 und weist zwischen den Resten cV60 und cI66 einen Knick von ca. 30° auf. Zuvor konnte gezeigt werden, dass das Protein in Chloroform/Methanol/Wasser (4/4/1) seine Konformation gegenüber dem nativen Zustand nur unwesentlich ändert, da es seine Reaktivität gegenüber DCCD behält, dass Mutationen an Position cA24 die Reaktivität gegenüber DCCD auch in Chloroform/Methanol/Wasser (4/4/1) beeinflussen (Girvin & Fillingame, 1994) und dass außerdem eine funktionelle Rekonstitution in Proteoliposomen der in Chloroform/Methanol/Wasser (4/4/1) gereinigten Untereinheit c möglich ist (Dmitriev *et al.*, 1995). Die Bindung von DCCD an einen Carboxylrest der Untereinheit c wurde schon früh an ATP-Synthasen aus Chloroplasten (Nelson *et al.*, 1977) und *E. coli* (Fillingame, 1975) beobachtet und ist ein typisches Merkmal von F-Typ ATP-Synthasen. Dabei reicht die Bindung von DCCD an ein einziges Proteolipid im Oligomer aus, um die Protonentranslokation zu unterbinden (Hermolin & Fillingame, 1989). Die DCCD-reaktive Carboxylgruppe ist auch essentiell für die Protonentranslokation (Hoppe *et al.*, 1982; Fillingame *et al.*, 1984), bei *E. coli* befindet sich diese in Form eines Aspartatrestes an Position 61. In *P. modestum* F₀ kann die Bindung von DCCD an die Untereinheit c durch hohe Konzentrationen an Na⁺ inhibiert werden, die DCCD Bindestelle ist daher wahrscheinlich mit der Na⁺ Bindestelle identisch (Kluge & Dimroth, 1993). Aufgrund der vorliegenden Strukturdaten nimmt man an, dass dieser Rest ungefähr in der Mitte der Membran lokalisiert ist (Girvin *et al.*, 1998). Entscheidend für die Funktion der Untereinheit c ist dabei nicht der Rest cD61, sondern die Position einer Carboxylgruppe, was durch die funktionelle Mutante cD61G/cA24D gezeigt werden konnte (Miller *et al.*, 1990). Die auf der cytoplasmatischen Seite lokalisierte hydrophile Schleife (Hensel *et al.*, 1990; Girvin *et al.*, 1989; Birkenhäger *et al.*, 1999) ist für die Kopplung der Ionentranslokation an die ATP Synthese wichtig, so führt z.B. ein Aminosäureaustausch an Position cR41, wie auch die Mutation cQ42C zu einer entkoppelten Reaktion (Fraga & Fillingame, 1991; Fraga *et al.*, 1994; Mosher *et al.*, 1985). Bei Markierungsversuchen wurde festgestellt, dass die Reaktion von cQ42C in F₀F₁ mit N-Ethylmaleimid zweiphasig verläuft. Während 60 % der Reste sehr schnell reagierten, war bei 40 % der Reste eine 40fach verlangsamte Reaktion zu verzeichnen (Watts & Capaldi, 1997). Nach Ablösung des F₁-Komplexes reagierten alle Reste gleich schnell, was darauf hindeutet, dass die Untereinheiten γ und ϵ an ca. 40 % der c Untereinheiten relativ statisch gebunden sind und mit diesen eine relativ feste Einheit bilden

(Watts & Capaldi, 1997). Die genaue Struktur des *c*-Oligomers ist bisher unbekannt, allgemein wird allerdings davon ausgegangen, dass sich die flachen Monomere der Untereinheit *c* mit ihren Vorder- und Rückseitenseiten zu einem Ring zusammenlagern, so dass zwei konzentrische Ringe von α -Helices entstehen. Diese Ringstruktur wurde sowohl durch Röntgenstrukturanalyse als auch im Rasterkraftmikroskop bestätigt (Stock *et al.*, 1999; Stahlberg *et al.*, 2001; Seelert *et al.*, 2000). Jones *et al.* (1998) favorisieren dabei ein Modell, bei dem die C-terminale Helix der Untereinheit *c* außen liegt. Dieses wird durch Quervernetzungsexperimente, theoretische Berechnungen (Dmitriev *et al.*, 1999a) sowie die Röntgenstruktur eines F_1 -*c* Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stock *et al.*, 1999) untermauert. Dagegen ergab die Auswertung zahlreicher Tryptophaninsertionen sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich der Untereinheit *c* sowie theoretische Berechnungen mit dem Programm „O“, dass die C-terminale Helix wahrscheinlich den Innenring des *c*-Oligomers bildet (Groth & Walker, 1997; Groth *et al.*, 1998; Schnick *et al.*, 2000). Für diese Anordnung spricht auch die Bindung von Antikörpern mit Epitopen zwischen cL31 bis cQ42 an einen vollständigen F_0F_1 -Komplex (Birkenhäger *et al.*, 1999), da eine Wechselwirkung des Antikörpers unter diesen Bedingungen nur schwer vorstellbar ist, wenn sein Epitop im Inneren des *c*-Oligomers liegt.

In der Diskussion um den Mechanismus der Protonentranslokation wird eine Rotation des *c*-Oligomers zusammen mit den Untereinheiten γ und ϵ gegen die Untereinheiten *a* und *b* des F_0 Teils und α , β , δ des F_1 Teils für wahrscheinlich gehalten (Howitt *et al.*, 1996; Elston *et al.*, 1998; Junge, 1999; Vik *et al.*, 2000; Cross, 2000). Analog zu den Experimenten von Noji *et al.* (1997) mit der Untereinheit γ wurde die Rotation der Untereinheit *c* durch ein an ihren C-Terminus angehängtes fluoreszierendes Actinfilament gezeigt (Sambongi *et al.*, 1999). Dazu wurde die Aminosäure an Position zwei der Untereinheit *c* durch ein Cystein ausgetauscht und alle Cystein Reste in der Untereinheit γ entfernt. Danach konnte die Untereinheit *c* über Biotinmaleimid und Streptavidin an ein Actinfilament gekoppelt werden. Die α Untereinheiten des F_1 -Komplexes wurden über Histidin Schwänze an eine Nickeloberfläche gebunden. Da die von Sambongi *et al.* (1999) gewählte Verknüpfung über ein Biotinmaleimid nicht 100 % spezifisch für das in die Untereinheit *c* klonierte Cystein war, weil die Maleimid-Funktion nicht absolut spezifisch für Cysteine ist, wurde der Versuch von Pänke *et al.* (2000) mit einer an die Untereinheit *c* angehängten Streptactin Erkennungssequenz wiederholt. Auch in diesem Ansatz konnte eine Rotation des Actinfilaments beobachtet werden. Einen etwas anderen Ansatz wählten Tanabe *et al.* (2001), indem sie die Untereinheit *c* an eine

Nickeloberfläche koppelten und das Actinfilament an die Untereinheit α oder β banden. Auch in diesem Ansatz konnte eine Rotation beobachtet werden. Problematisch in allen drei Ansätzen von Sambongi *et al.* (1999), Pänke *et al.* (2000) und Tanabe *et al.* (2001) ist allerdings die fehlende oder sehr geringe DCCD Inhibierbarkeit. Tsunoda *et al.* (2001) gehen daher davon aus, dass bei den Rotationsexperimenten mit einem an die Untereinheit c angehängten Actinfilament die Untereinheiten a und b fehlten und damit zwei entscheidende Elemente des Stators nicht vorhanden waren. Bei Röntgenkristalluntersuchungen an der ATP-Synthase aus *S. cerevisiae* war bereits ein F_1 - c Komplex beobachtet worden, dem die Untereinheiten a und b fehlten (Stock *et al.*, 1999). Daher untersuchten Tsunoda *et al.* (2001) die Aktivität von ATP-Synthase-Komplexen, bei denen die Untereinheiten γ , ϵ und c untereinander quervernetzt waren. Die Experimente ergaben eine ATPase-Aktivität von 85 % gegenüber dem nicht quervernetzten Enzym und auch die ATP Synthese konnte zu 75 % mit DCCD inhibiert werden. Des Weiteren deuten Markierungsexperimente mit radioaktivem DCCD darauf hin, dass das c -Oligomer relativ zur Untereinheit a rotiert (Hutcheon *et al.*, 2001). In diesen Experimenten wurde durch die Klonierung je eines Cysteinrestes in die Untereinheiten a und c die Möglichkeit zu deren Quervernetzung gegeben. Dabei wurde signifikant mehr radioaktives DCCD im a - c Quervernetzungsprodukt gefunden, wenn die ATP-Synthase vor der Quervernetzung mit ATP inkubiert wurde. Auch die Inhibierung der ATP Synthese durch eine Quervernetzung der Untereinheiten b und c lässt sich durch eine Rotation des c -Oligomers am plausibelsten erklären (Jones *et al.*, 2000).

Der Mechanismus der Protonentranslokation konnte noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Aktuell werden drei verschiedene Mechanismen diskutiert, die im Folgenden beschrieben werden sollen. Allen Modellen gemeinsam ist die zentrale Bedeutung einer Carboxylgruppe in der Untereinheit c . Dieser Rest ist essentiell und kann nicht ohne Funktionsverlust ausgetauscht werden (Hoppe *et al.*, 1980; Hoppe *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1990). Bei *E. coli* handelt es sich um den Aspartatrest $cD61$, während bei den meisten anderen Organismen ein Glutamat zu finden ist. In der Untereinheit a ist bei *E. coli* allein der Rest $aR210$ völlig invariabel gegenüber Austausch. Dies gilt nur in Bezug auf eine gekoppelte Aktion von F_0 und F_1 , eine passive Protonentranslokation konnte auch ohne diesen Rest gezeigt werden (Valiyaveetil *et al.*, 1997). Die maximale Translokationsrate liegt im Bereich von typischen Carriern wie z.B. Gramicidin und auch die Sättigungscharakteristik der Protonenbindung spricht eindeutig gegen einen Kanalmechanismus (Fillingame, 1996).

Das Protonentranslokationsmodell von Junge *et al.* (1997) (Abb. 2) beruht auf drei Grundeigenschaften des F_0 -Komplexes. Erstens verhindert ein elektrostatischer Zwang, dass der Rest cD61 unprotoniert ist, da er sich in sehr hydrophober Umgebung in der Mitte der Membran befindet, während die Carboxylgruppen, die sich in räumlicher Nähe zur Untereinheit *a* befinden deprotoniert vorliegen können. Zweitens gibt es in der Untereinheit *a* vom Periplasma und vom Cytoplasma aus zwei Zugangskanäle zum Rest cD61, welche nicht kollinear angeordnet sind. Drittens unterliegt das *c*-Oligomer unter dem Einfluss von Stößen aus der benachbarten Lipid- und Wasserphase Brownschen Fluktuationen relativ zur Untereinheit *a*. Diese ungerichteten, thermalen Fluktuationen bilden die Grundlage für die gerichtete Rotation auf der Basis der beiden erstgenannten Eigenschaften. Ein negativ geladenes, unprotoniertes Proteolipid kann aufgrund des elektrostatischen Zwanges die Grenzfläche zur Untereinheit *a* nicht verlassen, daher bewegen sich die Fluktuationen des *c*-Oligomers in sehr engem Rahmen. Nur wenn der elektrostatische Zwang durch die Bindung eines Protons entfällt, kann sich das betreffende Proteolipid von der Untereinheit *a* entfernen und sich zusammen mit dem *c*-Oligomer in die entsprechende Richtung drehen. Dabei wird die Drehrichtung allein dadurch bestimmt, dass die Protonierungswahrscheinlichkeit vom Periplasma her aufgrund des höheren Protonenpotentials deutlich höher ist. In Abb. 2 ist also der linke Rest, der sich in Kontakt mit der Untereinheit *a* befindet, mit höherer Wahrscheinlichkeit protoniert als der rechte Rest und daher wird sich das in gelb dargestellte *c*-Oligomer nach links bewegen. Anders ausgedrückt zählt und vergleicht diese entropische Maschine die Anzahl der Protonen auf beiden Seiten der Membran (Junge *et al.*, 1997). Dabei sind Konzentrations- und Potentialunterschiede absolut gleichwertig.

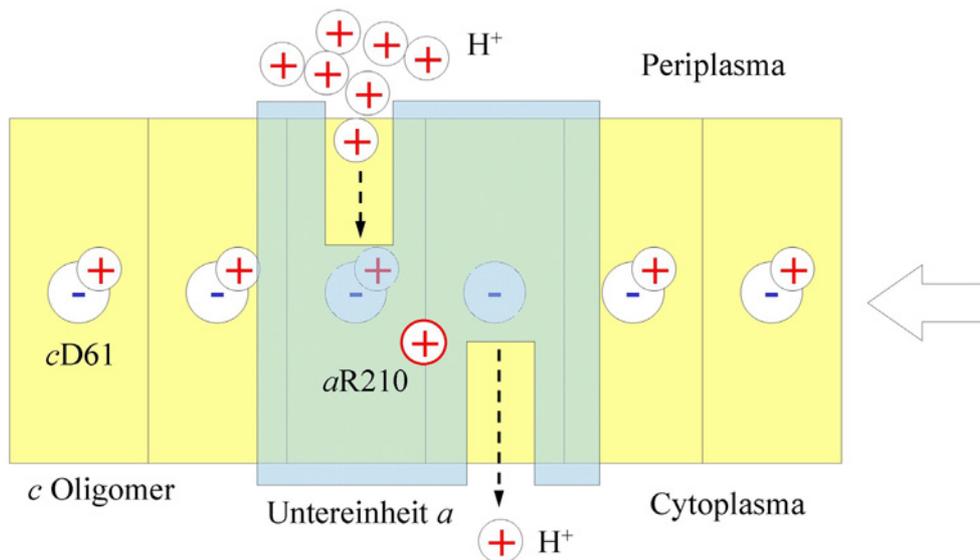


Abb. 2: Modell der Protonentranslokation von Junge *et al.* (1997)

Kaim *et al.* (1998) schließen aus Na^+ Bindungsstudien an der Na^+ translozierenden ATP-Synthase aus *P. modestum*, dass die Bindungstasche für Na^+ in der Untereinheit *c*, welche neben den Resten *cS66* und *cQ32* auch die Carboxylgruppe des Restes *cE65* beinhaltet (Kaim *et al.*, 1997), von der cytoplasmatischen Seite der Membran direkt zugänglich ist. Außerdem bindet Na^+ mit hoher Kooperativität an die Untereinheit *c*, was sich ebenfalls nur durch die simultane Zugänglichkeit mehrerer Bindungstaschen für Na^+ vom Cytoplasma aus erklären lässt (Dimroth *et al.*, 1998). Ein von Matthey *et al.* (1999) postuliertes Modell der Untereinheit *c* basierend auf NMR Untersuchungen, in dem die Na^+ Bindestelle auf der cytoplasmatischen Membranoberfläche liegt, wurde inzwischen durch Untersuchungen mit photoaktivierbarem Diazerin revidiert, nach denen die Na^+ Bindestelle wie auch im Modell für *E. coli* in der Mitte der Membran lokalisiert ist (Ballmoos *et al.*, 2001). Daher postulieren Dimroth *et al.* (1999) ein Modell mit nur einem Zugangskanal in der Untereinheit *a*, welcher das Periplasma mit der Na^+ Bindungstasche in der Untereinheit *c* verbindet und einem weiteren Zugangskanal in der Untereinheit *c*, welcher die Na^+ Bindestelle aus dem Cytoplasma heraus direkt zugänglich macht. Durch die Asymmetrie in der Untereinheit *a*, welche mit einem Teil des *c*-Oligomers in Kontakt steht, wird die Drehrichtung des *c*-Oligomers bestimmt. Ein hydrophiler Durchgang, der in Abb. 3 unterhalb des Restes *aR227* (homolog zu *aR210* in *E. coli*) dargestellt ist, erlaubt es der geladenen Carboxylgruppe der Na^+ Bindungstasche in die Grenzfläche zwischen den Untereinheiten *c* und *a* einzutreten, um dort über einen Kanal in der Untereinheit *a* aus dem Periplasma heraus mit Na^+ neutralisiert zu werden. Dadurch wird eine weitere Bewegung nach links über einen hydrophoben Abschnitt in der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten *a* und *c* (Abb. 3) ermöglicht.

Nachdem die Untereinheit *c* die Grenzfläche zur Untereinheit *a* verlassen hat, dissoziiert das Na^+ wieder aus seiner Bindungstasche, da es jetzt wieder direkt mit dem Cytoplasma im Gleichgewicht steht, wo die Na^+ Konzentration relativ niedrig ist. Dadurch erhält die Na^+ -Bindungstasche wieder ihre negative Ladung und eine Rückdrehung ist nicht mehr möglich.

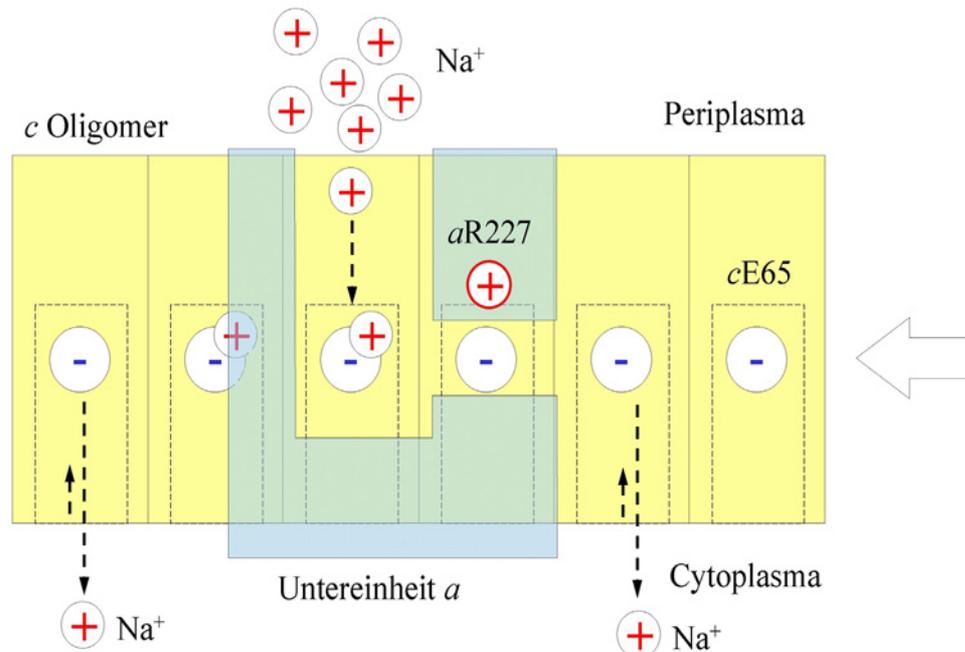


Abb. 3: Modell der Protonentranslokation nach Dimroth *et al.* (1998)

Gestützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass ein Austausch von radioaktivem $^{22}\text{Na}^+$ auch durch einen DCCD inhibierten Komplex möglich war (Kaim *et al.*, 1998). Während für die Erklärung dieses Austausches in dem Modell von Dimroth *et al.* (1999) nur eine geringfügige Bewegung des *c*-Oligomers relativ zur Untereinheit *a* ausreicht, müsste das *c*-Oligomer nach dem Modell von Junge *et al.* (1997) eine fast vollständige Drehung relativ zur Untereinheit *a* durchführen, was unter diesen Bedingungen nur schwer vorstellbar ist. Auch die Beobachtung, dass sich nur dann ein Na^+ im DCCD inhibierten Komplex an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten *c* und *a* einfangen ließ, wenn die Zugabe von Na^+ vor der Zugabe von ATP erfolgte, spricht für das Modell von Dimroth *et al.* (1999).

Grundlage des Modells von Rastogi & Girvin (1999) sind NMR Untersuchungen an der Untereinheit *c*, gelöst in Chloroform/Methanol/Wasser (4:4:1), bei pH 5 und pH 8, aus denen hervorgeht, dass sich die C-terminale Transmembranhelix nach Protonierung ihrer Carboxylgruppe gegenüber der ersten Transmembranhelix um 140° verdreht. Die Autoren

postulieren, dass durch sterische Interaktionen und Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Untereinheiten *a* und *c* die Drehung der C-terminalen Helix der Untereinheit *c* nach Protonierung an eine Rotation des gesamten *c*-Oligomers relativ zur Untereinheit *a* gekoppelt ist (Abb. 4).

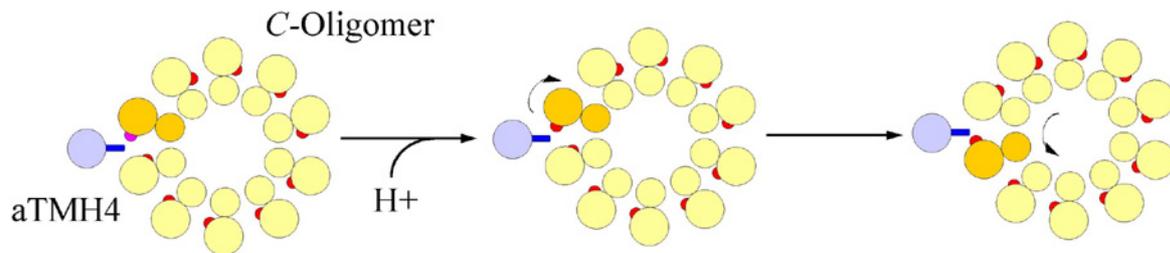


Abb. 4: Modell der Protonentranslokation nach Rastogi & Girvin (1999)

In allen Modellen ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der translozierten Protonen und der freiwerdenden Energie durch $\Delta G = n \times F \times \Delta p$ gegeben, wobei *n* für die Anzahl der translozierten Protonen, *F* für die Faraday Konstante und Δp für das Membranpotential steht. Das bedeutet, dass bei gegebenem Membranpotential und ATP/ADP Verhältnis die Stöchiometrie der Untereinheit *c* darüber entscheidet, in welche Richtung die Reaktion der ATP-Synthase abläuft.

1.1 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst die Etablierung einer neuen Rekonstitutionsmethode auf der Grundlage der Entfernung des Detergens mittels Bio-Beads. Die neue Methode sollte die Rekonstitution erheblich beschleunigen und die zu untersuchende Probe möglichst geringen Belastungen aussetzen, wie sie durch die alte Methode z.B. durch die wiederholte Beschallung und die lange Dialyse gegeben waren. Mit Hilfe der neuen Methode sollten die Auswirkungen einer Mutation auf dem Plasmid pRPG54 untersucht werden. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation in der TIR vor dem *atpE* Gen, welche zu einer erniedrigten Protein-Syntheserate dieses Gens führt. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob die Untereinheit *c* in einer invariablen Stöchiometrie in den ATP-Synthase-Komplex eingebaut wird und daher bei einer Erniedrigung der Syntheserate für diese Untereinheit freie *ab*-Subkomplexe auftreten, oder ob sich die vorhandenen *c*-Untereinheiten gleichmäßig auf alle ATP-Synthase-Komplexe verteilen und dadurch die Stöchiometrie der Untereinheit *c* von ihrer Syntheserate relativ zu den anderen Untereinheiten abhängt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Amersham-Pharmacia (Freiburg)	ECL-Hyperfilm
Anatrace (Maumi)	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
Avanti (Alabaster)	<i>E. coli</i> Lipidextrakt
Biomol (Hamburg)	Carbenicillin, Dithiothreitol, Dialysemembran Typ 8 PMSF
Bio-Rad (München)	vorgefärbter Proteinstandard (low range)
Boehringer (Mannheim)	Proteaseinhibitoren Complete™
DIFCO (Hamburg)	Fest- und Flüssigmedien
Eurogentec (Sevaing)	Agarose, DNA-Standard
Invitrogen (Groningen)	Proteinstandard
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Phosphatase
Pierce (Rockford)	SuperSignal®
QIAGEN (Hilden)	Qiaprep Spin Miniprep Kit
Schleicher & Schüll (Dassel)	Nitrocellulosemembran (0,45 μ m), Faltenfilter \varnothing 385 mm, Filtereinheit FP 30/0,2 CA-S
Serva Feinbiochemica (Heidelberg)	Acrylamid, <i>N</i> , <i>N'</i> -Methylenbisacrylamid, APS, Na- Cholat, DCCD
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Ampicillin, ATP, Chloramphenicol, Na-Desoxycholat, Gelatine, <i>n</i> -Octyl- β -D-glucopyranosid, Tris, Tricin, Valinomycin

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt) und Riedel-de Haën (Seelze) im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

TTFB wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. U. Schairer (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Antikörper

Primärantikörper (Verdünnung für Immunoblot/ELISA):

monoklonale Maus-Antikörper:	anti- <i>a</i> GDH 8-8B3	(G. Deckers-Hebestreit)
	(200 µg/ml / 500 µg/ml)	
	anti- <i>b</i> GDH 10-6D1	(G. Deckers-Hebestreit)
	(2 µg/ml / 200 µg/ml)	
	anti- <i>a</i> GDH 14-5C6	(G. Deckers-Hebestreit)
	(400 µg/ml)	
	anti- <i>c</i> GDH 9-2A2	(G. Deckers-Hebestreit)
	(50 µg/ml)	
polyklonale Kaninchen-Antikörper:	anti- <i>c</i> IgG ₆	
	Serum vom 16.02.88	(G. Deckers-Hebestreit)
	(1:10.000 / 1:10.000)	
	anti- <i>a</i> IgG ₆	
	Serum vom 29.05.91	(G. Deckers-Hebestreit)
	(1:10.000)	

Sekundärantikörper (Verdünnung Immunoblot/ELISA):

polyklonale Ziegen-Antikörper:	anti-Maus IgG HRP	(Amersham-Pharmacia,
	(1:10.000)	Freiburg)
	anti-Kaninchen IgG HRP	(Amersham-Pharmacia,
	(1:10.000)	Freiburg)
	anti-Maus IgG AP	(Pierce, Rockford)
	(1:5.000)	

2.2 Stämme und Plasmide

2.2.1 Stämme

DK8	<i>1100, ΔatpB-C, ilv::Tn10</i>	(Klionsky <i>et al.</i> , 1984)
DK6	<i>F⁻, ΔatpB-C, str^r, hsdR, minA, minB, purE, pdx, his, ilv, met</i>	(Klionsky <i>et al.</i> , 1984)
LE392Δ <i>atpI-C</i>	<i>F⁻, supF58, supE44, hsdR514, galK2, galT22, atpIBEFHAGDC, metB1, lacY1, trpR55</i>	(Angov & Brusilow, 1988)

2.2.2 Plasmide

Derivate von pACYC184 , 4,244 kb:

	DNA:	Protein:	
pRPG54	<i>atpI'BEFHAGDC, Cm^R</i>		(Gunsalus <i>et al.</i> , 1982)
pWSB30.0	<i>atpI'BEFHAGDC, Cm^R</i>		(Brusilow, 1987)

Derivate von pBR322, 4,361 kb:

	DNA:	Protein:	
pBWU13	<i>atpI'BEFHAGDC, Ap^R</i>		(Iwamoto <i>et al.</i> , 1991)
pIA1	<i>atpI'BEFHAGDC, Ap^R</i>		(diese Arbeit)
pBWU13NOC	<i>atpI'BEFHAGDC, Ap^R</i>	<i>cA21C, cM65C</i>	(diese Arbeit)
pIA1NOC	<i>atpI'BEFHAGDC, Ap^R</i>	<i>cA21C, cM65C</i>	(diese Arbeit)

2.3 Medien und Anzuchtbedingungen

2.3.1 Luria Bertani-Vollmedium (LB-Medium) (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Anzucht von *E. coli* LE392Δ*atpI-C* erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C mit Luria Bertani-Vollmedium (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach plasmidkodierter Resistenz wurde dem Medium Chloramphenicol (50 µg/ml) oder Ampicillin (50 µg/ml) zugesetzt.

2.3.2 Minimalmedium

(Tanaka *et al.*, 1967)

Für die Anzucht von *E. coli* DK8 und DK6 wurde das Minimalmedium nach Tanaka *et al.* (1967) verwendet. Zur Steigerung der Biosyntheserate der ATP Synthase wurde als Kohlenstoffquelle 0,5 % Glycerin eingesetzt. Folgende Supplemente wurden für das Wachstum auf Minimalmedium benötigt:

E. coli DK8 und DK6: je 50 µg/ml Isoleucin, Valin, Asparagin und Thymin
2 µg/ml Thiamin

2.3.3 Fermentation

Die Anzucht von *E. coli* LE392 Δ *atpI-C*/pRPG54 bzw. pWSB30.0 erfolgte in 30 bzw. 60 l LB-Medium. Der Fermenter (Braun, Melsungen) wurde mit 1 l Vorkultur auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die Zellen wuchsen bei 37 °C, bis die Wachstumskurve eine Verringerung der maximalen Teilungsrate anzeigte. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit einem Pellicon Filtrationssystem (Millipore, Bedford) auf ein Volumen von ca. 4 l konzentriert, 20 min bei 8700 x g zentrifugiert und anschließend sofort bei -80 °C eingefroren.

Die Anzucht von *E. coli* DK8/pBWU13, pIA1, pBWU13NOC und pIA1NOC erfolgte in 100 l Tanaka-Minimalmedium und wurde analog durchgeführt.

2.4 Restriktion, Modifikation und elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die *in vitro* Modifikationen von Plasmid DNA wie Restriktion und Ligation erfolgten gemäß den Angaben der Hersteller. Die Ligation wurde entweder mit T4-DNA-Ligase oder dem TaKaRa DNA Ligation Kit (Biomedicals) durchgeführt. Die analytische und präparative Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte je nach Fragmentgröße in 0,7 - 1,5 % Agarosegelen in TAE Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Die anschließende Isolierung von DNA Fragmenten wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Beurteilung der Gesamtausbeute erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

2.5 Klonierung des Plasmids pIA1

Um die Mutation in der TIR vor *atpE* von pRPG54 auf pBWU13 zu übertragen, wurden beide Plasmide an den Restriktionsschnittstellen *Sph*I und *Pf*MI geschnitten. Anschließend wurde das gereinigte große Vektorfragment (8672 bp) aus pBWU13 mit dem kleinen *atpE* Fragment aus pRPG54 mit T4-DNA-Ligase ligiert. Die Kontrolle des resultierenden Plasmids pIA1 erfolgte durch Vergleich der *Alw*26/1 Schnittstellen, von denen in pIA1, bedingt durch die Mutation in der TIR vor *atpE*, eine fehlt.

2.6 Klonierung der Plasmide pBWU13NOC und pIA1NOC

Die Konstruktion von pBWU13NOC erfolgte durch Ligation eines 2350 bp *Hind*III/*Sph*I Fragments aus pNOC (Jones *et. al.*, 1998) mit einem 8405 bp *Hind*III/*Sph*I Fragment aus pBWU13. Die Konstruktion von pRPG54NOC erfolgte durch Ligation eines 1290 bp *Bsr*GI/*Afl*II Fragments aus pNOC mit einem 11911 bp *Bsr*GI/*Afl*II Fragment aus pRPG54. Aus pRPG54NOC wurde schließlich ein 2048 bp *Pf*MI/*Sph*I Fragment ausgeschnitten und mit einem 8672 bp *Pf*MI/*Sph*I Fragment aus pBWU13 ligiert, woraus das Plasmid pIA1NOC entstand. Sämtliche Ligationen für diese Klonierung wurden mit dem TaKaRa DNA Ligation Kit (Biomedicals) durchgeführt.

2.7 Präparation von F₀

(Schneider & Altendorf, 1984)

Puffer 1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	MgCl ₂
Puffer 2	10 mM	Tris/NaOH pH 7,5
	10 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
Puffer 3	1 mM	Tris/HCl pH 7,5
	0,5 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
Puffer 7	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
	0,1 mM	PMSF
	0,1 mM	DTT
Puffer K	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	10 % (v/v)	Glycerin
	0,2 mM	PMSF
	1 % (w/v)	Na-Cholat

Zunächst wurden ca. 50 g eingefrorene Zellen zerkleinert und in 250 ml Puffer 1 homogenisiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 11.600 x g wurde das Zellpellet mit einem Homogenisator erneut in 200 ml Puffer 1 homogenisiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNase wurden die Zellen 10 min auf Eis gerührt, so dass sie anschließend in der Ribi-Press (SORVALL[®] Ribi Cell Fractionator Model RF-1) bei 138 x 10⁶ Pa (20.000 psi) und 5 - 10 °C aufgeschlossen werden konnten. Die anschließende Zentrifugation von 30 min bei 26.200 x g diente der Trennung der Membranen von Zelltrümmern und ganzen Zellen. Die im Überstand befindlichen Membranen wurden anschließend in einer Ultrazentrifuge für 90 min bei 180.000 x g pelletiert. Danach wurde das Membranpellet in 125 ml Puffer 2 resuspendiert und erneut zentrifugiert (90 min, 180.000 x g). Um die F₁-Komplexe von den Membranen zu trennen, wurden die Membranen jetzt in 150 ml Puffer 3 resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde die Messung der ATPase-Aktivität der

invertierten Membranvesikel durchgeführt (Kap. 2.13). Zur möglichst vollständigen Entfernung der F_1 -Komplexe erfolgte danach eine dreimalige Wiederholung von Zentrifugation (90 min, 180.000 x g), Homogenisation in 125 ml Puffer 3 und Rühren für 60 min bei Raumtemperatur. Nach der dritten Zentrifugation erfolgte eine Homogenisation in ca. 20 ml Puffer 7. Die Membranen wurden nach diesem Schritt bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die Ablösung der F_1 -Komplexe wurde durch Messung der ATPase-Aktivität in den jeweiligen Pellets und Überständen kontrolliert. Dabei sollte nach dem letzten Ablöseschritt eine Restaktivität von ca. 1 % der ursprünglich vorhandenen Aktivität erreicht werden. Für die weitere Verarbeitung wurden die Membranen aufgetaut und in Puffer 7 auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. Nach der Zugabe von 0,1 % DOC und Rühren für 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 90 min bei 180.000 x g. Die DOC Behandlung wurde nochmals wiederholt und die Membranen anschließend in ca. 8 ml Puffer 7 resuspendiert. Danach konnten die Membranen zur Lagerung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren werden. In der Regel wurden sie jedoch zur sofortigen Weiterverarbeitung mit Puffer 7 auf 20 mg/ml verdünnt. Die Solubilisierung der F_0 -Komplexe erfolgte durch Zugabe von 10 % Ammoniumsulfat (pH 8,0 mit NH_3 eingestellt), 0,5 % Na-Cholat und 1,5 % Octylglycosid. Der Ansatz wurde danach 20 min auf Eis gerührt. Anschließend wurden die Membranbestandteile durch eine Zentrifugation für 60 min bei 180.000 x g entfernt und das Membranpellet verworfen. Die F_0 -Komplexe im Überstand wurden durch die Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 35 % gefällt. Dabei wurde gesättigte Ammoniumsulfatlösung langsam und tropfenweise zugegeben. Nachdem der Ansatz bis zur vollständigen Präzipitation 20 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gestanden hatte, erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 29.900 x g. Das Pellet wurde anschließend mit einer Hamilton-Spritze in ca. 500 μl Puffer K resuspendiert, in 50 μl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zuletzt erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts der Präparation.

Zur eindeutigen Identifizierung wurden alle Präparationen mit Plasmidnummer, Nummer der Fermentation und Nummer der Präparation aus dieser Fermentation versehen. So bezeichnet 13/III/I- F_0 z.B. die Präparation Nr. I aus einem Stamm mit dem Plasmid pBWU13, der in der Fermentation 13/III angezogen wurde. Wird hingegen auf alle Präparationen aus einem bestimmten Plasmid Bezug genommen, werden diese nur mit der Plasmidnummer benannt. Die Angabe pRPG54- F_0 bezeichnet z.B. alle Präparationen, die aus einem Stamm mit dem Plasmid pRPG54 kommen. Sind allgemein F_0 -Präparationen aus Zellen mit Wildtyp-Plasmid gemeint, werden sie mit (TIR-WT)- F_0 bezeichnet, während Präparationen aus Zellen mit Plasmiden, welche die Mutation in der TIR tragen, mit (TIR-Mut)- F_0 angesprochen werden.

2.8 Präparation von F_0F_1

(Friedl & Schairer, 1986)

Die Präparation von F_0F_1 wurde nach der Vorschrift von Friedel & Schairer (1986) durchgeführt.

2.9 Präparation von F_1

(Wise, 1990)

Puffer W1:

100 mM TES-NaOH pH 7,0
40 mM 6-Aminohexanonsäure
20 mM Mg-Acetat
6 mM 4-Aminobezamidin
0,25 mM EGTA
250 mM Saccharose

Puffer W2:

100 mM TES, pH 7,0
40 mM 6-Aminohexanonsäure
20 mM Mg-Acetat
6 mM 4-Aminobezamidin
0,25 mM EGTA

Puffer W3:

50 mM TES pH 7,0
5 % (v/v) Glycerin
40 mM 6-Aminohexanonsäure
6 mM 4-Aminobenzamidin
1 mM EDTA
0,5 mM DTT

Puffer W4:

5 mM TES pH 7,0
5 % (v/v) Glycerin
40 mM 6-Aminohexanonsäure
6 mM 4-Aminobenzamidin

Puffer W5:

5 mM TES, pH 7,0
5 % (v/v) Glycerin
40 mM 6-Aminohexanonsäure
1 mM EDTA
0,5 mM DTT

Puffer WB :

50 mM Tris-HCl, pH 7,4
10 % Methanol
40 mM 6-Aminohexanonsäure
2 mM EDTA
1 mM ATP
1 mM DTT
500 mM Na₂SO₄

Puffer WA:

50 mM Tris-HCl, pH 7,4
10 % Methanol
40 mM 6-Aminohexanonsäure
2 mM EDTA
1 mM ATP
1 mM DTT

25 g Zellen DK8/pBWU13 wurden in 100 ml Puffer W1 resuspendiert und nach Zugabe einer Spatelspitze DNase und 1 mM PMSF in der Ribipresse bei 20.000 psi durch zweimalige Passage aufgeschlossen. Das Volumen des Überstandes der anschließenden Zentrifugation von 30 min bei 30.000 x g wurde mit Puffer W2 verdoppelt und anschließend für 1 h bei 227.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit den Puffern W3 und W4 gewaschen und anschließend einer F₁ Ablösung mit 150 ml Puffer W5 unterzogen. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation von 1 h bei 227.000 x g wurde der F₁-haltige Überstand mit drei Protease Mix Tabletten (Boehringer) versetzt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde der Überstand auf eine TSK-DEAE Säule (Toyopearl 650 S, TOSOH, Japan) aufgetragen und mit Puffer WA äquilibriert. Die anschließende Elution des Proteins erfolgte durch Mischung von Puffer WA mit 15 % Puffer WB. Zur Konzentration des gereinigten F₁ wurde es noch mit 50 % Ammoniumsulfat gefällt und in Puffer WB resuspendiert.

2.10 Präparation von gereinigter Untereinheit c

(Altendorf *et al.*, 1979; Fillingame, 1976)

50 g Zellen DK8/pBWU13 wurden bei 4 °C in 800 ml Chloroform/Methanol (2:1) aufgetaut, homogenisiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte Probe mit einem Faltenfilter filtriert, mit 0,2 Volumenanteilen Wasser aufgefüllt und anschließend vorsichtig durchmischt. Während der anschließenden Inkubation über Nacht erfolgte eine Phasentrennung. Nach Erwärmung der Probe auf Raumtemperatur wurde die wässrige Oberphase abgesaugt und das Volumen der Unterphase mit Chloroform verdoppelt.

Anschließend wurde tropfenweise so lange Methanol zugegeben, bis die zunächst trübe Suspension klar wurde. Nach dem Eindampfen im Rotationsverdampfer bis zur völligen Trocknung erfolgte die Aufnahme des Pellets in 20 ml Chloroform/Methanol (2:1).

Anschließend wurde die Probe auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und zur Fällung mit dem fünffachen Volumen Diethylether bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei $1900 \times g$ wurde das Pellet erneut in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen, mit dem fünffachen Volumen Diethylether bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ versetzt und wiederum über Nacht gefällt. Für die anschließende Chromatographie wurde das Pellet nach 30minütiger Zentrifugation bei $1900 \times g$ wieder in 20 ml Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und auf Raumtemperatur erwärmt.

Die CM23-Cellulose Säule (320 x 13 mm) war mit Chloroform/Methanol (2:1) äquilibriert und lief hydrostatisch mit ca. 0,5 ml/min. Nach dem Auftrag der Probe wurde der Durchlauf mit den Lipiden abgewartet, um dann auf Chloroform/Methanol (1:1) zu wechseln. Die Elution des Proteins erfolgte nach einem Wechsel auf Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1).

2.11 Rekonstitution von F_0 in Liposomen

2.11.1 Herstellung vorgeformter Liposomen

(Rigaud *et al.*, 1995)

Puffer H (pH 7,0):	61,5 mM	K_2HPO_4
	38,5 mM	KH_2PO_4
	2 mM	β -Mercaptoethanol

10 ml *E. coli* Lipid (20 mg/ml, Avanti Nr. 100600) gelöst in Chloroform wurden in einem mit Aluminiumfolie umwickelten 150 ml Becherglas unter Argon so lange gerührt, bis das Lösungsmittel verdampft war (ca. 30 min). Dann erfolgte die Zugabe von 8 ml Puffer H mit 1,5 % Octylglycosid. Anschließend wurde so lange gerührt, bis das Lipid vollständig gelöst war (ca. 2,5 h). Zur Entfernung des Detergens wurde die Probe 24 h gegen 100faches Volumen Puffer H dialysiert (Dialyseschlauch SERVAPOR, \varnothing 16 mm, MWCO 12-14 kDa), wobei der Puffer dreimal gewechselt wurde. Die Lagerung der fertigen Liposomen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.11.2 Herstellung vorgeformter Liposomen mit gereinigter Untereinheit c

Für die Herstellung vorgeformter Liposomen mit gereinigter Untereinheit *c* wurden 10 ml *E. coli* Lipid (20 mg/ml, Avanti Nr. 100600) gelöst in Chloroform mit 1920 µg gereinigter Untereinheit *c* (Kap. 2.10) (0,24 µg *c* / µl Liposomen, bzw. *c* / Lipid = 1:104) versetzt. Die weitere Präparation erfolgte analog zu Kap. 2.11.1.

2.11.3 Rekonstitution

(Rigaud *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1986)

Für jeden Rekonstitutionsansatz wurden 150 µl vorgeformte Liposomen (Kap. 2.11.1) zunächst mit 400 nm extrudiert (20 Passagen durch das Filter) und anschließend mit 60 µl einer 10 %igen Triton X-100 Lösung in Puffer H versetzt, wobei die ursprüngliche Trübung der Liposomensuspension vollständig verschwand. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge an F_0 wurde der Ansatz mit Puffer H (Kap. 2.11.1) auf 300 µl aufgefüllt, so dass das zugegebene Triton X-100 eine Endkonzentration von 2 % hatte. Danach wurde der Ansatz für 10 min auf einer Wippe bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte nach weiteren dreimal 30 und einmal 60 min die Zugabe von 10, 10, 20 und 60 mg Bio-Beads (SM-2 Bio-Rad). In der Zwischenzeit wurde weiterhin bei 30 °C auf einer Wippe inkubiert. Um Verluste zu vermeiden, wurden die Ansätze vor der Zugabe von BioBeads jeweils kurz zentrifugiert. Zur Trennung der Liposomen von den BioBeads nach der Rekonstitution dienten flachgedrückte Pro/Elec Pipettenspitzen von Bio-Rad. Die fertigen Proteoliposomen wurden bis zur Messung ausschließlich bei Raumtemperatur gelagert. Vor ihrer Verwendung wurden die Bio-Beads nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) mit Methanol gewaschen und dann in destilliertem Wasser gelagert.

2.12 Bestimmung der Protonentranslokation

2.12.1 Messung der Protonentranslokation

(Schneider & Altendorf, 1982)

1950 µl Messpuffer und 50 µl Rekonstitutionsansatz wurden in einer 2 ml Glasküvette vereinigt und mit einem speziellen Teflonrührblock (Stir Bar Z36,354-5, Sigma, Deisenhofen) ständig durchmischt. Das Kaliumdiffusionspotenzial wurde durch Zugabe von 1 µM

Valinomycin initialisiert, das TTFB Signal durch Zugabe von 200 nM TTFB und die anschließende Eichung erfolgte durch dreimalige Zugabe von 5 µl einer 1 mM HCl Lösung.

2.12.2 Datenerfassung und Auswertung

Das pH Signal wurde mit einer an ein PHM93 (Radiometer) angeschlossenen pH Elektrode (Mettler Toledo InLab 422, Mettler, Steinbach/Ts.) gemessen und über eine an den Analoganschluss des PHM93 angeschlossene Digitalisierungseinheit (DataLogger) in Echtzeit digitalisiert und gespeichert. Nach der Messung wurden die Daten aus dem DataLogger als ASCII Tabelle über die serielle Schnittstelle durch das Programm prt17.bas auf einem PC gespeichert. Das Programm ptr17.bas diente außerdem zur graphischen Darstellung der Kurven, wobei auch zwei beliebige Kurven gleichzeitig dargestellt werden konnten. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kurven von prt17.bas vor der graphischen Darstellung automatisch entdriftet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Hierfür wurden die Messwerte in ein speziell für diesen Zweck vorbereitetes Formblatt importiert, die Drift des Messsignals ermittelt und abgezogen und dann die ersten 15 s des Protonentranslokationssignals numerisch an die Formel $V_{(t)} = V_f - (V_f - V_i) \times e^{-k(t - t_0)}$ (Dmitriev *et al.*, 1995) angepasst. Die Exponentialkurve beschreibt mit ihren Variablen $V_{(t)}$ (Messsignal zum Zeitpunkt t), V_f (Messsignal zum Zeitpunkt $t = \infty$), V_i (Messsignal zum Zeitpunkt $t = t_0$) den theoretischen Verlauf der pH-Änderung, so dass durch Berechnung der ersten Ableitung im Punkt $t = t_0$ die Steigung der Exponentialfunktion und somit die Protonentranslokation ermittelt werden kann.

2.13 Bindung von F_1 an F_0 -Proteoliposomen und Messung der ATPase Aktivität

(Steffens *et al.*, 1984; Arnold *et al.*, 1976)

F_1 Bindepuffer:	50 mM	Tricin/NaOH pH 8,0
	2 mM	MgSO ₄
	2 mM	DTT

100 µl Proteoliposomen und 48 µg gereinigtes F_1 wurden direkt in ein TFT70.13-Röhrchen (Kontron) gegeben und mit F_1 Bindepuffer auf 1 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde

anschließend 25 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, mit F₁ Bindepuffer aufgefüllt und 30 min bei 85.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in F₁ Bindepuffer resuspendiert und das Röhrchen aufgefüllt, worauf eine zweite 30minütige Zentrifugation bei 85.000 x g erfolgte. Danach wurde das Pellet wieder in F₁ Bindepuffer resuspendiert und auf 100 µl aufgefüllt. Für die anschließende Messung der ATPase Aktivität wurden in der Regel 20 µl dieser Liposomensuspension eingesetzt, sie erfolgte nach der automatisierten Methode von Arnold *et al.* (1976).

2.14 Toluol/Ether Fällung

50-100 µl Proteoliposomen oder Membranen wurden mit 1 ml Methanol versetzt und in der Kühlzentrifuge bei 25.000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Erhaltene Sediment wurde im Speed Vac Concentrator (Savant) getrocknet, in 1 ml Toluol/Ether (2:1) (v/v) aufgenommen, im Ultraschallbad gelöst und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederum getrocknet, in Probenaufgabepuffer im Ultraschallbad gelöst und die erhaltenen Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel Getrennt

2.15 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte nach der Methode von Dulley & Grieve (1975) oder mit dem BCA™-Kit der Firma Pierce/KMF (St. Augustin). Als Standardprotein zur Erstellung einer Eichreihe wurde BSA (20-100 µg) eingesetzt.

2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen erfolgte entweder mittels 10 % SDS-Polyacrylamidgelen nach Schagger & Jagow (1987) oder durch 7,5-17,5 % bzw. 10-20 % SDS-Polyacrylamidgelen nach Douglas *et al.* (1979). Die getrennten Proteine wurden hierauf einer Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 1986), einer Immunoblotanalyse (Kap. 2.17) oder einer Färbung mit Sypro Ruby™ (Bio-Rad, Kap. 2.19) unterzogen.

2.17 Immunoblotanalyse

(Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1986)

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose wurde gemäß Deckers-Hebestreit & Altendorf (1986) durchgeführt. Eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran erfolgte durch Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,9 % (w/v) NaCl). Anschließend schloss sich die Inkubation der Membran mit dem in TBS + 5 % (w/v) Magermilch verdünnten Primärantikörper (Kap. 2.1.1), entweder über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei 37 °C an. Nach der Entfernung ungebundener Antikörper durch mehrfaches Waschen der Membran in TBS erfolgte der Nachweis der Primärantikörper mit entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (Verdünnung 1:10⁴ in TBS + 5 % (w/v) Magermilchpulver). Die Antikörperbindung wurde schließlich unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Kits (SuperSignal[®], Pierce, Rockford) nach Angaben des Herstellers und Exposition der Membran auf ECL-Hyperfilm (Amersham-Pharmacia, Freiburg) detektiert. Alternativ zur Detektion mit SuperSignal[®] erfolgte der Nachweis mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern nach der Methode von Blake *et al.* (1984). Für die Quantifizierung von Immunoblots wurden die entwickelten Hyperfilm[™] ECL[™] auf einem Fluor-S[™] MultiImager (Bio-Rad, München) eingescannt und mit der Software Quantity One[™] (Bio-Rad) ausgewertet.

2.18 Quantifizierung mittels ¹²⁵I Protein A

Quenchpuffer:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	0,9 % (w/v)	NaCl
	5 % (w/v)	Magermilchpulver

Für die Quantifizierung der Untereinheiten *a* und *c* wurden die F₀ Präparationen 30/III/I und 54/VI/I in verschiedenen Mengen auf ein 10 % Schagger Glycerin Gel aufgetragen und nach dem Gellauf per Nassblot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Sowohl der primäre Antikörper als auch das radioaktive ¹²⁵I Protein A (1:5.000, 1,2 µCi) wurden anschließend für eine Stunde bei 37 °C in Quenchpuffer auf einer Wippe inkubiert. Die Inkubation des Phosphorscreens (Amersham-Pharmacia, Freiburg) erfolgte für ca. 60-90 Stunden. Anschließend wurde der Phosphorscreen an einem PhosphorImager SI[™] (Amersham-

Pharmacia, Freiburg) eingescannt und mit der Software ImageQuaNT™ (Amersham-Pharmacia, Freiburg) ausgewertet.

2.19 Quantifizierung mittels Sypro Ruby

Für die direkte Quantifizierung der Untereinheiten *a*, *b* und *c* wurden die Gele zunächst mit Sypro Ruby (Bio-Rad) gemäß den Angaben des Herstellers gefärbt und anschließend auf einem Fluor-S™ MultiImager (Bio-Rad, München) eingescannt und mit der Software Quantity One™ ausgewertet.

2.20 Minizellmarkierung mit ³⁵S-Methionin

2.20.1 Präparation der Minizellen (Reeve, 1984)

Der Minizellen bildende Stamm DK6 wurde mit den Plasmiden pRPG54 und pWSB30.0 transformiert und dann bis ca. $OD_{578} = 2,5$ in LB Medium mit 50 µg/ml Chloramphenicol angezogen. Je 750 ml dieser Kulturen wurden in Eiswasser abgekühlt und 10 min bei 11.500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 5 ml Überstand aufgenommen und anschließend auf einen Sucrosegradienten aufgetragen und 20 min bei 3.800 x g zentrifugiert. Der Mittelteil der Minizellbande wurde danach abgenommen und 10 min bei 19.700 x g zentrifugiert. Vor der zweiten Sucrosegradientenzentrifugation erfolgte eine Aufnahme des Pellets in 5 ml schwefelfreiem M9 Medium (Difco). Anschließend wurden die Minizellen in 2,5 ml M9 Medium aufgenommen, nochmals 10 min bei 13.700 x g zentrifugiert und anschließend zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff in 800 µl M9 Medium mit 30 % Glycerin resuspendiert.

2.20.2 Markierung der Minizellen (Reeve, 1984)

Je 100 µl Minizellen wurden 1:10 in M9 Medium mit 0,4 % Glucose und 0,02 mg/ml D-Cycloserin verdünnt, 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und anschließend wieder in 100 µl M9 Medium mit 0,4 % Glucose und 0,02 mg/ml D-Cycloserin resuspendiert. Nach einer

30minütigen Inkubation bei 37 °C unter Schütteln erfolgte die Zugabe von 8 µl ³⁵S-Methionin (80 µCi), gefolgt von einer weiteren 30sekündigen Inkubation bei 37 °C (pulse). Danach wurden die Zellen mit 10 µl Methionin (0,1 M) versetzt und nach 0, 15, 60 min, bzw. 24 h (chase) 2 min bei 10.000 x g abzentrifugiert und in 30 µl Probenpuffer aufgenommen. Die anschließende Auftrennung erfolgte auf einem 10-20 % SDS-Polyacrylamidgele nach Douglas. Für die Quantifizierung wurden die Gele zunächst getrocknet und dann auf einem Phosphorscreen (Molecular Dynamics) für ca. 5 h exponiert. Anschließend wurde der Phosphorscreen an einem Phosphoimager SI™ eingescannt und mit der Software ImageQuaNT™ ausgewertet.

2.21 ELISA

(Jäger *et al.*, 1998)

Carbonat Puffer:	50 mM	Na-Carbonat pH 9,6
TBS:	50 mM	Tris/HCl pH 7,8
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
TMB Lösung:	1 %	TMB in DMSO
Substratlösung:	100 mM	Na-Citrat pH 6,0
	0,63 %	TMB Lösung
	0,0026 %	H ₂ O ₂

Mikrotiterplatten des Typs Maxisorp II Nr. 442404 (Nunc, Wiesbaden) wurden zunächst über Nacht bei 4 °C mit je 100 µl in Carbonat Puffer verdünnter F₀ Präparation beschichtet. Ungebundenes F₀ wurde durch viermaliges Waschen mit H₂O entfernt und anschließend die verbleibenden Bindungsstellen durch Inkubation mit 200 µl TBS + 0,5 % (w/v) Gelatine für 2 h bei 37 °C abgesättigt. Die Inkubation mit je 100 µl der in TBS + 0,2 % (w/v) Gelatine verdünnten Primärantikörper (Kap. 2.1.1) erfolgte über Nacht bei 4 °C, die des entsprechenden Sekundärantikörpers (Kap. 2.1.1) in TBS + 0,2 % (w/v) Gelatine für 1 h bei 37 °C. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Mikrotiterplatten intensiv mit TBS gewaschen. Die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers erfolgte durch Zugabe von 100 µl Substratlösung. Die blaue Farbreaktion wurde nach 15-45 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe von 100 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt (Farbumschlag von blau nach gelb). Die Absorption als Maß für die Bindung des Primärantikörpers konnte im Mikrotiterplatten-Photometer (SLT, Crailsheim) bei 450 nm bestimmt werden.

2.22 Reinigung von *E. coli* Lipid (Avanti)

(Altendorf *et al.*, 1979; Fillingame, 1976)

5 ml *E. coli* Lipid (Avanti Nr.100600 20 mg/ml in Chloroform Lot# 53 und 56) wurden mit 2,5 ml Methanol versetzt und direkt auf eine CM23 Cellulose Säule (12,5 x 1 cm) aufgetragen. Die Elution des Lipids erfolgte hydrostatisch mit Chloroform:Methanol 2:1. Nach dem Lipidpeak wurde auf Chloroform:Methanol 1:1 und anschließend auf Chloroform:Methanol:Wasser 5:5:1 gewechselt. Zum Abschluss wurde noch gebundenes Protein durch Anlegen eines Ammoniumacetatgradienten von 0-100 mM eluiert.

2.23 Phosphatbestimmung nach Ames

(Ames, 1966)

Die Ermittlung der Konzentration an Phospholipiden in Fraktionen vor und nach der Reinigung von *E. coli* Lipid (Avanti) (Kap. 2.22) erfolgte nach dem Protokoll von Ames (1966).

2.24 Fettsäureextraktion und qualitative Analyse

(Sasser, 1990)

Die Fettsäureextraktion wurde auf Avanti-Lipide und gereinigte Avanti-Lipide angewandt, dabei wurden 1-5 mg Lipid mit NaOH-Lösung verseift. Anschließend wurden die Fettsäuren in HCL methyliert und mit Hexan aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Fettsäuremethylester in der organischen Phase wurden bis zur gaschromatographischen Analyse bei -20 °C gelagert. Die Identifizierung erfolgte über Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS; GC 5890 Series II Plus, MS 5972 Series, Hewlett Packard, Böblingen). Die Fettsäuremethylester wurden dabei zunächst gaschromatographisch getrennt und anschließend im Massenspektrometer jeweils in Bruchstücke mit charakteristischen Massen zerlegt. Die Bedingungen des GC-MS wurden nach Lipski (1995) festgelegt. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit André Lipski und Michèle Friedrich durchgeführt.

2.25 Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide

(Minnikin *et al.*, 1984)

Zur Analyse der polaren Lipide wurde eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Proben wurden jeweils punktförmig mit einer Glaskapillare auf eine DC-Platte (Kieselgel 60, Format 10 x 10 cm) aufgetragen und getrocknet. Die Chromatographie in der ersten Dimension erfolgte in Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4, v/v) für ca. 30 min. Nach dem Trocknen der Platte (20 min) bei RT erfolgte die Chromatographie in der zweiten Dimension für weitere 30 min in Chloroform/Essigsäure/Methanol/H₂O (80:15:12:4, v/v). Nach dem Trocknen wurden die unterschiedlichen polaren Lipide mit der Ninhydrin-Färbung nachgewiesen. Dazu wurden die Platten mit Ninhydrinlösung besprüht und für ca. 5 min auf 100 °C erhitzt.

2.26 Quervernetzung der Untereinheit c

2.26.1 Quervernetzung der Untereinheit c auf Membranebene

(Jones *et al.*, 1998)

DK8/pBWU13NOC (WT, *cA21C*, *cM65C*) und DK8/pIA1NOC (Mut, *cA21C*, *cM65C*) wurden in Minimalmedium nach Tanaka mit Glycerin als Kohlenstoffquelle bis OD₅₇₈ 0,8 gezogen und anschließend 30 min bei 9000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in TMG Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 5 mM MgSO₄ 10 % Glycerin) gewaschen und anschließend in 50 ml TMG resuspendiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von DNase in der Ribis-Pressen bei 20.000 psi aufgeschlossen und für 30 min bei 20.000 x g pelletiert. Die Membranen im Überstand wurden bei 200.000 x g in 60 min pelletiert und in ca. 200 µl TMG resuspendiert.

Von den oben beschriebenen Membranen wurden jeweils 500 µg auf ein Volumen von 50 µl in TMG Puffer gebracht und anschließend mit 50 µl Cu(II)-(1,10-phenanthrolin)₂ auf eine Endkonzentration von 3 mM eingestellt. Die Reaktion erfolgte bei 23 °C und wurde nach einer Stunde durch die Zugabe von 10 µl 500 mM EDTA und 5,5 µl 500 mM NEM beendet. Zur Kontrolle erfolgte die Zugabe von EDTA und NEM bei zwei Proben vor dem Zusatz von Cu(II)-(1,10-phenanthrolin)₂. Hierdurch sollte geklärt werden, ob nach dem Beenden der Reaktion noch Quervernetzungen im denaturierten System nach der Probenvorbereitung für das SDS-Gel auftreten.

Das Trenngel des 10 % SDS-Polyacrylamidgels nach Schagger & Jagow (1987) polymerisierte nach dem Gießen über Nacht bei Raumtemperatur und wurde erst ca. 2 h vor

dem Gellauf mit dem Sammelgel überschichtet. Das Gel wurde nach dem Lauf im Nassblotverfahren über Nacht bei 200 mA geblottet. Zur Detektion der Untereinheit *c* wurde der Blot eine Stunde lang mit dem monoklonalen Antikörper GDH 9-2A2 (Kap. 2.1.1) bei 37 °C inkubiert.

2.26.2 Quervernetzung der Untereinheit *c* auf Liposomenebene

(Jiang *et al.*, 2001)

Nach der Rekonstitution (Kap. 2.11.3) wurden die fertigen Proteoliposomen mit 100 µM I₂ (in 100 mM Kaliumphosphat Puffer) versetzt und eine Stunde bei 22 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Proteoliposomen 30 min bei 100.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet direkt in Probenaufgabepuffer resuspendiert. Für den folgenden Gellauf wurden die besten Ergebnisse mit 10 % SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger & Jagow (1987) erzielt. Nach dem Nassblot erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Antikörper GDH 9-2A2 (Kap. 2.1.1) in Quencherpuffer (Kap. 2.17) bei 37 °C. Die ebenfalls einstündige Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte bei Raumtemperatur. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit dem SuperSignal[®] Kit von Pierce durchgeführt. Danach folgte noch eine weitere einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem durch alkalische Phosphatase markierten sekundären Antikörper, nach deren Ende der Blot nach dem Protokoll von Blake *et al.* (1984) (Kap. 2.17) entwickelt werden konnte.

2.27 Gefrierbruchuntersuchungen

(H. Lünsdorf, pers. Mitteilung)

Die Rekonstitution für die Gefrierbruchuntersuchungen erfolgte wie in Kap. 2.11.3 beschrieben. Die einzige Änderung bestand in der Erhöhung des F₀ Gehalts in den Liposomen, da sich gezeigt hatte, dass bei den Mengen, die für die Protonentranslokation optimal sind, zu wenige Partikel ausgewertet werden konnten. Die Konzentration der F₀-Komplexe für die Gefrierbruchuntersuchungen wurde daher um einen Faktor 30 höher gewählt. Nach der Rekonstitution, die grundsätzlich in Osnabrück durchgeführt wurde, erfolgte die Extrusion der Liposomen mit einem Extruder mit 400 nm Porenweite. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgte an der GBF in Braunschweig zusammen mit Dr. Heinrich Lünsdorf. Für die Aufnahmen im EM wurden ca. 0,5 µl Liposomen zwischen zwei Deckgläschen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurden die Deckgläschen

voneinander getrennt und ihre mit Liposomen besetzten Oberflächen zunächst mit Kohlenstoff und dann zur Kontrastierung mit Platin bedampft. Die Replica wurden anschließend auf einen Objektträger transferiert und geeignete Bereiche unter dem Elektronenmikroskop bei ca. 20.000 bis 50.000facher Vergrößerung fotografiert.

Für die Auswertung wurden die Fotos von Dr. Lünsdorf nachträglich digitalisiert und dann für jedes Partikel unter Berücksichtigung von Ausrichtung und Kontrastierung ein maximaler Durchmesser ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der einzelnen Untereinheiten in F_o Präparationen

Zur Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse der Untereinheit *c* im F_o Teil der ATP-Synthase von *Escherichia coli* wurde ein quantitativer und physiologischer Vergleich zwischen dem Wildtyp (WT) und einer Mutante (Mut) durchgeführt. Bei der Mutation handelt es sich um einen einzelnen Basenaustausch in der Translationsinitiationsregion (TIR) vor dem *atpE*-Gen, welches für die Untereinheit *c* codiert, bei der in vorausgehenden Arbeiten festgestellt worden war, dass die im F_oF₁-Komplex assemblierte Menge an Untereinheit *c* durch diese Mutation um den Faktor zwei bis fünf erniedrigt wird (Schemidt *et al.*, 1995). Somit bot sich diese Mutante für funktionelle Studien in Bezug auf die Untersuchung der *c*-Stöchiometrie im ATP-Synthasekomplex an.

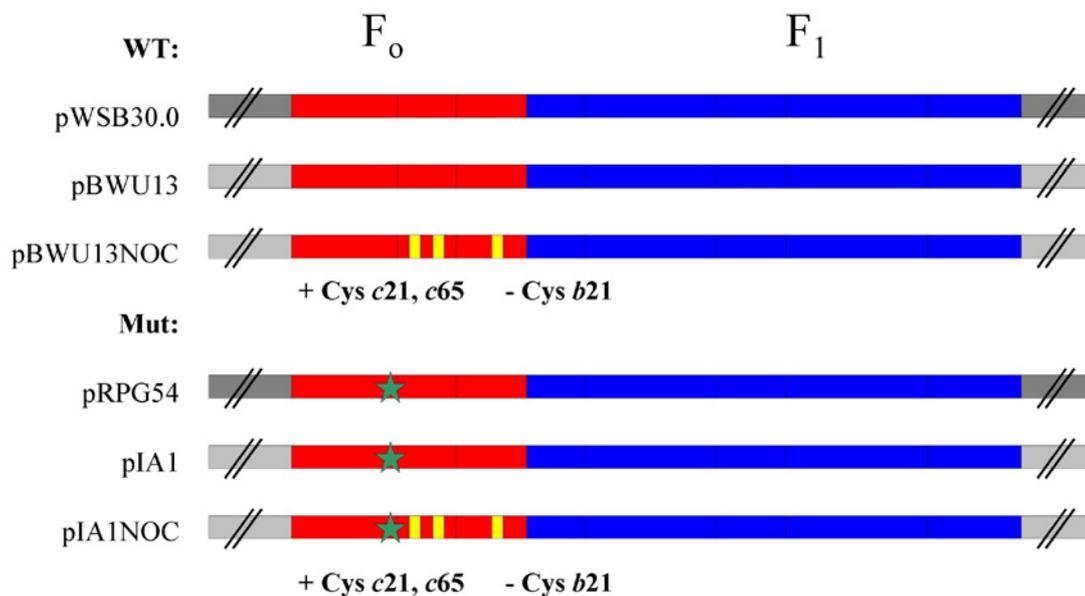


Abb. 5: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide: Die Gene für die Untereinheiten des F_o Teils sind rot, die für die Untereinheiten des F₁ Teils blau dargestellt. Der grüne Stern kennzeichnet die Punktmutation in der TIR vor dem *atpE* Gen.

Zunächst wurde die Verringerung an *c* Untereinheit im (TIR-Mut)-F_o durch verschiedene Methoden verifiziert. Für die Untersuchungen kamen zwei Plasmidpaare zum Einsatz, die sich jeweils nur durch die Punktmutation vor dem *atpE*-Gen unterschieden. Dabei waren pWSB30.0 (WT) und pRPG54 (Mut) Abkömmlinge des Plasmids pACYC184 (Chang &

Cohen, 1978), während es sich bei pBWU13 (WT) und pIA1 (Mut) um Derivate von pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) handelte.

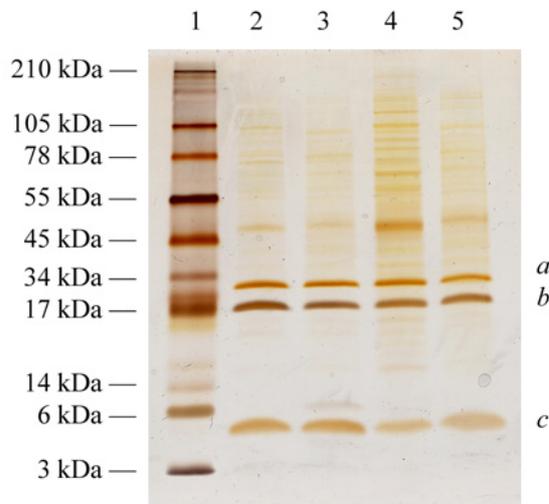


Abb. 6: F₀-Präparationen: 1. Standard; 2. 30/III/I-F₀ (WT); 3. 13/III/I-F₀ (WT); 4. 54/VI/I-F₀ (Mut); 5. 1/III/I-F₀ (Mut)

Schon im SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung war die Reduktion im Gehalt an Untereinheit *c* bei (TIR-Mut)-F₀ gegenüber (TIR-WT)-F₀ deutlich sichtbar (Abb. 6). Außerdem fiel auf, dass der relative Gehalt an F₀ Untereinheiten bei Präparationen von (TIR-WT)-F₀ deutlich höher war als bei Präparationen von (TIR-Mut)-F₀. Aus diesem Grund konnte für einen funktionellen Vergleich von (TIR-WT)- und (TIR-Mut)-F₀ nicht die Proteinkonzentration der Präparationen herangezogen werden. Daher wurde der Gehalt an F₀-Untereinheiten mittels des fluoreszierenden Proteinfarbstoffes Sypro Ruby™ bzw. mit Hilfe von radioaktiv markiertem ¹²⁵I Protein A quantifiziert.

3.1.1 Quantifizierung der Untereinheiten *a* und *c* von pWSB30.0-F₀ und pRPG54-F₀ mit ¹²⁵I Protein A

Um die Unterschiede im Gehalt an Untereinheit *a* und *c* in den Präparationen pWSB30.0-F₀ (WT) und pRPG54-F₀ (Mut) quantifizierbar zu machen, wurden beide Präparationen geblottet und mit ¹²⁵I Protein A markiert. Die Normierung der Proteingehalte auf den Blots erfolgte, wie auch bei der Quantifizierung mittels Sypro Ruby™, über die Untereinheit *a*. Das Verhältnis (Untereinheit *a* pWSB30.0) / (Untereinheit *a* pRPG54) war also ein Maß dafür, um wie viel mehr F₀ in den Präparationen des Wildtyps gegenüber denen der Mutante war.

Da die Signale für die Untereinheit *b* zu schwach waren, konnten nur die Untereinheiten *a* und *c* in die Auswertung einbezogen werden. Dabei ergab sich, bezogen auf die Untereinheit *a*, eine 1,8fache Reduktion der Untereinheit *c* in pRPG54-F₀ (Mut) gegenüber pWSB30.0-F₀.

(WT) (Tab. 1). Außerdem ergaben die Untersuchungen, dass die Präparation von pWSB30.0-F₀ bezogen auf ihren Proteingehalt 3,6mal soviel Untereinheit *a* enthielt wie die Präparation von pRPG54-F₀.

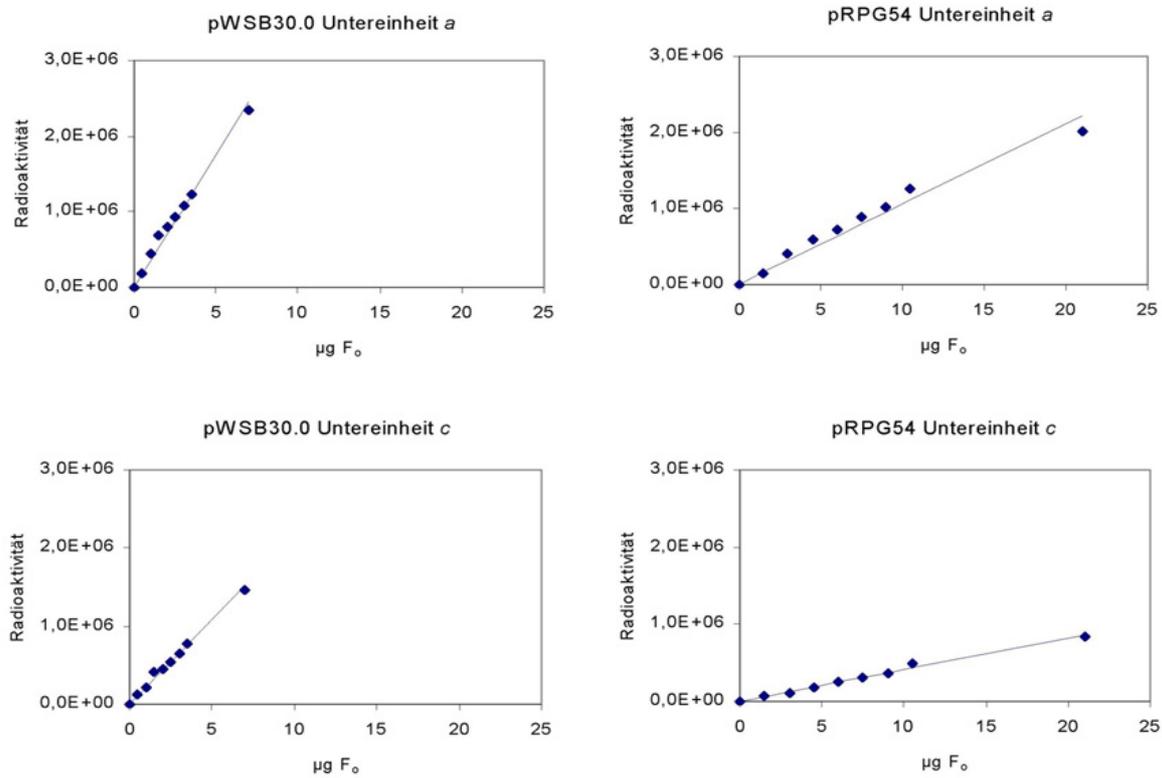


Abb. 7: Quantifizierung der Untereinheiten *a* und *c* aus pWSB30.0-F₀ und pRPG54-F₀ mit ¹²⁵I-Protein A.

Versuch	a_{30}/a_{54}	c_{30}/c_{54}	$(c_{30}/c_{54})/(a_{30}/a_{54})$
1	3,3	8,7	2,6
2	3,9	5,5	1,4
3	3,8	5,3	1,4
5	3,3	5,3	1,6
Mittelwerte	3,6	6,2	1,8

Tab. 1: Gesamtergebnis der Quantifizierung der Untereinheiten *a* und *c* aus pWSB30.0-F₀ und pRPG54-F₀ mittels ¹²⁵I-Protein A.

3.1.2 Quantifizierung der Untereinheiten *a*, *b* und *c* von verschiedenen F_0 Präparationen mittels Sypro Ruby™

Bezüglich der Reduktion des Gehalts an Untereinheit *c* unterschieden sich pWSB30.0- F_0 / pRPG54- F_0 und pBWU13- F_0 / pIA1- F_0 nicht signifikant voneinander (Abb. 8). Auffallend war jedoch, dass die Untereinheit *b* bei pBWU13- F_0 / pIA1- F_0 nicht durch die Mutation vor *atpE* beeinflusst wurde. Dies bedeutet, dass bei pBWU13- F_0 / pIA1- F_0 im Gegensatz zu pWSB30.0- F_0 / pRPG54- F_0 das *a/b* Verhältnis bei (TIR-WT)- F_0 und (TIR-Mut)- F_0 identisch war. Außerdem betrug das *a/a* Verhältnis von pBWU13- F_0 zu pIA1- F_0 , also der Unterschied im Reinheitsgrad der Präparationen, ungefähr zwei, während zwischen pWSB30.0- F_0 und pRPG54- F_0 ein Faktor drei lag. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden alle späteren Untersuchungen mit den Plasmiden pBWU13 und pIA1 weitergeführt.

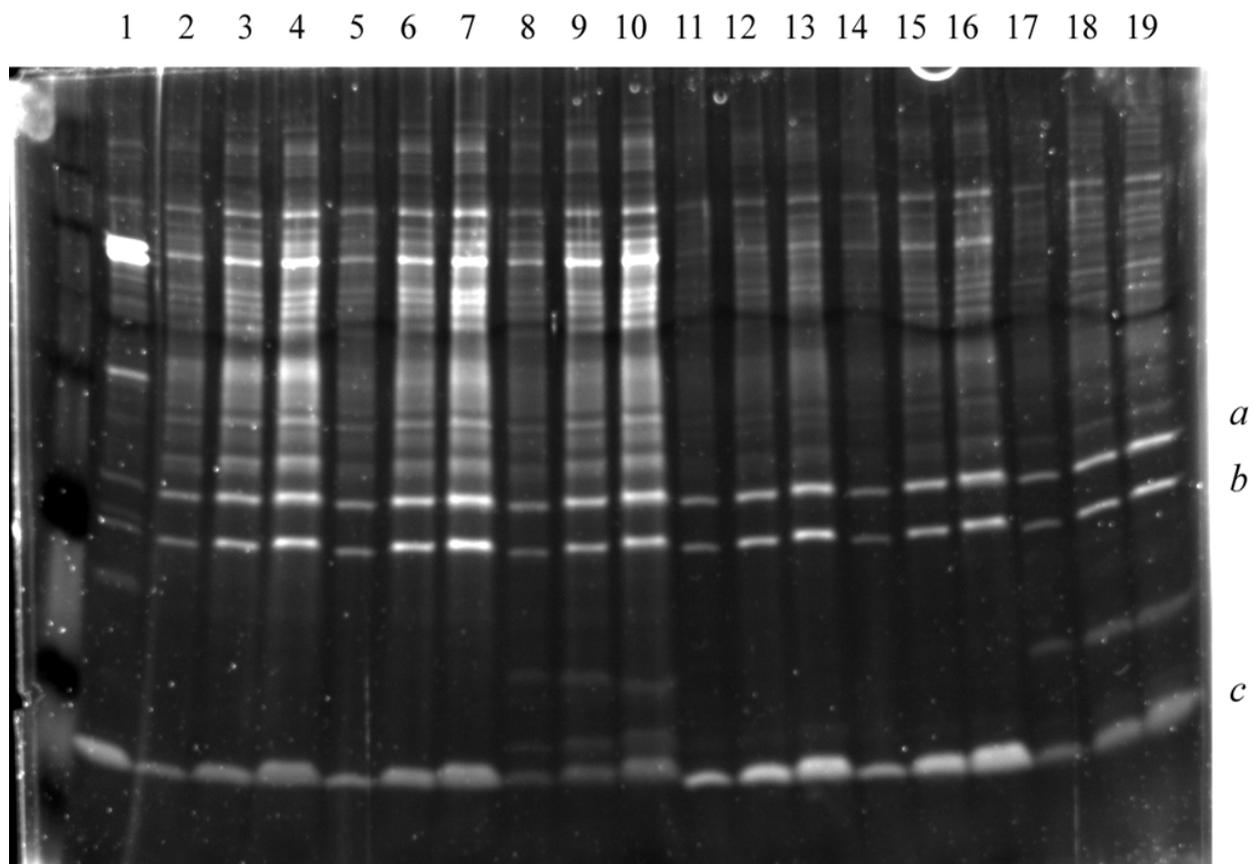


Abb. 8: Quantifizierungen der Untereinheiten *a*, *b* und *c* aus F_0 Präparationen mit Sypro Ruby™: 1. F_0F_1 -Standard, 2. 1/II/I 0,8 μ g, 3. 1/II/I 1,6 μ g, 4. 1/II/I 2,4 μ g, 5. 1/III/I 0,8 μ g, 6. 1/III/I 1,6 μ g, 7. 1/III/I 2,4 μ g, 8. 1NOC/I/I 0,8 μ g, 9. 1NOC/I/I 1,6 μ g, 10. 1NOC/I/I 2,4 μ g, 11. 13/III/I 0,4 μ g, 12. 13/III/I 0,8 μ g, 13. 13/III/I 1,2 μ g, 14. 13/IV/I 0,4 μ g, 15. 13/IV/I 0,8 μ g, 16. 13/IV/I 1,2 μ g, 17. 13NOC/I/I 0,4 μ g, 18. 13NOC/I/I 0,8 μ g, 19. 13NOC/I/I 1,2 μ g. Bezeichnung der Präparationen: Plasmidnummer/Fermentation/Präparation

Das konstante a/b Verhältnis war, wie zu erwarten, auch bei den für eine spätere Quervernetzung der c Untereinheiten vorgesehenen Cysteinmutanten pBWU13NOC- F_0 / pIA1NOC- F_0 (Kap. 3.8.2) zu beobachten. Allerdings war die Reduktion des c -Gehalts des pIA1NOC- F_0 deutlich geringer als bei pBWU13- F_0 / pIA1- F_0 . Um die tatsächliche Reduktion der Untereinheit c beim (TIR-Mut)- F_0 zu ermitteln, musste das c_{WT}/c_{Mut} -Verhältnis noch auf den tatsächlichen Gehalt an F_0 in der Präparation normiert werden. Daher wurde c_{WT}/c_{Mut} in Relation zu a_{WT}/a_{Mut} berechnet. Dadurch ergab sich bei pWSB30.0- F_0 /pRPG54- F_0 eine Reduktion um einen Faktor 2,3, während bei pBWU13- F_0 /pIA1- F_0 ein Mittelwert von 2,2 wurde (Tab. 2). Damit war das Ergebnis der ^{125}I -Protein A Quantifizierung (Kap. 3.1.1) bestätigt, welches eine 1,8fache Reduktion ergeben hatte (Tab 1). Bei den Cysteinmutanten pBWU13NOC- F_0 /pIA1NOC- F_0 fiel die Reduktion der Untereinheit c mit einem Faktor von 1,7 am niedrigsten aus (Tab. 2).

	Versuch	a_{WT}/a_{Mut}	b_{WT}/b_{Mut}	c_{WT}/c_{Mut}	$(c_{WT}/c_{Mut})/(a_{WT}/a_{Mut})$
pWSB30.0-pRPG54	1	3,1	4,6	7,1	2,3
	2	2,8	4,5	6,5	2,3
Mittelwert		3,0	4,6	6,8	2,3
pBWU13-pIA1	1	2,1	2,1	5,2	2,5
	2	2,1	2,1	4	1,9
	3	1,6	1,8	3,5	2,2
Mittelwert		1,9	2	4,2	2,2
pBWU13NOC-pIA1NOC	1	1,8	1,9	3,1	1,7

Tab. 2: Quantifizierung der Untereinheiten a , b und c mittels Sypro Ruby™.

3.1.3 Quantifizierung der Untereinheiten α , β , γ , δ und c aus Minizellen mit den Plasmiden pWSB30.0 und pRPG54

Nachdem die Unterschiede zwischen (TIR-WT)- F_0 und (TIR-Mut)- F_0 im Gehalt an Untereinheit c mittels Sypro Ruby™ und ^{125}I Protein A ermittelt werden konnten, stellte sich die Frage, inwieweit die Mutation in der Translationsinitiationsregion (TIR) vor dem *atpE* Gen nicht nur den Gehalt an Untereinheit c beeinflusste, sondern auch einen negativen Effekt auf die Expression des gesamten F_0 -Komplexes hatte. Außerdem war während der Präparationen festgestellt worden, dass die ATPase-Aktivität von Membranen mit (TIR-WT)- F_0 gegenüber Membranen mit (TIR-Mut)- F_0 ca. fünffach höher war. Es lag also die Vermutung nahe, dass auch der Gehalt an F_1 -Komplexen durch die Mutation in der TIR vor *atpE* erniedrigt wurde. Um diesen Sachverhalt näher zu beleuchten, wurden Expressions- und Abbaustudien in Minizellen durchgeführt. Dazu wurden die Plasmide pWSB30.0 (WT) und

pRPG54 (Mut) in den Minizellen bildenden Stamm DK6 (Klionsky *et al.*, 1984) transformiert. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, wurden die Untereinheiten α , β , γ , δ , und c im Gel aufgelöst und für eine Quantifizierung herangezogen, während die Untereinheiten a und b aufgrund mangelnder Auflösung im Gelsystem nicht ausgewertet werden konnten. Die Auswertung ergab einen achtfachen Überschuss bei der Synthese der Untereinheit c von pWSB30.0 gegenüber pRPG54 (Abb. 10). Nach Inkubation mit kaltem Methionin reduzierte sich dieser Überschuss auf einen Faktor fünf. Die Untereinheiten des F_1 Komplexes wurden in zweifachem Überschuss synthetisiert und hielten sich nach Inkubation mit kaltem Methionin auf diesem Niveau. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass auch der Gehalt an F_1 -Komplexen erniedrigt wurde und die Unterschiede im F_1 -Gehalt von Membranen mit (TIR-WT)- F_0 und (TIR-Mut)- F_0 nicht allein auf den Abbau überschüssiger Untereinheiten, sondern auch auf einer unterschiedlichen Syntheserate beruhen.

Der Grund für den Einfluss der Mutation in der TIR von *atpE* auf das gesamte *atp*-Operon ist unbekannt. Northern-Blot Untersuchungen, die eine Quantifizierung der vorhandenen m-RNA ermöglichen sollten, erbrachten widersprüchliche Ergebnisse und konnten daher nicht ausgewertet werden.

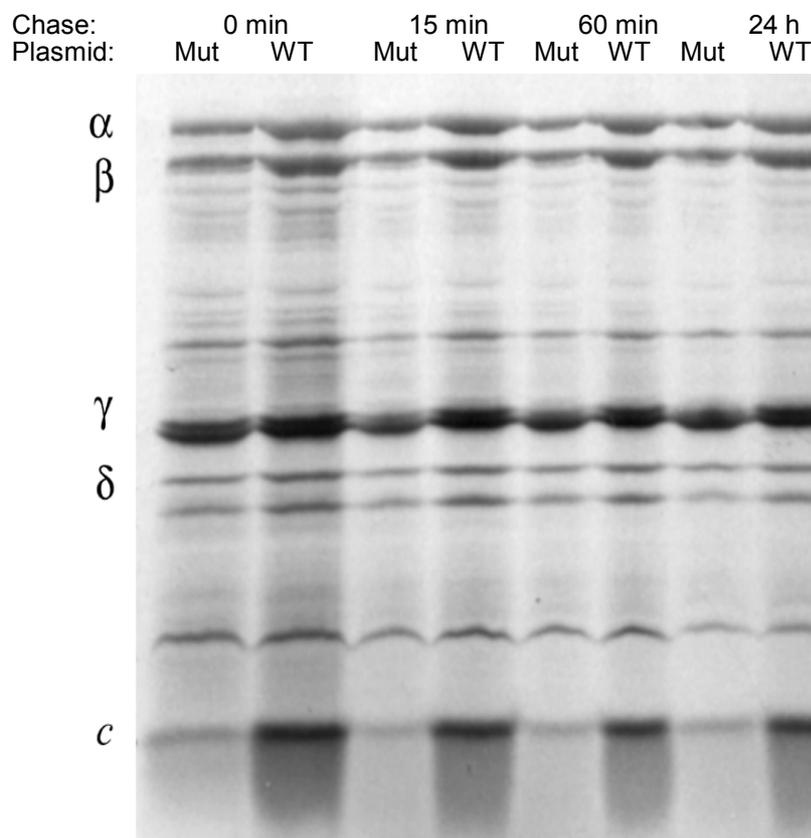


Abb. 9: Pulse chase Experiment mit Minizellen DK6/pWSB30.0 (WT) und DK6/pRPG54 (Mut): Radioaktive Markierung der Zellen mit ^{35}S -Methionin, 30 s Markierungszeit

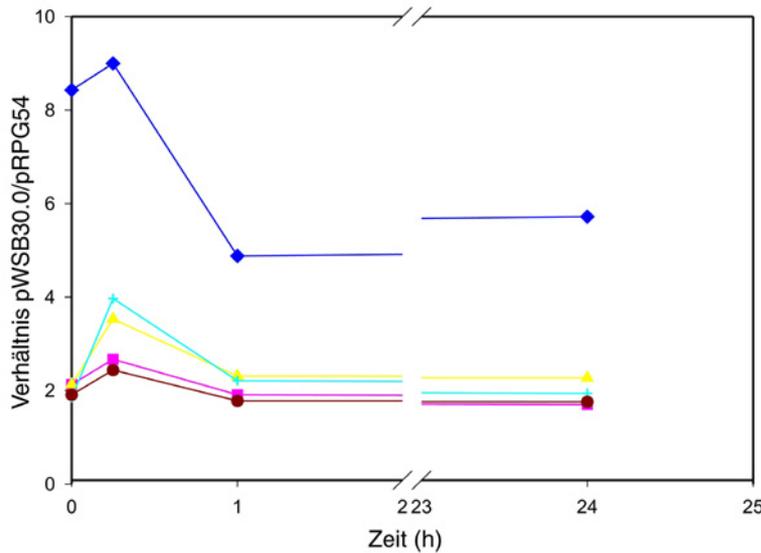


Abb. 10: Markierung von Minizellen DK6/pWSB30.0 und DK6/pRPG54 mit ³⁵S-Methionin: Markierungszeit 30 s, danach Inkubation für 0, 15, 60 und 360 min mit Methionin im 10⁷fachen Überschuß. ♦ Untereinheit c, x Untereinheit α, ▲ Untereinheit β, ■ Untereinheit γ, ● Untereinheit δ

3.2 Rekonstitution

Bevor die eigentlichen Experimente zur Rekonstitution beginnen konnten, sollte eine neue Rekonstitutionsmethode etabliert werden. Diese sollte schneller durchzuführen sein als die alte Methode, welche mit einer 48stündigen Dialyse sehr viel Zeit beanspruchte und außerdem keinen Beschallungsschritt mehr beinhalten, welcher zu einer partiellen Inaktivierung der F_o-Komplexe führen konnte.

Aus diesen Gründen sollte eine Methode an das System angepasst werden, bei welcher das für die Rekonstitution notwendige Detergens mittels Bio-Beads entfernt wurde. Seit ihrer Einführung wurden mit diesen Polystyrenkugeln viele Membranproteine erfolgreich rekonstituiert. Groth und Walker (1996) haben SM-2 Bio-Beads (Bio-Rad) mit Erfolg für die Rekonstitution mitochondrieller ATP-Synthase eingesetzt. Als Lipid kam zunächst Asolectin Typ IV (Sigma) zu Einsatz. Es zeigte sich jedoch, dass mit gereinigten *E. coli* Lipiden (Avanti) bessere Resultate, sowohl in Bezug auf die Translokationsraten als auch auf die Ionendichtigkeit der Liposomen erzielt werden konnten.

Zunächst wurden die Solubilisierungskurven der vorgeformten Liposomen für mehrere Detergenzien photometrisch aufgenommen (Abb. 11). Bei der Solubilisierung mit Dodecylmaltosid zeigte sich ein gelartiger Übergangszustand bei partieller Solubilisierung. Dieser Gel-Zustand war bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden (Lambert *et al.*, 1998) und wurde auf die Bildung extrem langer, filamentöser Mizellen zurückgeführt. Da dieser Gel-Zustand eine weitere Rekonstitution unmöglich machte, schied Dodecylmaltosid für weitere Rekonstitutionsexperimente aus.

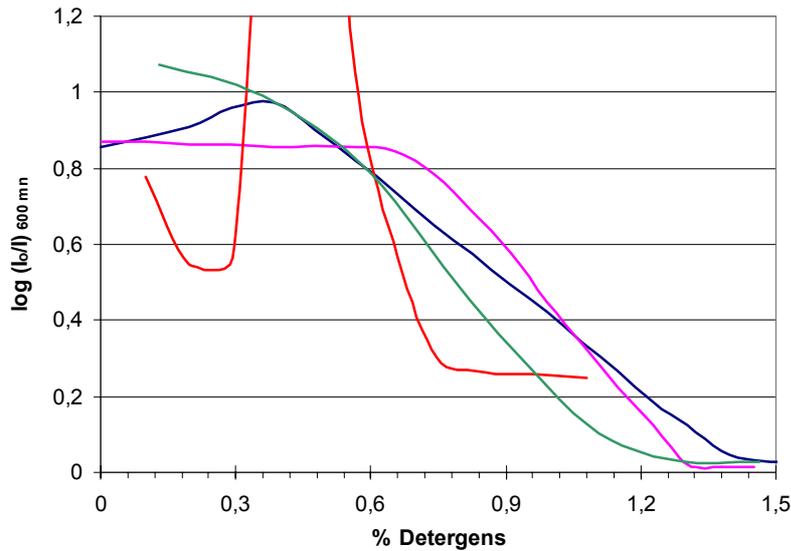


Abb. 11: Solubilisierung vorgeformter Liposomen mit: Triton X-100 (—), Octylglycosid (—), Dodecylmaltosid (—) und Cholal/DOC (2:1) (—). Die Lipidkonzentration betrug bei allen Versuchen ca. 12 mg/ml.

Bei weiteren Versuchen mit den Detergenzien Triton X-100, Octylglycosid und Cholal/DOC (2:1) erwies sich Triton X-100 eindeutig als das am besten geeignete Detergens zur Rekonstitution von gereinigtem F₀ in vorgeformten Liposomen. Bei Vergleichen der Protonentranslokationsrate wurden mit Triton X-100 im Vergleich zu den anderen Detergenzien die höchsten Werte ermittelt. Außerdem waren die Messungen reproduzierbarer. Triton X-100 hat eine cmc von 0,3 mM (Lasch, 1995) und ist daher für die Dialyse ungeeignet, die Bindekapazität von SM-2 Bio-Beads für dieses Detergens ist hoch, auch wenn die Angaben von 70 mg pro g Bio-Beads (Bio-Rad) bis 185 mg pro g Bio-Beads (Rigaud *et al.*, 1998) schwanken. Triton X-100 Mizellen liegen mit ca. 9-10 nm Durchmesser (Helenius & Simons, 1975) im Bereich der Porengröße von SM-2 Bio-Beads (Rigaud *et al.*, 1998). Die Adsorption von Protein an die Bio-Beads erwies sich als äußerst gering, wie durch eine Ameisensäurebehandlung von Bio-Beads nach der Rekonstitution mit anschließender SDS-Gelelektrophorese im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine Vorbehandlung der Bio-Beads mit Lipidlösung, wie sie von einigen Autoren zur Verringerung der Lipidadsorption vorgeschlagen wird (Rigaud *et al.*, 1997) brachte keinerlei Veränderung der Rekonstitutionsergebnisse und wurde daher nicht in das Standardprotokoll aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde der optimale Solubilisierungsgrad der Liposomen für die Rekonstitution mit Triton ermittelt.

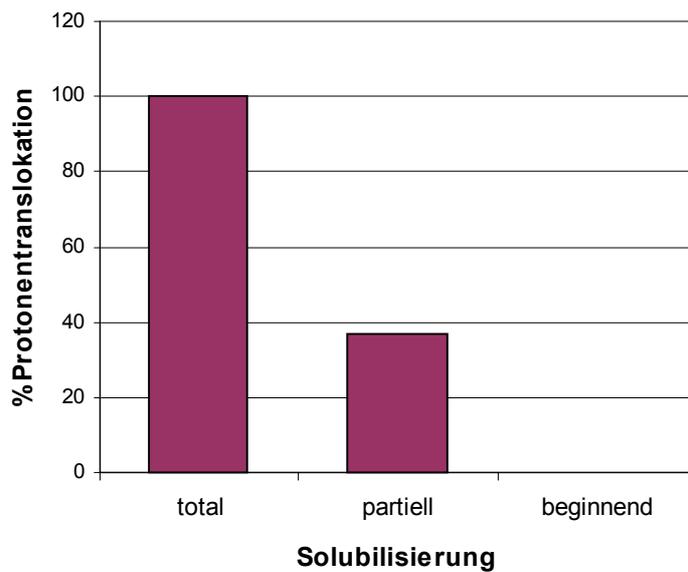


Abb. 12: Protonentranslokation rekonstituierter F_0 Komplexe nach totaler, partieller und beginnender Solubilisierung der vorgeformten Liposomen.

Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, wurden die höchsten Protonentranslokationsraten nach totaler Solubilisierung der vorgeformten Liposomen erreicht. Eine Destabilisierung der Liposomen bei beginnender Solubilisierung führte zu Liposomen, deren Translokationsrate nicht messbar war.

Der Einfluss der Temperatur auf den Verlauf der Rekonstitution wurde untersucht, indem die optische Dichte der Rekonstitutionsansätze während der Rekonstitution im Photometer gemessen wurde. Versuche bei 4 °C zeigten, dass eine Rekonstitution bei dieser Temperatur mit dieser Methode nicht möglich war, während sich die Ergebnisse bei 37 °C nicht von denen bei 30 °C unterschieden. Daher wurden für weitere Versuche nur RT und 30 °C weiter untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei 30 °C Liposomen von höherer optischer Dichte schneller generiert wurden (Abb. 13). Die resultierenden Translokationsraten waren vergleichbar. Der Umstand, dass für eine erfolgreiche Rekonstitution mindestens eine partielle Solubilisierung nötig war, könnte darauf hindeuten, dass eine Insertion von F_0 nur in gemischte Lipid-Detergenz Mizellen erfolgen kann. Da diese in einer Suspension mit destabilisierten Liposomen nicht vorliegen (Rigaud *et al.*, 1995), erfolgt auch keine Integration von F_0 .

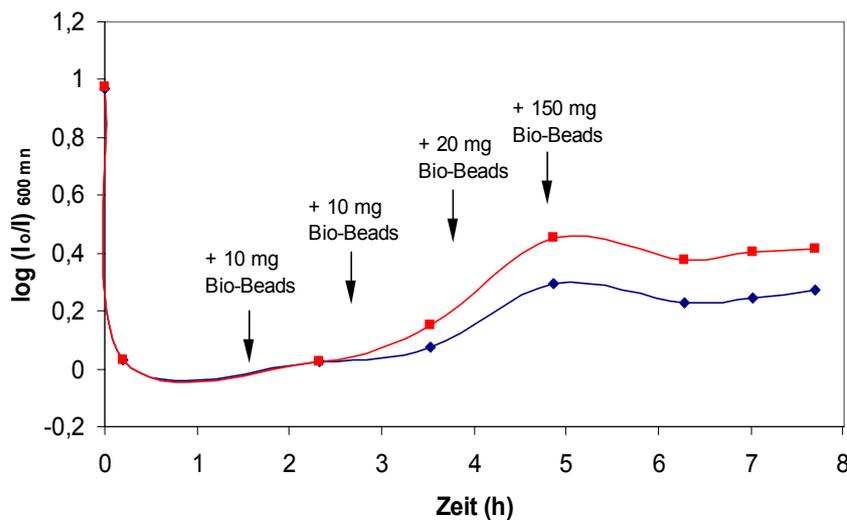


Abb. 13:
Rekonstitution bei RT und 30 °C: Die Optische Dichte der Ansätze wurde während der Rekonstitution im Photometer gemessen. ■ 30 °C, ◆ RT. Messungen bei 37 °C zeigten den gleichen Kurvenverlauf wie Messungen bei 30 °C.

Durch die sukzessive Zugabe der Bio-Beads im Batch Verfahren kann die Geschwindigkeit der Detergenzentfernung gut kontrolliert werden, außerdem kann auf diese Weise die Adsorption von Lipid und Detergens an die Bio-Beads minimiert werden. Durch die totale Solubilisierung liegen Lipide und Proteine am Anfang der Rekonstitution in gemischten Mizellen vor und die Gefahr der Adsorption an die extrem große Polystyrenoberfläche innerhalb der Poren der Bio-Beads ist erheblich größer, als in einem späteren Stadium, wo das meiste Lipid bzw. Protein schon in detergenzhaltigen Liposomen vorliegt, deren Durchmesser erheblich über dem der Poren in den Bio-Beads liegt. Daher wurde bei der Zugabe der Bio-Beads mit sehr kleinen Mengen angefangen. Die Gesamtmenge der zugegebenen Bio-Beads lag nur ca. 10 % über der absolut notwendigen Menge zur vollständigen Entfernung des in den Ansätzen enthaltenen Triton X-100 (Bio-Rad), wodurch ebenfalls Verluste an Lipid und Protein minimiert wurden.

Ein sehr kritischer Punkt beim Vergleich verschiedener F_0 Präparationen ist die Linearität der Protonentranslokationsrate bei verschiedenen Protein:Lipid Verhältnissen. Nur wenn sichergestellt war, dass eine F_0 Präparation mit verschiedenen Protein:Lipid Verhältnissen vergleichbare Protonentranslokationsraten lieferte, konnten verschiedene F_0 Präparationen zumindest relativ miteinander verglichen werden. Bei den Versuchen zeigte sich, dass eine Linearität nur in einem relativ engen Protein:Lipid Verhältnis gegeben war, wobei überraschenderweise sowohl zu geringe als auch zu große Mengen an F_0 zu deutlich geringeren Translokationsraten führten. Während das Verhalten bei zu großen Mengen an F_0 mit einem ungünstigen Protein:Lipid Verhältnis und daraus resultierender Undichtigkeit der Liposomen durch ein niedriges TTFB-Signal, hervorgerufen durch eine niedrige Aufladung der Liposomen, erklärbar war, bleibt das Phänomen der geringen Raten bei zu wenig F_0

erklärungsbedürftig. Sehr geringe Protonentranslokationsraten bei einer niedrigen F_0 Konzentration wurden mit allen Detergenzien beobachtet, mit denen eine funktionelle Rekonstitution von F_0 möglich war und trat sowohl bei (TIR-WT)- F_0 als auch bei (TIR-Mut)- F_0 auf. Die Ursache hierfür lag möglicherweise in einer Dissoziation der F_0 Komplexe während der totalen Solubilisation. Stehen die einzelnen F_0 Untereinheiten in den Liposomen in zu geringer Konzentration zur Verfügung, verläuft die Reassemblierung möglicherweise zu ineffektiv für eine ausreichende Anzahl an funktionstüchtigen Komplexen. Da bei den Translokationsraten die Kontrollwerte der folgenden, wie auch aller weiteren Messungen stets nahe null lagen, wurden sie nicht explizit aufgeführt und nur die um den Kontrollwert reduzierten Daten in die Tabellen aufgenommen (Tab. 3 und Tab 4).

Protein:Lipid	30/III/I (WT) Versuch 1	30/III/I (WT) Versuch 2	13/III/I (WT) Versuch 1	13/III/I (WT) Versuch 2	13/III/I (WT) Versuch 3	13/VI/I (WT) Versuch 1
1:52		72				137
1:69		94				
1:78						173
1:104	55	183			218	
1:125					135	
1:156				95	135	122
1:208	136	145	92	93	64	
1:313			74	83	41	
1:417	187					
1:625			22			

Tab. 3: Linearität der Protonentranslokationsrate [$\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$] von (TIR-WT)- F_0 in Abhängigkeit von verschiedenen Protein:Lipid Verhältnissen: Bezeichnung der Präparationen: Plasmidnummer/Fermentation/Präparation.

Protein:Lipid	54/IV/I (Mut) Versuch 1	54/II/II (Mut) Versuch 1	1/II/I (Mut) Versuch 1	1/II/I (Mut) Versuch 2
1:35	6			
1:52				
1:69	11,3	2	7	
1:78	5			18
1:104		8	11	17
1:156				13

Tab. 4: Linearität der Protonentranslokationsrate [$\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$] von (TIR-Mut)- F_0 in Abhängigkeit von verschiedenen Protein:Lipid Verhältnissen: Bezeichnung der Präparationen: Plasmidnummer/Fermentation/Präparation.

Die Protonentranslokationsraten des (TIR-Mut)-F_o lagen bei ca. 10 % der Raten des (TIR-WT)-F_o. Obwohl die Streuung der Daten, wie auch bei den Translokationsraten in Kap. 3.3, zwischen den einzelnen Versuchen relativ groß war, konnten die Translokationsraten von (TIR-WT)-F_o und (TIR-Mut)-F_o eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Unterschiede zwischen (TIR-WT)-F_o und (TIR-WT)-F_o innerhalb eines Experiments lagen immer mindestens bei einem Faktor zwei. Doppelansätze an ein und demselben Versuchstag mit verschiedenen Rekonstitutionsansätzen derselben Probe zeigten weitaus geringere Schwankungen, welche stets deutlich unterhalb eines Faktors von zwei lagen (Daten nicht gezeigt).

Gefrierbruchuntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass die Liposomen unilamellar und mit Durchmessern von 100 – 200 nm relativ größenhomogen waren (Kap. 3.8.5). Ähnliche Resultate waren mit Bio-Beads schon von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht worden (Rigaud *et al.*, 1995). Die Oberfläche eines Phospholipidmoleküls in einer biologischen Membran beträgt ungefähr 72 Å² (Szoka *et al.*, 1978). Bei einem Lipidgehalt von ca. 12 mg/ml, einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:200 und einem mittleren Durchmesser der Liposomen von ca. 150 µm kann man daher erwarten, dass sich in jedem Liposom im Mittel sechs F_o-Komplexe befinden. In den auswertbaren Bereichen der Gefrierbruchproben wurden im Mittel etwas weniger F_o-Komplexe gefunden, was auf eine Überschätzung des F_o-Gehalts der F_o-Präparationen, auf eine mögliche Dissoziation einiger F_o-Komplexe und auf der Adsorption von F_o an die Bio-Beads beruhen dürfte.

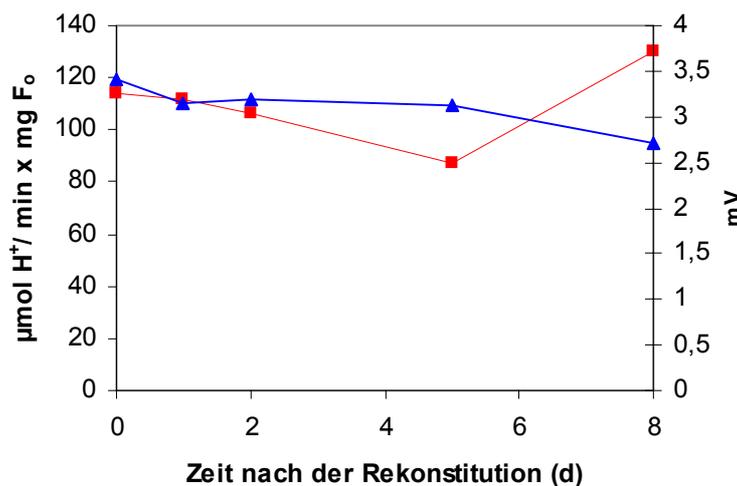


Abb. 14: Stabilität von Proteoliposomen nach der Rekonstitution: Lagerung bei RT. ▲ TTFB, ■ Protonentranslokation.

Die Liposomen erwiesen sich nach der Rekonstitution als außerordentlich stabil. Selbst Lagerzeiten von über einer Woche bei RT änderten ihre Aktivität nur wenig (Abb. 14). Außerdem war es möglich, die Protonentranslokation durch eine 30minütige Inkubation der

Proteoliposomen mit 50 μM DCCD bei nahezu unverändertem TTFB-Signal vollständig zu inhibieren.

3.3 Vergleich der Protonentranslokation von (TIR-WT)-F_o und (TIR-Mut)-F_o

Versuch	30/II/II (WT)	30/III/I (WT)	54/II/I (Mut)	54/II/II (Mut)	54/III/I (Mut)	54/VI/I (Mut)	13/III/I (WT)	13/IV/I (WT)	1/II/I (Mut)	1/III/I (Mut)
1	315				58 (174)					
2	153	344			21 (63)					
3	106	208		20 (60)	23 (69)					
4	128	213	24 (72)	48 (144)	24 (72)					
5		145	24 (72)							
6		318				16 (48)				
		343				14 (42)				
7		348				3 (9)				
8		202				16 (48)				
9		111				5 (15)				
10		78				5 (15)	105		9 (18)	
11		136				5 (15)			11	
12							92		13 (26)	
13							93		17 (34)	
14							124		11 (22)	29 (58)
15							194	160		
16								210		
17								122		

Tab. 5: Vergleich der Protonentranslokationsraten [$\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$] von (TIR-WT)-F_o (30/II/II, 30/III/I, 13/III/I, 13/IV/I) und (TIR-Mut)-F_o (54/II/I, 54/II/II, 54/III/I, 54/IV/I, 1/II/I, 1/III/I): Unter den Translokationsraten für (TIR-Mut)-F_o sind die um den relativen F_o-Gehalt in der Präparation korrigierten Protonentranslokationsraten angegeben. Für die Korrektur wurden die Ergebnisse für das (TIR-Mut)-F_o bei pWSB30.0-pRPG54 mit 3 und bei pBWU13-pIA1 mit 1,9 multipliziert (Tab. 2). Der Kontrollwert wurde von allen Raten bereits abgezogen. Bezeichnung der Präparationen: Plasmidnummer/Fermentation/Präparation.

Obwohl die Unterschiede zwischen (TIR-WT)-F₀ und (TIR-Mut)-F₀ erheblich variierten, lag die Protonentranslokationsrate beim (TIR-WT)-F₀ grundsätzlich um ein Vielfaches höher als bei der Mutante. Während in einem Versuch 315 $\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ beim (TIR-WT)-F₀ zu 58 $\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ beim (TIR-Mut)-F₀ ermittelt wurden (Verhältnis 5,4:1), ergab ein anderer Versuch 348 $\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ beim (TIR-WT)-F₀ zu 3 $\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ beim (TIR-Mut)-F₀ (Verhältnis 116:1). Diese Ergebnisse wurden allerdings durch den Befund aus Kap. 3.1.1 und 3.1.2 relativiert, wonach sich der F₀-Gehalt der Präparationen zwischen (TIR-WT)-F₀ und (TIR-Mut)-F₀ signifikant unterschieden. Die um das jeweilige Verhältnis korrigierten Raten sind in Tab. 5 in Klammern jeweils unterhalb der Raten für das (TIR-Mut)-F₀ aufgeführt.

Grundsätzlich war, unabhängig vom verwendeten Plasmid, in jedem Versuch die Protonentranslokationsrate des (TIR-WT)-F₀ signifikant höher als die des (TIR-Mut)-F₀. Außerdem wurden innerhalb eines Experiments deutlich geringere Schwankungen der Translokationsraten beobachtet als zwischen den Ergebnissen verschiedener Versuche.

3.4 ATPase-Aktivität nach Bindung von F₁ an F₀ Proteoliposomen

Die Ergebnisse für die ATPase-Aktivität nach Bindung von gereinigtem F₁ an F₀ Proteoliposomen fielen sehr uneinheitlich aus (nicht dargestellt). Der Kontrollwert war im Verhältnis zu den Werten der Proteoliposomen oft unverhältnismäßig hoch und außerdem waren die Messwerte nicht proportional zur eingesetzten F₀ Menge in den Liposomen. Grundsätzlich zeigten sich jedoch innerhalb einer Versuchsreihe die Werte für (TIR-Mut)-F₀ niedriger als für (TIR-WT)-F₀. Eines der Hauptprobleme bei diesen Messungen bestand im nichtlinearen Anstieg der ATPase-Aktivität nach Erhöhung der F₀ Menge im Rekonstitutionsansatz. Geringe Unterschiede in der F₀ Menge im Rekonstitutionsansatz führten zu teilweise extremen Schwankungen in der ATPase-Aktivität. Aus diesem Grund können die Daten für (TIR-WT)-F₀ und (TIR-Mut)-F₀ nicht direkt verglichen werden. Eine sichere Aussage über die F₁-Bindefähigkeit des (TIR-WT)-F₀ im Vergleich zum (TIR-Mut)-F₀ kann daher nicht gemacht werden.

3.5 Protonentranslokation nach Titration von gereinigter Untereinheit *c*

Da die Protonentranslokationsrate wahrscheinlich durch die geringere Anzahl an *c*-Untereinheiten erniedrigt wurde, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt durch die nachträgliche Titration von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz aufgehoben werden konnte.

Für die Angaben der Menge an zugegebener Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz wurde der Quotient aus den Proteingehalten von F_0 -Präparation und Untereinheit *c* basierend auf den Proteinbestimmungen gebildet. Da diese Angabe die tatsächlichen Verhältnisse nicht widerspiegelt, wurden Rekonstitutionsansätze mit und ohne Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* auf einem Gel aufgetrennt, mit Sypro Ruby™ gefärbt und anschließend quantifiziert (Abb. 15). Dabei zeigte sich, dass eine Zugabe von 0,17 *c* tatsächlich einer Versechsfachung der bei 1/II/I- F_0 vorhandenen Menge an Untereinheit *c* gleichkam, während 0,67 *c* die 22fache Menge an Untereinheit *c* bedeutete. Ein Rekonstitutionsansatz, dem 0,17 *c* zugesetzt wurde, hatte daher tatsächlich schon die doppelte Menge eines mit vergleichbarem F_0 Gehalt rekonstituierten (TIR-WT)- F_0 ohne Zusatz von gereinigter Untereinheit *c*.

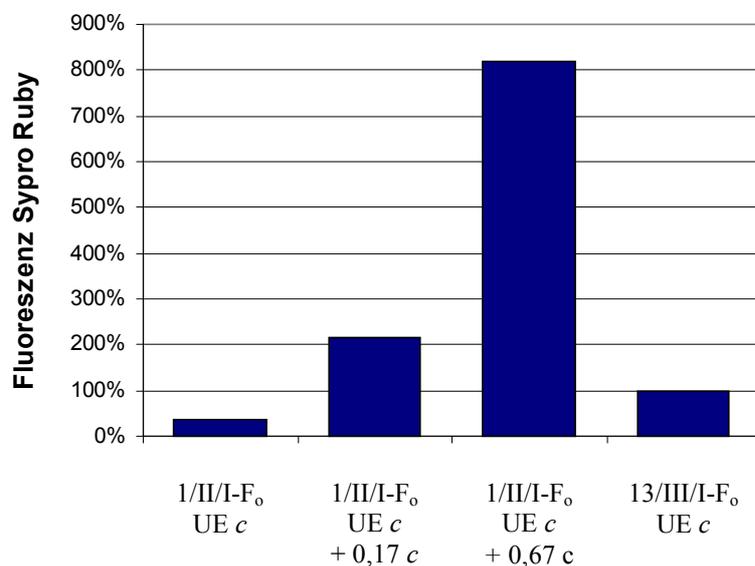


Abb. 15: Quantifizierung der Untereinheit *c* in Rekonstitutionsansätzen nach Titration von gereinigter Untereinheit *c*: Die Wildtyp-Menge an Untereinheit *c* wurde auf 100 % gesetzt. Die Angaben zur zugegebenen Menge an Untereinheit *c* errechnen sich aus dem Quotienten aus F_0 -Proteinmenge/*c*-Proteinmenge. Die unterschiedlichen F_0 -Gehalte der Präparationen von 13/III/I- F_0 und 1/II/I- F_0 wurden berücksichtigt.

Versuch	54/II/I (Mut)						30/III/I (WT)		
	<i>c</i> / F ₀ -Präparation						<i>c</i> / F ₀ -Präparation		
	0	0,13	0,27	0,33	0,4	0,53	0	0,53	1
1	16 (48)					79 (237)	202	215	192
2	5 (15)	4 (12)	5 (15)		27 (81)	31 (93)	111	145	
3	11 (33)			21 (63)			136		109

Tab. 6: Titration von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz bei 54/II/I-F₀ und 30/III/I-F₀: Unter den Translokationsraten für (TIR-Mut)-F₀ sind die um den relativen F₀-Gehalt in der Präparation korrigierten Protonentranslokationsraten angegeben. Für die Korrektur wurden die Ergebnisse für das (TIR-Mut)-F₀ mit 3 multipliziert (siehe Tab. 2). Der Kontrollwert wurde von allen Raten bereits abgezogen. Bezeichnung der Präparationen: Plasmidnummer/Fermentation/Präparation.

Versuch	1/II/I						13/III/I	
	<i>c</i> / F ₀ -Präparation						<i>c</i> / F ₀ -Präparation	
	0	0,17	0,34	0,5	0,67	1	0	1
1	11 (34)		22 (68)		39 (121)	24	92	71
2	17 (53)	27 (84)	50 (155)	51 (158)	26 (81)			

Tab. 7: Titration von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz bei 1/II/I-F₀ und 13/III/I-F₀: Unter den Translokationsraten für (TIR-Mut)-F₀ sind die um den relativen F₀-Gehalt in der Präparation korrigierten Protonentranslokationsraten angegeben. Für die Korrektur wurden die Ergebnisse für das (TIR-Mut)-F₀ mit 1,9 multipliziert (siehe Tab. 2). Der Kontrollwert wurde von allen Raten bereits abgezogen. Bezeichnung der Präparationen: Plasmidnummer/Fermentation/Präparation.

Durch die Titration von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz konnte die Protonentranslokationsrate des (TIR-Mut)-F₀ signifikant gesteigert werden, während sich die Aktivität des (TIR-WT)-F₀ nicht änderte (Tab. 6, Tab. 7 und Abb. 16). Korrigierte man wie in Kap. 3.3 die Protonentranslokationsraten, so entsprachen die Aktivitäten des (TIR-Mut)-F₀ nach der Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* ziemlich genau den Raten, die mit (TIR-WT)-F₀ mit oder ohne zugesetzter Untereinheit *c* gemessen wurden. Da der genaue Gehalt an F₀ in den Präparationen unbekannt war, wurde für die Angabe der zugegebenen Menge an Untereinheit *c* die Proteingehalte nach Proteinbestimmung (Dulley & Grieve, 1975) der Untereinheit *c*- bzw. F₀-Präparationen zugrundegelegt.

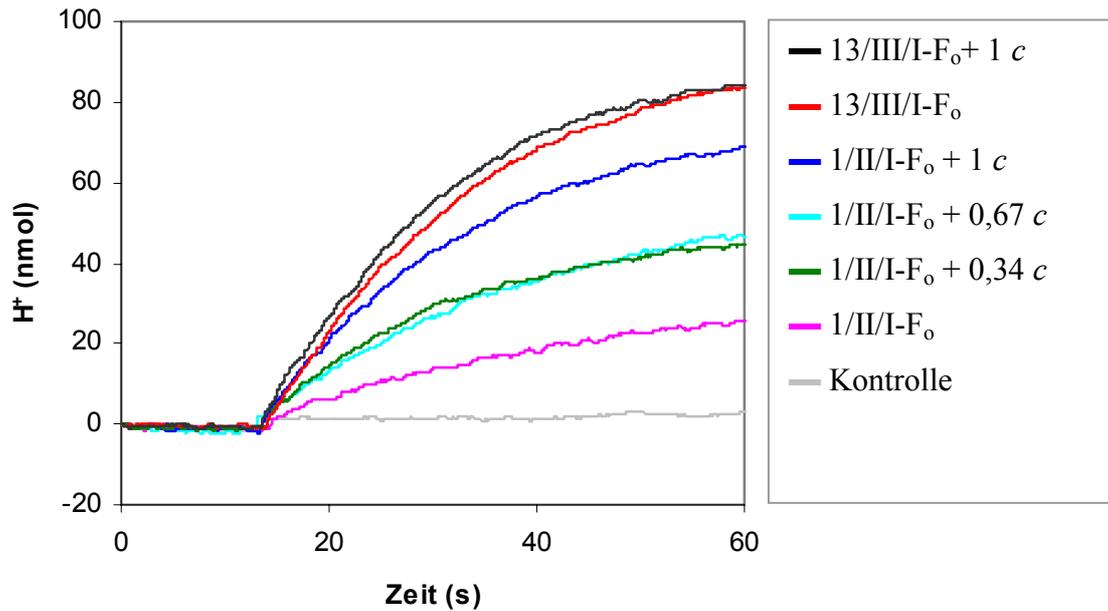


Abb. 16: Titration von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz bei pIA1-F₀ (Mut) und pBWU13-F₀ (WT).

3.6 ATPase-Aktivität nach Bindung von F₁ an F₀ Liposomen und Titration von gereinigter Untereinheit *c*

Versuch	Kontrolle	1/II/I (Mut) <i>c</i> / F ₀ -Präparation						13/III/I (WT) <i>c</i> / F ₀ -Präparation	
		0	0,17	0,33	0,5	0,67	1	0	1
1	0,25	1	0,9	2,9		3,6	2,8	3,5	
2	0	0,7		1,7		2,9	3,3	4	6,7
3	1,8	0,7			4,2			9,1	

Tab. 8: ATPase-Aktivität nach Bindung von F₁ an F₀ Liposomen und Titration von gereinigter Untereinheit *c* bei pIA1/II/I-F₀ (Mut) und pBWU13/III/I-F₀ (WT).

Versuch	Kontrolle	54/III/I (Mut) <i>c</i> / F ₀ -Präparation			30/III/I (WT) <i>c</i> / F ₀ -Präparation		
		0	0,5	1	0	0,5	1
1	0	2,8	5,2	7,1	15,5	19,4	19,4

Tab. 9: ATPase-Aktivität nach Bindung von F₁ an F₀ Liposomen und Titration von gereinigter Untereinheit *c* bei pRPG54/III/I (Mut) und pWSB30.0/III/I-F₀ (WT).

Die ATPase-Aktivität wurde nach Bindung von F_1 an F_0 -Liposomen in Abhängigkeit von zutitrierter Untereinheit c gemessen. Da in diesen Versuchen identische F_0 -Konzentrationen miteinander verglichen wurden, war eine lineare Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Menge an eingesetztem F_0 nicht unbedingt erforderlich. Daher war eine relative Interpretation der Daten möglich. Bei allen vier Versuchen war eine deutliche Zunahme der ATPase-Aktivität nach Rückbindung von gereinigtem F_1 zu verzeichnen, wenn die Menge an gereinigter Untereinheit c erhöht wurde (Tab. 8 und Tab. 9). Kontrollliposomen, die nur gereinigte Untereinheit c enthielten, waren bezüglich ihrer ATPase-Aktivität nicht von Kontrollliposomen ohne Untereinheit c zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

3.7 Reinigung von *E. coli* Lipid (Avanti)

Bei den Rekonstitutionsversuchen war aufgefallen, dass das zur Herstellung von Liposomen verwendete *E. coli* Lipid (Avanti) nicht frei von Protein war. Auffällig waren zwei Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel, von denen eine ein apparentes Molekulargewicht von ca. 4 kDa hatte und nicht identifiziert werden konnte, während die andere im Immunoblot als Untereinheit c erkannt wurde. Es stellte sich daher die Frage, ob die schon vorhandene Untereinheit c einen Einfluss auf die Rekonstitutionsexperimente hatte. Zu diesem Zweck wurde das Lipid nachgereinigt und dann in der Rekonstitution mit nicht nachgereinigtem Lipid verglichen.

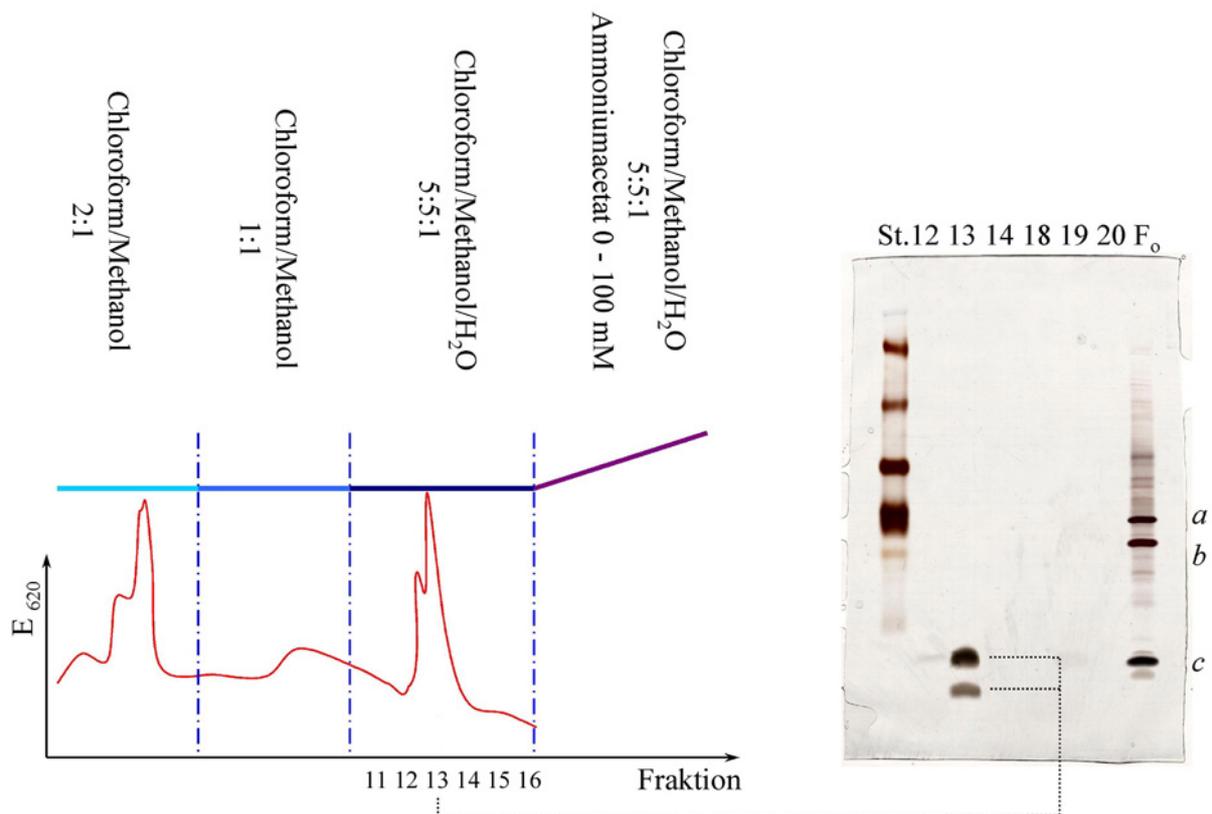


Abb. 17: Elutionsdiagramm und Kontrollgel einer Reinigung von *E. coli* Lipid (Avanti, Nr. 100600, Lot# 56): Die Nummern der Elutionsfraktionen sind über den jeweiligen Gelspuren angegeben.

Für die Lipidreinigung wurde die standardisierte Methode der Reinigung der Untereinheit *c* (Altendorf *et al.*, 1979; Fillingame, 1976) verwendet. Das Elutionsprofil und ein Kontrollgel sind in Abb. 17 illustriert. Der erste Peak (Chloroform/Methanol 2:1) enthielt das Lipid. Zur Kontrolle der Ausbeute wurden die Lipidgehalte der Eluate beider Präparationen mittels Ames Test (Ames, 1966) bestimmt. Die Bestimmung ergab Ausbeuten von 90 bzw. 85 %. Der zweite Peak (Chloroform/Methanol/Wasser 5:5:1) enthielt ein Protein von ca. 4 kDa und die Untereinheit *c* (Abb. 17, Kontrollgel, Fraktion13).

3.7.1 Vergleich der Lipide vor und nach der Reinigung durch Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie

Um sicherzustellen, dass sich durch die Reinigungsprozedur die Lipidzusammensetzung nicht verändert hatte wurde das Lipid vor und nach der Reinigung dünnschicht- und gaschromatographisch miteinander verglichen.

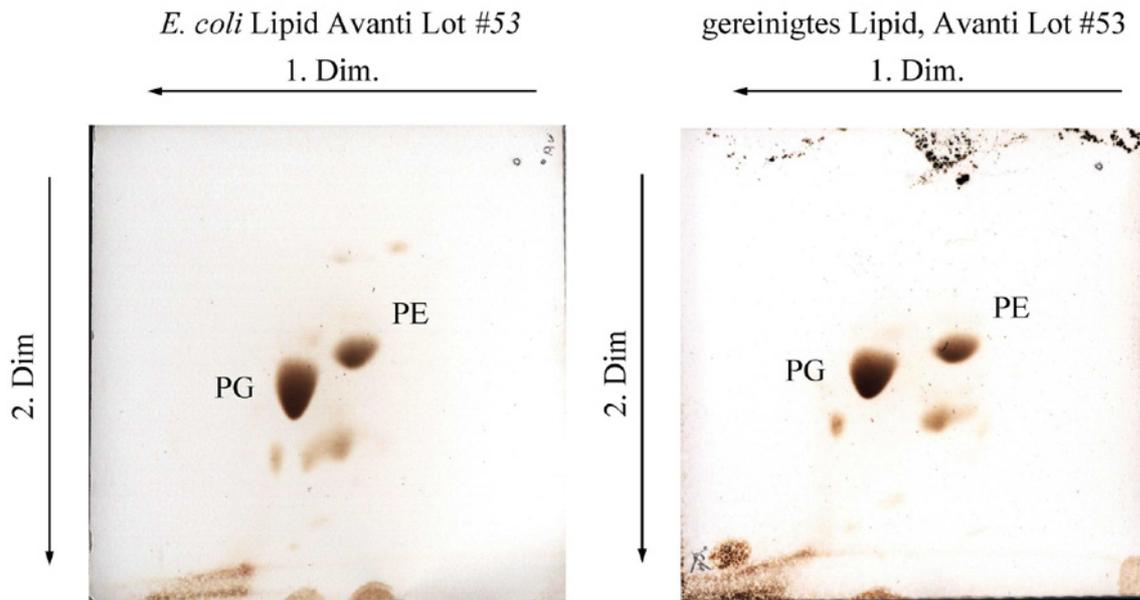


Abb. 18: Dünnschichtchromatographie der *E. coli* Lipide (Avanti, Nr. 100600 Lot# 53): Laufmittel 1. Dimension: Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4), Laufmittel 2. Dimension: Chloroform/Essigsäure/Methanol/Wasser (80:15:12:4). PE: Phosphatidylethanolamin, PG: Phosphatidylglycerin.

Um den Gehalt an verschiedenen Phospholipiden zu vergleichen, wurden sie vor und nach der Reinigung per Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb. 18). Die typischen Spots für Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerin waren in beiden Fällen zu sehen. Signifikante Unterschiede vor und nach der Reinigung traten nicht auf.

Um den mit der Dünnschichtchromatographie durchgeführten Vergleich quantifizierbar zu machen, wurden die Lipide vor und nach der Reinigung mittels eines Gaschromatographen untersucht. Hierbei ergab sich ebenfalls die nahezu vollständige Identität der Proben vor und nach der Reinigung. Beide Proben enthielten die gleichen Fettsäuren in nahezu identischen prozentualen Anteilen (Tab. 10). Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die Lipidzusammensetzung durch die Reinigung nicht veränderte.

Peak	<i>E. coli</i> Lipid (Avanti)		gereinigtes <i>E. coli</i> Lipid (Avanti)		Fettsäure
	Retentionszeit	Vorkommen [%]	Retentionszeit	Vorkommen [%]	
1	13,38	1,8	13,39	1,4	14:0
2	17,14	6,1	17,15	6,6	16:1 cis 9
3	17,57	37,6	17,57	36,1	16:0
4	19,27	19,7	19,28	19,0	17:0 cyclo 9-10
5	21,09	31,0	21,09	32,6	18:1 cis 11
6	23,08	3,9	23,07	4,2	19:0 cyclo 11-12

Tab. 10: Gaschromatographischer Vergleich der Fettsäurezusammensetzung von *E. coli* Lipid (Avanti, Lot# 56) vor und nach der Reinigung.

3.1.1 Rekonstitution mit gereinigtem *E. coli* Lipid (Avanti)

Zur weiteren Charakterisierung des gereinigten Lipids erfolgte ein Vergleich der Rekonstitution von gereinigtem und ungereinigtem Lipid (gleiche Lot#). Die Rekonstitution wurden jeweils mit gereinigtem (TIR-WT)-F_o und zur Kontrolle ohne F_o durchgeführt. Nach Toluol/Ether Fällung zeigte sich, dass die Menge an Untereinheit *c* im ungereinigten Lipid (Abb.19, Spur 5) sehr gering gegenüber der Menge an Untereinheit *c* war, die durch die Rekonstitution über das zugegebene F_o in die Liposomen gelangte.

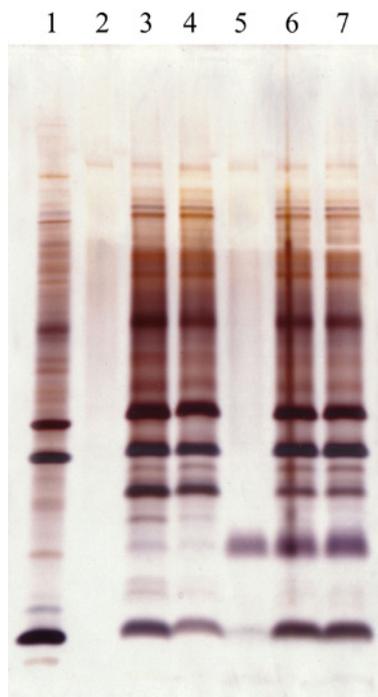


Abb. 19: Toluol/Ether Fällung von in gereinigtem (Avanti, Lot# 53) und nicht gereinigtem Lipid (Avanti, Lot# 53) rekonstituierten F_o Komplexen: 1. F_o (nicht rekonstituiert), 2. Kontrolle (ger. Lipid), 3. rek. F_o (ger. Lipid), 4. rek. F_o (ger. Lipid + Protease-Inhibitor), 5. Kontrolle (nicht ger. Lipid), 6. ger. F_o (nicht ger. Lipid), 7. ger. F_o (nicht ger. Lipid + Protease-Inhibitor). Die Verunreinigung zwischen den Banden der Untereinheiten *b* und *c* in den Spuren 5-7 wurden bei der Reinigung der Lipide mit der Lot# 56 nicht detektiert (Abb. 17)

Auch bei der Protonentranslokationsrate konnten keine signifikanten Unterschiede von (TIR-WT)-F_o rekonstituiert in gereinigtem oder ungereinigtem Lipid festgestellt werden (Abb. 20). Mit 131 μmol H⁺ x min⁻¹ x mg⁻¹ für das gereinigte Lipid zu 125 μmol H⁺ x min⁻¹ x mg⁻¹ für

das nicht gereinigte Lipid bewegten sich die Unterschiede im Rahmen der Messgenauigkeit des Systems.

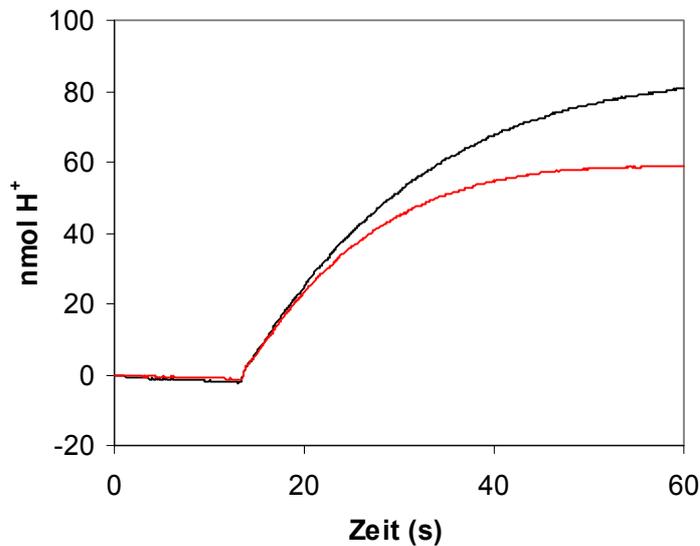


Abb. 20: Vergleich der Protonentranslokationsrate rekonstituierter (TIR-WT)-F₀ Komplexe in gereinigtem und nicht gereinigtem *E. coli* Lipid (Avanti): (AV —, 125 $\mu\text{mol H}^+$ x min^{-1} x mg^{-1}) und gereinigtem Lipid (PL —, 131 $\mu\text{mol H}^+$ x min^{-1} x mg^{-1}).

3.2 Verteilung der c Untereinheiten auf die F₀-Komplexe

3.2.1 Quantifizierung der Untereinheiten a, b und c von pWSB30.0-F₀ und pRPG54-F₀ mittels ELISA

Die Quantifizierungen der Untereinheiten a, b und c mit Sypro Ruby™, ¹²⁵I Protein A und in Minizellen wurden jeweils unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das bedeutet, dass die Gesamtmenge an vorhandener Untereinheit c verglichen werden konnte, nicht aber die Verteilung der vorhandenen Menge auf die einzelnen Komplexe. Zur Unterscheidung, ob beim (TIR-Mut)-F₀ die vorhandenen c Untereinheiten gleichmäßig auf alle Komplexe verteilt wurden oder ob es wenige Komplexe mit einer dem (TIR-WT)-F₀ vergleichbaren Stöchiometrie an Untereinheit c gab, wurden ELISA Untersuchungen eingesetzt. Ausgehend von der Annahme, dass nur ein oder wenige Antikörper an einen assemblierten c-Komplex binden konnten, war bei einer gleichmäßigen Verteilung der vorhandenen Untereinheiten c ein identisches Bindungssignal bei (TIR-WT)-F₀ und (TIR-Mut)-F₀ zu erwarten. War die Stöchiometrie in den F₀ Präparationen allerdings invariabel, müssten sich auch in den Bindungskurven zwischen (TIR-WT)-F₀ und (TIR-Mut)-F₀ deutliche Unterschiede zeigen, da es in diesem Fall bei der (TIR-Mut)-F₀ deutlich weniger Komplexe geben musste. Im Gegensatz zum denaturierenden System zeigte sich beim Vergleich der Untereinheiten mittels ELISA, dass keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an Untereinheit c zwischen

pWSB30.0-F₀ und pRPG54-F₀ im nativen System festgestellt werden konnten. Untereinheit *a* und *b* waren bei pWSB30.0-F₀ in 3,3fachem Überschuss vorhanden, während Untereinheit *c* in pWSB30.0-F₀ in 2,8fachem Überschuss gegenüber pRPG54-F₀ zu finden war. Nimmt man an, dass nur ein oder wenige Antikörper pro F₀ Komplex binden konnten, könnte dieser Befund darauf hindeuten, dass sich die *c* Untereinheiten gleichmäßig auf die vorhandenen Komplexe verteilen. Damit würden die Präparationen 30/III/I und 54/VI/I zwei F₀ Populationen mit verschiedenen *c*-Stöchiometrien darstellen. Der Faktor 3,3 (Abb. 21, Untereinheit *a*) im F₀-Gehalt zwischen den Präparationen von (TIR-WT)-F₀ und (TIR-Mut)-F₀ bestätigte außerdem die Quantifizierungen mit Sypro Ruby™ (Kap. 3.1.2, Faktor 3,0) und ¹²⁵I Protein A (Kap. 3.1.1, Faktor 3,6).

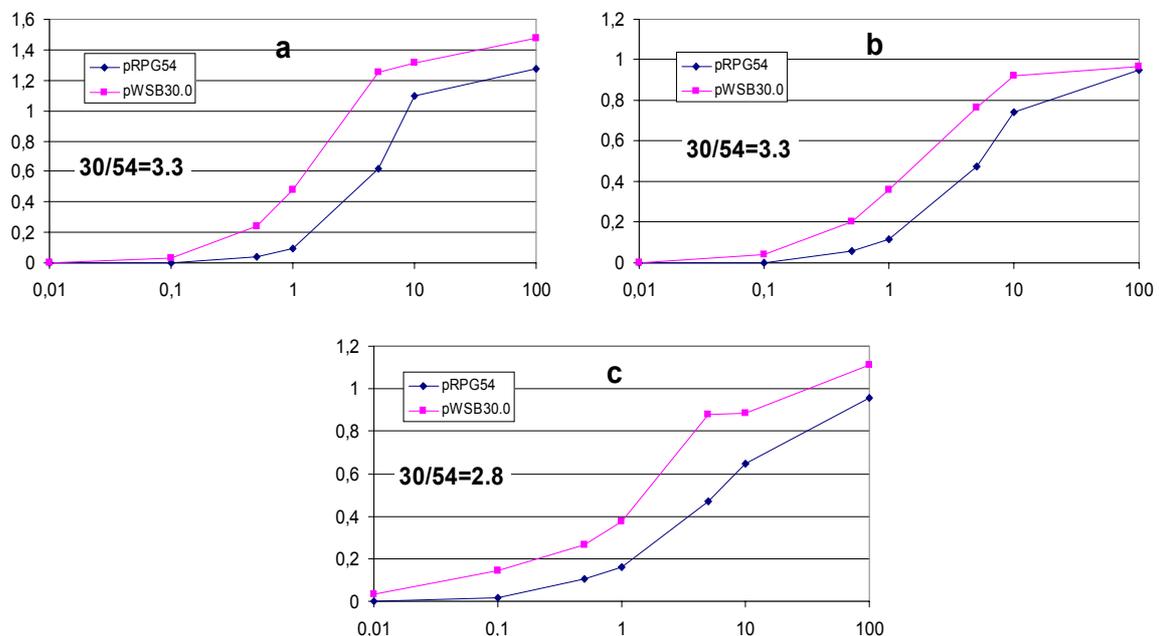


Abb. 21: Quantifizierung der Untereinheiten *a*, *b* und *c* von pRPG54-F₀ und pWSB30.0-F₀ mittels ELISA.

3.2.2 Quantifizierung von pBWU13NOC- und pRPG54NOC-Membranen mittels ECL und alkalischer Phosphatase

Für den direkten Vergleich der Quervernetzungsrate der Untereinheit *c* zwischen pBWU13NOC-F₀ und pIA1NOC-F₀ auf Membranebene (Kap. 3.8.3) wurden die Untereinheiten *a* und *c* mittels Alkalischer Phosphatase bzw. SuperSignal® (Pierce) nach

Immunoblot und Antikörperbindung quantifiziert. Hierdurch konnte die Quervernetzungsrate der Untereinheit *c* zwischen pIA1NOC-F_o und pBWU13NOC-F_o direkt verglichen werden. Dabei ergab sich, dass pIA1NOC-F_o im Gegensatz zum pBWU13NOC-F_o einen 1,7fach (4,5/2,7) geringeren Anteil an Untereinheit *c* aufwies. Damit waren die relativen Anteile von Untereinheit *a* und Untereinheit *c* in Membranen von pBWU13NOC-F_o und pIA1NOC-F_o identisch mit denen in gereinigtem F_o (Tab. 11), welche mit Sypro Ruby™ und ¹²⁵I Protein A bestimmt worden waren (Kap. 3.1.2 und 3.1.1). Dies lässt darauf schließen, dass sich bei der F_o Präparation zumindest die relativen Verhältnisse der einzelnen Untereinheiten nicht wesentlich änderten.

Versuch		<i>c</i> 13NOC/ <i>c</i> 1NOC	<i>a</i> 13NOC/ <i>a</i> 1NOC
1	ECL 15 s exponiert	3,5	
	AP	3,8	
2	ECL 10 s exponiert	6,5	2,6
	ECL 60 s exponiert	4,5	2,7
	AP	4,2	2,5
3	ECL 5 s exponiert	4,8	2,9
	ECL 10 s exponiert	5,6	2,6
	ECL 20 s exponiert	4,2	3
	AP	3,5	
Mittelwert		4,5	2,7

Tab. 11: Quantifizierung der Untereinheiten *a* und *c* aus pBWU13NOC- und pIA1NOC-Membranen nach Immunoblot und Antikörperbindung mittels SuperSignal® (Pierce) und alkalischer Phosphatase.

3.2.3 Cystein Quervernetzung der Untereinheit *c* auf Membranebene

Um einen möglichst direkten Zugang zur Situation *in vivo* zu bekommen, boten sich Quervernetzungsexperimente mit Cysteinmutanten an. Jones *et al.* (1998) hatten gezeigt, dass mit den Austausch *c*A21C und *c*M65C eine Quervernetzung mehrerer Untereinheiten *c* untereinander möglich war. Ausgehend von der Annahme, dass die maximale Anzahl an quervernetzten Untereinheiten ihrer Stöchiometrie im F_o Komplex entspricht, bestand mit diesem Ansatz die Möglichkeit, die eventuell verschiedenen Stöchiometrien von pBWU13NOC-F_o - und pIA1NOC-F_o auch auf Membranebene und damit *in vivo* direkt sichtbar zu machen.

Im Westernblot wurden maximal 10 verschiedene *c*-Quervernetzungsprodukte sowohl bei pBWU13NOC-F_o-Membranen (WT) als auch bei pIA1NOC-F_o-Membranen (Mut)

identifiziert (Abb. 22). Unter Berücksichtigung des in Kap. 3.8.2 ermittelten quantitativen Verhältnisses von gesamt- F_0 in pBWU13NOC- F_0 und pIA1NOC- F_0 , wurde Spur 1 mit Spur 6, bzw. Spur 2 mit Spur 7 verglichen, da diese ungefähr gleiche Mengen an Untereinheit c enthielten. Auffällig war allerdings die höhere Quervernetzungsrate der Untereinheit c beim pBWU13NOC- F_0 gegenüber der von pRPG54NOC- F_0 .

Auf Membranebene konnte also, im Gegensatz zu den F_0 -Präparationen, kein Unterschied in der Stöchiometrie der Untereinheit c festgestellt werden, vielmehr ergaben die Quervernetzungsexperimente eine festgelegte Anzahl von 10 Untereinheiten c pro F_0 -Komplex.

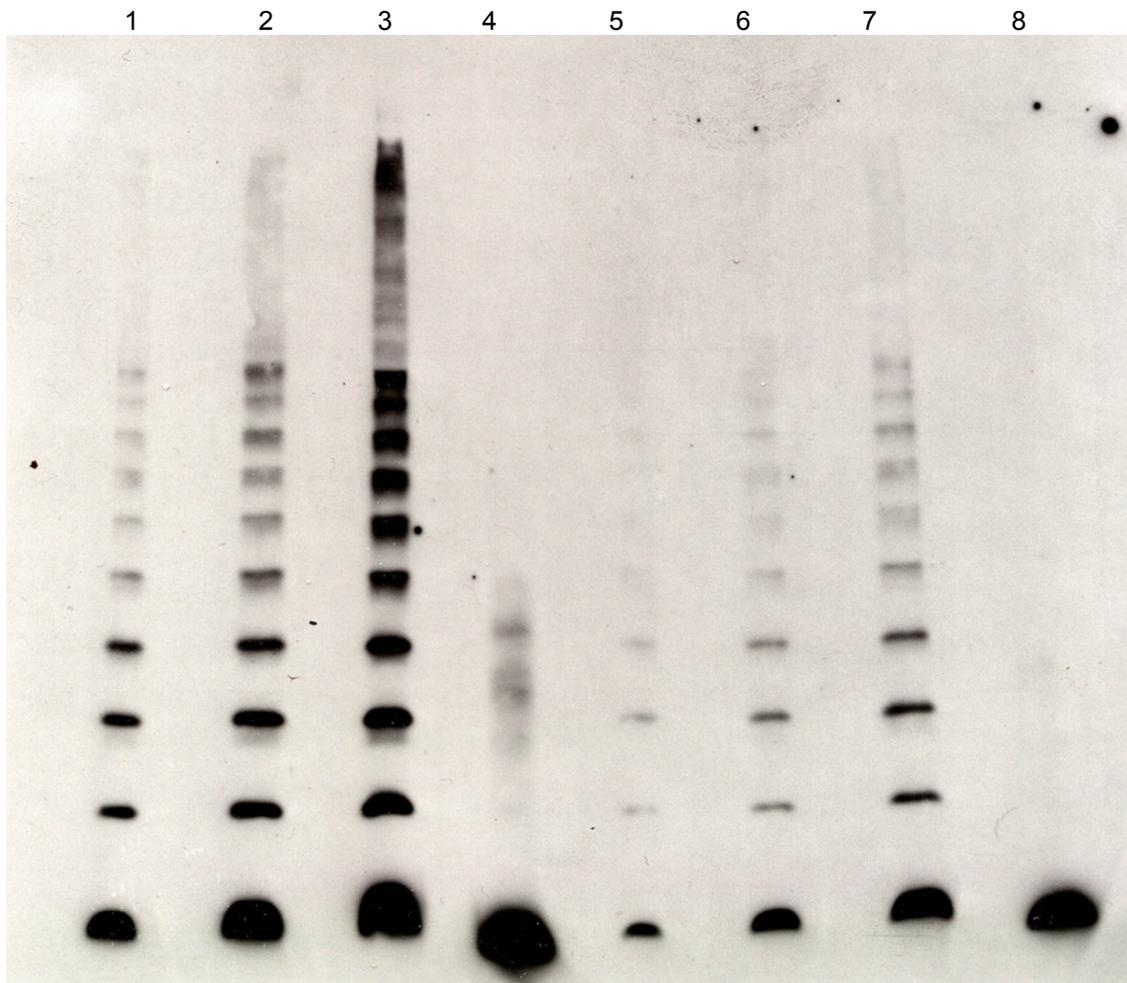


Abb. 22: Westernblot nach Quervernetzungsreaktion von pBWU13NOC- und pIA1NOC-Membranen: Spur 1-3: pBWU13NOC-Membranen 5, 10, 20 μg . Spur 5-7: pIA1NOC-Membranen 10, 20, 40 μg . Spur 4 und 8: pBWU13NOC- bzw. pIA1NOC-Membranen, Zugabe von EDTA und NEM vor Zusatz von CuP (Kontrolle). Detektion mit IgG M α c GDH 9-2A2 (Kap 2.1.1).

3.2.4 Cystein Quervernetzung der Untereinheit *c* auf Liposomenebene

Da bei den Quervernetzungsexperimenten auf Membranebene eine feste Stöchiometrie von 10 Untereinheiten *c* pro F_0 -Komplex beobachtet worden war, die ELISA Versuche mit gereinigten F_0 -Komplexen (Kap. 3.8.1) aber auf eine variable Stöchiometrie hindeuteten, wurde die Methode der Quervernetzung auch auf rekonstituierte, gereinigte F_0 -Komplexe angewendet (Abb. 23). Hierbei sollte sich zeigen, ob die Stöchiometrie der Untereinheit *c* der gereinigten F_0 -Komplexe tatsächlich variabel war.

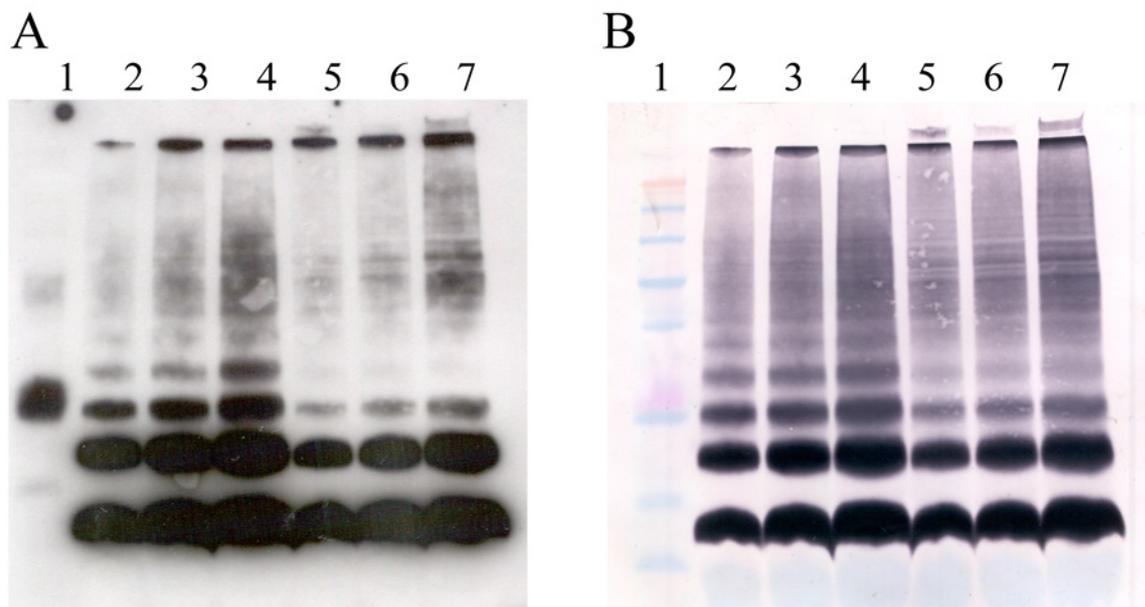


Abb. 23: Westernblot nach Quervernetzungsreaktion auf Liposomenebene: A: Hyperfilm mit SuperSignal® (Pierce), B: Alkalische Phosphatase. 1. Standard; 2. pBWU13NOC- F_0 1,35 μ g; 3. pBWU13NOC- F_0 2,25 μ g; 4. pBWU13NOC- F_0 3,15 μ g; 5. pIA1NOC- F_0 4,2 μ g; 6. pIA1NOC- F_0 7 μ g; pIA1NOC- F_0 9,8 μ g.

Die Ergebnisse der Quervernetzungsuntersuchungen auf Liposomenebene waren nicht eindeutig. Die Effizienz der Quervernetzung war bei pBWU13NOC im Vergleich zu pIA1NOC deutlich höher. Dieser Effekt konnte jedoch auch schon bei der Quervernetzung auf Membranebene beobachtet werden (Kap. 3.8.3). Das Hauptproblem bestand darin, dass bei diesen Versuchen keine eindeutige Maximalanzahl an quervernetzten Untereinheiten *c* abgezählt werden konnte. Dieses ließe sich einerseits durch die ungenügende Trennkapazität der verwendeten Gelsysteme, andererseits aber auch durch die im Vergleich zum Membransystem erheblich geringere Quervernetzungsrate erklären.

3.2.5 Gefrierbruchuntersuchungen

Da die Quervernetzungsexperimente an rekonstituierten F_o -Komplexen (Kap. 3.8.4) nicht zur Unterstützung der ELISA Untersuchungen (Kap. 3.8.1) herangezogen werden konnten, wurden die Durchmesser der F_o -Komplexe nach Rekonstitution und Gefrierbruch direkt gemessen. Mit dieser Methode sollte eine eventuell vorhandene Variabilität der Stöchiometrie der Untereinheit c bei rekonstituierten F_o -Komplexen direkt sichtbar gemacht werden.

Die Aufnahmen zeigten eine relativ homogene Verteilung der Liposomengröße von ca. 100 – 200 nm Durchmesser (Abb. 24a). Außerdem schienen die Liposomen grundsätzlich einschichtig zu sein. In den Kontrollliposomen waren keine Partikel zu erkennen (Abb. 24d). Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den in den Proteoliposomen gefundenen Partikeln tatsächlich um F_o handelte. In Liposomen, die zusammen mit gereinigter Untereinheit c rekonstituiert wurden, konnten ebenfalls keine Partikel beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

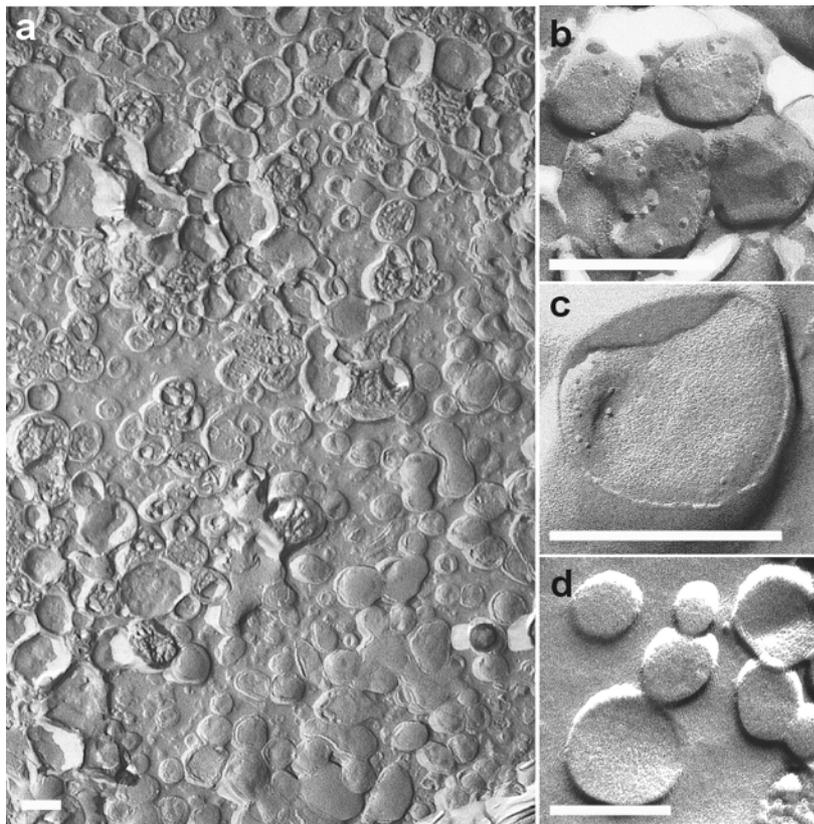


Abb. 24:
Gefrierbruchuntersuchungen:
 (a) Übersicht (TIR-WT)- F_o -Liposomen, (b) Detail (TIR-WT)- F_o -Liposomen, (c) Detail (TIR-Mut)- F_o -Liposomen (d) Detail Kontrolle ohne F_o . Für diese Aufnahmen wurde ein Protein:Lipid Verhältnis von 1:110 eingestellt. Die Liposomen wurden vor dem Einfrieren extrudiert. Die Abbildungsmaßstäbe von a-d sind nicht identisch. Der in den Abbildungen dargestellte weiße Balken hat eine Länge von 0,2 μm .

Beim Vergleich der Durchmesser von pBWU13- F_o - (WT) und pIA1- F_o -Komplexen (Mut) zeigte sich, dass die pBWU13- F_o -Komplexe mit 10,3 nm Durchmesser 1,1 nm größer waren als die pIA1- F_o -Komplexe mit 9,2 nm (Abb. 25 und Tab. 12). Der Vergleich von pBWU13- F_o und pIA1- F_o mit und ohne gereinigter Untereinheit c ergab, dass sich die pIA1- F_o Komplexe

vergrößerten, während sich die pBWU13-F₀ Komplexe nach Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* nicht veränderten. Dieser Befund ließ darauf schließen, dass die pIA1-F₀ Komplexe im Vergleich zu den pBWU13-F₀-Komplexen mit einheitlich weniger *c* ausgestattet waren. Durch die Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* erhöhte sich möglicherweise die Stöchiometrie der Untereinheiten *c* pro F₀ Komplex, so dass es zu einer Vergrößerung des Durchmessers kam.

Damit waren die ELISA Experimente (Kap. 3.8.1), wonach sich die Stöchiometrie der Untereinheit *c* im rekonstituierten System variabel zeigte, bestätigt.

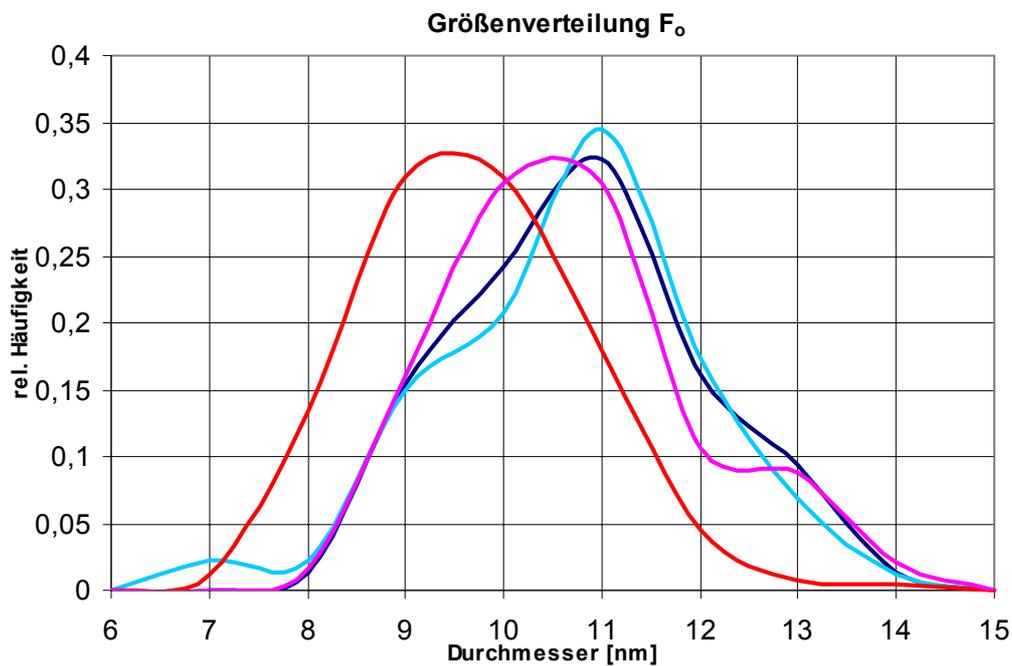


Abb. 25: Vergrößerung des Durchmessers von pIA1-F₀ nach Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz: (—) (TIR-WT)-F₀, (—) (TIR-WT)-F₀ + Untereinheit *c*, (—)(TIR-Mut)-F₀, (—) (TIR-Mut)-F₀ + Untereinheit *c*.

	pBWU13-F ₀	pBWU13-F ₀ + <i>c</i>	pIA1-F ₀	pIA1-F ₀ + <i>c</i>
Durchmesser [nm]	10,3	10,3	9,2	10,2
min [nm]	7,7	6,8	6,7	7,1
max [nm]	14,3	14,3	14,0	14,4
stdev [nm]	1,3	1,5	1,2	1,3
Messungen [n]	149	89	246	238

Tab. 12: Durchmesser von pBWU13-F₀ und pIA1-F₀ vor und nach Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz. Die Tabelle enthält die Mittelwerte aller Messungen der jeweiligen F₀-Population, welche nicht mit den Scheitelpunkten der in Abb. 25 dargestellten Kurven identisch sind.

4 Diskussion

Die ATP-Synthase aus *E. coli* ist sicherlich eine der am besten untersuchten ATP-Synthasen. Aufgrund ihrer im Vergleich zur ATP-Synthase anderer Organismen relativ einfachen Struktur und der guten genetischen Manipulierbarkeit, stehen für dieses Enzym bei weitem die meisten Daten zur Verfügung. Allerdings ist die Frage nach der Stöchiometrie der Untereinheit *c* des F_0 -Komplexes noch immer nicht abschließend geklärt. Mittlerweile gibt es in der Literatur Stöchiometriedaten der Untereinheit *c* für eine ganze Reihe von Organismen. So wurden durch Rasterkraftmikroskopie 11 *c* Untereinheiten für *Ilyobacter tartaricus* (Stahlberg *et al.*, 2001) und 14 Untereinheiten im *c* Oligomer der ATP Synthase aus Chloroplasten ermittelt (Seelert *et al.*, 2000). Röntgenstrukturuntersuchungen an der ATP Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* ergaben 10 *c* Untereinheiten pro Oligomer (Stock *et al.*, 1999), ein Wert der in Quervernetzungsuntersuchungen auch bei *E. coli* gefunden wurde (Jiang *et al.*, 2001). Grundsätzlich erscheint jedoch eine variable Stöchiometrie der Untereinheit *c* gerade bei einem Bakterium wie *E. coli* durchaus sinnvoll, da die ATP Synthase in diesem Organismus je nach physiologischer Situation entweder als Protonenpumpe oder zur Synthese von ATP eingesetzt werden muss. Bei den Untersuchungen an *I. tartaricus* und Chloroplasten wurde allerdings festgestellt, dass das *c* Oligomer immer denselben Durchmesser hatte, auch wenn Untereinheiten fehlten (Müller *et al.*, 2001), was auf eine feste Stöchiometrie schließen lässt. Das *c* Oligomer aus *E. coli* ist allerdings hinsichtlich seiner Stabilität nicht mit dem von *I. tartaricus* oder Chloroplasten zu vergleichen (Neumann *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2001).

Da, auf der Grundlage der Modelle von Junge *et al.* (1997), Dimroth *et al.* (1998) und Rastogi & Girvin (1999), über die Größe des *c*-Oligomers das H^+ /ATP-Verhältnis eingestellt werden kann, bietet sich diese Regulationsmöglichkeit an, um unter allen Bedingungen eine möglichst effiziente Energiewandlung zu gewährleisten. Eine Anpassung der Protonenzahl pro ATP kann also auf der einen Seite auch bei unterschiedlichen Protonenpotentialen eine optimale Ausnutzung der Energie gewährleisten und auf der anderen Seite ohne Veränderung des Protonenpotentialen eine Umschaltung zwischen ATP Synthese und Protonenpumpe ermöglichen, was gerade für einen sehr anpassungsfähigen Organismus von großem Vorteil sein kann. Bei Messungen des H^+ /ATP-Verhältnisses an *Synechococcus* waren z.B. je nach Belichtung und Wachstumstemperatur Werte von 4 bis 9 ermittelt worden (van Walraven *et*

al., 1997). Allerdings müsste dabei sichergestellt werden, dass zu jeder Zeit immer nur eine *c*-Stöchiometrie bzw. ein H^+ /ATP-Verhältnis im Organismus vorkommt, da ansonsten die gleichzeitige Aktion von ATP Synthese und Protonenpumpe denkbar wäre. Durch die Untersuchungen der Rotation von an die Untereinheit γ gekoppelten Actinfilamenten konnte zwar gezeigt werden, dass die Energiekonversion von der ATP Hydrolyse zum Drehmoment in Untereinheit γ mit einer Effizienz von nahezu 100 % verläuft (Oster & Wang 2000), bei der Übertragung dieser Rotation auf die Protonentranslokation bzw. der Übertragung der Protonentranslokation auf die Rotation der Untereinheit γ muss aber ein Energieüberschuss vorhanden sein, da sich das System ansonsten im Gleichgewicht befände und damit stillstehen würde. Eine Zelle hat also ein elementares Interesse daran, zur gleichen Zeit immer nur eine Reaktion ablaufen zu lassen, wenn sie keine Energie verschwenden will. Wenn *E. coli* von der Möglichkeit Gebrauch macht auf verschiedene physiologische Situationen mit einer variablen *c*-Stöchiometrie zu reagieren, dann ist es wahrscheinlich, dass es bei *E. coli* und vergleichbaren Organismen einen Regulationsmechanismus gibt, der erstens verhindert, dass verschiedene *c*-Stöchiometrien auftreten und zweitens die *c*-Stöchiometrie auf die jeweilige physiologische Situation anpasst. Theoretische Berechnungen der Struktur des *c*-Oligomers durch Energieminimierungen und molekulare Dynamik auf der Grundlage der von Girvin *et al.* (1998) durch NMR bestimmten Struktur der Untereinheit *c* lassen eine Variation der im Oligomer vorhandenen *c*-Untereinheiten durchaus zu (Groth & Walker 1997; Dmitriev *et al.* 1999a).

In der neueren Literatur tauchen vereinzelt Hinweise auf eine mögliche Variabilität der Stöchiometrie der Untereinheit *c* bei *E. coli* auf. Schemidt *et al.* (1998) untersuchten die Expression von *atpB* und *atpE* mittels transkriptioneller und translationeller *lacZ* Fusionen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dazu wurden Zellen sowohl auf Succinat, als auch auf Glucose als C-Quelle gezogen und die relative Expression beider Gene miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass beim Wachstum auf Succinat mehr *atpB* (Untereinheit *a*) und weniger *atpE* (Untereinheit *c*), während beim Wachstum auf Glucose weniger *atpB* und mehr *atpE* exprimiert wurde. Da beim Wachstum auf Succinat eine Substratkettenphosphorylierung nicht möglich ist, wird der Enzymkomplex unter diesen Bedingungen zur ATP Synthese unbedingt benötigt. Es ist daher verwunderlich, dass beim Wachstum auf der nicht fermentierbaren C-Quelle die Stöchiometrie der Untereinheit *c* abgesenkt wird, während sie beim Wachstum auf der fermentierbaren C-Quelle angehoben wird, da beides thermodynamisch ungünstig ist. Die Autoren vermuten daher einen

kinetischen Vorteil. Ausgehend von der Annahme, dass die Translokationsgeschwindigkeit für Protonen konstant ist, postulieren sie eine schnellere Rotationsgeschwindigkeit für kleinere *c*-Oligomere, dadurch könnte die ATP Synthese beim Wachstum auf Succinat schneller ablaufen und das Enzym beim Wachstum auf Glucose mehr Protonen pro ATP transportieren. Voraussetzung für einen solchen Mechanismus ist allerdings, dass die Gleichgewichtspotentiale eine Reaktion in die entsprechende Richtung überhaupt noch zulassen.

Zur Klärung der Frage nach einer möglicherweise vorhandenen Variabilität der Stöchiometrie der Untereinheit *c* im F_0 -Komplex der ATP-Synthase von *E. coli* wurde in dieser Arbeit vor allem ein Wildtypstamm mit einer Mutante, die eine erniedrigte Expressionsrate der Untereinheit *c* aufweist, verglichen. Diese Mutante besitzt eine Punktmutation in der Translationsinitiationsregion (TIR) vor dem *atpE* Gen, die bei der Konstruktion des Plasmids pRPG54 (Gunsalus *et al.* 1982) unbeabsichtigt selektioniert worden war und führt zu einer Erniedrigung der Syntheserate für die Untereinheit *c* um einen Faktor zwei bis drei (Solomon & Brusilow, 1988; Schaefer *et al.*, 1989). Die TIR für ein beliebiges translationsreguliertes Gen lässt sich nur schwer eingrenzen, allgemein geht man davon aus, dass ein Bereich von -30 bis +20 Basen um das Startcodon eine Rolle spielt (McCarthy, 1988). Für die TIR vor *atpE* konnte gezeigt werden, dass die Expression der Untereinheit *c* nach der Entfernung von 20 Basen vor der Shine Dalgarno Sequenz deutlich absank (McCarthy *et al.* 1985). Für die Untersuchungen kamen vier Plasmide zum Einsatz. Das Plasmid pRPG54 (Mut), welches eine Punktmutation in der TIR vor dem *atpE* Gen trägt und ansonsten als Derivat von pACYC184 das gesamte *atp*-Operon mit Ausnahme des *atpI*-Gens enthält. Ein identisches Plasmid mit dem Namen pWSB30.0 (WT) ohne Mutation war von Brusilow (1987) konstruiert worden, so dass vergleichende Analysen vor identischem genetischen Hintergrund möglich waren. Zur Kontrolle wurde im Rahmen dieser Arbeit noch ein zweites Plasmidpaar verwendet, welches die Auswirkungen der Mutation vor einem anderen Vektorhintergrund verifizieren sollte. Dazu wurde die Mutation aus pRPG54 (Mut) in das Plasmid pBWU13 (WT) (*atpI'*BEFHAGDC) übertragen, wodurch pIA1 (Mut) entstand.

Solomon *et al.* (1988) ermittelten für die Mutante bei *in vivo* Transkriptions-Translationsexperimenten eine zwei- bis dreifache Erniedrigung der *atpE* Expression gegenüber dem Wildtyp. Bei der Präparation von F_0 im Verlauf der vorliegenden Arbeit deutete allerdings ein signifikanter Unterschied in der ATPase-Aktivität auf Membranebene

zwischen Wildtyp und Mutante an, dass sich die Auswirkungen der Mutation nicht auf die Expression der Untereinheit *c* allein beschränkten. Bei den Präparationen im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass Membranen aus LE392 Δ *atpI-C*/pWSB30.0 (WT) eine fünfmal höhere ATPase Aktivität als Membranen aus LE392 Δ *atpI-C*/pRPG54 hatten. In Versuchen mit Minizellen (Kap. 3.1.3) zeigte sich, dass neben der Erniedrigung der Syntheserate der Untereinheit *c* um einen Faktor acht pRPG54-F₀ auch alle anderen Untereinheiten auf ungefähr die Hälfte ihrer wildtypspezifischen Syntheseraten heruntergeregelt wurden. Dieser Effekt könnte unter anderem auf die translationelle Kopplung der Gene im *atp*-Operon zurückzuführen sein. Da aber auch *atpB*, welches direkt vor dem *atpE* Gen liegt, von der Mutation betroffen ist, kann translationelle Kopplung alleine den beobachteten Effekt nicht erklären. Die Reduktion im Gehalt an Untereinheit *a* könnte durch die Beobachtung erklärt werden, dass ihre Insertion und Assemblierung in die Membran abhängig von der Anwesenheit der Untereinheiten *b* und *c* ist. Es konnte gezeigt werden, dass unassemblierte Untereinheit *a* durch die membrangebundene ATP-abhängige Protease FtsH abgebaut wird (Akiyama *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1999). Denkbar ist auch, dass die Mutation die Stabilität der mRNA negativ beeinflusst, so dass sie schneller abgebaut wird. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Northern-Blot Experimente zur Aufklärung des *atp*-mRNA Gehalts von Wildtyp und Mutante durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente ließen allerdings keinen eindeutigen Schluss zu, so dass die Frage nach einer durch die Mutation in der TIR veränderten mRNA-Stabilität unbeantwortet bleiben muss. Des Weiteren ist eine Feedback Kontrolle der Untereinheit *c* auf das gesamte *atp*-Operon denkbar. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass die Bindung der Untereinheit *c* an die *atp*-mRNA einen stabilisierenden Effekt ausübt. Damit hätte die Expression der Untereinheit *c* einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation des gesamten *atp*-Operons.

Der unterschiedliche Gehalt an ATP Synthase in Wildtyp und Mutante hatte zur Folge, dass die (TIR-WT)-F₀-Präparationen deutlich weniger Verunreinigungen enthielten als die des (TIR-Mut)-F₀. Aus diesem Grund war der Proteingehalt der Präparationen kein zuverlässiges Maß für den Gehalt an F₀ in einer Präparation, da die (TIR-WT)-F₀-Präparationen bei gleichem Proteingehalt stets mehr F₀ enthielten als die (TIR-Mut)-F₀-Präparationen. Zur Quantifizierung dieses Sachverhalts wurden pWSB30.0-F₀(WT) und pRPG54-F₀(Mut) geblottet und mit ¹²⁵I Protein A markiert (Kap. 3.1.1). Dabei stellte sich heraus, dass pWSB30.0-F₀ im Verhältnis zum Proteingehalt 3,6 mal mehr Untereinheit *a* enthielt als pRPG54-F₀. Eine Wiederholung dieser Experimente mit dem fluoreszierenden Farbstoff

Sypro Ruby™ ergab einen Faktor 3,0. In den Versuchen mit Sypro Ruby™ wurden ebenfalls pBWU13-F₀ und pIA1-F₀ untersucht und sie ergaben für pBWU13-F₀ einen 1,9fach höheren Gehalt an Untereinheit *a* als in pIA1-F₀. Nimmt man die Untereinheit *a* als relatives Maß für den Gehalt einer Präparation an F₀, dann enthielten, relativ zum Proteingehalt, die (TIR-WT)-F₀-Präparationen 2-3mal soviel F₀ wie die Präparationen des (TIR-Mut)-F₀. In Veröffentlichungen, die sich mit einer erniedrigten Expressionsrate der Untereinheit *c* aufgrund der beschriebenen Mutation beschäftigen, wird auf den Unterschied bei den Expressionsraten der anderen Untereinheiten mit Ausnahme der Untereinheiten *b* und δ nicht eingegangen (Solomon & Brusilow, 1988; Schaefer *et al.*, 1989; Schemidt *et al.*, 1995). Da es aus technischer Sicht zu aufwendig erschien, den tatsächlichen Anteil an F₀ vom Gesamtprotein einer F₀-Präparation zu ermitteln, wurden relative Gehalte verschiedener Untereinheiten bestimmt und auf den Gehalt an Untereinheit *a* normiert. Für die Untereinheit *c* ergaben sich in der vorliegenden Arbeit, normiert auf die Untereinheit *a*, Verhältnisse von 1,8 bis 2,3 zwischen Wildtyp und Mutante (Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Quantifizierungen an gereinigtem und mit F₁ Antikörpern immunopräzipitierten F₀F₁-Komplexen ergaben einen 2-5fach niedrigeren Gehalt an Untereinheit *c* in pRPG54-F₀ gegenüber pWSB30.0-F₀ (Schemidt *et al.*, 1995). Dieser Befund deckt sich mit Messungen von Solomon *et al.* (1988), die für die Expressionsraten der Untereinheit *c* dieser beiden Plasmide einen Faktor von 2-3 ergaben. Mittels Toeprinting war von Schaefer *et al.* (1989) eine Verringerung der Initiationsfrequenz durch die Mutation um einen Faktor von 2,3 festgestellt worden.

Ein Unterschied zeigte sich bei der Quantifizierung der Untereinheit *b* mittels Sypro Ruby™ zwischen pWSB30.0/pRPG54 und pBWU13/pIA1. Während sich das Verhältnis *b*-pWSB30.0-F₀ zu *b*-pRPG54F₀ mit 4,6 signifikant vom Verhältnis *a*-pWSB30.0-F₀ zu *a*-pRPG54F₀ mit 3,0 unterschied, ergab sich für pBWU13-F₀ zu pIA1-F₀ für die Untereinheit *b* der gleiche Wert, wie für die Untereinheit *a* (Kap. 3.1.2). Es zeigte also in beiden Fällen ein Effekt der Mutation in der TIR von *atpE* auf die Expression der Untereinheiten *a* und *b*. Allerdings ist bei pIA1-F₀ die Menge an Untereinheit *a* und *b* zumindest gleichermaßen erniedrigt, so dass die relative Stöchiometrie von *a* und *b* der des Wildtyps entspricht. Um unerwünschte Effekte einer veränderten Stöchiometrie von *a* und *b* auszuschließen, wurden die weiteren Untersuchungen mit pBWU13-F₀ und pIA1-F₀ durchgeführt.

Die maximalen Protonentranslokationsraten, die für rekonstituiertes Wildtyp F₀ in dieser Arbeit gemessen wurden, liegen bei ca. 350 $\mu\text{mol H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Das entspricht einer

Translokationsrate von $840 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times \text{F}_0^{-1}$ und bei einer Stöchiometrie von 10 Untereinheiten c pro F_0 -Komplex ungefähr 80 Umdrehungen des c -Oligomers pro Sekunde. Die Protonentranslokation wurde durch ein Kaliumdiffusionspotential von ca. 100 mV induziert, so dass der spezifische Leitwert von F_0 unter diesen Bedingungen bei 1,4 fS liegt. Dieser Leitwert befindet sich im Bereich vieler in der Natur vorkommender Protonenkanäle und ca. drei bis vier Größenordnungen unter dem Leitwert der meisten Ionenkanäle (DeCoursey & Cherny, 2000). Cao *et al.* (2001) hatten F_0 nach einem ähnlichen Protokoll wie in dieser Arbeit rekonstituiert und kamen dabei auf eine Protonentranslokationsrate von $70 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times \text{F}_0^{-1}$, was gut eine Größenordnung unter den in dieser Arbeit ermittelten Werten liegt. Die Reinigung von F_0 erfolgte bei Cao *et al.* (2001), wie auch in der vorliegenden Arbeit, nach dem Protokoll von Schneider und Altendorf (1984), allerdings diente als Ausgangsmaterial ein Stamm mit chromosomal codierter ATP Synthase, der das Enzym in einer dem Wildtyp entsprechenden Menge synthetisiert, während für die vorliegende Arbeit stets Überproduzenten genutzt wurden. Der Gehalt an Verunreinigungen in den F_0 -Präparationen war daher bei Cao *et al.* (2001) daher relativ hoch. Da eine Quantifizierung des Gehalts an reinem F_0 in der Präparation extrem aufwendig ist, konnte die F_0 -Menge für die Auswertung der Translokationsraten nicht direkt aus der Menge an zugegebener F_0 -Präparation abgeleitet werden, so wie es in der vorliegenden Arbeit geschah, wo der F_0 -Gehalt der F_0 -Präparationen für die Auswertung mit 100 % gleichgesetzt wurde. Stattdessen wurde der Quotient aus maximalem Valinomycinsignal und maximalem CCCP-Signal (äquivalent zum TTFB-Wert in dieser Arbeit) gebildet. Da dieser bei 0,4 lag, gingen Cao *et al.* (2001) davon aus, dass nur 40 % aller Liposomen F_0 -haltig waren und zwar in der großen Mehrzahl nur mit einem F_0 -Komplex besetzt. Die Protonentranslokationsrate wurde dann über die Anzahl an Liposomen im Ansatz berechnet, wodurch die Berechnung unabhängig von der Reinheit der eingesetzten F_0 -Präparation war. In den von mir durchgeführten Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass der Quotient aus maximalem Valinomycinsignal und maximalem TTFB-Signal niemals den Wert eins erreichte, sondern ab einem Wert von ca. 0,7 auch bei deutlicher Erhöhung der F_0 Menge im Rekonstitutionsansatz relativ konstant blieb. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass der Unterschied von maximalem Valinomycin- und maximalem TTFB-Signal nicht alleine auf die relative Besetzung der Liposomen mit F_0 zurückzuführen ist. Vielmehr ist zu erwarten, dass auch F_0 -haltige Liposomen noch einen Beitrag zum TTFB-Signal leisten, da sich durch die Insertion des TTFB die relativen Permeabilitäten für Kalium und Protonen drastisch ändern. Dadurch bewirkt TTFB auch in F_0 -haltigen Liposomen noch einen deutlichen Protoneneinstrom. Da dieser Effekt allerdings nicht quantifizierbar ist,

wurden die Protonentranslokationsraten für die vorliegende Arbeit weiterhin auf der Grundlage des Proteingehalts ermittelt, obwohl die so ermittelten Raten, bedingt durch die enthaltenen Verunreinigungen, sicherlich zu niedrig sind. Des Weiteren kann man nicht davon ausgehen, dass das eingesetzte F_0 zu 100 % funktionell rekonstituiert wird, was zu einer weiteren Unterschätzung der tatsächlichen Protonentranslokationsraten führt. In früheren Untersuchungen waren nach Rekonstitution von F_0 durch Dialyse mit anschließendem Einfrieren und Auftauen Protonentranslokationsraten von $14 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ bzw. $21 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ gemessen worden (Dmitriev *et al.*, 1995; Schneider & Altendorf, 1985b). Beim Vergleich dieser Daten stellt sich natürlich die Frage nach der physiologischen Protonentranslokationsrate eines F_0F_1 -Komplexes in *E. coli*. Betrachtet man eine auf der nicht fermentierbaren C-Quelle Glycerin aerob wachsende *E. coli* Zelle, so kann man davon ausgehen, dass die gesamte zur Biosynthese benötigte ATP-Menge durch die ATP Synthase bereitgestellt wird. Bei ca. 3000 ATP-Synthasen pro Zelle (von Meyenburg *et al.*, 1984) einem Energiebedarf von 34,8 mmol ATP für 1 g Zellmaterial (Gottschalk, 1984) und einer Verdopplungszeit von 90 min ist bei einer Stöchiometrie von 10 Untereinheiten c pro F_0 -Komplex eine Protonentranslokationsrate von ungefähr $1000 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ nötig, um die erforderliche ATP Menge zu erzeugen. Die aus der ATP Synthase theoretisch abgeleitete Protonentranslokationsrate von Thylakoiden liegt mit $900 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ praktisch im gleichen Bereich (Schönknecht *et al.*, 1986). Spektrometrische Messungen an F_1 -freien Thylakoiden hatten Translokationsraten von $6200 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ ergeben (Schönknecht *et al.*, 1986). Die Rotationsgeschwindigkeit der Untereinheit γ im F_1 -Komplex wurde mit Hilfe einer an diese Untereinheit gekoppelten Nanogoldkugel von 40 nm Durchmesser bestimmt. Sie lag bei 130 Umdrehungen pro Sekunde, was theoretisch, bei Kopplung an ein Oligomer mit 10 c -Untereinheiten, mit einer Translokationsrate von $1300 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ gleichzusetzen wäre. Aus der Hydrolyserate von F_0F_1 kann eine Protonentranslokationsrate von ungefähr $1000 \text{ H}^+ \times \text{s}^{-1} \times F_0^{-1}$ abgeleitet werden (Kinosita *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit gemessenen Maximalwerte für die Protonentranslokationsrate liegen also im physiologisch sinnvollen Bereich und sind mit neueren Daten, die auf vollständig anderen Messmethoden beruhen, vergleichbar.

Die gemessenen Raten für das (TIR-Mut)- F_0 mit weniger Untereinheit c liegen zwischen einem Faktor zwei und einem Faktor neun unter denen des (TIR-WT)- F_0 . Geht man davon aus, dass das (TIR-Mut)- F_0 im Durchschnitt nur die Hälfte an c Untereinheiten hat, würde das bedeuten, dass die Rotationsgeschwindigkeit des kleineren c -Oligomers geringer ist, als die

des größeren *c*-Oligomers. Damit ist der von Schemidt *et al.* (1998) bereits erläuterte kinetische Vorteil eines kleineren *c*-Oligomers gegenüber einem größeren *c*-Oligomer nicht gegeben. Es ist daher vor dem Hintergrund dieser Daten nicht zu erklären, warum beim Wachstum auf Succinat die Synthese der Untereinheit heruntergeregelt wird, obwohl dieses sowohl thermodynamisch als auch kinetisch ungünstig erscheint.

Die sehr hohe Konzentration an Triton X-100 am Anfang der Rekonstitution hat möglicherweise Folgen für die Integrität der F_0 -Komplexe. Bei dem Versuch, den gereinigten, in Dodecylmaltosid gelösten F_0 -Komplex einer nativen Gelelektrophorese zu unterziehen (Schägger *et al.*, 1994) zeigte sich deutlich eine Dissoziation einzelner Untereinheiten. Insbesondere die Untereinheit *c* neigte dazu, sich vom Komplex abzutrennen (unveröffentlichte Daten). Versuche den F_0 -Komplex mit verschiedenen Detergenzien über eine Säule zu reinigen, scheiterten ebenfalls an einer zumindest partiellen Dissoziation der Untereinheiten. Die Vermutung liegt daher nahe, dass auch während der Rekonstitution eine Dissoziation eintritt und mit der Entfernung des Detergens eine langsame Neuassemblierung der F_0 -Komplexe stattfindet, was weitreichende Konsequenzen für die Interpretation der Stöchiometriedaten hätte. Dass eine *in vitro* Assemblierung des F_0 -Komplexes aus den einzelnen Untereinheiten möglich ist, konnte durch Schneider & Altendorf (1985b) sowie Dmitriev *et al.* (1995) gezeigt werden. Außerdem gelang es, im Rahmen dieser Arbeit, die Protonentranslokation des (TIR-Mut)- F_0 durch Zugabe von gereinigter Untereinheit *c* zum Rekonstitutionsansatz auf das Niveau des (TIR-WT)- F_0 anzuheben (Kap. 3.5). Es ist daher wahrscheinlich, dass die durchweg kleineren (TIR-Mut)- F_0 -Komplexe durch den Einbau zusätzlicher *c* Untereinheiten während der Rekonstitution vergrößert wurden, bzw. nach ihrer Dissoziation und der Zugabe zusätzlicher Untereinheit *c* während der Rekonstitution mit einem höheren Gehalt an Untereinheit *c* assembliert wurden. Der Beweis für diesen Mechanismus wäre erbracht, wenn durch die Zugabe von nicht funktioneller Untereinheit *c* (D61G) (Dmitriev *et al.* 1995) zum Rekonstitutionsansatz die Protonentranslokationsrate auf null gesenkt werden kann, da die Daten in dieser Arbeit auf einen Einbau neuer *c* Untereinheiten in vorhandene F_0 -Komplexe hindeuten.

ELISA Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit (Kap. 3.8.1) erbrachten den ersten Hinweis darauf, dass es sich bei dem gereinigten (TIR-Mut)- F_0 im Vergleich zu (TIR-WT)- F_0 um Komplexe mit durchschnittlich weniger *c* Untereinheiten und nicht um eine verringerte Anzahl an Komplexen mit identischer *c*-Stöchiometrie handelt. Die Unterschiede im Gehalt

an Untereinheit c , die in der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese nach der Quantifizierung gemessen wurden (Kap. 3.1.1-3.1.3), traten im nativen ELISA System nämlich nicht auf (Kap. 3.8.1). Birkenhäger *et al.* (1995) konnten zeigen, dass aus sterischen Gründen an einen nativen F_0 -Komplex nur ein bis zwei Antikörper binden können. Da die verringerte Menge an c Untereinheiten des (TIR-Mut)- F_0 in den ELISA Untersuchungen nicht sichtbar war, kann davon ausgegangen werden, dass diese Komplexe einheitlich weniger Untereinheit c beinhalten und dass die Bindung des Antikörpers hierdurch nicht beeinflusst wurde. Wäre die c -Stöchiometrie von (TIR-Mut)- F_0 und (TIR-WT)- F_0 gleich gewesen, hätten sich in der (TIR-Mut)- F_0 , aufgrund der Mengenverhältnisse, zu mindestens 50 % freie ab -Komplexe befinden müssen, was in den ELISA Experimenten sichtbar geworden wäre. Der zweite Hinweis auf eine unterschiedliche c -Stöchiometrie von (TIR-Mut)- F_0 und (TIR-WT)- F_0 wurde durch die Gefrierbruchuntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erbracht (Kap. 3.8.5). Diese Methode wurde bereits mit Erfolg von Lüttge & Ratajczak (1997) bei der Untersuchung der Auswirkungen von Salzstress auf den V_0 -Teil der V-ATPase von *Mesembryanthemum crystallinum* angewendet. Die Autoren beobachteten eine Vergrößerung des Durchmessers des V_0 -Teils, wenn die Pflanzen unter Salzstress gewachsen waren und führten diese Vergrößerung auf eine Erhöhung der c -Stöchiometrie zurück. Auch in dieser Arbeit wurden mit 10,3 nm für pBWU13- F_0 (WT) und 9,2 nm für pIA1- F_0 (Mut) unterschiedliche Durchmesser in den Gefrierbruchaufnahmen beobachtet. Nach Zugabe von gereinigter Untereinheit c wuchs der Durchmesser von pIA1- F_0 auf 10,2 nm, während sich der Durchmesser von pBWU13- F_0 nicht änderte. Im Folgenden soll kurz abgeschätzt werden, ob diese Größenreduktion durch die in dieser Arbeit gemessene Reduktion an Untereinheit c bei pIA1- F_0 erklärt werden kann. Die Quantifizierungen (Kap. 3.1.1 und 3.1.2) ergaben für die Untereinheit c ungefähr eine Reduktion um einen Faktor zwei, was bei einer Stöchiometrie von 10 c Untereinheiten im pBWU13- F_0 eine Reduktion auf 5 c Untereinheiten bei pIA1- F_0 bedeuten würde. Damit hätte pBWU13- F_0 eine Masse von ca. 145 kDa während pIA1- F_0 nur eine Masse von 105 kDa, also 72 % von pBWU13- F_0 . Da sich durch eine Verringerung der Anzahl an c Untereinheiten die Dicke des F_0 -Komplexes, mit der die Membran überspannt wird, nicht ändert, ist seine Masse ungefähr proportional zu seiner im Gefrierbruch sichtbaren Grundfläche. Zur Berechnung der Grundflächen der beiden F_0 Spezies muss allerdings ihr tatsächlicher Durchmesser abgeschätzt werden. Birkenhäger *et al.* (1995) hatten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen einen Durchmesser von $7,5 \pm 0,5$ nm für einen F_0 -Komplex ermittelt. Aus Röntgenstrukturuntersuchungen und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass das c -Oligomer ungefähr einen Durchmesser von 5 nm hat

(Stock *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001), da dieses nur ca. 55 % der Masse des gesamten F_0 -Komplexes hat, wird dessen Durchmesser, wenn man ihn anhand des Massenunterschiedes linear interpoliert, bei ca. 6,8 nm liegen, was mit den Messungen von Birkenhäger *et al.* (1995) gut übereinstimmt. pIA1- F_0 und pBWU13- F_0 werden in den Gefrierbruchaufnahmen also durch die methodenbedingte Beschichtung um 3,5 nm zu groß dargestellt, woraus sich für pIA1- F_0 ein Durchmesser von 5,7 nm ergibt. Daraus lässt sich errechnen, dass die Grundfläche von pIA1- F_0 ungefähr 70 % der Fläche von pBWU13- F_0 entspricht. Die gemessene Reduktion des Durchmessers von 1,1 nm bei pIA1- F_0 entspricht also genau den Erwartungen, wenn man von einer Reduktion der Anzahl an c Untereinheiten von 10 auf 5 ausgeht. Daraus lässt sich schließen, dass im rekonstituierten System mit gereinigtem F_0 der F_0 -Komplex mit verschiedenen c -Stöchiometrien funktionsfähig zu sein scheint.

Zur Untersuchung der Stöchiometrie der Untereinheit c im *in vivo* F_0 -Komplex, wurden Quervernetzungsversuche mit Cysteinmutanten auf Membranebene durchgeführt. Jones *et al.* (1998) hatten geeignete Stellen für die Insertion von 2 Cysteinen in der Untereinheit c gefunden, die nach Assemblierung von F_0 zur Quervernetzung des c -Oligomers führen. Diese Mutationen wurden verwendet, um die Auswirkung der erniedrigten Expression der Untereinheit c auf die Größe des c -Oligomers *in vivo* zu untersuchen. Es konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, dass sowohl (TIR-WT)- F_0 als auch (TIR-Mut)- F_0 ein c -Decamer auf Membranebene ausbilden. Die erniedrigte Expression der Untereinheit c hatte also keinen Einfluss auf die Stöchiometrie des *in vivo* Komplexes, obwohl im rekonstituierten System eine variable Stöchiometrie anscheinend möglich und auch funktionell war. Im Gegensatz dazu belegen Quantifizierungen der Untereinheiten b und c an immunpräzipitierten F_0F_1 -Komplexen, dass die Stöchiometrie der Untereinheit c *in vivo* erniedrigt ist, wenn die Expressionsrate der Untereinheit c herabgesetzt wird (Schemidt *et al.*, 1995). Es erscheint schwierig die Invariabilität der c -Stöchiometrie aus den Quervernetzungsexperimenten mit den verschiedenen Mengen an assemblierter Untereinheit c in F_0F_1 -Komplexen in Einklang zu bringen. Eine mögliche Erklärung bestünde in der Postulierung von zwei verschiedenen F_0F_1 Populationen, von denen eine die gerade physiologisch sinnvolle Anzahl an c Untereinheiten trägt und voll funktionell ist, während die andere nicht funktionell ist und nur extrem wenige c Untereinheiten pro Komplex beinhaltet. Ein derartige nichtfunktionelle Population an F_0F_1 ist sicherlich nur bei einem gestörten Expressionsverhältnis der Untereinheit c , zu den anderen Untereinheiten, wie sie durch die beschriebene Punktmutation in der TIR auftritt, denkbar. Physiologisch wären die nichtfunktionellen Komplexe für die Zelle ungefährlich und in den

Quervernetzungsexperimenten nicht zu detektieren. Die grundsätzliche Funktionsfähigkeit verschieden großer *c*-Oligomere *in vivo* konnte durch Jones *et al.* (1998) gezeigt werden, indem zwei bzw. drei *c*-Untereinheiten durch eine dem Proteolipid der V-ATPase ähnliche 11 Aminosäuren lange Verbindungssequenz verknüpft wurden. Eine Komplementation der entsprechenden ATP-Synthasen konnte durch Wachstum auf Succinat gezeigt werden.

Die offensichtliche Diskrepanz der in dieser Arbeit beobachteten Stöchiometrien im rekonstituierten System und auf Membranebene wäre durch einen zusätzlichen Regulationsmechanismus der Stöchiometrie von Untereinheit *c* auf *in vivo* Ebene erklärbar. Der postulierte Regulationsmechanismus würde, angepasst an die physiologische Situation, jeweils nur eine Stöchiometrie von *c* Untereinheiten erlauben. Eine niedrige Expression der Untereinheit *c* in der *E. coli* Mutante könnte sich bei einem solchen übergeordneten Regulationsprozess *in vivo* nicht auswirken. Ein solcher übergeordneter Regulationsmechanismus wäre sinnvoll, da eine veränderte Stöchiometrie von Untereinheit *c* im F_o-Komplex drastische Auswirkungen auf die Funktion der ATP-Synthase haben kann. Wie schon oben erwähnt, könnten mehrere Stöchiometrien der Untereinheit *c* in einer Zelle zur selben Zeit dazu führen, dass einige ATP-Synthase-Komplexe ATP synthetisieren, während andere ATP hydrolysieren.

Zur Klärung der Frage nach der physiologischen Bedeutung einer prinzipiell möglichen variablen Stöchiometrie von *c* im F_o-Komplex könnten Untersuchungen dienen, die die Größe des *c*-Oligomers unter verschiedenen Bedingungen (O₂-Verfügbarkeit, C-Quelle) näher beleuchten. Es erscheint allerdings wenig sinnvoll, diese Untersuchungen in einem Überproduzenten durchzuführen. Vielmehr sollten, wie auch bei Schmidt *et al.* (1998), die entsprechenden Doppel-Cys Mutanten ins Chromosom integriert werden. Es erscheint jedoch fraglich, ob die bei der Quervernetzung entstehenden *c*-Multimere im Immunoblot nachweisbar wären.

5 Zusammenfassung

- Die mit der in dieser Arbeit entwickelten Rekonstitutionsmethode gemessenen Protonentranslokationsraten erreichen physiologisch relevante Werte und liegen ca. eine Größenordnung über Messungen, die mit vergleichbaren Methoden erzielt wurden.
- Die Stöchiometrie der Untereinheit c ist *in vitro* vom Verhältnis der Untereinheiten a , b und c abhängig. Das bedeutet, dass bei einer Rekonstitution mit verringerter Menge an Untereinheit c F_0 -Komplexe mit einheitlich weniger c -Untereinheiten entstehen. Das deutet darauf hin, dass der F_0 -Komplex möglicherweise mit verschiedenen c -Stöchiometrien Protonen translozieren kann und dass die Stöchiometrie der Untereinheit c einen Einfluss auf die Protonentranslokationsrate des F_0 -Komplexes haben könnte.
- Die Stöchiometrie der Untereinheit c im F_0F_1 -Komplex ist *in vivo* von der Expressionsrate ihres Gens weitgehend unabhängig.
- Das unterschiedliche Verhalten der c -Stöchiometrie bei Variation der relativen c -Menge *in vitro* und *in vivo* legen einen Regulationsmechanismus in der Zelle nahe, der die Stöchiometrie der Untereinheit c je nach physiologischer Notwendigkeit einstellt und der unabhängig von der Expressionsrate der Untereinheit c arbeitet.

6 Literatur

- ABRAHAMS, J. P., LESLIE, A. G. W., LUTTER, R. & WALKER, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria; *Nature* **370**, 621-628.
- AGGELER, R., HAUGHTON, H. A. & CAPALDI, R. A. (1995). Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the β subunits and the γ and ε subunits of the *Escherichia coli* F₁ ATPase – Structural implications and functional consequences; *J. Biol. Chem.* **270**, 9185-9191.
- AKIYAMA, Y., KIHARA, A., TOKUDA, H. & ITO, K. (1996). FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins; *J. Biol. Chem.* **271**, 31196-201.
- ALTENDORF, K., HAMMEL, U., DECKERS, G., KILTZ, H.-H. & SCHMID, R. (1979). Purification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive proteins of the energy-transducing adenosine triphosphate complex from mutant strains of *Escherichia coli*; *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport* (eds. E. Quagliariello *et al.*) pp. 55-61, Elsevier Biomedical Press, North-Holland.
- AMES, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Meth. Enzymol.* **8**, 115-118.
- ANGOV, E. & BRUSILOV, W. S. A., (1988). Use of *lac* fusions *in vivo* regulation of expression of *Escherichia coli* proton translocating ATPase (*unc*) genes; *J. Bacteriol.* **170**, 462-469.
- ARIS, J. P. & SIMONI, R. D. (1983). Cross-linking and labeling of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase reveal a compact hydrophilic portion of F₀ close to an F₁ catalytic subunit; *J. Biol. Chem.* **258**, 14599-14609.
- ARNOLD, A., WOLF, H. U., ACKERMANN, B. P. & BADER, H. (1976). An automated continued assay of membrane-bound and soluble ATPase and related enzymes; *Anal. Biochem.* **71**, 209-213.
- ASSADI-PORTER, F. M. & FILLINGAME, R. H. (1995). Proton translocating carboxyl of subunit *c* of the F₁F₀-ATP synthase: The unique environment suggested by pK_a determined by ¹H NMR; *Biochemistry* **34**, 16186-16193.
- AUFURTH, S., SCHÄGGER, H. & MÜLLER, V. (2000). Identification of subunits *a*, *b*, and *c*₁ from *Acetobacterium woodii* Na⁺-F₁F₀-ATPase. Subunits *c*₁, *c*₂, and *c*₃ constitute a mixed *c*-oligomer; *J. Biol. Chem.* **275**, 33297-301.
- BIRKENHÄGER, R., GREIE, J. C., ALTENDORF, K. & DECKERS-HEBESTREIT, G. (1999). F₀ complex of the *Escherichia coli* ATP synthase. Not all monomers of the subunit *c* oligomer are involved in F₁ interaction; *Eur. J. Biochem.* **264**, 385-96.
- BIRKENHÄGER, R., HOPPERT, M., DECKERS-HEBESTREIT, G., FRANK, M. & ALTENDORF, K. (1995). The F₀ Komplex of the *Escherichia coli* ATP synthase. Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy; *Eur. J. Biochem.* **230**, 58-67.
- BJØRBAEK, C., FOËRSOM, V. & MICHELSEN, O. (1990). The transmembrane topology of the *a* subunit from the ATPase in *Escherichia coli* analyzed by PhoA protein fusions; *FEBS Lett.* **260**, 31-4.
- BLAKE, M. S., JHONSTON, K. H., RUSSEL-JONES, G. L. & GOTSCHLICH, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots; *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G. 3RD, BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B., SHAO, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12; *Science* **277**, 1453-74.

- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., GREENE, P. J., BETLACH, M. C., HEYNEKER, H. L. & BOYER, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*; **2**, 95-113.
- BÖTTCHER, B., BERTSCHE, I., REUTER, R. & GRÄBER, P. (2000). Direct visualization of conformational changes in F_0F_1 by electron microscopy; *J. Mol. Biol.* **296**, 449-457.
- BÖTTCHER, B., SCHWARZ, L. & GRÄBER, P. (1998). Direct indication for the existence of a double stalk in CF_0F_1 ; *J. Biol. Chem.* **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.
- BRUSILOW, W. A., KLIONSKY, D. J. & SIMONI, R. (1982). Differential Polypeptide Synthesis of the Proton-Translocating ATPase of *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.* **151**, 1363-1371.
- BRUSILOW, W. S. A. (1987). Proton Leakiness Caused by Cloned Genes for the F_0 Sector of the Proton-Translocating ATPase of *Escherichia coli*: Requirement for F_1 Genes; *J. Bacteriol.* **169**, 4984-4990.
- CAO, N. J., BRUSILOW, W. S. A., TOMASHEK, J. J. & WOODBURY, D. J. (2001). Characterization of Reconstituted F_0 from Wild-Type *Escherichia Coli* and Identification of Two other Fluxes Co-Purifying with F_0 ; *Cell Biochem. Biophys.* **34**, 1-16.
- CAPALDI, R. A., SCHULENBERG, B., MURRAY, J. & AGGELER, R. (2000). Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase; *J. Exp. Biol.* **203**, 29-33.
- CAPALDI, R. A. & SCHULENBERG, B. (2000). The ϵ subunit of bacterial and chloroplast F_1F_0 ATPases. Structure, arrangement, and role of the ϵ subunit in energy coupling within the complex; *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 263-9.
- CAPALDI, R. A., SCHULENBERG, B., MURRAY, J. & AGGELER, R. (2000). Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase; *J. Exp. Biol.* **203**, 29-33.
- CHANG, A. C. & COHEN, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid; *J. Bacteriol.* **134**, 1141-56.
- CHEREPANOV, D. A., MULKIDJANIAN, A. Y. & JUNGE, W. (1999). Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase; *FEBS Lett.* **449**, 1-6.
- COX, G. B., JANS, D. A., FIMMEL, A. L., GIBSON, F. & HATCH, L. (1984). Hypothesis. The mechanism of ATP synthase. Conformational change by rotation of the b subunit; *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 201-208.
- CROSS, R. L. (2000). The rotary binding change mechanism of ATP synthases; *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 270-5.
- DECKERS-HEBESTREIT, G. & ALTENDORF, K. (1986). Accessibility of F_0 subunits from *Escherichia coli* ATP synthase. A study with subunit specific antisera; *Eur. J. Biochem.* **161**, 225-231.
- DECKERS-HEBESTREIT, G. & ALTENDORF, K. (1996). The F_0F_1 -Type ATP Synthase of Bacteria: structure and Function of the F_0 Complex; *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 791-824.
- DECKERS-HEBESTREIT, G., GREIE, J. -C., STALZ, W. -D. & ALTENDORF, K. (2000). The ATP synthase of *Escherichia coli*: structure and function of F_0 subunits; *Biochim. et Biophys. Acta* **1458**, 364-373.

- DECOURSEY, T. E. & CHERNY, V. V. (2000). Common themes and problems of bioenergetics and voltage-gated proton channels; *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 104-119.
- DIMROTH, P., KAIM, G. & MATTHEY, U. (1998). The motor of the ATP synthase; *Biochim. Biophys. Acta*. **1365**, 87-92.
- DIMROTH, P., WANG, H., GRABE, M. & OSTER, G. (1999). Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum*; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4924-9.
- DMITRIEV, O. Y., JONES, P. C., JIANG, W. & FILLINGAME, R. H. (1999b). Structure of the membrane domain of subunit *b* of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **274**, 15598-604.
- DMITRIEV, O. Y., JONES, P. C. & FILLINGAME, R. H. (1999a). Structure of the subunit *c* oligomer in the F₁F₀ ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 7785-90.
- DMITRIEV, O. Y., ALTENDORF, K. & FILLINGAME, R. H. (1995). Reconstitution of the F₀ complex of *Escherichia coli* ATP synthase from isolated subunits. Varying the number of essential carboxylates by co-incorporation of wild-type and mutant subunit *c* after purification in organic solvent; *Eur. J. Biochem.* **233**, 478-483.
- DUNCAN, T. M., BULYGIN, V. V., ZHOU, Y., HUTCHEON, M. L. & CROSS R. L. (1995). Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10964-10968.
- DUNN, S. D. & CHANDLER, J. (1998). Characterization of a b₂δ complex from *Escherichia coli* ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **273**, 8646-8651.
- DUNN, S. D. (1992). The Polar Domain of the *b* Subunit of *Escherichia coli* F₁F₀-ATPase Forms an Elongated Dimer That Interacts with the F₁ Sector; *J. Biol. Chem.* **267**, 7630-7636.
- DUNN, S. D., MCLACHLIN, D. T. & REVINGTON, M. (2000). The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase; *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 356-63.
- ELSTON, T., WANG, H. & OSTER, G. (1998). Energy transduction in ATP synthase; *Nature* **391**, 510-3.
- FILLINGAME, R. H. (1976). Purification of the carbodiimide-reactive protein component of the ATP energy-transducing system of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* **251**, 6630-6637.
- FILLINGAME, R. H. (1996). Membrane sectors of F- and V-type H⁺-transporting ATPases; *Current Opinion in Structural Biology* **6**, 491-498.
- FILLINGAME, R. H. (1997). Coupling H⁺ transport and ATP Synthesis in F₁F₀-ATP Synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine; *J. Exp. Biol.* **200**, 217-224.
- FILLINGAME, R. H. (2000). Getting to the bottom of the F₁-ATPase; *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1002-4.
- FILLINGAME, R. H., JIANG, W. & DMITRIEV, O. Y. (2000). Coupling H⁺ transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor; *J. Exp. Biol.* **203**, 9-17.
- FILLINGAME, R. H., PETERS, L. K., WHITE, L. K., MOSHER, M. E. & PAULE, C. R. (1984). Mutations Altering Aspartyl-61 of the Omega Subunit (*uncE* Protein) of *Escherichia coli* H⁺ ATPase Differ in Effect on Coupled Hydrolysis; *J. Bac.* **158**, 1078-1083.
- FOSTER, D. L. & FILLINGAME, R. H. (1982). Stoichiometry of Subunits in the H⁺-ATPase Complex of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* **257**, 2009-2015.

- FRAGA, D. & FILLINGAME, R. H. (1991). Essential Residues in the Polar Loop Region of Subunit *c* of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP Synthase Defined by Random Oligonucleotide-Primed Mutagenesis; *J. Bacteriol.* **173**, 2639-2643.
- FRAGA, D., HERMOLIN, J., OLDENBURG, M., MILLER, M. J. & FILLINGAME, R. H. (1994). Arginine 41 of Subunit *c* of *Escherichia coli* H⁺-ATP Synthase Is Essential in Binding and Coupling of F₁ to F₀; *J. Biol. Chem.* **269**, 7532-7537.
- FRIEDEL, P. & SCHAIRER, H. U. (1986). Preparation and reconstitution of F₁F₀ and F₀ from *E. coli*; *Methods Enzymol.* **126**, 579-588.
- FUTAI, M., OMOTE, H., SAMBONGI, Y. & WADA, Y. (2000). Synthase (H⁺ ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation; *Biochim. Biophys. Acta.* **1458**, 276-88.
- GIBBONS, C., MONTGOMERY, M. G., LESLIE, A. G. & WALKER, J. E. (2000). The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution; *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-61.
- GIRVIN, M. E. & FILLINGAME, R. H. (1994). Hairpin folding of the subunit *c* of F₀F₁ ATP synthase: ¹H distance measurements to nitroxide-derivatized aspartyl-61; *Biochemistry* **33**, 665-674.
- GIRVIN, M. E. & FILLINGAME, R. H. (1995). Determination of Local Protein Structure by Spin Label Difference 2D NMR: The Region Neighboring Asp61 of Subunit *c* of the F₁F₀ ATP Synthase; *Biochemistry* **34**, 1635-1645.
- GIRVIN, M. E., HERMOLIN, J., POTTORF, R. & FILLINGAME, R. H. (1989). Organization of the F₀ Sector of *Escherichia coli* H⁺-ATPase: The Polar Loop Region of Subunit *c* Extends from the Cytoplasmic Face of the Membrane; *Biochemistry* **28**, 4340-4343.
- GIRVIN, M. E., RASTOGI, V. K., ABILDGAARD, F., MARKLEY, J. L. & FILLINGAME, R. H. (1998). Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit *c* of the F₁F₀ ATP synthase; *Biochemistry* **37**, 8817-24.
- GOTTSCHALK, G. (1986). Bacterial Metabolism; *Springer-Verlag, New York*.
- GREIE, J. C., DECKERS-HEBESTREIT, G. & ALTENDORF, K. (2000). Secondary structure composition of reconstituted subunit *b* of the *Escherichia coli* ATP synthase; *Eur. J. Biochem.* **267**, 3040-8.
- GROTH G., WALKER J.E. (1996). ATP synthase from bovine heart mitochondria: reconstitution into unilamellar phospholipid vesicles of the pure enzyme in a functional state; *Biochem. J.* **318**, 351-7.
- GROTH, G. & WALKER, J. E. (1997). Model of the *c*-subunit oligomer in the membrane domain of F-ATPases. *FEBS Lett.* **410**, 117-23.
- GROTH, G. & WALKER, J. E. (1997). Model of the *c*-subunit oligomer in the membrane domain of F-ATPases; *FEBS Lett.* **410**, 117-23.
- GUMBIOWSKI, K., CHEREPANOV, D., MÜLLER, M., PÄNKE, O., PROMTP, P., WINKLER, S., JUNGE, W. & ENGELBRECHT, S. (2001). F-ATPase: Forced Full Rotation of the Rotor Despite Covalent Cross-link with the Stator; *J. Biol. Chem.* **276**, 42287-42292.
- GUNSALUS, R. P., BRUSILOW, W. S. A. & SIMONI, R. (1982). Gene order and gene-polypeptide relationships of the proton-translocating ATPase operon (*unc*) of *Escherichia coli*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 320-324.
- HATCH, L. P., COX, G. B. & HOWITT, S. M. (1995). The essential arginine residue at position 210 in the α subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity; *J. Biol. Chem.* **270**, 29407-12.

- HELENIUS, A. & SIMONS, K. (1975). Solubilization of Membranes by Detergents; *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29-79.
- HELLMUTH, K., REX, G., SURIN, B., ZINCK, R., MCCARTHY, J. E. (1991). Translational coupling varying in efficiency between different pairs of genes in the central region of the *atp* operon of *Escherichia coli*; *Mol. Microbiol.* **4**, 813-24.
- HENSEL, M., DECKERS-HEBESTREIT, G., SCHMID, R. & ALTENDORF, K. (1990). Orientation of subunit *c* of the ATP synthase of *Escherichia coli* – a study with peptide-specific antibodies; *Biochim. et Biophys. Acta*; **1016**, 63-70.
- HERMOLIN, J. & FILLINGAME, R. H. (1989). H⁺-ATPase Activity of *Escherichia coli* F₁F₀ Is Blocked after Reaction of Dicyclohexylcarbodiimide with a Single Proteolipid (Subunit *c*) of the F₀ Complex; *J. Biol. Chem.* **264**, 3698-3903.
- HERMOLIN, J. & FILLINGAME, R. H. (1995). Assembly of F₀ sector of *Escherichia coli* H⁺ ATP synthase. Interdependence of subunit insertion into the membrane; *J. Biol. Chem.* **270**, 2815-7.
- HERMOLIN, J., DMITRIEV, O. Y., ZHANG, Y. & FILLINGAME, R. H. (1999). Defining the domain of binding of F₁ subunit ϵ with the polar loop of F₀ subunit *c* in the *Escherichia coli* ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **274**, 17011-6.
- HERMOLIN, J., GALLANT, J., FILLINGAME, R. H. (1983). Topology, organization, and function of the ψ subunit in the F₀ sector of the H⁺-ATPase of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* **258**, 14550-5.
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. (1986). Neue Erkenntnisse zum Mechanismus der Silberfärbung: in *Elektrophorese Forum* (Radola, B. J. ed.), 22-27.
- HILLE, B. (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes. 2.nd Ed Sinauer Associates
- HIRONO-HARA, Y., NOJI, H., NISHIURA, M., MUNEYUKI, E., HARA, K. Y., YASUDA, R., KINOSITA, K. & YOSHIDA, M. (2001). Pause and rotation of F₁-ATPase during catalysis; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13649-13654.
- HOPPE, J., BRUNNER, J. & JØRGENSEN, B. (1984). Structure of the Membrane-Embedded F₀ Part of F₁F₀ ATP Synthase from *Escherichia coli* As Inferred from Labeling with 3-(Trifluoromethyl)-3-(m[¹²⁵I]iodophenyl) diazirine; *Biochemistry* **23**, 5610-5616.
- HOPPE, J., SCHAIRER, H. U. & SEBALD, W. (1980). Identification of Amino-Acid Substitutions in the Proteolipid Subunit *c* of the ATP Synthase from Dicyclohexylcarbodiimide-Resistant Mutants of *Escherichia coli*; *Eur. J. Biochem.* **112**, 17-24.
- HOPPE, J., SCHAIRER, H. U., FRIEDL, P. & SEBALD, W. (1982). An Asp-Asn substitution in the proteolipid subunit of the ATP-synthase from *Escherichia coli* leads to a non-functional proton channel; *FEBS Lett.* **145**, 21-24.
- HOWITT, S. M., RODGERS, A. J. W., HATCH, L. P., GIBSON, F. & COX, G. B. (1996). The Coupling of the Relative Movement of the *a* and *c* Subunits in the F₀ to Conformational Changes in the F₁-ATPase; *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 415-419.
- HUTCHEON, M. L., DUNCAN, T. M., NGAI, H. & CROSS, R. L. (2001). Energy-driven subunit rotation at the interface between subunit *a* and the *c* oligomer in the F₀ sector of *Escherichia coli* ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8519-24.
- JÄGER, H., BIRKENHÄGER, R., STALZ, W. -D., ALTENDORF, K. & DECKERS-HEBESTREIT, G. (1998). Topology of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase; *Eur. J. Biochem.* **251**, 122-32.

- JIANG, W. & FILLINGAME, R. H. (1998). Interacting helical faces of subunits *a* and *c* in the F₁F₀ ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 6607-12.
- JIANG, W., HERMOLIN, J. & FILLINGAME, R. H. (2001). The preferred stoichiometry of the *c* subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* is 10; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4966-4971.
- JONES, P. C., HERMOLIN, J. & FILLINGAME, R. H. (2000). Mutations in single hairpin units of genetically fused subunit *c* provide support for a rotary catalytic mechanism in F₀F₁ ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **275**, 11355-60.
- JONES, P. C. & FILLINGAME, R. H. (1998). Genetic fusions of subunit *c* in the F₀ sector of H⁺-transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis; *J. Biol. Chem.* **273**, 29701-5.
- JONES, P. C., HARRISON, M. A., KIM, Y. I., FINBOW, M. E. & FINDLAY, J. B. (1995). The first putative transmembrane helix of the 16 kDa proteolipid lines a pore in the V_o sector of the vacuolar H⁺-ATPase; *Biochem J.* **312**, 739-47.
- JONES, P. C., JIANG, W. & FILLINGAME R. H. (1998). Arrangement of Multycopy H⁺-translocating Membrane Sector of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP Synthase; *J. Biol. Chem.* **273**, 17178-17185.
- JOUNOUCHI, M., TAKEYAMA, M., CHAIPRASERT, P., NOUMI, T., MORIYAMA, Y., MAEDA, M. & FUTAI, M. (1992). *Escherichia coli* H⁺-ATPase: role of the δ subunit in binding of the F₁ to the F₀ sector; *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 376-381.
- JUNGE, W. (1999). ATP synthase and other motor proteins; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4735-7.
- JUNGE, W., LILL, H. & ENGELBRECHT, S. (1997). ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics; *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-3.
- KAIM, G. & DIMROTH, P. (1993). Formation of functionally active sodium-translocating hybrid F₁ F₀ ATPase in *Escherichia coli* by homologous recombination; *Eur. J. Biochem.* **218**, 937-944.
- KAIM, G., MATTHEY, U. & DIMROTH, P. (1998). Mode of interaction of the single *a* subunit with the multimeric *c* subunits during the translocation of the coupling ions by F₁F₀ ATPases; *EMBO J.* **17**, 688-95.
- KAIM, G., WEHRLE, F., GERIKE, U. & DIMROTH, P. (1997). Molecular basis for the coupling ion selectivity of F₁F₀ ATP synthases: probing the liganding groups for Na⁺ and Li⁺ in the *c* subunit of the ATP synthase from *Propionigenium modestum*; *Biochemistry.* **36**, 9185-94.
- KANAZAWA, H., MIKI, T., TAMURA, F., YURA, T. & FUTAI, M. (1979). Specialized transducing phage λ carrying the genes for coupling factor of oxidative phosphorylation of *Escherichia coli*: Increased synthesis of coupling factor on induction of prophage λ asn; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1126-1130.
- KARRASCH, S. & WALKER, J. E. (1999). Novel features in the structure of bovine ATP synthase; *J. Mol. Biol.* **290**, 379-84.
- KIHARA, A., AKIYAMA, Y. & ITO, K. (1999). Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis; *EMBO J.* **18**, 2970-81.
- KINOSHITA, K. JR., YASUDA, R., NOJI, H., ISHIWATA, S. & YOSHIDA, M. (1998). F₁-ATPase: a rotary motor made of a single molecule; *Cell* **93**, 21-4.
- KLIONSKY, D. J., BRUSILOV, W. S. A. & SIMONI, R. D. (1984). In Vivo Evidence for the Role of the ϵ Subunit as an Inhibitor of the Proton-Translocating ATPase of *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.* **160**, 1055-1060.

- KLUGE, C. & DIMROTH, P. (1992). Studies on Na⁺ and H⁺ Translocation through the F_O Part of the Na⁺-Translocating F₁ F_O ATPase from *Propionigenium modestum*: Discovery of a Membrane Potential Dependent Step; *Biochemistry* **31**, 12665-12672.
- KLUGE, C. & DIMROTH, P. (1993). Kinetics of Inactivation of the F₁F_O ATPase of *Propionigenium modestum* by Dicyclohexylcarbodiimide in Relationship to H⁺ Concentration: Probing the Binding Site for the Coupling Ions; *Biochemistry* **32**, 10378-10386.
- LASCH, J. (1995). Interaction of detergents with lipid vesicles; *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 269-292.
- LAUBINGER, W. & DIMROTH, P. (1987). Characterization of the Na⁺-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F₁ F_O type; *Eur. J. Biochem.* **168**, 475-480.
- LAUBINGER, W. & DIMROTH, P. (1989). The Sodium Translocating Adenosine- triphosphatase of *Propionigenium modestum* Pumps Protons at Low Sodium Ion Concentrations; *Biochemistry* **28**, 7194-7198.
- LILL, H., HENSEL, F., JUNGE, W. & ENGELBRECHT, S. (1996). Cross-linking of engineered subunit δ to ($\alpha\beta$)₃ in chloroplast F-ATPase; *J. Biol. Chem.* **271**, 32737-32742.
- LIPSKI, A. (1995). Taxonomische und funktionelle Charakterisierung von Bakterien aus Ammoniakbelasteten Biofiltern. Dissertation, Universität Osnabrück.
- LONG, J. C., WANG, S. & VIK, S. B. (1998). Membrane topology of subunit *a* of the F₁F_O ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **273**, 16235-16240.
- LUNARDI, J., GARIN, J., ISSARTEL, P. & VIGNAIS, P. V. (1987). Mapping of Nucleotide-depleted Mitochondrial F₁ ATPase with 2-Azido-[α -³²P]adenosine Diphosphate; *J. Biol. Chem.* **262**, 15172-15181.
- LÜTTGE, U. & RATAJCZAK, R. (1997). The physiology, biochemistry, and molecular biology of the plant vacuolar ATPase; *Adv. Bot. Res.* **25**, 253-296.
- MATTEN, S. R., SCHNEIDER, T. D., RINGQUIST, S. & BRUSILOW, W. S. A. (1998). Identification of an intragenic ribosome binding site that affects expression of the *uncB* gene of the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase (*unc*) operon; *J. Bacteriol.* **180**, 3940-5.
- MATTHEY, U., KAIM, G., BRAUN, D., WÜTHRICH, K. & DIMROTH, P. (1999). NMR studies of subunit *c* of the ATP synthase from *Propionigenium modestum* in dodecylsulphate micelles; *Eur. J. Biochem.* **261**, 459-67.
- MAYER, L. D., HOPE, M. J. & CULLIS, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure; *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 161 - 168.
- MCCARTHY, J. E., SCHAIRER, H. U. & SEBALD, W. (1985). Translational initiation frequency of *atp* genes from *Escherichia coli*: identification of an intercistronic sequence that enhances translation; *EMBO J.* **4**, 519-26.
- MCCARTHY, J. E. & GUALERZI, C. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression; *Trends Genet.* **6**, 78-85.
- MCCARTHY, J. E. (1988). Expression of the *unc* genes in *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **20**, 19-39.
- MCCARTHY, J. E. (1990). Post-transcriptional control in the polycistronic operon environment: studies of the *atp* operon of *Escherichia coli*; *Mol. Microbiol.*, **4**, 1233-40.

- MCCARTHY, J. E., GERSTEL, B., SURIN, B., WIEDEMANN, U. & ZIEMKE, P. (1991). Differential gene expression from the *Escherichia coli atp* operon mediated by segmental differences in mRNA stability; *Mol. Microbiol.* **5**, 2447-58.
- MCCARTHY, J. E., SEBALD, W., GROSS, G. & LAMMERS, R. (1986). Enhancement of translational efficiency by the *Escherichia coli atpE* translational initiation region: its fusion with two human genes; *Gene*, **41**, 201-6.
- MCLACHLIN, D. T., BESTARD, J. A. & DUNN, S. D. (1998). The β and δ subunits of the *Escherichia coli* ATP synthase interact via residues in their C-terminal regions; *J. Biol. Chem.* **273**, 15162-15168.
- MENDEL-HARTVIG, J. & CAPALDI, R. A. (1991). Catalytic Site Nucleotide and Inorganic Phosphate Dependence of the Conformation of the ϵ Subunit in *Escherichia coli* Adenosinetriphosphatase; *Biochemistry* **30**, 1278-1284.
- MENZ, R. I., WALKER, J. E. & LESLIE, A. G. (2001). Structure of bovine mitochondrial F_1 -ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites. Implications for the mechanism of rotary catalysis; *Cell* **106**, 331-41.
- MILLER, M. J., OLDENBURG, M. & FILLINGAME, R. H. (1990). The essential carboxyl group in subunit c of $F_1 F_0$ ATP synthase can be moved and H^+ -translocating function retained; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4900-4904.
- MINNIKIN, D. E., O'DONNELL, A. G., GOODFELLOW M., ALDERSON, G., ATHALYE, M., SCHAAL, A. & PARLETT, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids; *J. Microbiol. Meth.* **2**, 233-241.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism; *Nature* **191**, 144-148.
- MONTICELLO, R. A. & BRUSILOW, W. S. A. (1994). Role of the δ Subunit in Enhancing Proton Conduction through the F_0 of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase; *J. Bacteriol.* **176**, 1383-1389.
- MOSHER, M. E., WHITE, L. K., HERMOLIN, J. & FILLINGAME, R. H. (1985). H^+ -ATPase of *Escherichia coli*: an *uncE* mutation impairing coupling between F_1 and F_0 -mediated H^+ translocation; *J. Biol. Chem.* **260**, 4807-4814.
- MÜLLER, D. J., DENCHER, N. A., MEIER, T., DIMROTH, P., SUDA, K., STAHLBERG, H., ENGEL, A., SEELERT, H. & MATTHEY, U. (2001). ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor; *FEBS Lett.* **504**, 219-22.
- MÜLLER, V., RUPPERT, C. & LEMKER, T. (1999). Structure and function of the A_1A_0 -ATPases from methanogenic Archaea; *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 15-27.
- NELSON, N., EYTAN, E., NOTSANI, B. E., SIGRIST, H., SIGRIST-NELSON, K. & GITLER, C. (1977). Isolation of a Chloroplast N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid, active in proton translocation; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2375-8.
- NEUMANN, S. MATTHEY, U., KAIM, G. & DIMROTH, P. (1998). Purification and Properties of *Ilyobacter tartaricus*, a Sodium Ion Pump; *J. Bacteriol.* **180**, 3312-3316.
- NIELSEN, J., JØRGENSEN, B. B., VON MEYENBURG, K. & HANSEN, F. G. (1984). The Promoters of the *atp* operon of *Escherichia coli* K12; *Mol. Gen. Genet.* **193**, 64-71.
- NOJI, H., YASUDA, R., YOSHIDA, M. & KINOSITA, K. (1977). Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase; *Nature* **386**, 299-302.

- OGILVIE, I., AGGELER, R. & CAPALDI, R. A. (1997). Cross-linking of the δ subunit to one of the three α subunits has no effect on functioning, as expected if δ is a part of the stator that links F_1 and F_0 parts of the *Escherichia coli* ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **272**, 16652-16656.
- OSTER, G. & WANG, H. (2000). Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase; *Biochim. Biophys. Acta.* **1458**, 482-510.
- OSTER, G. & WANG, H. (2000). Why is the Mechanical Efficiency of F_1 -ATPase so High? *J. Bioenerg Biomembr.* **32**, 459-469.
- OSTER, G., WANG, H. (1999). ATP synthase: two motors, two fuels; *Structure Fold. Des.* **7**, 67-72.
- PÄNKE, O., CHEREPANOV, D. A., GUMBIOWSKI, K., ENGELBRECHT, S. & JUNGE, W. (2001). Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F-atpase: angular torque profile of the enzyme; *Biophys. J.* **81**, 1220-33.
- PÄNKE, O., GUMBIOWSKI, K., JUNGE, W. & ENGELBRECHT, S. (2000). F-ATPase: specific observation of the rotating *c* subunit oligomer of EF_0EF_1 ; *FEBS Lett.* **472**, 34-8.
- PATI, S. & BRUSILOW, W. S. A. (1989). The Roles of the α and γ Subunits in Proton Conduction through the F_0 Sector of the Proton-Translocating ATPase of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* **264**, 2640-2644.
- PATI, S. & BRUSILOW, W. S. A. (1991). Assembly of the F_0 Proton Channel of *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase: Low Proton Conductance of Reconstituted F_0 Sectors Synthesized and Assembles in the Absence of F_1 ; *Biochemistry* **30**, 4710-4714.
- RAHLFS, S., AUFURTH, S., MÜLLER, V. (1999). The Na^+ - F_1F_0 -ATPase operon from *Acetobacterium woodii*. Operon structure and presence of multiple copies of *atpE* which encode proteolipids of 8- and 18-kda; *J. Biol. Chem.*, **274**, 33999-4004.
- RASTOGI, V. K. & GIRVIN, M. E. (1999). Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase; *Nature* **402**, 263-268.
- REEVE, J. (1984). Advanced Molecular Genetics, Pühler & Timmis, *Springer Verlag*, 212-223.
- REIDLINGER, J. & MÜLLER, V. (1994). Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na^+ -translocating F_1F_0 -type enzyme; *Eur. J. Biochem.* **223**, 275-283.
- REX, G., SURIN, B., BESSE, G., SCHNEPPE, B. & MCCARTHY, J. E. (1994). The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. Higher order structure in the *atpHA* mRNA acts as a conformational switch regulating the access of de novo initiating ribosomes; *J. Biol. Chem.*, **269**, 18118-27.
- RIGAUD, J. L., LEVY, D., MOSSER, G. & LAMBERT, O. (1998). Detergent removal by non-polar polystyrene beads. Applications to membrane protein reconstitution and two-dimensional crystallization; *Eur. Biophys. J.* **27**, 305-319.
- RIGAUD, J. L., MOSSER, G., LACAPERE, J. J., LEVY, D., OLOFFSON, A. & RANCK, J. L. (1997). Bio-Beads: an efficient strategy for 2D crystallization of membrane proteins; *J. Struct. Biology* **118**, 226-235.
- RIGAUD, J. L., PITARD, B., LEVY, D. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins; *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 223 - 246.
- RODGERS, A. J. W. & CAPALDI, R. A. (1998). The second stalk composed of the *b*- and δ -subunits connects F_0 to F_1 via an α -subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **273**, 29406-10.

- RODGERS, A. J. W., WILKENS, S., AGGELER, R., MORRIS, M. B., HOWITT, S. M. & CAPALDI, R. A. (1997). The subunit δ - b domain of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase. The b subunits interact with F_1 as a dimer and through the δ subunit; *J. Biol. Chem.* **272**, 31058-31064.
- SABBERT, D., ENGELBRECHT, S. & JUNGE, W. (1996). Intersubunit rotation in active F-ATPase; *Nature* **381**, 623-625.
- SAMBONGI, Y., IKO, Y., TANABE, M., OMOTE, H., IWAMOTO-KIHARA, A., UEDA, I., YANAGIDA, T., WADA, Y. & FUTAI, M. (1999). Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): direct observation; *Science* **286**, 1722-4.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Ed 2nd.
- SASSER, M. (1990). Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: *Methods in Phytobacteriology*. (Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D. C., eds.), pp. 199-204. Akademiai Kiado.
- SCHAEFER, E. M., HARTZ, D., GOLD, L. & SIMONI, R. D. (1989). Ribosome-Binding Sites and RNA-Processing Sites in the Transcript of the *Escherichia coli unc* Operon; *J. Bacteriol.* **171**, 3901-3908.
- SCHÄGGER, H., CRAMER, W. A. & 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.
- SCHEMIDT R. A., QU J., WILLIAMS J. R. & BRUSILOW W. S.A. (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**, 3205-8.
- SCHEMIDT, R. A., BRAUNING, C. K., BOUVIER, A., BRUSILOW, W. S. A. (1996). Localization of a conformational energy-coupling determinant near the C terminus of the beta subunit of the F_1F_0 -ATPase; *J. Biol. Chem.* **271**, 33390-3.
- SCHEMIDT, R. A., HSU, D. K. W., DECKERS-HEBESTREIT, G., ALTENDORF, K. & BRUSILOW, W. S. A. (1995). The effects of an *atpE* ribosome-binding site mutation on the stoichiometry of the c subunit in the F_1F_0 ATPase of *Escherichia coli*; *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 423-428.
- SCHNEIDER, E. & ALTENDORF, K. (1987). Bacterial Adenosine 5'-Triphosphate Synthase (F_1F_0): Purification and Reconstitution of F_0 Complexes and Biochemical and Functional Characterization of Their Subunits; *Microbiol. Rev.* **51**, 477-497.
- SCHNEIDER, E. & ALTENDORF, K. (1982). ATP Synthase (F_1F_0) of *Escherichia coli* K-12. High-Yield Preparation of Functional F_0 by Hydrophobic Affinity Chromatography; *Eur. J. Biochem.* **126**, 149-153.
- SCHNEIDER, E. & 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. USA* **81**, 7279-7283.
- SCHNEIDER, E. & ALTENDORF, K. (1985a). Modification of subunit b of the F_0 complex from *Escherichia coli* ATP synthase by a hydrophobic maleimide and its effects on F_0 functions; *Eur. J. Biochem.* **153**, 105-109.
- SCHNEIDER, E. & ALTENDORF, K. (1985b). All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (F_0) of *Escherichia coli* ATP synthase (F_1F_0); *EMBO J.* **4**, 515-518.
- SCHNEPPE, B., DECKERS-HEBESTREIT, G. & ALTENDORF, K. (1991). Detection and localization of the i protein in *Escherichia coli* cells using antibodies; *FEBS Lett.* **292**, 145-147.

- SCHNICK, C., FORREST, L. R., SANSOM, M. S. & GROTH G. (2000). Molecular contacts in the transmembrane *c*-subunit oligomer of F-ATPases identified by tryptophan substitution mutagenesis; *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**, 49-60.
- SCHOENKNECHT, G., JUNGE, W., LILL, H. & ENGELBRECHT, S. (1986). Complete tracking of proton flow in thylakoids - the unit conductance of CF₀ is greater than 10 fs; *FEBS Lett.* **203**, 289-293.
- SCHRAMM, H. C., SCHNEPPE, B., BIRKENHÄGER, R. & MCCARTHY, J. E. (1996). The promoter-proximal, unstable IB region of the *atp* mRNA of *Escherichia coli*: an independently degraded region that can act as a destabilizing element; *Biochim. Biophys. Acta.*, **1307**, 162-70.
- SCHULENBERG, B., AGGELER, R., MURRAY, J. & CAPALDI, R. A. (1999). The γ -*c* subunit interface in the ATP synthase of *Escherichia coli*. Cross-linking of the ϵ subunit to the *c* subunit ring does not impair enzyme function, that of γ to *c* subunits leads to uncoupling; *J. Biol. Chem.* **274**, 34233-7.
- SCHULENBERG, B., WELLMER, F., LILL, H., JUNGE, W., & ENGELBRECHT, S. (1997). Cross-linking of chloroplast F₀F₁-ATPase subunit ϵ to γ without effect on activity. ϵ and γ are parts of the rotor; *Eur. J. Biochem.* **249**, 134-141.
- SEELERT, H., POETSCH, A., DENCHER, N. A., ENGEL, A., STAHLBERG, H. & MÜLLER, D. J. (2000). Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**, 418-9.
- SENIOR, A. E. (1990). The Proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*; *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**, 7-41.
- SENIOR, A. E., NADANACIVA, S. & WEBER, J. (2002). The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase; *Biochim. et Biophys. Acta*, in press.
- SINGH, S., TURINA, P., BUSTAMANTE, C. J., KELLER, D. J. & CAPALDI, R. (1996). Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase in aqueous buffer; *FEBS Lett.* **397**, 30-4.
- SOLOMON, K. A. & BRUSILOW, W. S. A. (1988). Effect of an *uncE* Ribosome-binding Site Mutation on the Synthesis and Assembly of the *Escherichia coli* Proton-translocating ATPase; *J. Biol. Chem.* **263**, 5402-5407.
- SOLOMON, K. A., HSU, D. K. W. & BRUSILOW, W. S. A. (1989). Use of lacZ fusions to measure *in vivo* expression of the first three genes of the *Escherichia coli unc* operon; *J. Bacteriol.* **171**, 3039-3045.
- SORGEN, P. L., BUBB, M. R., MCCORMICK, K. A., EDISON, A. S. & CAIN, B. D. (1998). Formation of the *b* subunit dimer is necessary for interaction with F₁-ATPase; *Biochemistry* **37**, 923-32.
- STAHLBERG, H., MÜLLER, D. J., SUDA, K., FOTIADIS, D., ENGEL, A., MEIER, T., MATTHEY, U. & Dimroth, P. (2001). Bacterial Na⁺-ATP synthase has an undecameric rotor; *EMBO Rep.* **2**, 229-33.
- STEFFENS, K., SCHNEIDER, E., DECKERS-HEBESTREIT, G. & ALTENDORF, K. (1987). F₀ Portion of *Escherichia coli* ATP Synthase: further resolution of trypsin-generated fragments from subunit *b*; *J. Biol. Chem.* **262**, 5866-5869.
- STEFFENS, K., SCHNEIDER, E., HERKENHOFF, B., SCHMID, R. & ALTENDORF, K. (1984). Chemical modification of the F₀ part of the ATP synthase (F₁F₀) from *Escherichia coli*. Effects on proton conduction and F₁ binding; *Eur. J. Biochem.* **138**, 617-622.
- STERNWEIS, P. C. & SMITH, J. B. (1977). Characterization of the Purified Membrane Attachment (δ) Subunit of Proton Translocating Adenosine Triphosphatase from *Escherichia coli*; *Biochemistry* **16**, 4020-4025.
- STOCK, D., LESLIE, A. G. & WALKER, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-5.

- SZOKA, F. JR. & PAPAHDJOPOULOS, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 4194-8.
- TAKEYASU, K., OMOTE, H., NETTIKADAN, S., TOKUMASU, F., IWAMOTO-KIHARA, A. & FUTAI, M. (1996). Molecular imaging of *Escherichia coli* F₀F₁-ATPase in reconstituted membranes using atomic force microscopy; *FEBS Lett.* **392**, 110-3.
- TANABE, M., NISHIO, K., IKO, Y., SAMBONGI, Y., IWAMOTO-KIHARA, A., WADA, Y., FUTAI, M. (2001). Rotation of a complex of the gamma subunit and c ring of *Escherichia coli* ATP synthase. The rotor and stator are interchangeable; *J. Biol. Chem.* **276**, 15269-74.
- TANAKA, S., SILERNER, S. A. & LIN, E. C. C. (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase for the utilization of mannitol; *J. Bacteriol.* **93**, 642-648.
- TANG, C. & CAPALDI, R. A. (1996). Characterization of the interface between γ and ϵ subunits of *Escherichia coli* F₁-ATPase; *J. Biol. Chem.* **271**, 3018-3024.
- TSUNODA, S. P., AGGELER, R., YOSHIDA, M. & CAPALDI, R. A. (2001). Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₁F₀ ATP synthase; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 898-902.
- TSUNODA, S. P., RODGERS, A. J., AGGELER, R., WILCE, M. C., YOSHIDA, M., CAPALDI, R. A. (2001). Large conformational changes of the ϵ subunit in the bacterial F₁F₀ ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 6560-4.
- VALIYAVEETIL, F. I. & FILLINGAME, R. H. (1997). On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the *Escherichia coli* F₀F₁-ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **272**, 32635-41.
- VALIYAVEETIL, F. I. & FILLINGAME, R. H. (1998). Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **273**, 16241-16247.
- VAN WALRAVEN, H. S., HOLLÄNDER, E. E., SCHOLTS, M. J. C. & KRAAYENHOF, R. (1997). The H⁺/ATP ratio of the ATP synthase from the cyanobacterium *Synechococcus* 6716 varies with growth temperature and light intensity; *BBA* **1318**, 217-224.
- VIK, S. B., LONG, J. C., WADA, T. & 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**, 457-66.
- VON BALLMOOS, C., APPOLDT, Y., BRUNNER, J., GRANIER, T., VASELLA, A. & DIMROTH P. (2002). Membrane topography of the coupling ion binding site in Na⁺-translocating F₁F₀ ATP synthase; *J. Biol. Chem.* **277**, 3504-10.
- VON MEYENBURG, K., JØRGENSEN, B. B. & VAN DEURS, B. (1984). Physiological and Morphological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12; *EMBO J.* **3**, 1791-1797.
- WADA, T., LONG, J. C., ZHANG, D. & 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**, 17353-7.
- WATTS, S. D. & CAPALDI, R. A. (1997). Interactions between the F₁ and F₀ parts in the *Escherichia coli* ATP synthase. Associations involving the loop region of c subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 15065-1568.
- WATTS, S. D., TANG, Y., & CAPALDI, R. A. (1996). The stalk region of the *Escherichia coli* ATP synthase. Tyrosine 205 of the γ subunit is in the interface between the F₁ and F₀ parts and can interact with both the ϵ and c oligomer; *J. Biol. Chem.* **271**, 28341-28347.
- WATTS, S. D., ZHANG, Y., FILLINGAME, R. H. & CAPALDI, R. A. (1995). The γ subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF₁F₀) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F₀ part; *FEBS Lett.* **368**, 235-238.

- WEBER, A. & SENIOR, A. E. (1997). Catalytic mechanism of F₁-ATPase; *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 19-58.
- WEBER, J. & SENIOR, A. E. (2000). ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis; *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 300-309.
- WILKENS, S. & CAPALDI, R. A. (1998). Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase; *Biochim. Biophys. Acta*. **1365**, 93-7.
- WILKENS, S. & CAPALDI, R. A. (1998). Solution structure of the ε subunit of the F₁-ATPase from *Escherichia coli* and interactions of this subunit with β subunits in the complex; *J. Biol. Chem.* **273**, 26645-51.
- WILKENS, S. & CAPALDI, R. A. (1998). Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase; *Biochim. Biophys. Acta*. **1365**, 93-7.
- WILKENS, S., DUNN, S. D., CHANDLER, J., DAHLQUIST, F. W. & CAPALDI, R. A. (1997). Characterization of an b₂δ complex from *Escherichia coli* ATP synthase; *Nature Struct. Biol.* **4**, 198-201.
- WILKENS, S., ZHOU, J., NAKAYAMA, R., DUNN, S. D. & CAPALDI, R. A. (2000). Localization of the δ subunit in the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase by immuno electron microscopy: the δ subunit binds on top of the F₁; *J. Mol. Biol.* **295**, 387-91.
- WISE, J. G. (1990). Site-directed Mutagenesis of the Conserved β Subunit Tyrosine 331 of *Escherichia coli* ATP Synthase Yields Catalytically Active Enzymes; **265**, 10403-10409.
- YAMADA, H., MORIYAMA, Y., MAEDA, M. & FUTAI, M. (1996). Transmembrane topology of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (ATP synthase) subunit *a*. *FEBS Lett.* **390**, 34-8.
- YASUDA, R., NOJI, H., YOSHIDA, M., KINOSHITA, K. JR. & ITOH, H. (2001). Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase; *Nature* **410**, 898-904.
- ZHANG, Y. & FILLINGAME, R. H. (1995). Subunits Coupling H⁺ Transport and ATP Synthesis in the *Escherichia coli* ATP Synthase; *J. Biol. Chem.* **270**, 24609-24614.
- ZHANG, Y., OLDENBURG, M. & FILLINGAME, R. H. (1994). Suppressor Mutations in F₁ Subunit ε Recouple ATP-driven H⁺ Translocation in Uncoupled Q42E Subunit *c* Mutant of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP Synthase; *J. Biol. Chem.* **269**, 10221-10224.

7 Anhang

7.1 Das Programm prt17.bas

Das QBasic Programm prt17.bas dient zur Übernahme der Messdaten für Protonentranslokation aus dem Data-Logger über die serielle Schnittstelle in einen PC. Dabei wird davon ausgegangen, dass die ersten 600 Datenpunkte in Intervallen von 0,1 s gemessen werden und nach 13-14 s die Zugabe von Valinomycin erfolgt. Nach Erfassung der ersten 600 Datenpunkte schaltet der Data-Logger automatisch auf Sekundenintervalle um und die Messung des TTFB-Signals und der HCl-Eichung schließen sich an. Die Messdaten werden zunächst direkt nach der Messung gespeichert, als Messkurven dargestellt und können auf Wunsch mit vorigen Messungen verglichen werden, indem zwei Messkurven simultan auf dem Bildschirm angezeigt werden. Für die Überlagerung zweier Messkurven werden diese vor der Darstellung entdriftet. Für die Funktion des Programms ist ein QBasic Interpreter (Microsoft, Redmond) notwendig.

```
' VERSION 1.7 (01.07.2000)
' Das Programm wird mit SHIFT + F5 gestartet

' Programmfunktionen:
'   - zeigt aktuelles Verzeichnis und darin enthaltene Dateien
'     automatisch an
'   - Entscheidung ob Datei von Dater-Logger eingelesen werden soll (neu in 1.5)
'   - Aufruf von datin1 als eigene BASIC-SUB (Dateiname und Pfad angeben).
'   - Die gemessene Datei wird automatisch angezeigt (-0,5 mV bis 3 mV)
'   - Ermittlung des TTFB Signals.
'   - Abfrage, ob noch eine weitere Datei dargestellt werden soll.
'     ( Muss mit j oder n beantwortet werden.)
'   - Kurven werden entdriftet
'   - Ermöglicht die Überlagerung von zwei Messkurven

SCREEN 12
CLS

COLOR 12
LOCATE 13, 13: PRINT "*****"
COLOR 14
LOCATE 15, 13: PRINT "Protleit.bas Version 1.7 written by Ingo Aldag"
LOCATE 16, 21: PRINT "Last modification: 01.07.2000"
COLOR 12
LOCATE 18, 13: PRINT "*****"
```

```
COLOR 10
LOCATE 22, 10: PRINT "Weiter mit Esc"
SLEEP 10
COLOR 15

DO

CLS
SCREEN 0
SHELL "dir /w"
COLOR 12
LOCATE 23, 5: PRINT "A C H T U N G, gleichnamige Dateien werden NICHT
□berschrieben!"
COLOR 15
LOCATE 24, 10: INPUT "Neue Datei anlegen [n], oder alte ansehen [ENTER]? ", select$
IF select$ = "n" THEN
LOCATE 24, 1: INPUT "Name der Messdatei (Mit Erweiterung): ", dateiname$
CALL datin1(dateiname$)
ELSE
CLS
SHELL "dir /w"
LOCATE 24, 1: INPUT "Welche Datei soll dargestellt werden [Dateiname.ext]? ",
dateiname$
CLS
END IF

CLS
SHELL "dir /w"
LOCATE 24, 1: INPUT "Soll gleichzeitig noch eine weitere Datei Dargestellt werden
[Dateinema.ext]/[ENTER]? ", dateiname2$
CLS

SCREEN 12
LOCATE 23, 10: SHELL "attrib +r *.dat"
CLS

DO
SCREEN 12
WINDOW (-100, -700)-(600, 3000)

'Hauptlinien:
LINE (0, -500)-(600, -500)
LINE (0, -500)-(0, 3000)
```

'Teilstriche Y-Achse:

```
LINE (-20, 0)-(0, 0)
LINE (-20, -500)-(0, -500)
LINE (-20, 500)-(0, 500)
LINE (-20, 1000)-(0, 1000)
LINE (-20, 1500)-(0, 1500)
LINE (-20, 2000)-(0, 2000)
LINE (-20, 2500)-(0, 2500)
LINE (-20, 3000)-(0, 3000)
```

'Teilstriche X-Achse:

```
LINE (0, -500)-(0, -600)
LINE (150, -500)-(150, -600)
LINE (300, -500)-(300, -600)
LINE (450, -500)-(450, -600)
LINE (600, -500)-(600, -600)
```

'Beschriftungen

```
LOCATE 1, 35: PRINT "Protonentranslokation"
COLOR 10
LOCATE 2, 35: PRINT "Datei 1: "; dateiname$
COLOR 12
LOCATE 3, 35: PRINT "Datei 2: "; dateiname2$
COLOR 15
LOCATE 1, 1: PRINT "3,0 mV"
LOCATE 5, 1: PRINT "2,5 mV"
LOCATE 9, 1: PRINT "2,0 mV"
LOCATE 13, 1: PRINT "1,5 mV"
LOCATE 17, 1: PRINT "1,0 mV"
LOCATE 21, 1: PRINT "0,5 mV"
LOCATE 25, 1: PRINT "0,0 mV"
LOCATE 28, 1: PRINT "-0,5 mV"
LOCATE 27, 77: PRINT "60 s"
LOCATE 27, 45: PRINT "30 s"
```

COLOR 10

TYPE WertTyp

```
Zeit AS STRING * 6
mVVK AS STRING * 3
Komma AS STRING * 1
mVVK AS STRING * 2
linefeed AS STRING * 2
```

END TYPE

```
DIM werte(900) AS WertTyp
```

```
OPEN dateiname$ FOR RANDOM AS #1 LEN = 14
```

```
GET #1, 1, werte(1)
mVVK$ = werte(1).mVVK
mVVK$ = werte(1).mVVK
mVVK$ = werte(1).mVVK
Offset = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVVK$)) / 100))
```

'Steigung der Anfangsgeraden, ermittelt aus der Werten 116, 118, 120, 122, 124:

```
GET #1, 116, werte(116)
mVVK$ = werte(116).mVVK
mVVK$ = werte(116).mVVK
mVVK$ = werte(116).mVVK
Gera116 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVVK$)) / 100)) - Offset
Gera116 = Gera116 * 1000
```

```
GET #1, 124, werte(124)
mVVK$ = werte(124).mVVK
mVVK$ = werte(124).mVVK
mVVK$ = werte(124).mVVK
Gera124 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVVK$)) / 100)) - Offset
Gera124 = Gera124 * 1000
```

```
GET #1, 118, werte(118)
mVVK$ = werte(118).mVVK
mVVK$ = werte(118).mVVK
mVVK$ = werte(118).mVVK
Gera118 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVVK$)) / 100)) - Offset
Gera118 = Gera118 * 1000
```

```
GET #1, 120, werte(120)
mVVK$ = werte(120).mVVK
mVVK$ = werte(120).mVVK
mVVK$ = werte(120).mVVK
Gera120 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVVK$)) / 100)) - Offset
Gera120 = Gera120 * 1000
```

```
GET #1, 122, werte(122)
mVVK$ = werte(122).mVVK
mVVK$ = werte(122).mVVK
mVVK$ = werte(122).mVVK
Gera122 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVVK$)) / 100)) - Offset
Gera122 = Gera122 * 1000
```

```
GeraSteig = (Gera116 + Gera118 + Gera120 + Gera122 + Gera124) / (5 * 120)
```

```
FOR i% = 1 TO 600
    GET #1, i%, werte(i%)
    mVVK$ = werte(i%).mVVK
    mVNK$ = werte(i%).mVNK
    mV = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100))
    mV = (mV - Offset) * 1000
    mV = mV - i% * GeraSteig
    PSET (i%, mV)

NEXT

COLOR 15

        TTFB = 0
FOR i% = 601 TO 900
    GET #1, i%, werte(i%)
    mVVK$ = werte(i%).mVVK
    mVNK$ = werte(i%).mVNK
    mV = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100))
    mV = (mV - Offset) * 1000
    IF TTFB < mV THEN TTFB = mV

NEXT

LOCATE 4, 35: PRINT "TTFB: ", TTFB / 1000
LOCATE 5, 35: PRINT "Drift [mV/15s]: ", GeraSteig / 1000 * 150
COLOR 10
LOCATE 27, 15: PRINT "Weiter mit Esc"
COLOR 15
IF TTFB < 1600 THEN LOCATE 6, 35: PRINT "A C H T U N G: TTFB unter 1.6!"
IF TTFB < 1600 THEN PLAY "O1MB CCC"
IF TTFB >= 1600 THEN BEEP
CLOSE #1

IF dateiname2$ = "" THEN
ELSE
COLOR 12
OPEN dateiname2$ FOR RANDOM AS #1 LEN = 14

        GET #1, 1, werte(1)
        mVVK$ = werte(1).mVVK
        mVNK$ = werte(1).mVNK
        Offset = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100))
```

'Steigung der Anfangsgeraden, ermittelt aus der Werten 116, 118, 120, 122, 124:

```
GET #1, 116, werte(116)
mVVK$ = werte(116).mVVK
mVNK$ = werte(116).mVNK
Gera116 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100)) - Offset
Gera116 = Gera116 * 1000
```

```
GET #1, 124, werte(124)
mVVK$ = werte(124).mVVK
mVNK$ = werte(124).mVNK
Gera124 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100)) - Offset
Gera124 = Gera124 * 1000
```

```
GET #1, 118, werte(118)
mVVK$ = werte(118).mVVK
mVNK$ = werte(118).mVNK
Gera118 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100)) - Offset
Gera118 = Gera118 * 1000
```

```
GET #1, 120, werte(120)
mVVK$ = werte(120).mVVK
mVNK$ = werte(120).mVNK
Gera120 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100)) - Offset
Gera120 = Gera120 * 1000
```

```
GET #1, 122, werte(122)
mVVK$ = werte(122).mVVK
mVNK$ = werte(122).mVNK
Gera122 = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100)) - Offset
Gera122 = Gera122 * 1000
```

```
GeraSteig = (Gera116 + Gera118 + Gera120 + Gera122 + Gera124) / (5 * 120)
```

```
FOR i% = 1 TO 600
```

```
GET #1, i%, werte(i%)
mVVK$ = werte(i%).mVVK
mVNK$ = werte(i%).mVNK
mV = -(VAL(mVVK$) - ((VAL(mVNK$)) / 100))
mV = (mV - Offset) * 1000
mV = mV - i% * GeraSteig
PSET (i%, mV)
```

```
NEXT
```

```
CLOSE #1
```

```
COLOR 15
```

```
END IF
```

```
SLEEP
CLS
    SHELL "dir /w"
    LOCATE 24, 1: INPUT "Soll noch eine weitere Datei dargestellt werden
[Dateiname.ext]/[ENTER]/[exit]? ", dateiname$
IF dateiname$ = "" THEN EXIT DO
IF dateiname$ = "exit" THEN SYSTEM
CLS
LOOP
LOOP
SYSTEM

DEFINT A-Z
SUB datin1 (dateiname$)
    OPEN "COM1:9600,N,8,1,OP0,RB32000" FOR RANDOM AS #1
'LINE INPUT "Name der Messdatei (mit Erweiterung): "; dateiname$
PRINT "Ausgabe mit # starten"
    OPEN dateiname$ FOR OUTPUT AS #2
10 x$ = INPUT$(1, #1)
    PRINT x$; : PRINT #2, x$;
    IF x$ = CHR$(26) GOTO 20
    GOTO 10
20 CLOSE #1
    CLOSE #2
    PRINT
END SUB
```

7.2 Das Formblatt Lipoaus3-25-2.xlt

Die Auswertung der mit prt17.bas aufgenommenen Daten erfolgte mit dem Excel-Formblatt Lipoaus3-25-2.xlt, welches eine weitgehend automatische Auswertung der Protonentranslokationsdaten ermöglicht. Das Steuerelement "Auswerten" im Auswertungsbereich öffnet zunächst einen Dialog, in welchem die auszuwertende Datei ausgewählt werden kann. Nach erfolgter Auswahl werden die Zeit- und mV-Werte automatisch in die Spalten [A] und [B] eingefügt. In Spalte [C] wird dann über die Formel [=WENN(B2="";"";-(B2-\$B\$2))] der Offset des mV-Signals abgezogen. Für die automatisch nachfolgende Auswertung wurden folgende Bereichsnamen zugewiesen:

[I1] = "Vmax" (maximales Potential bei $t = \infty$)

[I2] = "Vmin" (minimales Potential bei $t = 0$)

[I3] = "k" (Ratenkonstante der Protonentranslokationsreaktion)

[I4] = "t₀" (Anfangspunkt des Valinomycinsignals)

[K1] = "lin. Steig." (Steigung der Driftfunktion in den ersten 13 s)

[K2] = "lin. Konst." (absolutes Glied der Driftfunktion in den ersten 13 s)

[K4] = "Steigung" (Steigung der ermittelten Exponentialfunktion im Punkt $t = t_0$)

[K5] = "Protein" (für die Messung eingesetzte Proteinmenge in μg)

[E_{(t₀):E_{(t₀) + 150}] = "Summeexp"}

In Spalte [F] wird über die Formel [=lin.Steig.*(\$A2)+lin.Konst.] die Drift des Signals in den ersten 13 s vor der Zugabe von Valinomycin ermittelt. Dazu wird in Spalte [G] über [=(\$F2-\$C2)^2] die Abweichung des Formelergebnisses von Spalte [F] vom tatsächlichen Messwert berechnet und quadriert. Mit [=SUMME(G2:G130)] wird dann die Summe dieser Abweichungsquadrate berechnet und in Zelle [K3] eingetragen. Die Minimierung dieser Summe übernimmt dann, automatisch durch VBA aufgerufen, der Solver durch Veränderung der Zellen [K1] und [K2].

Nachdem die Driftfunktion ermittelt wurde, kann nun von VBA automatisch der Zeitpunkt der Zugabe von Valinomycin (t_0) ermittelt und in Zelle [I4] eingetragen werden. Nach der Ermittlung von t_0 erfolgt die Festlegung des Bereichs Summeexp, welcher sich in Spalte [E] von Zeile $t_0 \times 10$ bis $t_0 \times 10 + 150$ erstreckt.

Danach erfolgt die Anpassung der Funktion $[=V_{max}-(V_{max}-V_{min})\cdot \text{EXP}(-(k\cdot(\$A2-\text{to}))) + (\text{lin. Steig.} \cdot (\$A2))]$ (Dmitriev *et al.*, 1995) in Spalte [D] durch Summierung der Abweichungsquadrate in Spalte [E] $[=(C2-D2)^2]$ mittels $[=\text{SUMME}(\text{Summeexp})]$. Auch für diese Anpassung wird automatisch der Solver aufgerufen, welcher die Zellen [I1:I3] ändert, so dass $[=\text{SUMME}(\text{Summeexp})]$ minimal wird.

Die Auswertung von TTFB-Signal und HCl-Eichung geschieht anschließend vollautomatisch über VBA. Die ermittelten Werte werden in die Zellen [M2] und [M4] eingetragen. Die Berechnung der eigentlichen Protonentranslokationsrate in $\mu\text{mol H}^+ / \text{min} \times \text{mg F}_o$ erfolgt in Zelle [M5] über die Formel $[=((1000/\text{Protein})\cdot 0,005\cdot \text{Steigung}/\text{Standard})]$.

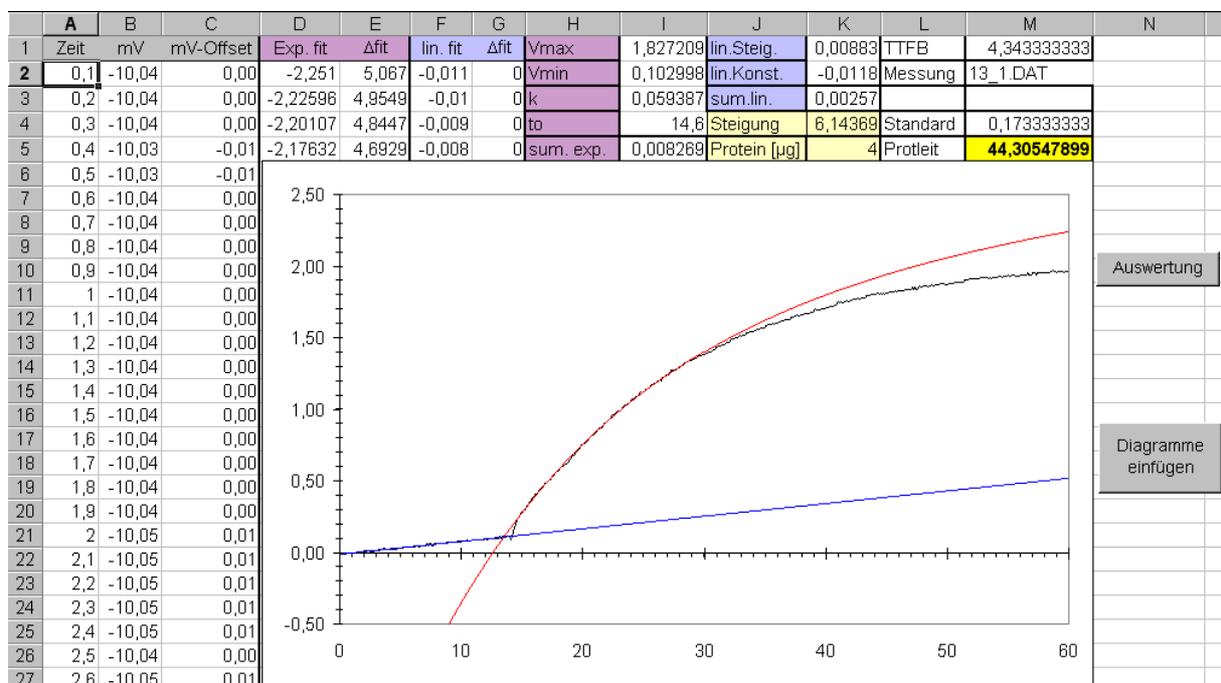


Abb. 26: Auswertungsbereich des Excel Formblattes Lipoaus3-25-2.xlt mit den VBA-Steurelementen "Auswertung" und "Diagramme einfügen".

Die automatische Auswertung der HCl-Eichung kann im TTFB/HCl-Bereich (Abb. 27) des Formblattes bei Bedarf berichtigt werden. Dazu werden die jeweiligen Ober- und Untergrenzen der ersten bis dritten Eichung im Diagramm zusammen mit der Eichungsmesskurve dargestellt. Wurde ein Eichschritt nicht korrekt erkannt, so können die entsprechenden Werte in Spalte [M] manuell angepasst werden.

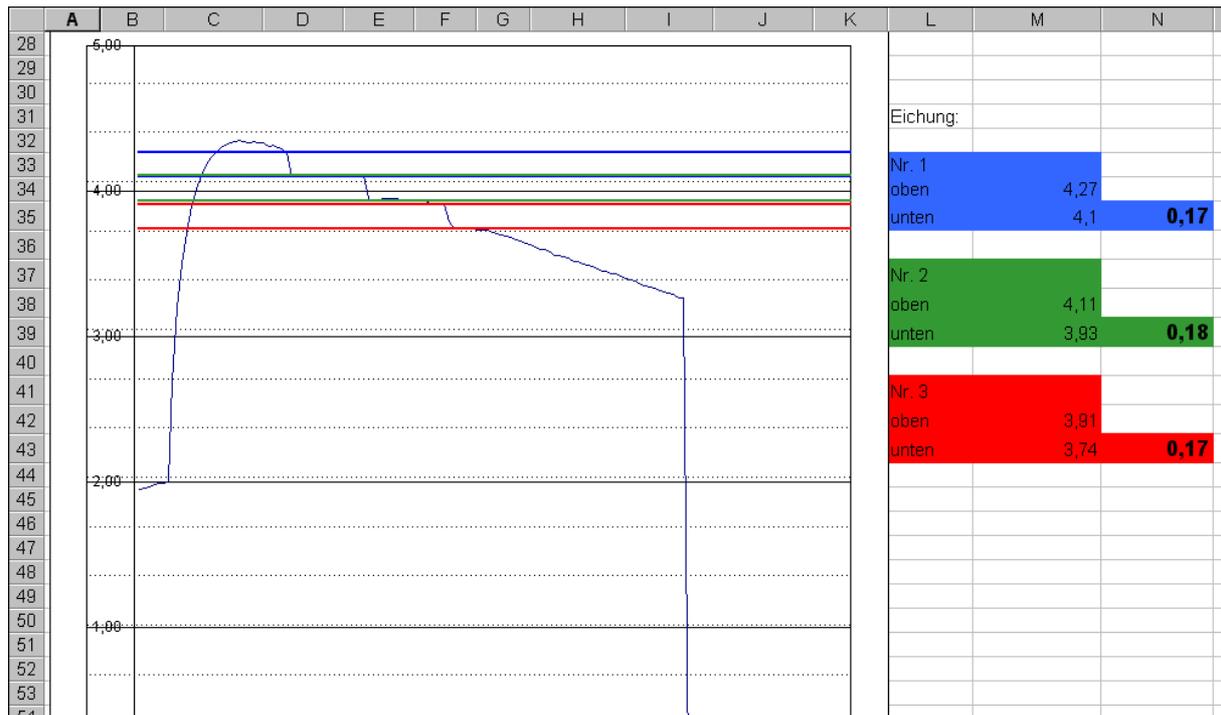


Abb. 27: TTFB/HCI-Bereich des Formblattes Lipoaus3-25-2.xlt mit den drei Werten für die HCI-Eichung.

Die beiden Diagramme mit Protonentranslokation und TTFB-Signal/HCI-Eichung und der Ergebnisbereich [H1:M5] werden von Excel automatisch in ein zweites Tabellenblatt ("Übersicht") übernommen. Von dort können die Daten über die Schaltfläche "Diagramme einfügen" (Abb. 26) in eine neue Excel Arbeitsmappe mit dem Namen "Uebersicht.xls" übertragen werden. Durch diesen Schritt wird der Speicherbedarf einer Auswertung drastisch reduziert.

Der nachfolgende VBA-Programmcode steht in einem VBA-Modul und wurde mit Excel97 erstellt:

```
Dateiname As Variant
```

```
Public Sub Auswertung()
```

```
'Alte Daten aus dem Blatt löschen
```

```
Application.Goto Reference:= _
```

```
    "Z4S9;Z2S1:Z2000S2;Z2S13;Z5S11;Z29S13;Z30S13;Z33S13;Z34S13;Z37S13;Z38S13"
```

```
    Selection.ClearContents
```

```
    Application.Goto Reference:="Z1S1"
```

```
    Application.Goto Reference:="Z2S1"
```

```
'Die Datei wird geöffnet
ZuÖffnendeDatei = Application.GetOpenFilename("dat (*.dat), *.dat")
'dateiname = InputBox("Geben Sie den Dateiname ein")

If ZuÖffnendeDatei = "Falsch" Then
MsgBox ("Sie haben keine Datei ausgewählt, die Auswertung wird abgebrochen!")
Exit Sub
End If

Workbooks.OpenText Filename:= _
    ZuÖffnendeDatei, Origin:= _
    xlWindows, StartRow:=1, DataType:=xlDelimited, TextQualifier:= _
    xlDoubleQuote, ConsecutiveDelimiter:=False, Tab:=True, Semicolon:=True, _
    Comma:=False, Space:=False, Other:=False, FieldInfo:=Array(Array(1, 1), _
    Array(2, 1))

Dateiname = ActiveWorkbook.Name
Range("A1:B1000").Select
Selection.Copy
Windows("Lipoaus3-25-21").Activate
Range("$M$2").Value = Dateiname
'ActiveWindow.ActivateNext
Range("A2").Select
ActiveSheet.Paste
Range("A2").Select
SendKeys "N"
Windows(2).Close SaveChanges:=False

'Abfrage nach der eingesetzten Proteinmenge
Proteinmenge = InputBox("Proteinmenge [µg]:", "Proteinmenge", 4)
[Protein] = Proteinmenge

'Das Dateiende wird ermittelt
n = 1

Do
    Zeit = Range("$A$" & n).Value
    If Asc(Zeit) = 26 Then Exit Do
    n = n + 1
Loop

Debug.Print "n am Dateiende: " & n
```

```
'Die Steigung wird ermittelt

mV1 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(130, 3).Value
mV2 = Range("$A$1:$B$" & n).Cells(131, 3).Value
mV3 = Range("$A$1:$B$" & n).Cells(133, 3).Value
mVMittelwert = ((mV1 + mV2 + mV3) / 3)
Steig = (mVMittelwert / 131) 'Steigung [mV/Zeilennummer]

Debug.Print "Steigung der ersten 13 sec: " & Steig

'Der Anfangspunkt des Valinomycinsignals wird gesucht
X = 100
Toleranz = 0.02

Do Until X = 200

    X = X + 1

    Val0 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X, 3).Value
    Val3 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X + 3, 3).Value
    Val5 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X + 5, 3).Value
    Val10 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X + 10, 3).Value

    Theo0 = X * Steig
    Theo3 = (X + 3) * Steig
    Theo5 = (X + 5) * Steig
    Theo10 = (X + 10) * Steig

    If Val0 > (Theo0 + Toleranz) And Val3 > (Theo3 + Toleranz) And Val5 > (Theo5 +
Toleranz) And Val10 > (Theo10 + Toleranz) Then Exit Do
    If X = 199 Then
        MsgBox ("Das Programm konnte keinen Anfangspunkt finden!")
    Exit Sub
    End If
Loop
X = X + 3 'Der Anfang des Valinomycinsignals wird um 3/10 sec verschoben um den
Valinomycinsprung nicht in die Auswertung mit einzubeziehen!
Debug.Print "X am Anfang des Valinomycinsignals: " & X

Range("$E$" & X & ":" & "$E$" & X + 150).Name = "Summeexp"
Range("$I$5").Formula = "=SUMME(summeexp)"
Range("to").Value = (X / 10) - 0.1
```

```
'Eichung
n = n - 1 'Die letzte zeile, die Werte enthält!
X = 600 'X ist Zeilennummer
Toleranzeich = 0.04

'1.Eichung
Do
    If X >= n - 1 Then X = n - 1
    EichmV0 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X, 3).Value
    EichmV1 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X + 1, 3).Value
    If EichmV1 + Toleranzeich < EichmV0 Then Exit Do
    If X = n - 1 Then Exit Do
    X = X + 1
Loop
HCL1_oben = X
Debug.Print "HCL1_oben: " & HCL1_oben
HCL1_unten = HCL1_oben + 2
Debug.Print "HCL1_unten: " & HCL1_unten

Range("$M$34").Value = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(HCL1_oben, 3).Value
Range("$M$35").Value = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(HCL1_unten, 3).Value

X = X + 3

'2.Eichung
Do
    If X >= n - 1 Then X = n - 1
    EichmV0 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X, 3).Value
    EichmV1 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X + 1, 3).Value
    If EichmV1 + Toleranzeich < EichmV0 Then Exit Do
    If X = n - 1 Then Exit Do
    X = X + 1
Loop
HCL2_oben = X
Debug.Print "HCL2_oben: " & HCL2_oben
HCL2_unten = HCL2_oben + 2
Debug.Print "HCL2_unten: " & HCL2_unten

Range("$M$38").Value = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(HCL2_oben, 3).Value
Range("$M$39").Value = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(HCL2_unten, 3).Value

X = X + 3
```

```
'3.Eichung
Do Until X = n - 1
    If X >= n - 1 Then X = n - 1
    EichmV0 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X, 3).Value
    EichmV1 = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(X + 1, 3).Value
    If EichmV1 + Toleranzeich < EichmV0 Then Exit Do
    If X = n - 1 Then Exit Do
    X = X + 1
Loop

HCL3_oben = X
Debug.Print "HCL3_oben: " & HCL3_oben
HCL3_unten = HCL3_oben + 2
Debug.Print "HCL3_unten: " & HCL3_unten

Range("$M$42").Value = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(HCL3_oben, 3).Value
Range("$M$43").Value = Range("$A$1:$C$" & n).Cells(HCL3_unten, 3).Value

'Solver
SendKeys "{ENTER}"
Application.ExecuteExcel4Macro
String:="SOLVER.XLA!SOLVER.OK(!Z3S11;2;0;(!Z1S11:Z2S11))"
Application.ExecuteExcel4Macro String:="SOLVER.XLA!SOLVER.LÖSEN()"
SendKeys "{ENTER}"
Application.ExecuteExcel4Macro
String:="SOLVER.XLA!SOLVER.OK(!Z5S9;2;0;(!Z1S9:Z3S9))"
Application.ExecuteExcel4Macro String:="SOLVER.XLA!SOLVER.LÖSEN()"

End Sub

Public Sub Diagramme_einfuegen()

Windows("uebersicht.xls").Activate
    Sheets.Add
    ActiveSheet.Name = Dateiname
    Windows("lipoaus3-25-21").Activate
    Sheets("Übersicht").Activate
    Range("A1").Select
    Sheets("Übersicht").ChartObjects("Diagramm 1").Activate
    ActiveChart.ChartArea.Select
    ActiveChart.CopyPicture Appearance:=xlPrinter, Size:=xlScreen, Format:= _
        xlPicture
    ActiveWindow.Visible = False
    Windows("uebersicht.xls").Activate
    ActiveSheet.PasteSpecial Format:="Grafik (Enhanced-Metadatei)", Link:=False _
        , DisplayAsIcon:=False
```

```
Windows("lipoaus3-25-21").Activate
Sheets("Übersicht").ChartObjects("Diagramm 2").Activate
ActiveChart.ChartArea.Select
ActiveChart.CopyPicture Appearance:=xlPrinter, Size:=xlScreen, Format:= _
    xlPicture
ActiveWindow.Visible = False
Windows("uebersicht.xls").Activate
Range("A33").Select
ActiveSheet.PasteSpecial Format:="Grafik (Enhanced-Metadatei)", Link:=False _
    , DisplayAsIcon:=False
ActiveWindow.Visible = False
Windows("lipoaus3-25-21").Activate
Range("A49:F55").Select
Selection.Copy
Windows("uebersicht.xls").Activate
ActiveWindow.SmallScroll Down:=23
Range("A52").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks:= _
    False, Transpose:=False
Application.CutCopyMode = False
Selection.Borders(xlDiagonalDown).LineStyle = xlNone
Selection.Borders(xlDiagonalUp).LineStyle = xlNone
With Selection.Borders(xlEdgeLeft)
    .LineStyle = xlContinuous
    .Weight = xlThin
    .ColorIndex = xlAutomatic
End With
With Selection.Borders(xlEdgeTop)
    .LineStyle = xlContinuous
    .Weight = xlThin
    .ColorIndex = xlAutomatic
End With
With Selection.Borders(xlEdgeBottom)
    .LineStyle = xlContinuous
    .Weight = xlThin
    .ColorIndex = xlAutomatic
End With
With Selection.Borders(xlEdgeRight)
    .LineStyle = xlContinuous
    .Weight = xlThin
    .ColorIndex = xlAutomatic
End With
With Selection.Borders(xlInsideVertical)
    .LineStyle = xlContinuous
    .Weight = xlThin
    .ColorIndex = xlAutomatic
End With
```

```
With Selection.Borders(xlInsideHorizontal)
    .LineStyle = xlContinuous
    .Weight = xlThin
    .ColorIndex = xlAutomatic
End With
```

```
ActiveWorkbook.Save
Windows("lipoaus3-25-21").Activate
Sheets("Auswertung").Activate
```

```
End Sub
```

8 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum Albumin
CCCP	Carbonylcyanid <i>m</i> -Chlorophenylhydrazon
cmc	critical micellar concentration
CuP	Cu(II)-(1,10-phenanthrolin) ₂
DCCD	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Na-Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay
HRP	Horseradish-peroxidase
IgG	Immunglobulin der Klasse G
LB	Luria Bertani
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
OD	optische Dichte
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tricin	<i>N</i> -tris[Hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris[Hydroxymethyl]aminomethan
TTFB	4,5,6,7-Tetrachlor-2-trifluoromethylbenzimidazol

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen ganz herzlich danken, deren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit nicht unerwähnt bleiben sollte:

Prof. Dr. K. Altendorf für die Möglichkeit ein Promotionsstudium aufnehmen zu können und die guten Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe.

Ganz allgemein allen 119ern und 120ern für das gute Arbeitsklima, welches sich immer hart am Rande des Wahnsinns bewegte und insbesondere:

Kerstin, für die Korrektur dieser Arbeit und das gute Zusammenspiel bei zahllosen Aktionen auch im außerdienstlichen Bereich.

Eva, die stets hilfsbereit war und mir schon in meiner Diplomzeit gezeigt hat „where the bunny longruns“.

Gerlinde für ihre permanente Hilfsbereitschaft, die mir so manche Arbeit enorm erleichterte.

Jörg, der mir mein E-Mail Postfach regelmäßig mit gigantischen pdf-Dateien verstopfte.

Roland, der auch zu später Nachtstunde noch an mein leibliches Wohl dachte

Dem Griechen, der die durch das Ausscheiden von Wody entstandene Lücke wundervoll ausfüllte, so dass ich immer jemanden hatte, über dessen Unordnung ich mich aufregen konnte.

Michèle und Udo, die ich zu 119ern „honoris causa“ ernennen möchte

Brigitte, die mir zeigte, dass auch Heilige nur mit Wasser kochen

Der Teeküchenrunde mit den 119ern, den 120ern, Gisela und Johanna, für das erstaunlich gute Feedback auf meinen manchmal allzu proktologischen Humor.

PD Dr. Engelbrecht für die Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung, Geduld und ihre „Care-Pakete“.

Uli und Fridrun für ihren besonders spitzen Rotstift bei der Eliminierung von Tippfehlern.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Aldag
Vorname: Ingo
Geburtsdatum: 08.02.1967
Geburtsort: Stade
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAU SBILDUNG

08/73 – 06/77: Pestalozzi-Grundschule-Stade
08/77 – 07/84: Realschule Camper Höhe in Stade
08/84 – 06/87: Vincent Lübeck Schule in Stade
06/87: Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

BUNDESWEHR

07/87 – 06/89: Zeitsoldat, 3. Beob. Btl. 33 in Stade

STUDIUM

10/89 – 01/96: Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Osnabrück
01/96: Abschluss (Diplom)
Seit 04/96: Promotionsstudium und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der
Universität Osnabrück

EIDESSTATTLICHER VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe.

Osnabrück im April 2002

.....
Ingo Aldag