

Mutagenesestudien an F-ATPasen aus *E. coli*

**Auswirkungen zentraler Blockaden der elastischen Rotoreinheit γ und
Visualisierung der Relativrotation unter ATP Synthesebedingungen**

von

Stephanie Ahlbrink

Dem Fachbereich Biologie/Chemie

der



vorgelegte Dissertation
zur Verleihung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Osnabrück 2006

Hauptberichterstatter: apl. Prof. Dr. S. Engelbrecht-Vandré
Berichterstatter: Prof. Dr. W. Junge

Datum der Prüfung: 11. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	F ₀ F ₁ -ATP-Synthasen	1
1.1.1	Struktur der F ₀ F ₁ -ATP-Synthase	2
1.1.2	Funktion der F ₀ F ₁ -ATP-Synthase	4
1.1.2.1	<i>binding change</i> Mechanismus	4
1.1.2.2	Rotation	5
1.1.2.3	Protonentranslokation	7
1.1.3	Kovalente Quervernetzungen von Rotor und Stator	9
1.1.4	Rotation unter ATP Synthesebedingungen	10
1.2	Aufgabenstellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	13
2.2	Medien, Puffer und Lösungen	16
2.3	Geräte	19
2.4	Stämme	21
2.4.1	E. coli DH5 α	21
2.4.2	E. coli DK8	21
2.5	Vektoren	22
2.5.1	pBluescript II SK (+)	22
2.5.2	pSTBlue-1	23
2.5.3	pBWU13	23
2.5.4	pKH7	24
2.5.5	pKG11	25
2.5.6	pMM24	25
2.5.7	pMM25	25
2.5.8	pMM26	25
2.5.9	pSE1	25
2.5.10	pSE3	26
2.5.11	pSE4	27
2.5.12	pSW7	27
2.5.13	pWH1	28
2.6	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	29

2.6.1	Anzucht und Lagerung von Klonen	29
2.6.2	Transformation in DH5 α -Zellen	29
2.6.3	Plasmidisolierung	30
2.6.4	Quantifizierung von Plasmid-DNA	30
2.6.5	Restriktionsenzyme	30
2.6.5.1	Analytischer Restriktionsansatz	31
2.6.5.2	Präparativer Restriktionsansatz	31
2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.6.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.6.8	Ligation	33
2.6.8.1	„sticky end“ Ligation	33
2.6.8.2	„blunt end“ Ligation	34
2.6.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.6.9.1	Mutagenese durch PCR	37
2.6.10	Sequenzierung	38
2.6.11	Transformation in DK8-Zellen	39
2.6.12	Konstruktion des Vektors pSW7	39
2.6.12.1	Baseninsertion im Subklon pSW4	40
2.6.12.2	Deletion im Subklon pSW5	42
2.7	Biochemische Arbeitsmethoden	44
2.7.1	Zellanzucht und Ernte von <i>E. coli</i> DK8-Mutanten	46
2.7.2	EF ₁ -Präparation	46
2.7.2.1	EF ₁ -Isolierung	46
2.7.2.2	Aufreinigung von EF ₁ -Komplexen	47
2.7.3	Oxidation/Reduktion an EF ₁ -Komplexen von Cystein-Doppelmutanten	48
2.7.4	Biotinylierung von EF ₁	48
2.7.5	EF ₀ F ₁ -Präparation	49
2.7.5.1	Herstellung von EF ₀ F ₁ -Membranen	49
2.7.5.2	EF ₀ F ₁ -Isolierung	49
2.7.5.3	Aufreinigung von EF ₀ F ₁ -Komplexen	49
2.7.6	SDS-Gelelektrophorese	50
2.7.6.1	PhastGel-System	50
2.7.6.2	Laemmli-System	51
2.7.7	Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)	51
2.7.8	Polymerisierung und Färbung von G-Aktin	52
2.7.9	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Sedmark & Grossberg)	53
2.7.10	Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität (nach LeBel)	53
2.7.11	Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität von membranassoziierten EF ₀ F ₁ -Komplexen	54
2.7.12	Bestimmung der Aktivierungsenergien nach Arrhenius	55
2.8	Biophysikalische Arbeitsmethoden	57

2.8.1	Instrumenteller Aufbau des Fluoreszenzmikroskops	57
2.8.2	Fluoreszenzmikroskopischer Einzelmolekülnachweis	59
2.9	Benutzte Software	59
3	Ergebnisse	63
3.1	Verknüpfung der γ Untereinheit mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon in EF ₁ -Cystein-Doppelmutanten	63
3.1.1	Herstellung der Cystein-Doppelmutanten	64
3.1.2	Auswertung der Proteinmenge über die Bandenintensität	68
3.1.3	Oxidation und Reduktion der Cystein-Doppelmutanten	70
3.1.3.1	Charakterisierung von KG11-EF ₁ (γ 11)	70
3.1.3.2	Charakterisierung von MM26-EF ₁ (γ 14)	76
3.1.3.3	Charakterisierung von MM25-EF ₁ (γ 17)	77
3.1.3.4	Charakterisierung von MM24-EF ₁ (γ 21)	82
3.1.4	Arrhenius-Analyse der Cystein-Doppelmutanten KG11-EF ₁ (γ 11) und MM24-EF ₁ (γ 21) unter oxidierten und reduzierten Bedingungen	87
3.2	Mutagenesestudien an EF ₀ F ₁ -Konstrukten	91
3.2.1	Mutagenese der EF ₀ F ₁ -Mutante pSW7	92
3.2.2	Herstellung der EF ₀ F ₁ -Mutanten aus <i>E. coli</i> DK8	93
3.2.2.1	Isolierung von EF ₁ - und EF ₀ F ₁ -Komplexen	96
3.2.3	Rotatorische Eigenschaften der EF ₀ F ₁ -Mutanten nach der Isolierung und in Membranen	99
4	Diskussion	101
4.1	Folgen der Rotor/Stator-Verknüpfungen im „Zentrum“ des $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Komplexes	101
4.2	Diskussion zur Stabilität verschiedener EF ₀ F ₁ -Mutanten	109
4.3	Ausblick	112
5	Zusammenfassung	115
6	Anhang	117
7	Literaturverzeichnis	139

Abbildungsverzeichnis

1.1	Modell der EF ₀ EF ₁ -ATP-Synthase	2
1.2	Schematische Darstellung des <i>binding change</i> Mechanismus	5
1.3	Zwei Nachweise der Rotation von γ	6
1.4	Experimenteller Aufbau der Kopplungskette für den EF ₀ EF ₁ -Komplex	7
1.5	Modell des Protonentransports (Erzeugung der Drehbewegung)	8
1.6	Cysteine auf γ innerhalb des EF ₁ -Komplexes (nach Gumbiowski et al. 2001)	9
1.7	Darstellung zur Aufwindung der C-terminalen α -Helix bei Rotation von γ	10
1.8	Aufbau der Kopplungskette für membranintegrierte EF ₀ EF ₁ -Komplexe	11
2.1	Polymerasekettenreaktion mit zwei Primern	35
2.2	Mutagenese durch Polymerasekettenreaktion	37
2.3	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereich der Untereinheit c vom mutierten pSW5 im Vergleich zu pSE1 und pSE3	44
2.4	Strukturformel des Farbstoffes TMR	53
2.5	Reaktionsschema des ATP-regenerierenden Systems	56
2.6	Strahlengang des inversen Auflicht-Hellfeld-Fluoreszenzmikroskops	58
2.7	Die Durchflussküvette	59
2.8	Experimenteller Aufbau der Kopplungskette für den EF ₁ -Komplex	60
3.1	Positionen der Cystein-Doppelmutanten innerhalb des EF ₁ -Komplexes	63
3.2	Restriktionsanalyse der Plasmide pKH7 und pMM24	65
3.3	Anionenaustauschchromatographie von EF ₁ -KH7-Komplexen	67
3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von BSA und Lysozym	68
3.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Lysozym in Anwesenheit von 10% BSA	69
3.6	Darstellung der Bandenintensität in Abhängigkeit vom eingesetzten Proteinanteil	70
3.7	Darstellung der Cystein-Doppelmutante KG11-EF ₁	70
3.8	Oxidationsverhalten von KG11-EF ₁	71
3.9	Kinetik der Quervernetzungsbildung von γ_{C276} und α_{C284} in KG11-EF ₁	73
3.10	Kinetik der Reversibilität der Quervernetzung von γ_{C276} und α_{C284} in KG11-EF ₁	74
3.11	Western Blots gegen γ und α des KG11	74
3.12	Darstellung der Cystein-Doppelmutante MM26-EF ₁	76
3.13	Darstellung des SDS-Gel von MM26 und deren Bandenintensitäten	76
3.14	Darstellung der Cystein-Doppelmutante MM25-EF ₁	77
3.15	Oxidationsverhalten von MM25-EF ₁	77
3.16	Kinetik der Quervernetzungsbildung von γ_{C270} und α_{C284} in MM25-EF ₁	79
3.17	Kinetik der Reversibilität der Quervernetzung von γ_{C270} und α_{C284} in MM25-EF ₁	80
3.18	Western Blots gegen γ und α des MM25	81
3.19	Darstellung der Cystein-Doppelmutante MM24-EF ₁	82
3.20	Oxidationsverhalten von MM24-EF ₁	82

3.21	Kinetik der Quervernetzungsbildung von γ_{C266} und α_{C336} in MM24- EF_1	84
3.22	Kinetik der Reversibilität der Quervernetzung von γ_{C266} und α_{C336} in MM24- EF_1	84
3.23	Western Blots gegen γ und α des MM24	85
3.24	Absorptionsmessung der NADH-Abnahme als Maß für die Aktivität von EF_1	87
3.25	Graphische Darstellung der Aktivität des KH7, KG11 und MM24 bei 10-40°C	88
3.26	Arrhenius-Analyse des KH7, KG11 und MM24 bei 10-40°C	89
3.27	Aktivierungsenergie E_a von red. und ox. KG11, MM24 und KH7 bei 20-35°C	89
3.28	Restriktionsanalyse der Plasmide pSE3 und pSW7	93
3.29	SDS-Gel der EF_0F_1 -Mutanten SE1, SE3, SE4, SW7 und WH1 nach der 1. Affinitätschromatographie	98
4.1	Darstellung der Cysteine-Positionen auf γ innerhalb des EF_1 -Komplexes aller vollständig oxidierbarer Mutanten	107
4.2	Entwindung der α -Helix oder Rotation um die Einfachbindung der Disulfidbrücke	108

Tabellenverzeichnis

1.1	Molmassen der verschiedenen Untereinheiten von EF_0EF_1 -ATP-Synthasen	3
2.1	Fragmentlängen-Trennbereich für verschiedene Agarosekonzentrationen	32
2.2	Pipettierschema für Ligationsreaktion („ <i>sticky end</i> “)	33
2.3	Pipettierschema für Ligationsreaktion („ <i>blunt end</i> “)	34
2.4	Pipettierschema für Polymerasekettenreaktion	36
2.5	Pipettierschema für Sequenzierungsreaktion	38
2.6	Temperaturprogramm für Sequenzierungsreaktion	39
2.7	Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für den pSW4	40
2.8	Temperaturprogramm für Baseninsertion im pSW4	41
2.9	Nukleotidsequenzen der Sequenzierungsprimer FP, RP und seqIII	41
2.10	PCR-Primer zur Erzeugung des <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-überspannenden Fragments	42
2.11	PCR-Programm zur Erzeugung des <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-überspannenden Fragments	42
2.12	Nukleotidsequenzen der Sequenzierungsprimer T7, seqVII, seqVIII und seqIX	43
2.13	Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für den pSW5	43
2.14	Temperaturprogramm für Sequenzdeletion im pSW5	44
2.15	Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels	51
2.16	Pipettierschema zur Bestimmung der Proteinkonzentration	53
2.17	Pipettierschema zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität von EF_1 und EF_0F_1	54
2.18	Pipettierschema zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von EF_0F_1 -Membranen	55
2.19	Reihenfolge der Oberflächenbeschichtung bei EF_1 -Rotationsexperimenten	61
3.1	Bezeichnung der Cystein-Doppelmutanten	64
3.2	Wachstum der Cystein-Doppelmutanten auf Succinat-Agarplatten	66
3.3	Verdopplungszeiten, Ernte- und Proteinausbeuten von KH7 und den Cytain-Doppelmutanten	66
3.4	Auswertung der SDS-Gele aus Abbildung 3.4	68
3.5	Auswertung der SDS-Gele aus Abbildung 3.5	69
3.6	Bandenintensitäten und Hydrolyseaktivitäten der KG11- EF_1 Komplexe	71
3.7	Bandenintensitäten und Aktivitäten zur Quervernetzungsbildung in KG11	72
3.8	Bandenintensitäten und Aktivitäten der Reduktion von quervernetztem KG11	73
3.9	Bandenintensitäten, Aktivitäten und Quervernetzungsausbeute des KG11- EF_1	75
3.10	Bandenintensitäten und Hydrolyseaktivitäten der MM25- EF_1 Komplexe	78
3.11	Bandenintensitäten und Aktivitäten zur Quervernetzungsbildung in MM25	78
3.12	Intensitäten und Aktivitäten der Reduktion von quervernetztem MM25	79
3.13	Bandenintensitäten, Aktivitäten und Quervernetzungsausbeute des MM25- EF_1	81
3.14	Bandenintensitäten und Hydrolyseaktivitäten der MM24- EF_1 Komplexe	83
3.15	Bandenintensitäten und Aktivitäten zur Quervernetzungsbildung in MM24	83
3.16	Intensitäten und Aktivitäten der Reduktion von quervernetztem MM24	85

3.17	Bandenintensitäten, Aktivitäten und Quervernetzungsausbeute des MM24- EF_1	86
3.18	ATP-Hydrolyseaktivitäten des KH7, KG11 und des MM24 bei 10-40°C	88
3.19	Aktivierungsenergien E_a des KG11, MM24 und des KH7 bei 20-35°C	90
3.20	Bezeichnung der EF_0F_1 -Konstrukte	91
3.21	Wachstum der EF_0F_1 -Mutanten und BWU13 auf Succinat-Agarplatten	94
3.22	Verdopplungszeiten und Ernteaussbeuten der EF_0F_1 -Mutanten und BWU13	94
3.23	ATPase-Aktivitäten und DCCD-Hemmung in Membranen von BWU13, KH7 und den EF_0F_1 -Mutanten	95
3.24	Proteinaussbeuten und Aktivitäten von EF_1 des BWU13, KH7, SE1 und SE3	96
3.25	Proteinaussbeuten und Aktivitäten der EF_0F_1 -Mutanten nach der Solubilisierung und der 1. Affinitätschromatographie	97
3.26	Proteinaussbeuten und Aktivitäten der EF_0F_1 -Mutanten nach der 2. Affinitätschromatographie	99
3.27	EF_0F_1 -Rotationsausbeute nach der 1. und 2. Affinitätschromatographie	100
4.1	Cystein-Doppelmutanten und die Distanzen zwischen den Aminosäuren	101
4.2	Zusammenfassung der Hydrolyseaktivitäten und Quervernetzungsausbeuten	103
4.3	Berechnung von η_{max} und a_{CL} des quervernetzten Enzyms	105
4.4	Bezeichnung der EF_0F_1 -Konstrukte	109

Abkürzungen

Für die Aminosäuren wurde der Ein- oder Dreibuchstabencode benutzt. Enzyme und Nukleotide wurden mit den üblichen Abkürzungen verwendet.

A_{xxx}	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm
4-AB	4-Aminobenzamidin
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
6-AHA	6-Aminohexansäure
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Biotin-PEAC ₅ -Maleimid	6- {N'-[2-(N-Maleimido)ethyl]-N-piperazinylamido} hexyl-D-biotinamid
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Da	Dalton (entspricht g/mol)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (<i>double-stranded</i> DNA)
DTNB	6,6'-Dinitro-3,3'-dithiodibenzoesäure
DTP	2,2'-Dithiodipyridin

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF _o	hydrophober, membranintegrierter Teilkomplex der <i>E. coli</i> ATP-Synthase
EF ₁	hydrophiler, katalytisch aktiver Teilkomplex der <i>E. coli</i> ATP-Synthase
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	Medium nach Luria-Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MM	Minimalmedium nach Tanaka
MW	Molmasse (<i>molecular weight</i>)
β-NADH	β-Nicotinamid-adenindinucleotid
n.b.	nicht bestimmt
NEM	N-Ethylmaleimid
Ni-NTA	Nickelnitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OG	Octyl-β-D-Glucopyranosid
ori	Replikationsstart (<i>origin of replication</i>)
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	Orthophosphat

PK	Pyruvat-Kinase
PSI	Einheit für den Druck (<i>pound per square inch</i> ; 1 PSI entspricht 0.0689 bar)
PTMR	Phalloidin-Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
red	reduziert
rep	Replikationsursprung
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ST	Streptactin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
t_d	Verdopplungszeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	2-{[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]amino}-ethansulfonsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u	Einheit enzymatischer Aktivität (<i>units</i> ; entspricht $\mu\text{mol}/\text{min}$)
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Einleitung

Adenosintriphosphat (ATP) ist die universelle Energiewährung der Zelle. Ein Mensch, der schwerer körperlicher Arbeit ausgesetzt ist, benötigt bis zu 0,5 kg ATP in der Minute. Bei der Hydrolyse von ATP entsteht durch Abspaltung des letzten Phosphatrestes Orthophosphat (P_i) und ADP. Die Freie Standard-Enthalpie (ΔG°) beträgt dabei $-30,5 \text{ kJmol}^{-1}$. Diese ATP-Hydrolyse treibt die mechanische Arbeit bei Bewegung, den aktiven Transport von Molekülen und Ionen und die Biosynthese von Makromolekülen aus einfachen Vorstufen an. Proteine, die zum Antrieb von Reaktionen ATP hydrolysieren, besitzen eine so genannte ATPase-Aktivität. Es gibt eine Vielzahl von ATPasen, die in den verschiedenen Membranen von Organismen lokalisiert sind.

Man unterscheidet drei Haupttypen, die F-, P-, und die V-ATPasen, deren mechanistische Unterschiede vor allem in der Vorzugsreaktion ATP-Synthese oder -Hydrolyse und in den transportierten Kationen, H^+ , Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} , liegen. Nur bei der F-ATPase handelt es sich um eine ATP-Synthase, die die notwendige ATP-Regeneration aus ADP und P_i übernimmt. Diese treibt die ATP-Synthese auf Kosten einer protonenmotorischen Kraft (pmf, proton motive force) an. Die indirekte Kopplung von primärer Protonenpumpe und ATP-Synthase (sekundäre Protonenpumpe) wurde von P. Mitchell als *chemiosmotische Theorie* postuliert (Mitchell, 1961).

1.1 F_0F_1 -ATP-Synthasen

Die Gruppe der F_0F_1 -ATP-Synthasen unterteilt sich nach ihrer Lokalisierung. Die F-ATP-Synthase in den Thylakoiden von Chloroplasten bezeichnet man als CF_0CF_1 , die der inneren Membran von Mitochondrien als MF_0MF_1 und die in der Plasmamembran von Bakterien (nach *Escherichia coli*) als EF_0EF_1 -ATP-Synthase. Durch die große Ähnlichkeit der einzelnen Klassen lassen sich Parallelen in Bezug auf Struktur und Funktion ziehen, obwohl wichtige Strukturbetrachtungen weitgehend auf der Röntgenstruktur des mitochondriellen Enzyms MF_0MF_1 basieren.

Die F_0F_1 -ATPasen sind in ihrer Struktur zweigeteilt und bestehen aus mindestens 8 verschiedenen Untereinheiten (Kap. 1.1.1). In die Membran eingelagert ist der F_0 -Teil, der die Funktion des Ionentransporters (Kap. 1.1.2.3) übernimmt. Der hydrophile Kopfteil (F_1) synthetisiert bzw. hydrolysiert ATP (Kap. 1.1.2.1) angetrieben durch eine Rotationsbewegung (Kap. 1.1.2.2). Verbunden werden beide Teile durch einen äußeren Stiel (stalk).

1.1.1 Struktur der EF_0EF_1 -ATP-Synthase

Die EF_0EF_1 -ATP-Synthase aus *E. coli* stellt mit nur 8 verschiedenen Untereinheiten, $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\varepsilon$ für F_1 und ab_2c_{10-14} für den F_0 -Teil, eine der strukturell einfachsten Formen der F-ATP-Synthasen dar (Foster & Fillingame, 1982; Fillingame et al., 1998; Jones & Fillingame, 1998).

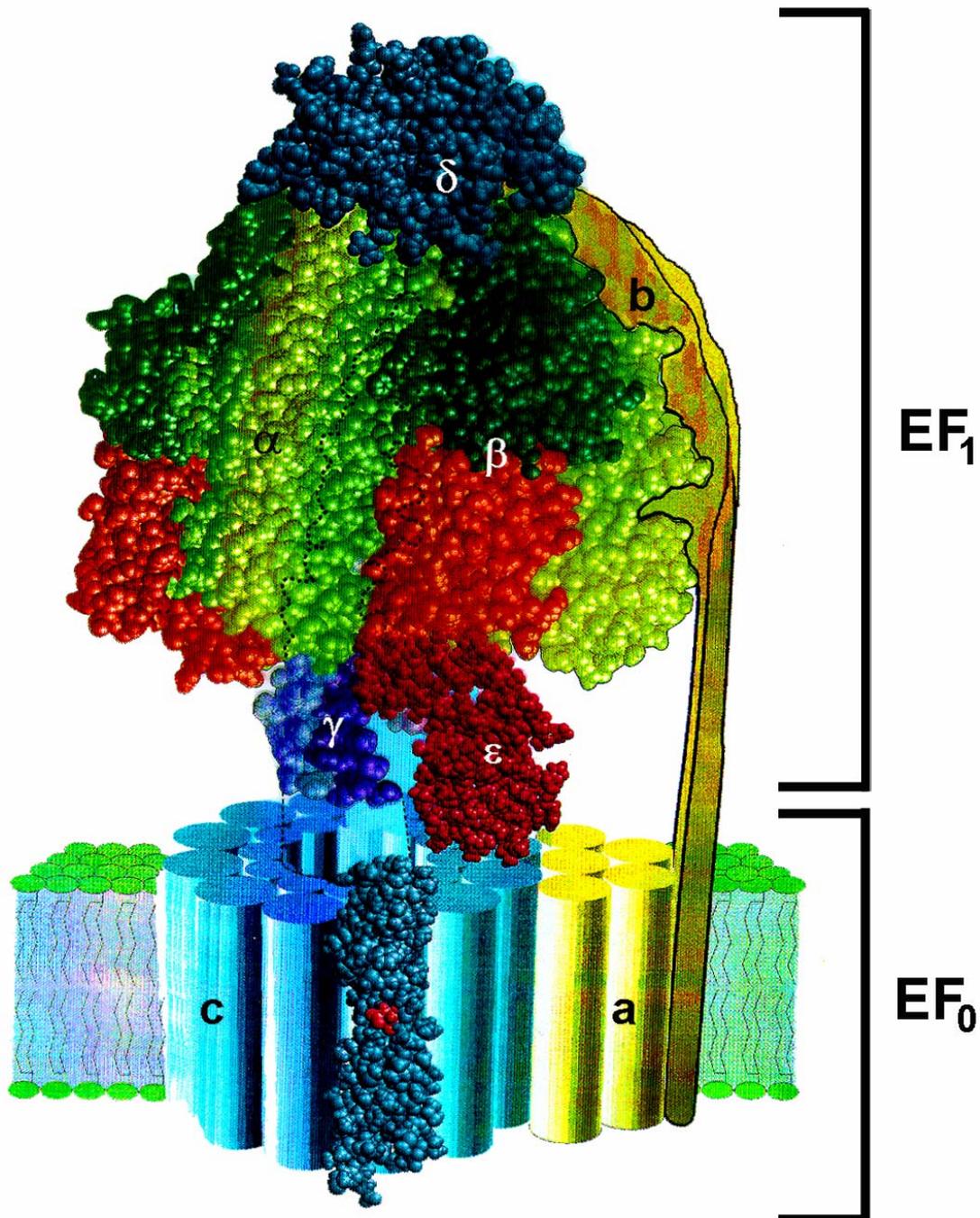


Abb. 1.1: Modell der EF_0EF_1 -ATP-Synthase mit seinen 8 Untereinheiten. Das gesamte Protein, bestehend aus dem EF_1 ($(\alpha\beta)_3\gamma\delta\varepsilon$) und dem EF_0 (ab_2c_{10-14}), besitzt eine Abmessung von ca. 10x13 nm (Breite x Höhe).

Die Untereinheiten sind durch ein einziges Operon codiert, wobei neben den 8 Genen ein neuntes Gen (*atpI*) mit unbekannter Funktion existiert. Die Abbildung 1.1 zeigt ein Modell der EF_0EF_1 -ATP-Synthase, wobei die Molmassen der einzelnen Untereinheiten in Tabelle 1.1 angegeben sind.

Tab. 1.1: Molmassen* der verschiedenen Untereinheiten von EF_0EF_1 -ATP-Synthasen

Untereinheit	F ₀ -Teil			F ₁ -Teil				
	a	b	c	α	β	γ	δ	ϵ
Molmasse in kDa	30,3	17,3	8,3	55,3	50,2	31,4	19,6	14,9

* Die Molmassen sind Senior & Wise, 1983 entnommen.

Der membranständige EF_0 -Teil (160 kDa) besteht aus den drei Untereinheiten a, b und c. Die c-Domäne ist ein zyklischer Ring aus N identischen Untereinheiten. Veröffentlichte Werte von N bewegen sich zwischen 10 bis 14 Kopien, wobei D. Stock (Stock et al., 1999) 10 in Hefe, W. Jiang (Jiang et al., 2001) 10 in *E. coli*, J. Vonck (Vonck et al., 2002) 11 in der Na^+ -ATP-Synthase aus *Ilyobacter tartaricus* und H. Seelert (Seelert et al., 2000) 14 Kopien in Chloroplasten gefunden haben. Jede Kopie dieser hydrophoben Untereinheiten besteht aus zwei α -Helices, die eine Haarnadelstruktur in der Membran bilden. Die beiden anderen Untereinheiten a und b sind asymmetrisch außerhalb des c-Ring angeordnet, wobei a durch fünf transmembrane Helices in die Lipiddoppelschicht eingebettet ist (Valiyaveetil und Fillingame, 1998; Dmitriev et al., 2004). Die zwei b-Untereinheiten, die als Dimer vorliegen, bestehen jeweils aus einer α -Helix und verbinden den Kopfteil F_1 über Anlagerung an β und δ mit dem Membranteil F_0 (Dunn et al., 2000; Del Rizzo et al., 2002). Das Problem bei der strukturellen Aufklärung des Membranteils der ATP-Synthasen liegt in seiner lipophilen Eigenschaft begründet.

Im Gegensatz zum F_0 -Teil besitzt der Kopfteil F_1 (380 kDa) der F-ATP-Synthasen bei allen Gruppierungen (Chloroplasten, Mitochondrien, Bakterien) eine sehr ähnliche Struktur. Die 5 verschiedenen Untereinheiten liegen in der bereits erwähnten Stöchiometrie von $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\epsilon$ vor. Der Kopf besitzt eine maximale Höhe von 90 Å und eine Breite von 110 Å. Die Kristallstruktur des $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Teils der mitochondrialen F-ATP-Synthasen aus Rinderherzen wurde erstmals 1994 von der Arbeitsgruppe um J. E. Walker (Abrahams et al., 1994) in einer Auflösung von 2.8 Å aufgeklärt und einige Jahre später verfeinert (Gibbons et al., 2000; Rodgers und Wilce, 2000). Sie zeigt ein Hexagon aus je drei alternierend angeordneten α - und β -Untereinheiten, in dessen Mitte sich die γ -Untereinheit befindet. Die Sequenzhomologie bei den unterschiedlichen Spezies beträgt 20%. Jede der 6 Untereinheiten α und β trägt eine Nucleotidbindungsstelle (Wise et al., 1983), wobei jedoch nur die Bindungsstellen auf der β -Untereinheit katalytisch aktiv sind (Kap. 1.1.2.1). Die γ -Untereinheit

besteht aus zwei α -Helices, deren C-Terminus (90 Å lang) in der Mitte des Hexamers liegt und dessen N-terminales Ende den c-Ring berührt. Die beiden kleinen Untereinheiten δ und ϵ sind asymmetrisch angeordnet. Die ϵ -Untereinheit ist am N-terminalen Ende von γ lokalisiert (Rodgers und Wilce, 2000; Hausrath et al., 2001), die δ -Untereinheit ist dagegen an das $(\alpha\beta)_3$ -Hexagon angelagert (Häsler et al., 1999; Wilkens et al., 2000) und stellt die letzte Untereinheit dar, deren Struktur noch unbekannt ist. Sie trägt vermutlich zur Stabilität der Kopplung von b an β bei.

1.1.2 Funktion der EF_0EF_1 -ATP-Synthase

Die EF_0EF_1 -ATP-Synthase unterteilt sich strukturell in zwei Teile, den F_0 - und den F_1 -Teil. Funktionell kombiniert sind ebenso zwei Mechanismen in der ATP-Synthase, die Synthese von ATP im F_1 -Teil (*binding change* Mechanismus) und der Transport von Protonen durch den F_0 -Teil (Protonentranslokation). Die Kopplung der beiden Funktionen erfolgt durch die Rotation vom F_1 -Komplex relativ zum F_0 -Komplex (Rotation), wobei man entsprechend der Blickrichtung einen Teil als Rotor und den anderen als Stator bezeichnet. Darüber hinaus ist aber auch eine Einteilung in „Motor“ und „Generator“ möglich. Kommt es im F_1 -Kopf zur Energiefreisetzung durch die Hydrolyse von ATP, so wird die als Welle fungierende γ Untereinheit zur Rotation angetrieben und im F_0 -Fuß Protonen gegen einen Konzentrationsgradienten gepumpt. In ATP-Synthese Richtung übernimmt der c-Ring die Funktion des „Motors“, wobei die elektrochemische Energie eines transmembranen Protonen-Konzentrationsgradienten in mechanische Energie der γ -Rotation umgewandelt wird, durch die es zur ATP Bildung kommt.

1.1.2.1 *binding change* Mechanismus

Die 6 Nucleotidbindungsstellen auf den beiden Untereinheiten α und β des F_1 -Kopfs unterscheiden sich durch ihre katalytischen (auf der β -Untereinheit) und nicht-katalytischen (auf der α -Untereinheit) Eigenschaften (Weber & Senior, 1996). Dieser Unterschied beruht auf der Geschwindigkeit, mit der Nucleotide an der Bindungsstelle ausgetauscht werden. Die Bindungsplätze auf der β -Untereinheit sind vom umgebenden Medium leicht zugänglich, was auf einen schnellen Nucleotidaustausch schließen lässt. Im Gegensatz dazu ist die Bindung in der α -Bindungstasche mit der Ausbildung vieler Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Die dadurch feste Kopplung verlangsamt den Nucleotidaustausch (Abrahams et al., 1994). Unter der Bezeichnung *binding change* Mechanismus fasste P. D. Boyer (Boyer und Kohlbrenner, 1981; Boyer, 1997) einen ATP-Zyklus zusammen, der die Kooperativität von mehreren Bindungsstellen erklärte. Diese Konformationsänderung beruht auf einer direkten Kopplung mit der Rotation von γ (Kap. 1.1.2.2). Abbildung 1.2 zeigt die ATP-Synthese gemäß des modifizierten *binding change* Mechanismus (Pänke & Rumberg, 1999; Weber & Senior, 2000).

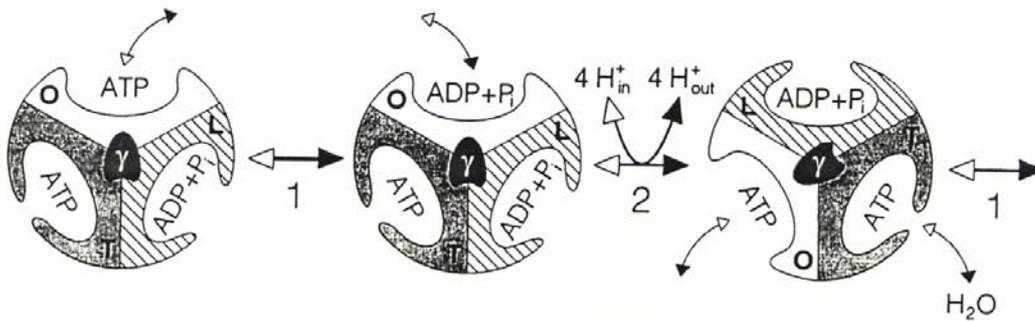


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des *binding change* Mechanismus nach O. Pänke (Pänke & Rumberg, 1999). Die Bezeichnungen O, L und T stehen für die Spezifität der Substratbindung (Erklärung im Text).

Bei diesem Mechanismus sind alle Bindungsstellen gleichberechtigt, liegen jedoch in drei verschiedenen Konformationen vor. Diese werden aufgrund ihrer Substratbindung als O (*open*), L (*loose binding*) und T (*tight binding*) bezeichnet. In der O-Konformation binden ADP und P_i reversibel in der Bindungstasche, wohingegen in der geschlossenen T-Konformation das Substrat fest gebunden ist. Eine Zwischenstufe ist der Zustand L, in dem eine lockere Substratbindung gegeben ist. Nach Bindung von ADP und P_i kommt es zu einer Konformationsänderung aller Bindungsplätze in den nächsten Zustand ($O \rightarrow L$, $L \rightarrow T$, $T \rightarrow O$), der durch die γ -Rotation angetrieben wird. Durch die Änderung in den O-Zustand kann das im T-Zustand spontan gebildete ATP leicht abdissoziieren. Bei einer dreimaligen Wiederholung dieses Zyklusses hat jede Bindungsstelle alle Zustände durchlaufen, wobei drei ATP-Moleküle entstanden sind.

1.1.2.2 Rotation

Ausgehend von der Kristallstruktur des EF_1 von der Arbeitsgruppe Walker (Abrahams et al., 1994) und dem *binding change* Mechanismus war die Rotation von γ als Verbindung zwischen Protonentransport und Synthese wahrscheinlich.

Der Nachweis dieser γ -Rotation relativ zum $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon erfolgte unter Beobachtung der Hydrolyserichtung von drei Arbeitsgruppen. R. Cross und seine Mitarbeiter führten Quervernetzungsexperimente durch, die auf die Rotation schließen ließen (Duncan et al., 1995a; Cross und Duncan, 1996). Dabei wurde durch Oxidation eine Disulfidbrücke zwischen β und γ über zwei Cysteine ($\beta C380$ und $\gamma C109$) gebildet. Die beiden Partner des Heterodimers wurden radioaktiv markiert und die Brücke wieder reduziert, um zu untersuchen, ob bei einem aktivem Enzym die gleichen oder andere Paarungen gebildet wurden (Abb. 1.3 A). Nur nach erfolgter ATP-Hydrolyse konnten neue Paarungen beobachtet werden, was auf eine Drehung hinwies. Einen weiteren Nachweis lieferte die Arbeitsgruppe von W. Junge mit Hilfe der spektroskopischen Sonde Eosin unter Benutzung von PARAP (polarized absorption relaxation after photobleaching) (Sabbert et al., 1997). Nach

Ankopplung der Sonde an den C-Terminus von γ konnte die Rotation durch Absorptionmessungen mit polarisiertem Licht zeitlich aufgelöst werden (Abb. 1.3 B).

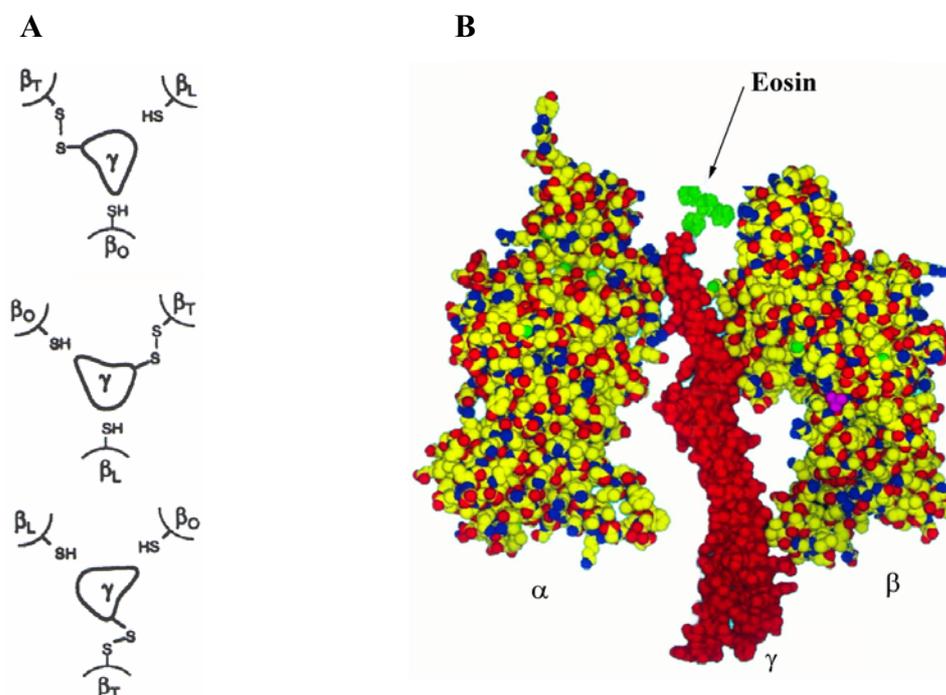


Abb. 1.3: A: Schematische Darstellung des Quervernetzungsversuches von Cross & Duncan, 1996; B: Rotationsnachweis durch Absorptionsspektroskopie. Darstellung der Sondenanlagerung (Eosin) am C-Terminus von γ nach Sabbert et al., 1997

Der dritte experimentelle Ansatz machte die Rotation mit Hilfe der Fluoreszenzvideographie sichtbar. Die Gruppe um M. Yoshida und K. Kinosita (Noji et al., 1997) koppelte den F_1 -Teil über His-tags an eine Glasoberfläche und konnte dann durch eine Bindung eines fluoreszenzmarkierten F-Aktinfilaments an das Ende von γ (über ein Cystein) die Drehung des selbigen gegen den Uhrzeigersinn, von der Membran aus betrachtet, beobachten (Aufbau vergleichbar mit Abb. 2.8). Es folgten weitere Rotationsmessungen mit F_1 von anderen Arbeitsgruppen, die diese Ergebnisse bestätigten (Omote et al., 1999; Noji et al., 1999). Bei einer Gliederung der ATP-Synthase aufgrund ihrer Funktion in Rotor und Stator wird der Stator durch die Untereinheiten a_2b_3 gebildet und der Rotor dementsprechend aus $c_{10-14}\epsilon$. Neuere Rotationsmessungen, bei denen die gesamten EF_0EF_1 -ATP-Synthase auf der Oberfläche immobilisiert wurde, zeigten dass der c-Ring an der Rotation beteiligt ist (Sambongi et al., 1999; Pänke et al., 2000; Tanabe et al., 2001). Die Abbildung 1.4 stellt den Aufbau der EF_0EF_1 -Rotationsmessungen aus Pänke et al. 2000 dar. Die Spezifität dieser Kopplungskette wird durch die spezifischen Bindungspartner ermöglicht. Dadurch, dass die Untereinheiten a und b nicht direkt mit c verbunden sind, könnte diese in dem Versuchsaufbau eventuell strukturell „verzerrt“ vorliegen bzw. abklappen (Tsunoda et al., 2000; Tsunoda et al., 2001).

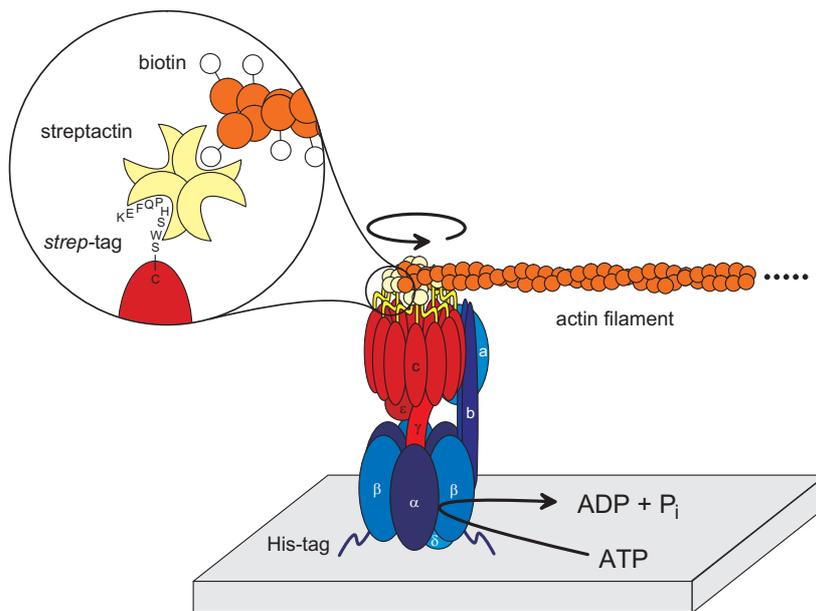


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der Kopplungskette mit dem gesamten EF₀EF₁-Komplex. Der rotierende F₁-Teil (Rotor) ist rot und der Stator blau markiert. (nach (Pänke et al., 2000))

Weitere Fluoreszenzvideographieveruche unter ATP-Limitierung zeigten den drei-Schritt-Mechanismus nach P. D. Boyer (Kap. 1.1.2.1), die Rotation um je 120° (Yasuda et al., 1998), unterstützt von Einzelfärbstoffuntersuchungen unter ATP-Sättigung (Häsler et al., 1998; Adachi et al., 2000). Dieses deutet auf eine Konformationsänderung der drei katalytischen Bindungsplätze in β hin, die durch γ hervorgerufen wird. Weitere Erkenntnisse von der Arbeitsgruppe um M. Yoshida und K. Kinosita (Yasuda et al., 2001) konnten jedoch noch eine weitere Unterteilung der 120° Rotationsschritte in einen 90° und einen 30° Schritt erkennen. Es wird vermutet, dass diese Unterteilung bei der Hydrolyse, durch die ATP-Bindung (90°) und die ADP-Freigabe (30°) hervorgerufen wird. Diese Unterteilung wurde später auf eine 80° und eine 40° Drehung korrigiert (Shimabukuro et al., 2003). Alle diese Experimente betrachteten die Rotation unter ATP-Hydrolyse, der Nachweis der Rotation unter ATP-Synthese Bedingungen konnte durch FRET-Messungen (fluorescence resonance energy transfer) an Liposomen mit eingebetteten EF₀F₁-Komplexen gezeigt werden (Diez et al., 2004). In einem weiteren Experiment konnte die Rotationsumkehr an F₁-Komplexen mit immobilisierten magnetischen Kügelchen durch die Bildung von ATP aus ADP und P_i nachgewiesen werden (Itoh et al., 2004).

1.1.2.3 Protonentranslokation

Der membranständige F₀-Teil der EF₀EF₁-ATP-Synthasen transportiert Protonen durch die Kopplungsmembran. Diese Protonenleitfähigkeit erzeugt eine Drehbewegung von γ (Rotation, Kap. 1.1.2.2), so dass ATP gebildet werden kann (Kap. 1.1.2.1). Nach einem Modell von W. Junge (Junge et al., 1997; Junge, 1999b) kommt es bei dem Transport von Protonen zu einer

Rotation des c-Ringes relativ zur a-Untereinheit (Abb. 1.5). Die daran beteiligte c-Untereinheit besitzt eine essentielle Aminosäure Asp⁶¹, die jeweils in der Mitte der Membran lokalisiert ist. Durch Wechselwirkung mit der Untereinheit a wird die Bindung der Protonen aus dem Inneren an diese deprotonierte Aminosäure erleichtert. Mit der Protonierung der Aminosäure kommt es an einem anderen Asp⁶¹, das seinerseits protoniert vorliegt und mit aR210 in Wechselwirkung steht, zu einer Protonenabspaltung. Diese Reaktionskopplung von Protonierung und Deprotonierung ermöglicht die Drehung des Ringes um eine Untereinheit und lässt c gegen a rotieren. (Junge et al., 1997; Jones, 2001; Weber und Senior, 2003).

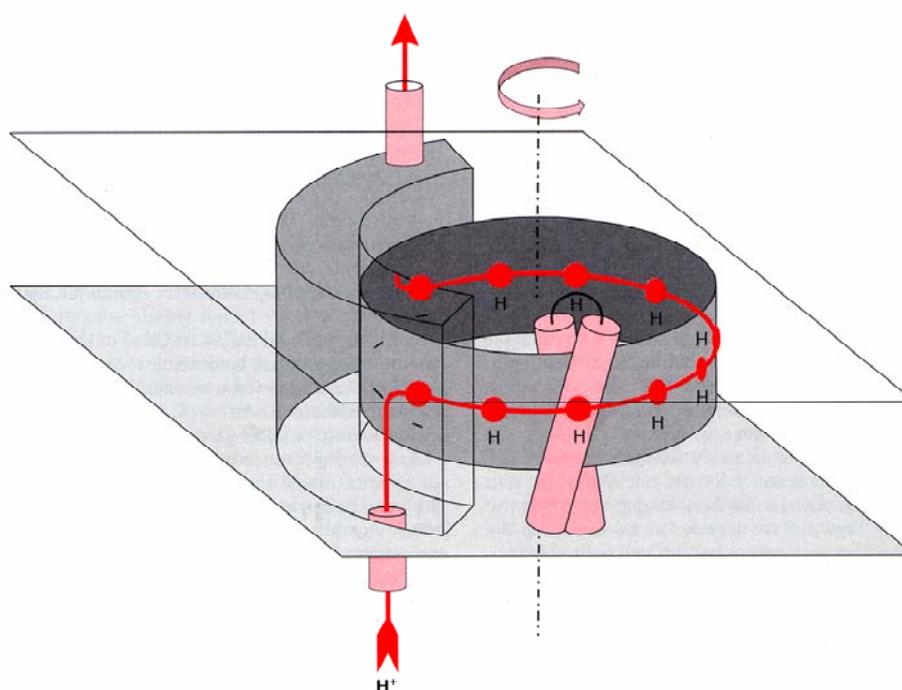


Abb. 1.5: Modell des Protonentransports durch die Membran und die daraus entstehende Drehbewegung nach (Junge et al. 1997).

Bei einer Drehung um 360° entspricht die Anzahl der transportierten Protonen der Anzahl der c-Untereinheiten. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich ebenfalls das Kopplungsverhältnis für H⁺ zu ATP. Bei einem 12 Untereinheiten enthaltenden c-Ring und einer ATP-Synthese in drei Schritten liegt damit das Kopplungsverhältnis bei 4. Bei einer variierenden Anzahl an c-Untereinheiten bedarf die Übersetzung eines elastischen Elements, das diese ausgleicht (Cherepanov et al., 1999; Cherepanov & Junge, 2001; Pänke et al. 2001). Die Untereinheit γ könnte sich dabei wie ein Gummiband aufdrehen (Transport von Protonen) und die Rotation durch das Lösen eines Endes erfolgen, wobei ein Zyklus durchlaufen und 3 ATP gebildet werden.

1.1.3 Kovalente Quervernetzungen von Rotor und Stator

Nach Kenntnis der Struktur von F-ATPasen lassen gezielte kovalente Quervernetzungen von Untereinheiten durch Einführung von Cystin (-C-S-S-C) Rückschlüsse auf die Funktion zu. Mit Hilfe von Punktmutagenese werden zwei Cysteinreste in die Primärstruktur eingebaut, die im späteren assemblierten Enzymkomplex durch Oxidation eine Disulfidbrücke ausbilden können. Bei einer Vernetzung von Rotor und Stator sollte die Ausbildung einer Disulfidbrücke die Rotation und damit auch die katalytische Aktivität des Enzyms beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Verbindung von γ mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon zur Inaktivierung des Enzyms führt (Aggeler et al., 1995; Duncan et al., 1995a; Gumbiowski et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnte von M. Müller und K. Gumbiowski gezeigt werden, dass eine Disulfidbrücke durch Punktmutation und Oxidation in Position $\gamma_{A285C} \leftrightarrow \alpha_{P280C}$ weder eine Hemmung der ATPase-Aktivität noch der Rotation zur Folge hatte (Müller, 2004; Gumbiowski et al., 2001). Abgesehen von dieser Quervernetzung am C-terminalen Ende von γ zeigte die Ausbildung von zwei anderen Disulfidbrücken, zum einen im mittleren, zum anderen im unteren Bereich von γ ($\alpha_{A334C}/\gamma_{L262C}$ bzw. $\beta_{D380C}/\gamma_{C87}$) wie erwartet die Inaktivität des Enzyms (Abb. 1.6).

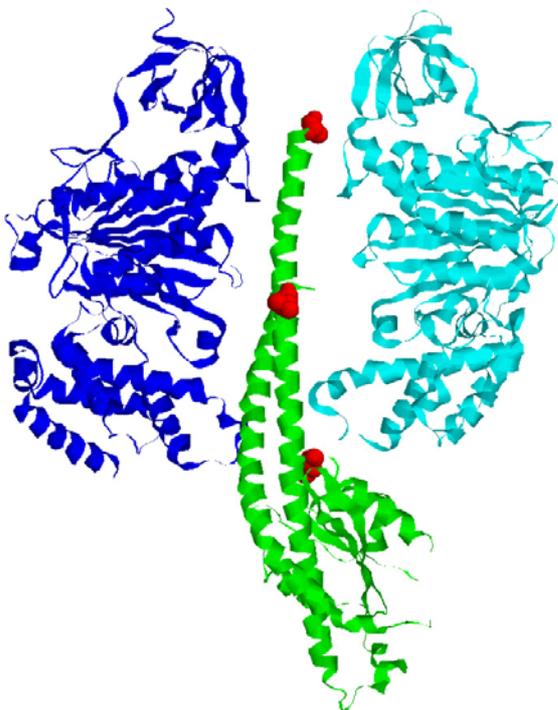


Abb. 1.6: Positionen der Cysteine auf γ innerhalb des EF₁-Komplexes nach Gumbiowski et al. 2001. Stellvertretend für das $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon ist in dunkelblau eine α -Untereinheit und in türkis eine β -Untereinheit dargestellt. Auf der grünen γ -Untereinheit sind in rot die Aminosäure-Positionen der Mutanten gezeigt. Die Positionen auf γ sind von oben nach unten: A285C, L262C und A87C.

Eine mögliche Erklärung der überraschenden Aktivität trotz Disulfidbrücke zwischen γ_{A285C} und α_{P280C} des so genannten MM10 könnte, bedingt durch Konformationsänderungen, eine Rotation um eine dann passend positionierten Einfachbindungen der Disulfidbrücke sein.

Eine andere Möglichkeit ist die Rotation des unteren Teils von γ durch den Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen in dessen α -helikalen Bereich.

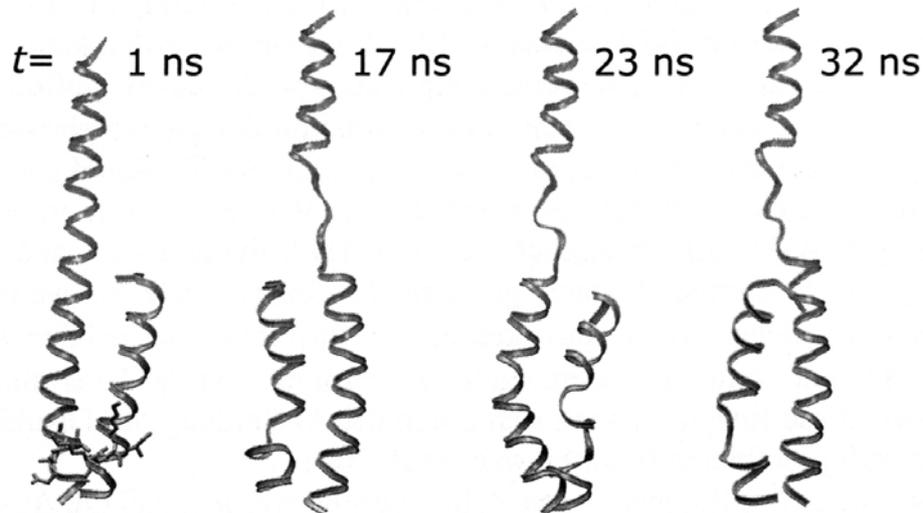


Abb. 1.7: Darstellung zur Aufwindung der C-terminalen α -Helix bei Rotation von γ (D. Cherepanov, unveröffentlicht). Das Modell zeigt einen Teil der γ -Untereinheit von MF_1 ($\gamma\text{A1-K24}$ und $\gamma\text{T230-L272}$) zu verschiedenen Zeiten der erzwungenen Rotation, beginnend zum Zeitpunkt $t = 1$ ns und endend mit der terminalen Äquilibration des Systems mit $t = 32$ ns. Die Zwischenschritte zeigen eine halbe und eine volle Umdrehung ($t = 17$ ns und $t = 23$ ns).

Diese postulierte Aufwindung konnte durch eine Computersimulation basierend auf den Strukturdaten von MF_1 gestützt werden (D. Cherepanov, unveröffentlicht; Abb. 1.7). Dabei wurden an einem 30 Aminosäuren umfassenden Modell des C-terminalen Bereichs von γ die Quervernetzungsposition (Ala285) fixiert und dann auf 4 N-terminale Aminosäurereste ein Drehmoment von 56 pN nm ausgeübt. Die Modellrechnungen deuten darauf hin, dass sich der „aufgewundene“ Bereich von $\gamma\text{T253-V257}$ erstreckt. Übertragen auf das $\text{EF}_1\text{-}\gamma$ entspricht dieser Teil dem Bereich $\gamma\text{A267 bis S271}$ (Miki et al., 1988). Durch weitere Cystein-Doppelmutanten im Zentrum des $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Komplexes wurde im Rahmen dieser Arbeit der Frage, ob der EF_1 -Komplex in der Lage ist, die Rotation durch einen Bruch in der α -Helix und der damit verbundenen Überwindung der Ramachandran-Barriere aufrechtzuerhalten, genauer auf den Grund gegangen.

1.1.4 Rotation unter ATP Synthesebedingungen

Neben der Betrachtung der Rotation in ATP-Hydrolyserichtung ist der Rotationsnachweis unter Synthesebedingungen, angetrieben durch eine elektrische Potentialdifferenz, trotz der neuesten Ergebnisse weiterhin von Interesse. Bislang konnte diese nur indirekt durch FRET-Messungen an Proteoliposomen gezeigt werden (Diez et al., 2004). Für eine direkte Messung

durch Visualisierung der Rotation unter ATP Synthese im Einzelmolekülnachweis (Abb. 1.8) benötigt man neben der notwendigen Energetisierung vor allem ein stabiles, membranintegriertes EF_0F_1 -Konstrukt.

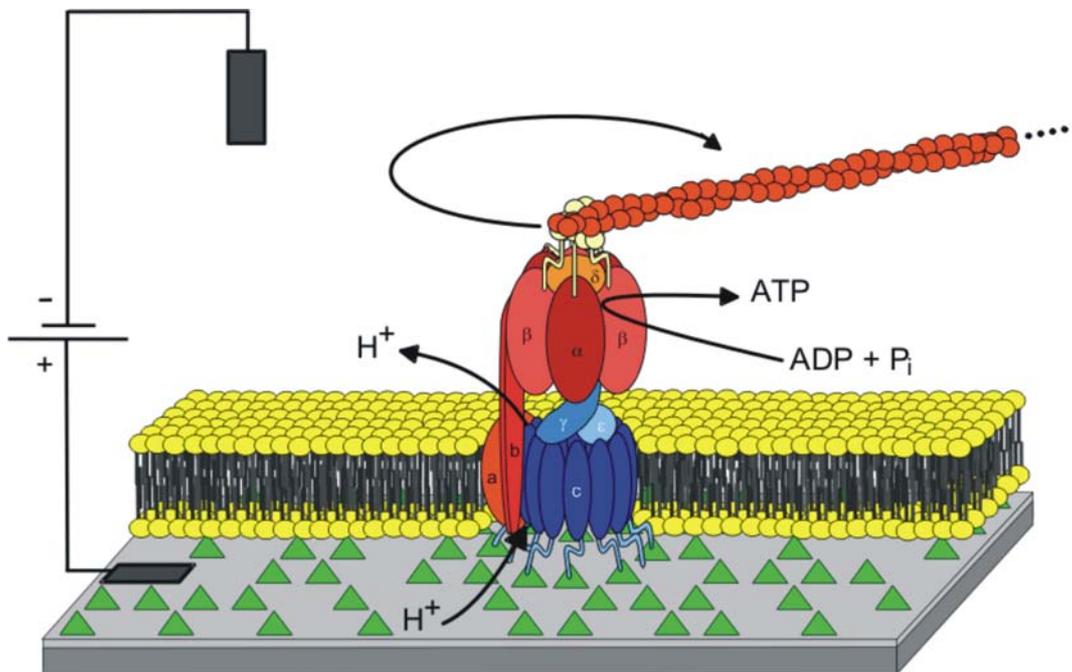


Abb. 1.8: Schematische Darstellung eines möglichen experimentellen Aufbaus der Kopplungskette von membranintegrierten EF_0F_1 -Komplexen. Der rotierende F_1 -Teil (Rotor) ist rot und der Stator blau in der gelben Lipidschicht dargestellt. Die Immobilisierung auf der ITO-beschichteten Glasoberfläche erfolgt über Ni-NTA (grüne Dreiecke).

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Hydrolyserotation von EF_0F_1 -Komplexen, sowohl in isolierter Form (Abb. 1.4; Pänke et al., 2000), als auch in Lipidmembranen eingebettet (Nishio et al., 2002), lag das Hautaugenmerk im zweiten Teil dieser Arbeit auf dem ersten Schritt zur Ermöglichung des optischen Nachweises der Rotation unter ATP-Synthese, der Mutagenese eines geeigneten EF_0F_1 -Konstruktes.

1.2 Aufgabenstellung

Ziele dieser Arbeit waren:

(a) Die Konstruktion von EF_1 -Mutanten, die durch Schließen einer künstlich eingeführten Disulfidbrücke zwischen α und γ im Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons nicht in ihrer ATPase-Aktivität gehemmt sind. Die qualitativen und quantitativen Untersuchungen der

Quervernetzungsparameter dienen der Weiterentwicklung der von Gumbiowski et al., 2001 gewonnenen Erkenntnisse über die molekulare Rotoreinheit γ .

(b) Die Mutagenese von EF_0F_1 -Komplexen, die den optischen Nachweis der Relativrotation unter Synthesebedingungen durch eine Fixierung des Stators F_0 auf der Oberfläche ermöglichen. Im Vordergrund sollte dabei, neben der Funktionalität, die Optimierung der Isolierung im Hinblick auf Ausbeute und Stabilität der gereinigten EF_0F_1 -Konstrukte stehen.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Nicht aufgeführte Reagenzien wurden in der höchsten kommerziell erhältlichen Reinheitsstufe bezogen (Roth, Sigma-Aldrich, Biomol, Riedel de Haën).

ADP	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Ampicillin	Biomol (Hamburg)
ATP	Roche Diagnostics (Mannheim)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)

Molekularbiologie

DH5α-Zellen	Invitrogen (Karlsruhe)
pBluescript II SK (+) Vektor	Stratagene (Heidelberg)
pSTBlue-1 Vektor	Novagen (Madison, WI, USA)
Kaseinhydrolysat, Hefeextrakt, Agar	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
„High Pure Plasmid Isolation Kit“	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas (Heidelberg)
peqGold Universal Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lambda DNA/PstI Marker, 24	MBI Fermentas (Heidelberg)
1 kb DNA-Leiter, 6x Beladungspuffer	Peqlab (Erlangen)
„QIAquick Gel Extraction Kit“	Qiagen (Hilden)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt/Main)

„Perfectly Blunt Cloning Kit“	Novagen (Madison, WI, USA)
PCR-Primer	MWG-Biotech (Ebersberg)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
dNTP	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
„ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“	Applied Biosystems (Darmstadt)

Biochemie

L-Isoleucin, L-Valin	Biomol (Hamburg)
L-Asparagin, Thymin, Thiamin, 4-AHA, 4AB	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
DTT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TSK-DEAE 650S Toyopearl	Tosoh Biosep (Stuttgart)
Gelfiltrationssäulen Nap-5, Nap-10, PD-10	Amersham Biosciences (Uppsala, SE)
Ni-NTA-Superflow	Qiagen (Hilden)
Imidazol	Biomol (Hamburg)
DTNB	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DTP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
NEM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Biotin-PEAC ₅ -maleimid	Dojindo Laboratories (Kumamoto, JP)
Octyl- β -D-Glucopyranosid	Fluka (Buchs, CH)
n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Streptactin-Sepharose	IBA (Göttingen)
Avidin, Destiobiotin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Sigma-Marker Low Range (6,5-66 kDa)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
8-25 % SDS-Gele	Amersham Biosciences (Uppsala, SE)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37.5:1)	BioRad (München)
Formaldehydlösung	Riedel de Haën (Seelze)
Amoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TEMED	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Serva-Blau G-250, Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brilliantblau R-250 /	Roth (Karlsruhe)
PVDF Membran	Roche Diagnostics (Mannheim)
Watman-Papiere	Schleicher & Schuell (Dassel)
Primäre Maus-Antikörper	Von der Arbeitsgruppe Altendorf (Mikrobiologie, Universität Osnabrück)
„Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit, (Mouse/Rabbit)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences (Uppsala, SE)
Anti-Mouse IgG - Alkalische Phosphatase	Pierce (Rockford, IL, USA)
Phalloidin-Tetramethylrhodamin-B- Isothiocyanat (PTMR)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Lactat-Dehydrogenase (Typ XI, Rabbit)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
β -NADH	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphoenolpyruvat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pyruvat-Kinase (Typ III, Rabbit Muscle)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Biophysik

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ni-NTA-Meerrettich-Peroxidase Konjugat (Ni-NTA-HRP)	Qiagen (Hilden)
Streptavidin	MB Biomedicals (Eschwege)
Streptactin	IBA (Göttingen)
Katalase	Fluka (Buchs, CH)
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.2 Medien, Puffer und Lösungen

Medien

LB-Medium	5 g Kaseinhydrolysat; 2,5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 2 mM NaOH; ad 500 ml ddH ₂ O
Minimalmedium	34 mM KH ₂ PO ₄ ; 64 mM K ₂ HPO ₄ ; 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1 μM FeSO ₄ ; 1 μM ZnCl ₂ ; 10 μM CaCl ₂ ; 0,3 mM MgSO ₄ ; 2 μg/ml Thiamin; 50 μg/ml L-Isoleucin; 50 μg/ml L-Valin; 50 μg/ml Thymin; 50 μg/ml L-Asparagin; 0,5 % (v/v) Glycerin; 100 μg/ml Ampicillin
SOB-Medium	2 g Kaseinhydrolysat; 0,55 g Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM KCl; ad 100 ml ddH ₂ O; autoklavieren
SOC-Medium	10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; ad 100 ml SOB-Medium; sterilfiltrieren
Succinat-Medium	34 mM KH ₂ PO ₄ ; 64 mM K ₂ HPO ₄ ; 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1 μM FeSO ₄ ; 1 μM ZnCl ₂ ; 10 μM CaCl ₂ ; 0,3 mM MgSO ₄ ; 2 μg/ml Thiamin; 50 μg/ml L-Isoleucin; 50 μg/ml L-Valin; 50 μg/ml Thymin; 50 μg/ml L-Asparagin; 0,4 % (w/v) Natriumsuccinat
Agarplatten	7,5 g Agar; 500 ml LB- oder Succinat-Medium

Puffer

10x TBE	1 M TRIS/ Borsäure (pH 8.3); 0,9 M Borsäure; 10 mM EDTA
NaAc-Puffer	3 M NaAc/HAc (pH 5.2)
Elutionspuffer	10 mM TRIS/ HCl (pH 8.5)
Puffer1	100 mM TES/NaOH (pH 7.0); 40 mM 6-AHA; 6 mM 4-AB; 20 mM Magnesiumacetat; 0,25 mM EGTA; 10 % (v/v) Glycerin
Puffer2	50 mM TES/NaOH (pH 7.0); 40 mM 6-AHA; 6 mM 4-AB; 5 % (v/v) Glycerin
Puffer3	5 mM TES/NaOH (pH 7.0); 40 mM 6-AHA; 6 mM 4-AB; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM DTT
Puffer4	5 mM TES/NaOH (pH 7.0); 40 mM 6-AHA; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM DTT

PufferA	50 mM TRIS/ H ₂ SO ₄ (pH 7.8); 10 % (v/v) Methanol
PufferB	50 mM TRIS/ H ₂ SO ₄ (pH 7.8); 0,5 M Na ₂ SO ₄ ; 10 % (v/v) Methanol
KG-Puffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerin
Ni-Elutionspuffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerin; 150 mM Imidazol
Ni-Waschpuffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerin; 20 mM Imidazol
EF ₀ F ₁ -Waschpuffer	5 mM TRIS/HCl (pH 8.0); 10 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EGTA; 10 % (v/v) Glycerin
Lagerungspuffer	5 mM TRIS/HCl (pH 8.0); 10 mM MgCl ₂ ; 70 mM KCl; 20 % (v/v) Glycerin
PufferJ1	50 mM TRIS/HCl (pH 8.0); 2 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin; 1mM DTT
Extraktionspuffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 1 mM ADP; 1,8 mM MgCl ₂ ; 8,5 % (v/v) Glycerin
NickelA	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 2 mM MgCl ₂ ; 20 mM Imidazol; 10 % (v/v) Glycerin
NickelB	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 2 mM MgCl ₂ ; 150 mM Imidazol; 10 % (v/v) Glycerin
StrepA	20 mM TES/NaOH (pH 7.0); 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM ADP; 15 % (v/v) Glycerin
StrepB	20 mM TES/NaOH (pH 7.0); 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM ADP; 15 % (v/v) Glycerin; 2,5 mM Destiobiotin
PufferPP	100 mM TRIS/HCl (pH 8.0); 2 % (w/v) SDS; 12,5 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 1 mM EDTA
PufferPP+	100 mM TRIS/HCl (pH 8.0); 2 % (w/v) SDS; 12,5 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 1 mM EDTA; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol
SDS-Probenpuffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.6); 1 M Harnstoff; 1,6 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 12,5 % (v/v) Glycerin; 0,0013 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl (pH 8.8)
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl (pH 6.8)

SDS-Laufpuffer	30 g/l Harnstoff; 3 g/l TRIS; 14,4 g/l Glycin; 10 ml 10 %ige SDS
Transferpuffer	10 mM NaHCO ₃ ; 3 mM Na ₂ CO ₃ ; 20 % (v/v) Methanol
Blockpuffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.4); 0,9 % (w/v) NaCl; 5 % (w/v) Magermilchpulver
Waschpuffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.4); 0,9 % (w/v) NaCl
MKM-Puffer	20 mM MOPS/KOH (pH 7.0); 50 mM KCl; 5 mM MgCl ₂
BMKM-Puffer	20 mM MOPS/KOH (pH 7.0); 50 mM KCl; 10 mg/ml BSA; 5 mM MgCl ₂
Puffer D	50 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerin; 10 mg/ml BSA; 1 % (w/v) Octyl-β-D-Glucopyranosid
PufferJ2	10 mM HEPES/NaOH (pH 7.8); 25 mM KCl; 6 mM MgCl ₂
PufferJ2+	10 mM HEPES/NaOH (pH 7.8); 25 mM KCl; 10 mg/ml BSA; 6 mM MgCl ₂

Lösungen

Coomassie-Färbereagenz	0,05% (w/v) Comassie Brilliantblau R-250; 50% (v/v) Methanol; 5% (v/v) HAc
Entfärber	25% (v/v) Methanol; 5% (v/v) HAc
Silber-Entwicklerlösung	400 mM NaAc/HAc (pH 6.0); 6,3 mM Na ₂ S ₂ O ₃ ; 30 % (v/v) Methanol
Silber-Färbereagenz A	5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ (pH 11.8)
Silber-Färbereagenz B	0,2 % (w/v) NH ₄ NO ₃ ; 0,2 % (w/v) AgNO ₃ ; 1 % (w/v) Wolframatokieselsäure; 1,4 % (v/v) 37 %ige Formaldehydlösung
Silber-Stopplösung	10 % (v/v) Glycerin; 5 % (v/v) HAc
S&G Farbreagenz	0,6% (w/v) Serva-Blau G-250; 3% Perchlorsäure
Testlösung (LeBel)	250 mM Tris/HCl pH 8; 15 mM MgCl ₂ ; 50 mM ATP Na ₂ · 3 H ₂ O/NaOH pH 7,0
Lösung A (LeBel)	4,6% (w/v) NaAc/HAc (pH 4.0); 0,25% (w/v) CuSO ₄
Lösung B (LeBel)	5% (w/v) (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
Lösung C (LeBel)	2% (w/v) C ₇ H ₉ NO · ½ H ₂ SO ₄ ; 5% (w/v) NaSO ₄

Molybdat-Reagenz	900 mM H ₂ SO ₄ ; 3,4 mM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ /NH ₃ (pH 6.0); 0,3 mM K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆
Ascorbat-Lösung	114 mM Ascorbinsäure; 10 µM KH ₂ PO ₄ ; 100 mM TRIS
Stop-Reagenz	25 mM TCA; 28 mM SDS
Arrhenius-Testlösung	25 mM TRIS/HCl (pH 7.5); 2 mM MgCl ₂ ; 25 mM KCl; 5 mM KCN; 2 mM PEP; 5 mM ATP; 0,35 mM β-NADH; 30 u/ml L-LDH; 30 u/ml PK
Reaktionslösung OSS	20 mM Glucose; 0,2 mM Glucoseoxidase; 5 mM ATP; 50µg/ml Katalase; 0,5 % β-Mercaptoethanol

2.3 Geräte

Äkta Explorer (FPLC-Anlage)	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Auflicht-Hellfeld-Fluoreszenzmikroskop IX70 mit Filtertubus U-MWIG mit Quecksilberlampe U-RFL-T 200 und Objektstischsteuerung MCL-3	Olympus (Hamburg) Lang (Hüttenberg)
Autoklaven HV-50	Wolf (Greisingen)
Bildprozessor ARGUS	Hamamatsu Photonics (Herrsching)
Blockthermostat Digi-Block	Laboratory Devices (Holliston, MA, USA)
Digitales Photodokumentationssystem mit Kamera Herolab EASY 429K und Transilluminator UVP M-20E (302 nm)	Herolab (Wiesloch) UVP (San Gabriel, CA, USA)
Fluo-Link TFL-20M (UV-Leuchttisch 312 nm)	Biometra (Göttingen)
French Pressure Cell Press „Thermo Spectronic“	Polytec (Waldbronn)
Gelelektrophoreseapparatur Horizon 11014 mit Spannungsquelle	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) Pharmacia Biotech (Freiburg)

Gelelektrophoresesystem „ <i>Mini-Trans Blot</i> “	BioRad (München)
Heißluftsterilisator	Heraeus (Hanau)
Homogenisator RZR 1	Heidolph (Schwabach)
Kamera Hamamatsu C 2400-08 mit Kamera-Kontrolleinheit C 2400 und Bildverstärker VS4-1845	Hamamatsu Photonics (Herrsching) Videoscope International (Sterling, VA, USA)
Konica SRX-101A	Konica (Hamburg)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle	Siemens (München)
Phast-Gel System	Pharmacia Biotech (Freiburg)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Dülmen)
Reinstwasseranlage Milli-Q académic	Millipore (Eichborn)
Rotationsinkubator Modell TC-7	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Schlauchpumpe EasyLoad Masterflex XX80 ELO 05	Millipore (Bedford, MA, USA)
Schüttelinkubator Gio Gyrotory Shaker	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Spektralphotometer HP 8453 E	Hewlett Packard (Böblingen)
Spektralphotometer Hitachi U-3000 mit Kühlthermostat Lauda RC6 CP	Hitachi (Krefeld) Lauda (Lauda-Königshofen)
Transfertank 2005 <i>Transphor Electroblotting Unit</i>	LKB Bromma (Bromma, SE)
VHS-Videorekorder NV-HS950	Panasonic (Hamburg)
Waage Mettler Toledo AG 285	Mettler Toledo (Greifensee, CH)
Waage Sartorius BL 1500 S	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad Haake W13 mit Thermostat Haake D2	Thermos Haake (Karlsruhe)
Wasserbad-Schüttelinkubator Type 1083	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Wippschüttler WS5	Edmund Bühler (Hechingen)

Kühlzentrifugen:

Avanti-Zentrifuge J-30 I	Beckman Coulter (Krefeld)
RC28S Sorvall-Zentrifuge	Du Pont Instruments (Bad Homburg)
Tisch-Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Instruments (Osterode)
Tisch-Zentrifuge 5402	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Optima L-70K	Beckman Coulter (Krefeld)

2.4 Stämme

2.4.1 *E. coli* DH5 α

Genotyp: F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺)
phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1

Der Stamm *E. coli* DH5 α zeichnet sich durch eine hohe Klonierungsausbeute und eine stabile Replikation von Plasmiden aus. Dieses wird zum einen durch die Deaktivierung der Endonuclease I, genannt *endA1* Mutation, ermöglicht und zum anderen durch eine Mutation im *recA1* Gen, wodurch der Stamm seine Fähigkeit zur homologen Rekombination verloren hat. Weiterhin bietet er durch einen ϕ 80dlacZ Δ M15-Marker für Vektoren mit *lacZ*-Gen die Möglichkeit der Blau/Weiß-Selektion.

2.4.2 *E. coli* DK8

Genotyp: bglIR thi-1 rel-1 HfrP01 Δ (uncB-uncC) ilv::Tn10

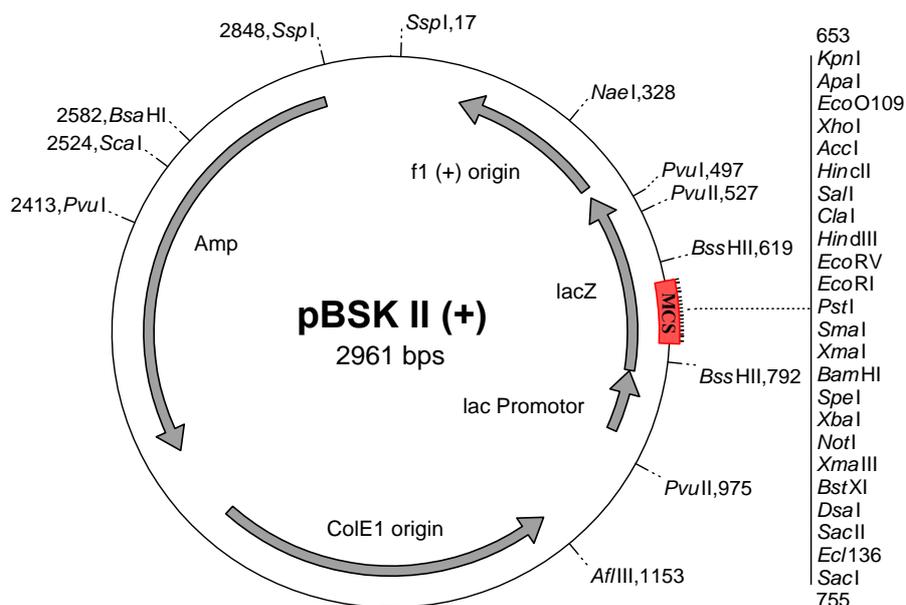
Das Genom dieses Wirts (Klionsky et al. 1984) enthält kein *unc*-Operon (auch *atp*-Operon genannt). Diese Deletion Δ (*uncB-uncC*) der ATP-Synthase-Untereinheiten α (*atpB*) bis ϵ (*atpC*) macht es dem Stamm unmöglich eine eigene ATP-Synthase zu exprimieren. Für das Wachstum auf unvergärbaren Kohlenstoffquellen ist DK8 daher auf eine plasmid-kodierte ATP-Synthase angewiesen. Eine Möglichkeit der Selektion bietet sich bei diesem Stamm durch seine Tetracyclin-Resistenz, hervorgerufen durch das Transposon Tn10 (Foster et al., 1981). Die kompetenten Zellen wurden von M. Müller nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983) isoliert.

2.5 Vektoren

Die folgenden Plasmide wurden in *E. coli* Zellen transformiert, wobei der DH5 α Stamm für die Klonierung und der DK8 Stamm für die Expression von plasmidkodierten EF₁- und EF₀F₁-Mutanten verwendet wurden. Alle Vektoren wiesen eine Ampicillin-Resistenz (Amp^r) auf.

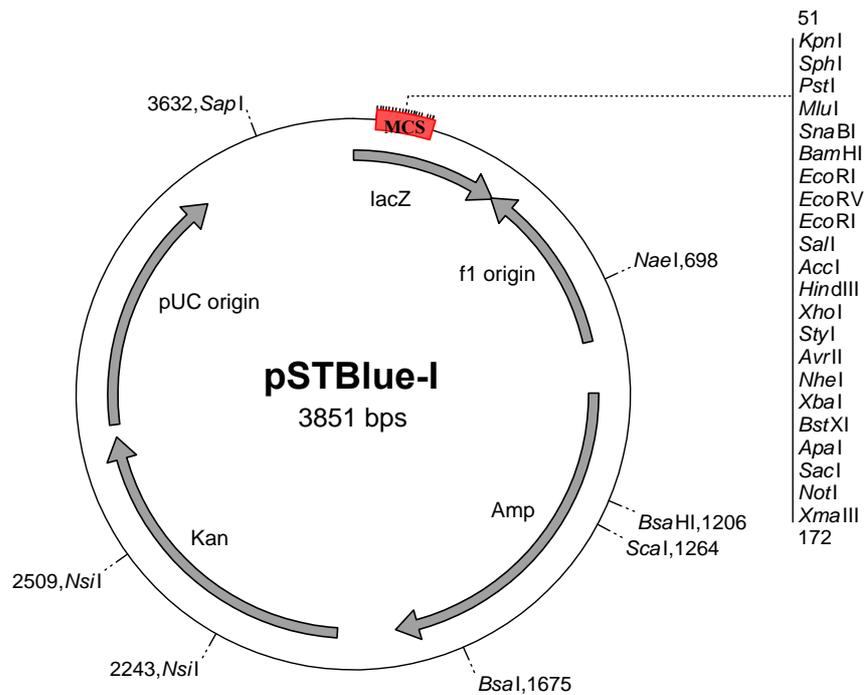
2.5.1 pBluescript II SK (+)

Bei dem pBluescript II SK (+) Vektor handelt es sich um einen *high copy*-Standard-Klonierungsvektor, der über eine *multiple cloning site* (MCS) und das *lacZ*-Gen verfügt. Die Bezeichnung SK gibt die Orientierung des Polylinkers an, so dass die Transkription des *lacZ*-Gens von *SacI* nach *KpnI* erfolgt. Das Produkt des *lacZ*-Gens, das N-terminale Fragment der β -Galaktosidase, ermöglicht durch α -Komplementation mit dem C-terminale Fragment der β -Galaktosidase, dessen Gen sich auf einem geeigneten Stamm-Genom befindet, die Blau/Weiß-Selektion von Bakterienkolonien. Die erfolgreiche Klonierung eines DNA-Fragments in die MCS unterbricht den Leserahmen des *lacZ*-Gens, so dass keine aktive β -Galaktosidase exprimiert werden kann und die Kolonien auf dem entsprechenden Medium (IPTG / X-Gal) weiß erscheinen. Kolonien bei denen in das Plasmid kein DNA-Fragment eingefügt wurde, lesen das *lacZ*-Gen ab und markieren sich so durch eine Blaufärbung.



2.5.2 pSTBlue-1

Der Klonierungsvektor pSTBlue-1 enthält ebenfalls das *lacZ*-Gen zur möglichen Blau/Weiß-Selektion, sowie eine *multiple cloning site* (MCS). Das pUC Origin sorgt dafür, dass der Vektor in einer hohen Kopienzahl in der Zelle vorliegt. Mit mehr als 100 Kopien pro Zelle wird er auch als *high copy* Plasmid bezeichnet. Zusätzlich zur Ampicillin-Resistenz besitzt dieses Plasmid noch eine Resistenz gegen Kanamycin. Es handelt sich bei diesem Vektor aber vor allem um einen *blunt end* Vektor, der linearisiert mit glatten Enden (DNA-Enden ohne überhängende 5'-oder 3'-Enden) und bereits dephosphoryliert vorliegt. Dadurch können phosphorylierte PCR-Produkt, die ebenfalls keine überhängenden Enden besitzen leichter eingebaut werden (Kap. 2.6.8.2). Zur besseren Übersicht wird das Plasmid im unteren Bild jedoch zirkulär dargestellt.



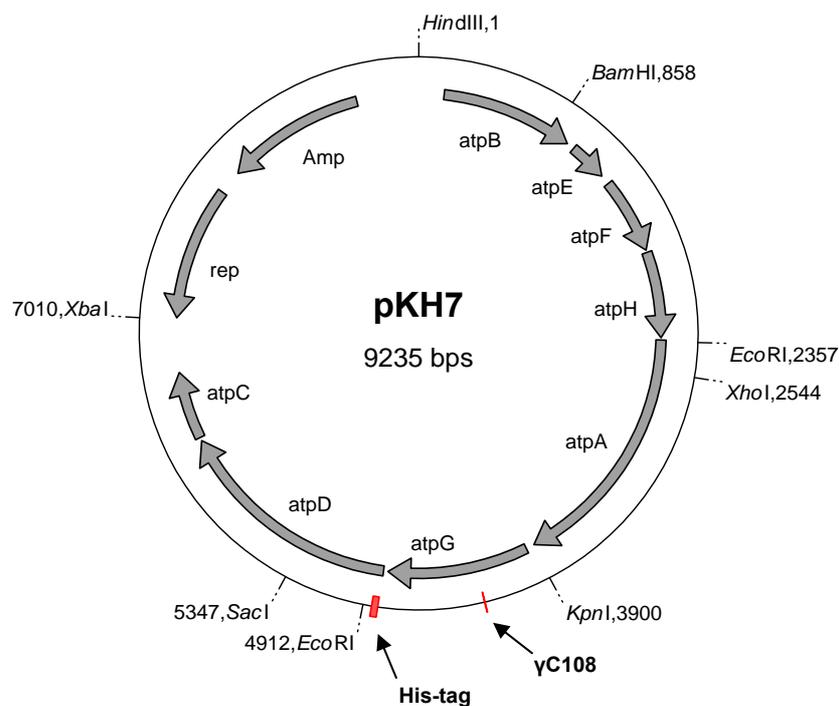
2.5.3 pBWU13

Der Vektor pBWU13 wurde aus einem *HindIII/NdeI*-Fragment der chromosomalen *E. coli* DNA, welche das *unc*-Operon von *uncB-uncC* beinhaltet, und dem *NdeI/HindIII*-Fragment von pBR322 hergestellt (Moriyama et al. 1991, Iwamoto et al. 1991). Dem pBR322-Fragment wurde zusätzlich noch das *rop* Gen entfernt, das einen negativen Einfluß auf die Replikation haben soll (Cesareni et al. 1982), so dass das Plasmid in einer hohen Kopienzahl in der Zelle

vorliegt. Das Plasmid, welches das Wildtyp *atp*-Operon trägt, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Wildtyp (WT) bezeichnet.

2.5.4 pKH7

Das Plasmid pKH7 stammt ursprünglich vom pACWU1.2 ab, der von Kuo et al. (1998) durch eine Ligation des *NheI/BamHI*-Fragments des pACYC177 (Chang et al., 1978) und des *HindIII/XbaI*-Fragments des pBWU13.4 (Ketchum et al., 1998) mit Hilfe eines Linkers hergestellt wurde. Innerhalb der Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* enthält der pBWU13.4 acht Gene des *atp*-Operons (*uncB-uncC*). Mit dem Replikationsursprung des pACYC177, dessen Kanamycin-Resistenz durch die Fusion entfernt wurde, liegt das Plasmid nur in einer geringen Kopienzahl in der Zelle vor. Bereits in dem Ursprungsvektor pACWU1.2 wurden alle Wildtyp-Cysteine (δ C21, δ C65, δ C141, α C47, α C90, α C193, α C243, γ 87, γ 112, und β C137) durch Alanine ersetzt (Kuo et al., 1998). Weiterhin weist der pKH7 Vektor eine His₆-tag Sequenz am N-terminalen Ende jeder der drei β -Untereinheiten (MRGSHHHHHHGM-(ATGKI...- β)) und eine Punktmutation in die γ -Untereinheit an Position 108 auf (Noij et al., 1999). An dieser Stelle wurde in Gamma ein Lysin (K) gegen ein Cystein (C) ausgetauscht, das die spätere Bindung von F-Aktin an das Enzym über eine Biotin-Streptavidin-Kopplung ermöglicht (Kap. 2.7.4). Ein Sequenzvergleich von pKH7 mit der Wildtypsequenz von *E. coli* K12 ist im Anhang aufgeführt.



2.5.5 pKG11

Der Vektor pKG11 stammt vom Plasmid pKH7 ab und wurde von K. Gumbiowski (Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück) hergestellt. Er enthält ebenfalls den His₆-tag am N-terminalen Ende der β -Untereinheit und das Cystein γ C108. Des Weiteren wurde jeweils ein Cystein an Position 284 in der Untereinheit α und eines an Position 276 in der γ -Untereinheit eingeführt (α E284C und γ L276C).

2.5.6 pMM24

Das Plasmid pMM24 ist ein pKH7-Derivat, das ein modifiziertes *atp*-Operon mit einen His₆-tag an der β -Untereinheit und die Mutation γ K108C trägt. Zusätzlich wurden an der Position 336 in der Untereinheit α ein Aspartat (D) und an der Position 266 in der γ -Untereinheit ein Lysin (K) gegen die Aminosäure Cystein ausgetauscht (α D336C und γ K266C). Die Mutationen wurden, wie bei den beiden folgenden Vektoren (pMM25 und pMM26) von M. Müller (Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück) vorgenommen.

2.5.7 pMM25

Der Ursprung des pMM25 liegt ebenfalls im pKH7 Plasmid, mit seinem N-terminalen His₆-tag an den β -Untereinheiten und dem Cystein γ 108. Neben diesem Cystein wurden diesem Genprodukt aufgrund der Mutationen GAA \rightarrow TGT (an Position 284 der Untereinheit β) und GCC \rightarrow TGT (an Position 270 der Untereinheit γ) an zwei weiteren Positionen quervernetzungs-fähige Cysteine (β C284 und γ C270) eingefügt.

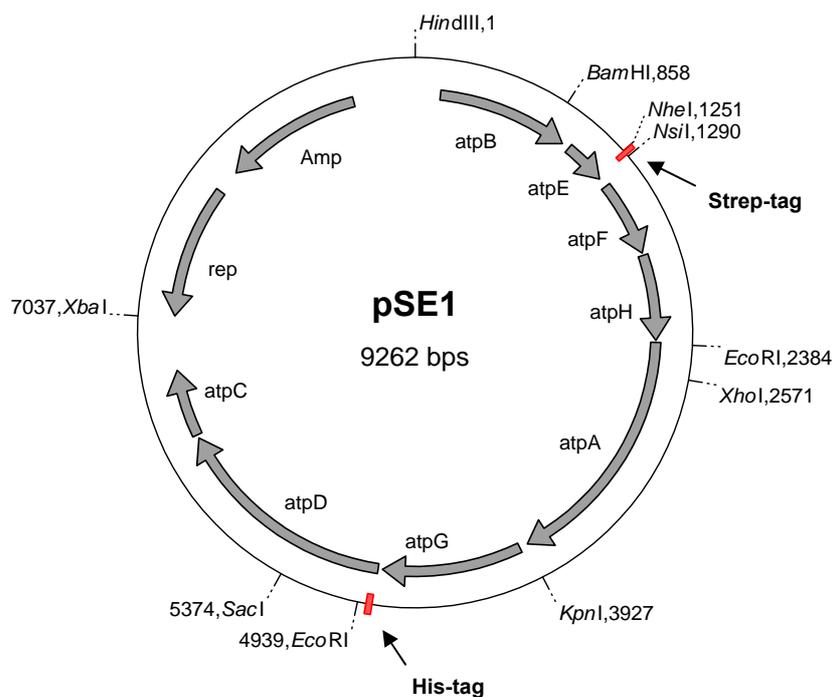
2.5.8 pMM26

Der Vektor pMM26 stammt wie pMM25 vom pKH7 ab. Im Unterschied zum pMM25 verfügt dieses Plasmid in der Untereinheit γ nicht über die Punktmutation A270C, sondern hat an der Position der 273. Aminosäure eine Mutation ACT \rightarrow TGT, wodurch das Genprodukt ebenfalls zwei zur Quervernetzung fähige Cysteine (α C284 und γ C273) besitzt.

2.5.9 pSE1

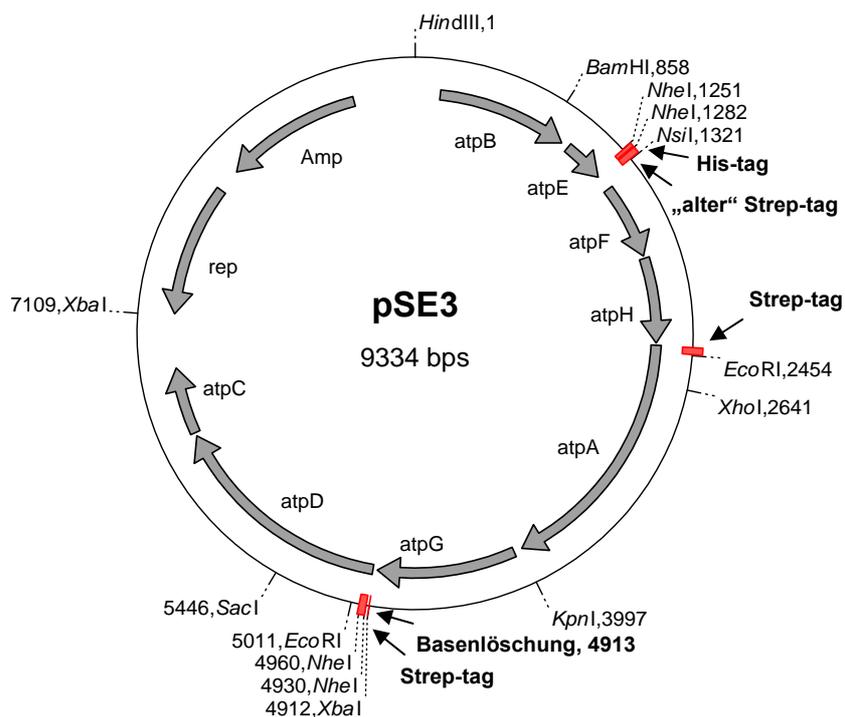
Der Vektor pSE1 trägt wie der pKH7 die acht Gene *atpB* bis *atpC* des E-coli *atp*-Operons. Das Genprodukt (SE1) besitzt aber im Gegensatz zum KH7-EF₁ gar keine Cysteine mehr.

Weiterhin enthält das Plasmid eine Strep-tag II Sequenz am C-terminalen Ende der Untereinheit c ((c-...MFAVA)-**SWSHPQFEK**) und eine His₆-tag Sequenz am N-terminalen Ende der β -Untereinheit (MRG**SHHHHHH**GM-(ATGKI...- β)) (Pänke et al., 2000).



2.5.10 pSE3

Das pSE3 Plasmid ist ein Nachkomme des pSE1 und wurde von der Firma IBA (Göttingen) hergestellt. Es kam bei dieser, weiterhin cysteinfreien Mutante, zu einem Kreuzwechsel der beiden Affinitäts-tags. So enthält der Vektor pSE3 den Strep-tag II nun am N-terminalen Ende der Untereinheit β (MAS**WSH**PQFEKAS-(ATGKI...- β)) und die His₆-tag Sequenz am C-terminalen Ende der Untereinheit c ((c-...MFAVA)-**SHHHHHH**). Zusätzlich wurde der Strep-tag II auch am N-terminalen Ende der α -Untereinheit (MAS**WSH**PQFEKASM-(QLNST...- α)) angebracht. Durch diese Mutationen kam es zu zwei weiteren Veränderungen des Genoms. Zum einen wurde eine *Xba*I-Schnittstelle in dem Intron zwischen den kodierenden Sequenzen für γ (*atpG*) und β (*atpD*) eingefügt, was eine Basenlöschung (Guanin) hinter der 4913. Position in der DNA-Sequenz zur Folge hatte. Zum anderen wurde die Sequenz (Position 1275-1311) des „alten“ Strep-tag II an der Untereinheit c des Vektors pSE1 nicht entfernt, sondern im pSE3 durch zwei Stop-Codons vom neuen His₆-tag getrennt und so in die intervenierende Region zwischen c (*atpE*) und b (*atpF*) verschoben.

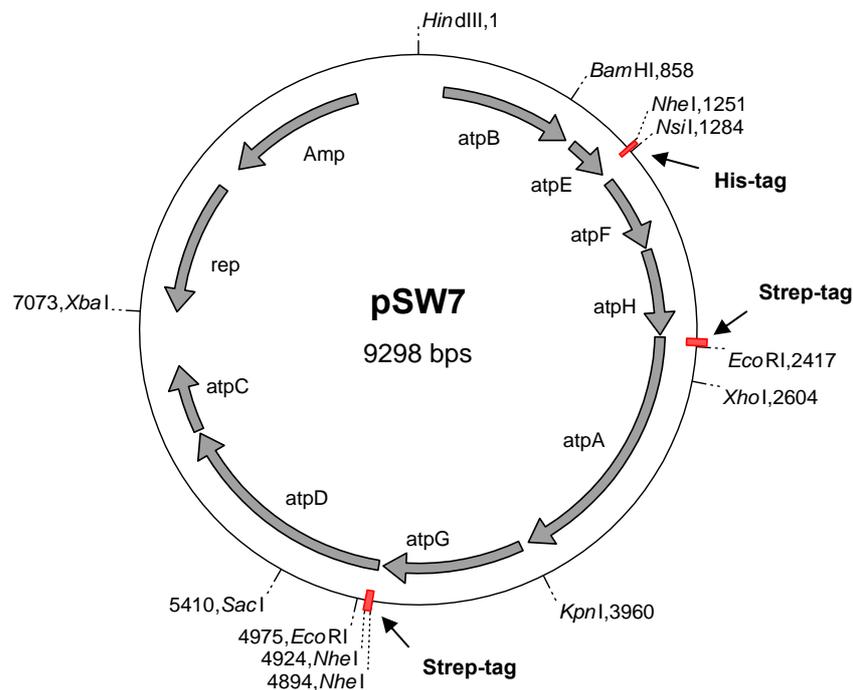


2.5.11 pSE4

Der Vektor pSE4 stammt vom pSE3 ab und unterscheidet sich von diesem nur durch den wieder entfernten Strep-tag II am N-terminalen Ende der α -Untereinheit (MASWSHPQFEKASM-(QLNST...- α)). Das Genprodukt SE4 trägt somit insgesamt nur drei Strep-tag II (eine an jeder β -Untereinheit) und keine sechs, wie der SE3. Hergestellt wurde dieses Plasmid von H. Kenneweg (Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück).

2.5.12 pSW7

Das Plasmid pSW7 geht ebenfalls auf den pSE3 zurück. Es trägt den Strep-tag II sowohl in der α - als auch in der β -Untereinheit, besitzt den His₆-tag am C-terminalen Ende der Untereinheit c und ist frei von Cysteinen. Die durch die Klonierung beim pSE3 hervorgerufenen Mutationen in den Introns, zum einen zwischen γ (*atpG*) und β (*atpD*), sowie zum anderen zwischen c (*atpE*) und b (*atpF*), konnten bei diesem Vektor rückgängig gemacht werden. Das bedeutet, dass es in dem erstgenannten Fall zu der Einfügung der Base Guanin, und in dem anderen Fall zur endgültigen Entfernung des alten Strep-tag II vom pSE1 in der intervenierenden Region hinter der Untereinheit c kommt. Die Klonierung dieses Vektors wird in Kapitel 2.6.12 noch genauer beschrieben.



2.5.13 pWH1

Das Plasmid pWH1 ist ein pSW7-Derivat und trägt das in gleicher Weise modifizierte *atp*-Operon. Das *HindIII/XbaI*-Fragment des pSW7, auf dem dieses Operon liegt, wurde allerdings durch Ligation mit dem pBWU13 Vektor verbunden. Dem pBWU13 wurde dazu erst durch Mutation in den Positionen 7005-7010 eine *XbaI*-Schnittstelle zugeführt (Sequenztausch von TTCGTT zu TCTAGA), um so dessen eigenes Wildtyp *atp*-Operon zu entfernen. Diese Mutagenese und das Einsetzen des pSW7 Fragments wurde von G. Hikade (Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück) durchgeführt.

2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.6.1 Anzucht und Lagerung von Klonen

Die für sämtliche Klonierungsarbeiten benötigten Plasmide wurden mit Hilfe des DH5 α -Stamms aus so genannten Über-Nacht-Kulturen gewonnen. Diese bestanden aus 10 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$), angeimpft mit einem Klon von einer Agarplatte oder einer Stammkultur. Die Anzucht von Kolonien erfolgte auf ampicillinhaltigen Agarplatten mit LB-Medium und konnten kurzzeitig bei -4°C aufbewahrt werden.

Für die Lagerung von Klonen in Form von Stammkulturen wurden entweder 0,5 ml einer Über-Nacht-Kultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin gemischt und bei -20°C , oder 0,9 ml einer Über-Nacht-Kultur mit 0,3 ml Glycerin (steril) bei -80°C eingefroren.

2.6.2 Transformation in DH5 α -Zellen

Bei der Transformation von Plasmid-DNA wurden jeweils 100 μl auf Eis aufgetaute kompetente Zellen mit 1 μl des entsprechenden Vektors gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die gesamte Bakteriensuspension wurde dann auf einer vorgewärmten Agarplatte (LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht in den Brutraum gestellt.

Etwas anders hingegen wurde bei der Vervielfältigung von Plasmid-DNA aus Ligationsreaktionen (Kap. 2.6.8) verfahren. Diese wurden ebenfalls in kompetente DH5 α -Zellen transformiert, aber zu dem 100 μl Aliquot auf Eis aufgetauter Zellen wurden 5-10 μl des Ligationsansatzes gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis kam dann ein 45-60 Sekunden langer Hitzeschock im 42°C warmen Heizblock. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis von 2 Minuten wurden 400 μl Soc-Medium zugegeben und die Bakterienkultur für 1 h bei 37°C im Rotationsinkubator (200 rpm) angezogen. 200-300 μl dieses Ansatzes wurden danach ebenso wie bei der erstbeschriebenen Transformation auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen. In beiden Fällen wurden am nächsten Tag Klone abgenommen und deren Plasmide isoliert.

Die Transformation von PCR-Produkten (neu synthetisierte, offene Plasmide) verlief genauso wie die von Ligationsansätzen. Im Plasmid enthaltene Strangbrüche werden dabei von der *E. coli*-eigenen DNA-Ligase geschlossen.

Handelte es sich bei dem transformierten Vektor um ein Derivat des pBSK II oder des pSTBlue-1, konnte bei der Klonauswahl die Blau/Weiß-Selektion verwendet werden (Kap. 2.5.1 & 2.5.2). Verfügt der Klon über eine funktionsfähige β -Galaktosidase, deren Expression durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) induziert wird, kann das Enzym das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) zu einem Indolyl-Derivat hydrolisieren. Es kommt somit zu einer Blaufärbung der Kolonien, die nur durch ein

in die *multiple cloning site* inseriertes DNA-Fragment verhindert werden kann. Um diese Nachweisreaktion zu nutzen, mussten auf den Agarplatten vor der jeweiligen Bakterienkultur 80 µl X-Gal (2% (w/v) in DMF) und 1 µl IPTG (20% (w/v) in H₂O) ausgestrichen werden.

2.6.3 Plasmidisolierung

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Plasmid-DNA dienten 6 ml einer Bakterienkultur. Die Plasmidpräparation erfolgte dann entweder mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche Diagn.) oder des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Quiagen) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Die alkalische Lyse der Zellen ist dabei in beiden Fällen der erste Schritt der Isolierung, gefolgt von dem Abbau der RNA durch RNAase A. Nach der Ausfällung von genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern liegt schließlich die gewaschene Plasmid-DNA in 80µl Elutionspuffer vor. Dieses Volumen enthielt in der Regel zwischen 15 µg und 30 µg Plasmid-DNA.

2.6.4 Quantifizierung von Plasmid-DNA

Die Konzentrationsbestimmung und Reinheitsüberprüfung von Nukleinsäurelösungen erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Absorptionsspektroskopie. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$), dem Verdünnungsfaktor (V) und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (M), der für dsDNA bei einer Absorption von 1 ungefähr 0,05 µg/µl entspricht. Die Plasmidkonzentration lässt sich demnach mit folgender Formel berechnen:

$$A_{260\text{ nm}} \cdot V \cdot M = \text{dsDNA Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die Reinheit (R) der Präparation konnte anhand des Verhältnisses $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ überprüfen werden. Bei einem Wert zwischen 1,8-2,0 galten die Nukleinsäurelösungen als proteinfrei. Hatte man aber nur sehr geringe Mengen an Nukleinsäuren zu quantifizieren, wie zum Beispiel isolierte DNA-Fragmente, musste man auf die Konzentrationsabschätzung mit Hilfe eines Agarosegels zurückgreifen. Dazu wurde der Standard-DNA-Größenmarker mit seinen bekannten Fragmentlängen als Mengenmarker verwendet und so die Größenordnung der DNA-Konzentration festlegt. Bei dieser recht ungenauen Methode liegt die Nachweisgrenze aber immer noch bei etwa 5 ng DNA pro Bande.

2.6.5 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die bestimmte Sequenzen auf dem DNA-Strang erkennen und spalten. Sie lassen sich in drei Kategorien, Typ I-III, einteilen.

Restriktionsenzyme des Typ I besitzen eine spezifische Erkennungssequenz, schneiden aber zufällig, wohingegen die Typ III Restriktionsendonukleasen die DNA etwa 20-25 Nukleotide entfernt von der erkannten Sequenz teilt. Für die Analyse der isolierten Plasmid-DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen des Typ II verwendet, die zumeist in einer palindromischen Erkennungssequenz von 4-8 bp (symmetrisch und damit in beiden DNA-Stängen gleiche Sequenz) scheiden. Es entstehen dabei DNA Fragmente definierter Größe mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende, die entweder glatt (*blunt ends*) oder überstehend (*sticky ends*) sind, wobei sowohl ein 5'- als auch ein 3'-Überhang entstehen kann.

2.6.5.1 Analytischer Restriktionsansatz

Die Charakterisierung und ersten Überprüfung der Identität isolierter dsDNA erfolgte durch eine Restriktionsanalyse. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt zwischen 0,4 und 0,8 µg Plasmid und wurde mit 5-10 u Restriktionsendonuklease für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente konnten über ein analytisches Agarosegel aufgetrennt werden.

2.6.5.2 Präparativer Restriktionsansatz

Um gezielt ein bestimmtes DNA-Fragment nach der Trennung als Bande aus einem präparativen Agarosegel herauszuschneiden zu können, ist es notwendig, größere Mengen DNA in dem vorangegangenen Restriktionsansatz einzusetzen. Ein 70 µl Reaktionsansatz enthielt 5-10 µg Plasmid und wurde mit 40 u der jeweiligen Restriktionsendonukleasen für gute 3 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Handelte es sich bei dem gewünschten Fragment um einen Vektor, der für eine Ligation (Kap. 2.6.8) verwendet werden sollte, musste dieser vor der Gelelektrophorese dephosphoryliert werden. Hierzu wurde der Vektor nach Zugabe von 3 u der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) und 8 µl des 10x CIAP-Puffers eine weitere Stunde im Wasserbad inkubiert. Bei der Dephosphorylierung werden die am 5'-Ende beim Restriktionsverdau entstandenen Phosphatreste entfernt und so die Religation (Selbstligation) der Vektor-DNA verhindert.

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Fragmente nach ihrer Größe und Sekundärstruktur zu trennen und zu identifizieren. Sie wurden benötigt für Konzentrationsbestimmung, Kontrolle von Restriktionsanalysen und PCR-Produkten, sowie für die präparative Fragmentisolierung. Um eine ideale Trennung zu erreichen, wurde die

Porengröße des Gels durch die Konzentration der Agarose variiert. In der nachfolgenden Tabelle 2.1 wurden die Trennbereiche bei verschiedenen Konzentrationen aufgelistet.

Tab. 2.1: Fragmentlängen-Trennbereich für verschiedene Agarosekonzentrationen *

Agarosekonzentrationen (w/v)	Fragmentlänge
0,5 %	1 – 30 kb
0,7 %	0,8 – 12 kb
1,0 %	0,5 – 7 kb
1,2 %	0,4 – 6 kb
1,5 %	0,2 – 3 kb
2,0 %	0,1 – 2 kb

* Aus Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics 4. Auflage 2003

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde eine entsprechende Menge an Standardagarose in 1x TBE-Elektrophoresepuffer durch Aufkochen gelöst und dann mit 8 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Banden konnten so aufgrund der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids bei Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 6x Beladungspuffer versetzt, um eine optische Kontrolle des Laufverhaltens zu ermöglichen. Dem Größenvergleich der Fragmente diente ein λ-DNA Marker (bekannte Auftrennung), der jedes Mal mit aufgebracht wurde. Man unterscheidet das analytische und das präparative Agarosegel durch das aufgetragene Probevolumen und die angelegte Spannung. Es wurden 10-20 µl Probe und 130 V bei den analytischen, und 80 µl Probe und 80 V bei den präparativen Gelen verwendet.

2.6.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Fragmenttrennung mittels eines präparativen Agarosegels ist es möglich, ein bestimmtes Band mit dem Skalpell herauszuschneiden und aus dem Gel zu isolieren. Dazu wird die DNA unter Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Dieser Vorgang sollte allerdings möglichst schnell durchgeführt werden, da die DNA sehr empfindlich auf UV-Strahlung reagiert. Mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen erfolgte dann nach deren Angaben die Isolierung der DNA aus dem Gel, wobei das DNA-Fragment am Ende in 30 µl Elutionspuffer vorlag. Eine Konzentrationsabschätzung wurde wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben durchgeführt.

2.6.8 Ligation

Der Verknüpfungsprozess von DNA-Fragmenten, auch Ligation genannt, wird durch die DNA-Ligase katalysiert. Dieses Enzym ermöglicht die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der benachbarten 5'-Phosphatgruppe eines anderen. Die Energie für diese Reaktion wird in dem Fall der hier verwendeten T4 DNA-Ligase aus T4-Bakteriophagen in Form von ATP geliefert. Diese Ligase ist besonders schnell und zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, auch zwei glatte Enden (*blunt ends*) miteinander verknüpfen zu können. Zu Beginn des Mechanismus kommt es unter Freisetzung von Pyrophosphat zur Bildung eines Enzym-AMP-Komplexes. Dieser Adenylatrest wird dann auf die 5'-Phosphatgruppe einer der beiden DNA-Ketten übertragen. Im letzten Schritt kommt es durch einen nukleophilen Angriff der benachbarten 3'-OH-Gruppe unter Abspaltung von AMP zur Bildung der Phosphodiesterbrücke. Die notwendige räumliche Nähe der beiden DNA-Fragmente wird bei überhängenden Enden (*sticky ends*) durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den einzelsträngigen Enden der zueinander komplementären DNA-Stränge erleichtert. Die Temperatur, bei der die Ligation abläuft, stellt demnach einen Kompromiss zwischen der Enzymaktivität der T4-DNA-Ligase (aktiver je wärmer) und der Stabilität der möglicherweise vorhandenen Wasserstoffbrücken (stabiler je kühler) dar. Für die Berechnung der Molmengen von Vektor und Insert wurde immer eine Näherung für ein Basenpaar von 660 g/mol angenommen. Die Transformation der Ligationprodukte in DH5 α -Zellen erfolgte in beiden Fällen („*sticky end*“ und „*blunt end*“ Ligation), wie bereits in Kapitel 2.6.2 beschrieben.

2.6.8.1 „*sticky end*“ Ligation

Bei der „*sticky end*“ Ligation wurde ein DNA-Fragment (Insert) in eine Vektor-DNA mit jeweils überhängenden Enden eingeführt. Beides wurde in präparativen Ansätzen (Kap. 2.6.5.2) mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und liegt dephosphoryliert (Vektor) bzw. phosphoryliert (inserteres DNA-Fragment) vor. Ein 30 μ l Ligationsansatz enthielt 50 ng Vektor-DNA und die 5-fache Molmenge an Insert-DNA (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Pipettierschema für Ligrationsreaktion

	Ligationansatz
10x T4 DNA Ligase-Puffer	3 μ l
Vektor-DNA	50 ng
Insert-DNA	5-fache Molmenge des Vektors
steriles ddH ₂ O	ad 30 μ l
T4-DNA Ligase (400 u/ μ l)	1 μ l

Die mitgeführte Blindprobe diente der besseren Abschätzung der Ausbeute und enthielt keine Insert-DNA. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 16°C im Schüttler inkubiert.

2.6.8.2 „blunt end“ Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden, wie bei PCR-Produkten (Kap. 2.6.9), ist schwieriger. Der Vektor (pSTBlue-1) lag linearisiert und dephosphoryliert mit glatten Enden, die durch einen Schnitt mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* erzeugt wurden, vor. Die Fragmente, die mit Hilfe der PCR entstanden sind, waren jedoch noch nicht phosphoryliert. Die Phosphorylierung und die Ligation wurden mit Hilfe des „Perfectly Blunt Cloning Kit“ nach Anleitung von Novagen durchgeführt. In einem 10 µl Ansatz wurde in einem ersten Schritt das PCR-Produkt phosphoryliert, wobei als Startmaterial die 2½-fache Molmenge an Insert- zu Vektor-DNA eingesetzt wurde (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Pipettierschema für Ligationsreaktion

Ligationansatz	
Insert-DNA aus PCR	2½-fache Molmenge des Vektors
steriles ddH ₂ O	ad 10 µl
End Conversion Mix	5 µl

Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Erhitzen inaktiviert. Es folgte eine Abkühlung von 2 min auf Eis und durch Zugabe von 50 ng der gebrauchsfertigen Vektor-DNA und 4u der T4 Ligase wurde die eigentliche Ligationsreaktion gestartet. Das Reaktionsgemisch inkubierte für 15 min bei 22°C.

2.6.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine effektive Methode eine spezifische DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Diese Amplifizierung erreicht man durch das zyklische Durchlaufen eines dreistufigen Temperaturprogramms. Man unterscheidet hierbei die Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung), die Anlagerung der Oligonukleotid-Primer (Hybridisierung) und die Kettenverlängerung durch die thermostabilen DNA-Polymerase (Elongation). Der erste Schritt im Zyklus, die Denaturierung der Template-DNA, findet für 1 Minute bei 95°C statt. Der Zeitraum hierfür ist recht kurz gehalten, um

mögliche, unerwünschte Nebenreaktionen (darunter Zerfall der Nukleotide und Denaturierung der Polymerase), die mit der hohen Temperatur einhergehen, so gering wie möglich zuhalten. Während der Temperatursenkung auf 50-65°C im darauf folgenden Hybridisierungsschritt paaren sich die Primer mit der jeweilig komplementären einzelsträngigen Template-DNA. Unspezifische Amplifikationen können dabei durch hohe Hybridisierungstemperaturen, die wiederum Schmelztemperaturen der Primer zwischen 55-80°C erfordern, unterbunden werden. Die genaue Hybridisierungstemperatur, richtet sich demnach hauptsächlich nach den Oligonukleotid-Primern. Diese besitzen meist eine Länge von 20-30 Basen und sollten weder mit sich selbst noch untereinander hybridisieren. Zur Vermeidung von Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen ist es sinnvoll, dass der Primer 40-60% Guanin und Cytosin enthält, wobei nicht mehr als vier gleiche Basen aufeinander folgenden sollten. Am 3'-Ende des Oligonukleotids sollten ebenfalls ein bis zwei Guanin- oder Cytosinbasen sitzen um eine bessere Bindung und stabile Elongation zu gewährleisten. Die eigentliche DNA-Synthese aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) findet bei 68-72°C im dritten Schritt, der Elongation, statt und wird katalysiert von der *Pfu*-DNA-Polymerase. Es handelt sich bei dem Enzym um eine rekombinante Form aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*. Die DNA-Polymerase zeichnet sich aufgrund ihrer 3'-5'-Exonucleaseaktivität durch eine sehr geringe Fehlerhäufigkeit von ungefähr 10^{-6} je eingebauter Base aus, wodurch allerdings nur eine geringe Syntheserate von ca. 550 Nukleotiden/min erreicht werden kann. Außerdem erzeugt das Enzym durch seine Korrekturaktivität Amplifikationsprodukte mit glatten Enden und keine Basenüberhänge (Kap. 2.6.8). Vervollständigt wird ein typisches PCR-Programm durch eine primäre Denaturierung (5 min) zu Beginn, einer 10 minütigen terminalen Elongation und eine Kühlung auf 4°C am Ende.

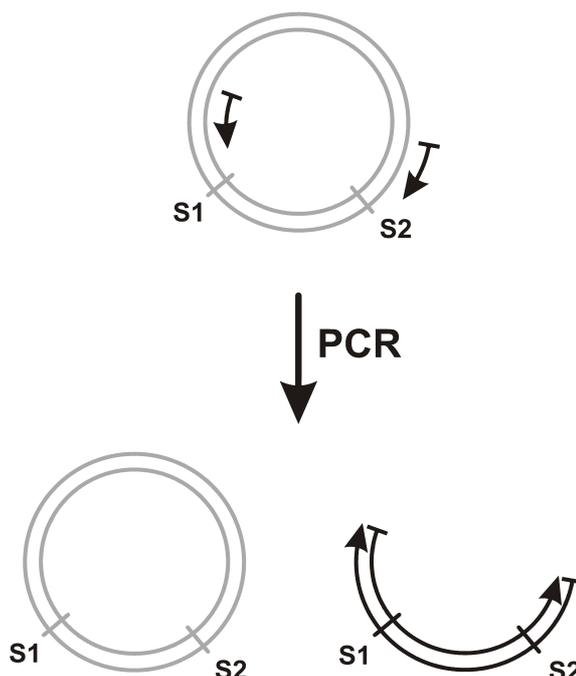


Abb. 2.1: Polymerasekettenreaktion mit zwei Primern. S1 und S2 sind zwei mögliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme innerhalb der zu amplifizierenden DNA-Sequenz.

Im ersten Zyklus eines PCR-Temperaturprogramms werden die neuen, von den Primern ausgehenden DNA-Stränge über das Ende der zum zweiten Primer komplementären Sequenz hinaus verlängert. Diese werden nun in den nächsten Zyklen ebenfalls als Matrize verwendet. Am Ende ist ein millionenfacher Überschuss an DNA-Fragmenten vorhanden, die genau den Bereich der Sequenz umfassen, der von den beiden eingesetzten Primern überspannt wird (Abb. 2.1).

Nach der PCR wurde die ursprüngliche Template-DNA, in Abbildung 2.1 grau dargestellt, durch eine *DpnI*-Verdauung im Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C zerstört. Das Enzym schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA am Adenin der Erkennungssequenz und entfernt so die nicht mutierte Template-DNA aus der Lösung. Das PCR-Produkt ist nicht von der Fragmentierung betroffen, da es keine methylierten Basen besitzt.



Handelt es sich bei der Template-DNA um ein Plasmid, das eine Länge von 6000 bp nicht überschreitet, kann eine Rundum-PCR (*Full-Circle-PCR*) durchgeführt werden, bei der das gesamte Plasmid amplifiziert wird (Weiner et al., 1994). Bei einer anschließenden Transformation in DH5 α -Zellen (Kap. 2.6.2) konnte durch den Verdau nur das PCR-Produkt ligiert werden. Ein typischer 50 μ l PCR-Ansatz (Tab. 2.4) enthielt immer 40-50 ng Template-DNA und wurde durch die Zugabe der *Pfu*-DNA-Polymerase gestartet.

Tab. 2.4: Pipettierschema für Polymerasekettenreaktion

	PCR-Ansatz
10x Thermo Pol Puffer	5 μ l
3'-5'-Primer (25 pmol/ μ l)	1 μ l
5'-3'-Primer (25 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP-Mix (5 mM)	3 μ l
steriles ddH ₂ O	ad 50 μ l
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2 u/ μ l)	1 μ l

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden bei PCR-Protokollen nur die Sequenzen der beteiligten Oligonukleotid-Primer und das optimierte PCR-Temperaturprogramm angegeben.

2.6.9.1 Mutagenese durch PCR

Bei einer Mutagenese mittels PCR wird eine zielgerichtete Mutation in eine bereits existierende DNA eingeführt. Es kann sich dabei um die Insertion, den Austausch oder die Deletion einer einzelnen oder mehrerer Basen handeln. Bei den beiden hier zur Anwendung gekommenen Verfahren (Abb. 2.2) konnte immer eine Rundum-PCR durchgeführt werden.

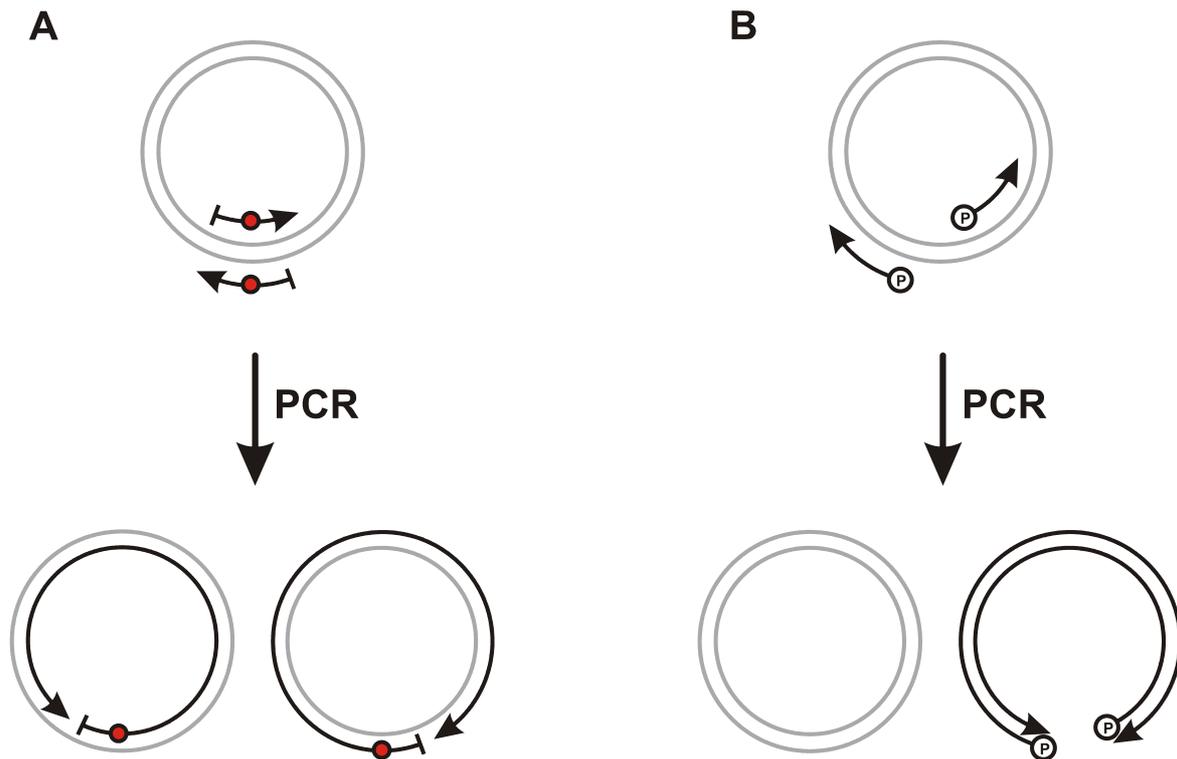


Abb. 2.2: Mutagenese durch Polymerasekettenreaktion. A: Punktmutation mit zwei zueinander komplementären Primern, die bereits die passende Mutation (roter Kreis) tragen; B: Deletion eines Sequenzbereiches durch Ausgrenzung des selbigen von zwei phosphorylierten Primern.

Bei der Punktmutation, das heißt der Mutation einer einzelnen Base, wie in Abbildung 2.2 A gezeigt, werden zwei Oligonukleotid-Primer, die in ihrer Mitte bereits die gewünschte Veränderung tragen und zueinander komplementär sind, benötigt. Bei dem PCR-Programm wurde nur mit wenigen Zyklen gearbeitet, um die Wahrscheinlichkeit von zufälligen Mutationen zu verringern. Anschließend kam es zu einem *DpnI*-Verdau und einer Transformation in kompetente Zellen. Eine andere Verwendung der Methode ist die Einführung einer Deletion (Abb. 2.2 B). Mit zwei nicht zueinander komplementären 5'-phosphorylierten Primern wird eine PCR über das gesamte Plasmid durchgeführt, welche den Sequenzbereich der Deletion ausgrenzt. Das gewünschte PCR-Produkt kann dann, nach der Entfernung der Template-DNA und einer Auftrennung mit Hilfe eines Agarosegels, direkt ligiert werden.

2.6.10 Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die automatischen Sequenzierungen mit dem „ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Es kommt dabei zum Einbau von ddNTP's, wobei jede der vier Varianten (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) eine andere Farbmakierungen aufweist. Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht dabei auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Dabei kommt es in einem Gemisch aus dNTP's und farbmarkierten ddNTP's durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch. Die entstehenden, verschieden langen Fragmente mit ihren farbigen Enden werden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und können über ihre Fluoreszenzmarkierung in Abhängigkeit zur Fragmentlänge detektiert werden. Die Sequenzierung erfolgt ähnlich einer PCR, allerdings wird hier nur ein Primer verwendet, so dass nur ein DNA-Strang bis zum jeweiligen Kettenabbruch kopiert werden kann. Daher können in den nachfolgenden Zyklen des Temperaturprogramms die Kopien nicht als Template-DNA benutzt werden, wodurch eine 16-20-fach größere Menge an Plasmid-DNA als bei einer PCR eingesetzt werden musste. Es können bis zu 700 bp mit einem Sequenzierungsprimer entschlüsselt werden. Ein 20 µl Sequenzierungsansatz (Tab. 2.5) wurde durch Zugabe des „Ready Reaction Mix“, der die dNTP's, die markierten ddNTP's, die DNA-Polymerase und den entsprechenden Puffer enthält, gestartet. Das zu durchlaufende Temperaturprogramm ist in Tabelle 2.6 angegeben.

Tab. 2.5: Pipettierschema für Sequenzierungsreaktion

	Sequenzierungsansatz
Templat-DNA	800 ng
Sequenzierungsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
„Ready Reactions Mix“	4 µl
steriles ddH ₂ O	ad 20 µl

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde die Probe entsalzt und nicht eingebaute markierte Nukleotide und Primer durch eine Ethanol-fällung entfernt. Dazu musste die Probe mit sterilem ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 10 µl NaAc-Puffer und 250 µl 100% Ethanol (p.a.) 20 min auf Eis inkubiert werden. Nach einer Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, RT) wurde das Pellet mit 300 µl 70% EtOH (p.a.) gewaschen. In einem weiteren Zentrifugationschritt (5 min, 14.000 rpm, RT) wurde dann die dsDNA erneut pelletiert. Der Überstand und die Lösungsmittelreste wurden vorsichtig entfernt. Nach dem Trocknen des Pellets wurden die Proben durch U. Coja (Abteilung Spezielle Botanik, Universität Osnabrück) sequenziert.

Tab. 2.6: Temperaturprogramm für Sequenzierungsreaktion

96°C	1 min	Primäre Denaturierung
50°C	15 s	Hybridisierung
60°C	4 min	Elongation
96°C	30 s	Denaturierung
72°C	5 min	Terminale Elongation
4°C	bis zur weiteren Verwendung	Kühlung

Die drei Temperaturschritte in der gestrichelten Umrandung durchliefen 30 Zyklen.

2.6.11 Transformation in DK8-Zellen

Für die Expression der EF₁- und EF₀F₁-Mutanten der verschiedenen Vektoren aus Kapitel 2.5.3 bis 2.5.13 war es notwendig die Plasmid-DNA in DK8-Zellen, welche kein *atp*-Operon mehr enthielten (Kap. 2.4.2), zu transformieren. Hierzu wurden 100 µl auf Eis aufgetaute DK8-Zellen mit 1 µl des entsprechenden Vektors versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die gesamte Bakteriensuspension wurde dann auf eine vorgewärmte, ampicillinhaltige Agarplatte ausgestrichen, und Klone über Nacht bei 37°C im Rotationsinkubator angezogen. Nach der Transformation wurde die Funktionsfähigkeit der plasmidkodierte ATP-Synthase durch das Wachstum auf Succinat-Agarplatten überprüft. Bei dieser Komplementation wurden einzeln liegende Klone gepickt und mit einer positiven und negativen Kontrolle ausgestrichen. Nur *E. coli* *atp*-Mutanten mit einem vollständigen ATPase Operon sind in der Lage, auf nichtvergärbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen (Boogerd et al., 1998). Unter diesen reduzierenden Bedingungen dauerte das Bakterienwachstum 3 Tage bei 37°C.

2.6.12 Konstruktion des Vektors pSW7

Als Ausgangsmaterial für den Vektor pSW7 (Kap. 2.5.12) diente das Plasmid pSE3 (Kap. 2.5.10). Bei dieser Mutagenese wurden die, bei der Klonierung von pSE3 aus dem Ursprungsvektor pSE1 entstandenen, unerwünschten Mutationen entfernt. Es handelt sich bei dem Plasmid pSW7 also um einen „reparierten“ pSE3. Zwei Veränderungen mussten dabei vorgenommen werden:

1. Insertion der Base Guanin zwischen Position 4913 und 4914 der DNA-Sequenz
2. Deletion der DNA-Sequenz von Position 1275-1311 („alter“ Strep-tag II des pSE1)

Die Mutagenese erfolgt in beiden Fällen nach der Methode von Weiner et al. (1994), bei der nahezu das gesamte Template-Plasmid in der PCR kopiert wird. Dazu war es nötig, die Größe des zu amplifizierenden DNA-Bereichs zu verringern, indem aus dem Vektor pSE3 (9334 bp) die entsprechenden DNA-Fragmente in Klonierungsvektoren umgesetzt wurden. Die Größe des Template-Plasmids konnte so für die Rundum-PCR fast halbiert werden.

2.6.12.1 Baseninsertion im Subklon pSW4

Für die Insertion der Base Guanin wurde erst der Subklon pSW4 aus dem *KpnI/SacI*-Fragment des pSE3 und dem Klonierungsvektor pBSK II hergestellt. Das Fragment enthält das gesamte *atpG* Gen (Untereinheit γ) und einen Teil des *atpD* Gens (R1-L162 der Untereinheit β), sowie die nichtkodierende Region dazwischen. Für die Herstellung des Subklons wurden jeweils 12 μg pSE3 und pBSK II mit jeweils 40 u *KpnI* und *SacI* geschnitten und der geöffnete pBSK II Vektor mit CIAP dephosphoryliert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Fragmente aus dem Gel isoliert. In der anschließenden Ligation bei 16°C über Nacht wurden ca. 50 ng des dephosphorylierten, *KpnI/SacI*-geöffneten pBSK II-Vektors und ca. 125 ng des *KpnI/SacI*-Fragments des pSE3 eingesetzt. Nach einer erfolgreichen Transformation in kompetente DH5 α -Zellen konnten einzelne Klone angezogen und auf ihre Richtigkeit mittels Restriktionsanalyse überprüft werden. Ein korrekter Klon pSW4 konnte danach für die Mutagenese, nach dem in Abbildung 2.2 A gezeigten Verfahren, eingesetzt werden. Für die Einführung der Base Guanin mittels PCR wurden in dem Reaktionsansatz (Tab 2.4) ca. 40 ng Plasmid pSW4 (4308 bp) als Template-DNA verwendet und die in Tabelle 2.7 aufgeführten Mutationsprimer eingesetzt.

Tab 2.7: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für den pSW4

	Nukleotidsequenz
PvSubgSE3	5'-CGCGGTTTAAACAGGTTATTTCC <u>G</u> TAGAGGATTTAATATGGC-3'
PrSubgSE3	5'-GCCATATTAATCCTCTAC <u>G</u> GAAATAACCTGTTTAAACCGCG-3'

Nach dem Durchlaufen des Temperaturprogramms (Tab. 2.8) wurde ein *DpnI*-Verdau (20 u) zur Entfernung der Template-DNA durchgeführt. Es folgte eine Transformation der PCR-Ansätze (Kap 2.6.2) in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen, die Anzucht einzelner Klone und die Überprüfung dieser durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung.

Tab. 2.8: Temperaturprogramm für Baseninsertion im pSW4

95°C	5 min	Primäre Denaturierung
56°C	1 min	Hybridisierung
72°C	10 min	Elongation
95°C	1 min	Denaturierung
72°C	10 min	Terminale Elongation
4°C	bis zur weiteren Verwendung	Kühlung

Die drei Temperaturschritte in der gestrichelten Umrandung durchliefen 16 Zyklen.

Die erfolgreiche Baseninsertion ließ sich bereits bei der Restriktion eindeutig nachweisen, da durch die Einführung eine *Xba*I-Schnittstelle zerstört wurde. Für die Überprüfung des gesamten Bereichs zwischen den Schnittstellen *Kpn*I und *Sac*I wurde dieser mit den Sequenzierungsprimer FP, RP und seqIII (Tab. 2.9) vollständig durchsequenziert.

Tab 2.9: Nukleotidsequenzen der Sequenzierungsprimer FP, RP und seqIII

	Nukleotidsequenz
FP	5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3'
RP	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
seqIII	5'-GCCCAGGTCACCGGCATG-3'

Ein mutierter pSW4-Kon wurde schließlich für die Rückführung des *Kpn*I/*Sac*I-Fragments in den Vektor pSE3 verwendet. Hierzu wurden ca. 10 ng des pSE3 und ca. 15 ng des mutierten pSW4 mit jeweils 40 u der beiden Restriktionsenzyme (*Kpn*I & *Sac*I) in einem präparativen Ansatz (Kap. 2.6.5.2) geschnitten, und der Vektor dephosphoryliert. Nach einer Ligation (Kap. 2.6.8.1), bei der jeweils ca. 50 ng des geöffneten Vektors und des mutierten pSW4-*Kpn*I/*Sac*I-Fragments eingesetzt wurden, konnte der Ansatz, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, transformiert werden. Nach einer erfolgreichen Überprüfung der Klone durch eine Restriktion mit dem Enzym *Xba*I, und einer Sequenzierung über die Mutationsposition mit dem Primer seqIII, konnte ein positiver Klon pSW6 isoliert werden. Sein Plasmid trägt als Nachkomme des pSE3 nun nur noch die unerwünschte Strep-tag II-Sequenz des pSE1.

2.6.12.2 Deletion im Subklon pSW5

Parallel dazu sollte der, für die Deletion der DNA-Sequenz (Position 1275-1311) benötigte, Subklon pSW5 aus dem *Bam*HI/*Xho*I-Fragment des pSE3 und ebenfalls dem Klonierungsvektor pBSK II hergestellt werden. Nach der Ligationsreaktion konnten trotz Variation des Vektor/Insert-Verhältnisses, Überprüfung der Plasmide und Enzyme, sowie Optimierung der präparativen Ansätze keine positiven Klone erzeugt werden. Die Klonierungsstrategie für die Herstellung des Subklons wurde geändert und das *Bam*HI/*Xho*I-Fragment stattdessen mittels PCR, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, durch zwei außerhalb dieser Schnittstellen bindenden Primer, BamSE3 und XhoSE3, hergestellt (Tab. 2.10), um es dann später durch „blunt end“ Ligation (Kap. 2.6.8.2) mit dem pSTBlue-I zu verbinden. Das PCR-Fragment enthält nun beidseitig über die Schnittstellen hinausragend insgesamt 1865 bp, wohingegen das durch die zwei Schnitte *Bam*HI und *Xho*I entstehende Fragment aus pSE3 nur 1783 bp groß gewesen wäre.

Tab 2.10: PCR-Primer zur Erzeugung des *Bam*HI/*Xho*I-überspannenden Fragments

	Nukleotidsequenz
BamSE3	5'-CATTCTGATTGCTGGTCTGTTGCCG-3'
XhoSE3	5'-GCGTACGGACCCATAACAACCGC-3'

Für die PCR wurden ca. 60 ng pSE3 als Template-Plasmid in den Reaktionsansatz gegeben und anschließend das in Tabelle 2.11 aufgeführte Temperaturprogramm durchlaufen.

Tab. 2.11: PCR-Programm zur Erzeugung des *Bam*HI/*Xho*I-überspannenden Fragments

95°C	5 min	Primäre Denaturierung
55°C	1 min	Hybridisierung
72°C	5 min	Elongation
95°C	1 min	Denaturierung
72°C	10 min	Terminale Elongation
4°C	bis zur weiteren Verwendung	Kühlung

Die drei Temperaturschritte in der gestrichelten Umrandung durchliefen 25 Zyklen.

Es folgte eine Zugabe von 20 u *DpnI* zur Verdauung des pSW3-Ausgangsmaterials und eine Aufreinigung des PCR-Produktes mittels Gelelektrophorese. Nach der Isolierung des 1865 bp großen DNA-Fragments aus dem Gel musste dieses aufgrund seiner glatten Enden über eine „*blunt end*“ Ligation mit dem dephosphoryliert und linearisiert vorliegenden *blunt end* Vektor pSTBlue-I (Kap. 2.5.2) verbunden werden. Es wurden ca. 60 ng des PCR-Produkts in die Ligation eingesetzt, und der Ligationsansatz danach in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Einzelne Klone wurden zunächst anhand einer Restriktionsanalyse auf erfolgreiche Insertion, und dann durch eine Sequenzierung auf die korrekte Amplifizierung des PCR-Fragments überprüft. Dazu wurden die in Tabelle 2.12 aufgeführten Primer verwendet.

Tab 2.12: Nukleotidsequenzen der Sequenzierungsprimer T7, seqVII, seqVIII und seqIX

	Nukleotidsequenz
T7	5'-CTAATACGACTCACTATAGG-3'
seqVII	5'-GGCGCCGAGAAGATCATCGAACG-3'
seqVIII	5'-CCACGATGTCGCTGTTAGCAGC-3'
seqIX	5'-GGCCTGGCCGAGGATTGTTGCG-3'

Der entstandene Subklon pSW5 (5716 bp) enthält nun *atpE*, *atpF*, *atpH* (Untereinheit c, b, δ), sowie Teile von *atpB* (I223-H271 der Untereinheit a) und von *atpA* (M1-Y79 der Untereinheit α). Die Sequenzdeletion im nichtcodierenden Bereich zwischen *atpE* und *atpF* wurde nach dem PCR-Verfahren aus Abbildung 2.2 B durch Ausgrenzung des Sequenzbereiches von zwei am 5'-Ende mit Phosphat lyophylisierten Primern (Tab. 2.13) hergestellt.

Tab 2.13: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für den pSW5

	Nukleotidsequenz
PvSubc_lang	5'-P-TAGTAAGCGATGCATTTATTTAAAGAGCAATATCAGAACG-3'
PrSubcSE3	5'-P-ATGATGATGATGATGATGGCTAGCGAC-3'

Abbildung 2.3 zeigt den entsprechenden Ausschnitt der Nukleotidsequenz der Plasmide pSE1 und pSE3, sowie der hergestellten Deletionsmutante mut. pSW5 mit den beiden eingesetzten Primern PvSubc_lang und PrSubcSE3. Der PCR-Ansatz enthielt ca. 60 ng des Template-Plasmids pSW5 und durchlief, dass in Tabelle 2.14, dargestellte PCR-Programm.

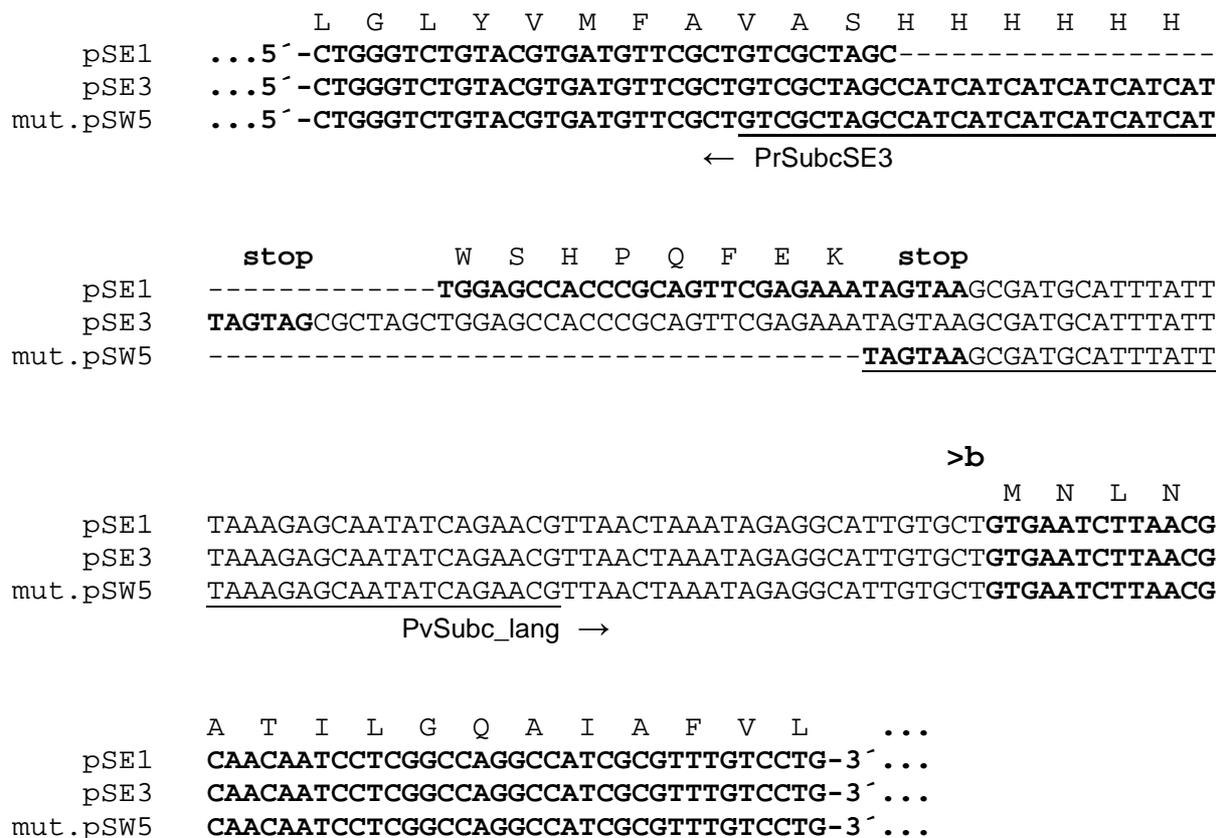


Abb. 2.3: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereich der Untereinheit c vom mutierten pSW5 im Vergleich zu pSE1 und pSE3. Die Sequenz der Primer ist unterstrichen, die His₆-tag Sequenz grün und die Strep-tag II Sequenz orange hervorgehoben.

Tab. 2.14: Temperaturprogramm für Sequenzdeletion im pSW5

95°C	5 min	Primäre Denaturierung
58°C	1 min	Hybridisierung
72°C	10 min	Elongation
95°C	1 min	Denaturierung
72°C	10 min	Terminale Elongation
4°C	bis zur weiteren Verwendung	Kühlung

Die drei Temperaturschritte in der gestrichelten Umrandung durchliefen 18 Zyklen.

Danach sorgte die Zugabe von 20 u *DpnI* für die Verdauung der Template-DNA, und nach einer 1h Inkubation wurde das PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und ligiert. Dazu wurden ca. 30 ng des PCR-Produktes mit 400 u T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Nach einer Transformation dieses Ligationsansatzes wurden Klone mit Hilfe einer Restriktionsanalyse und einer Sequenzierung, mit den in Tabelle 2.12 aufgelisteten Primern, überprüft. Das erfolgreich mutierte pSW5 Plasmid, um 37 bp deletiert, wurde schließlich für die Rückführung des *BamHI/XhoI*-Fragments in den Vektor pSW6 verwendet. In einem präparativen Ansatz wurden ca. 10 ng des pSW6 und ca. 20 ng des mutierten pSW5 mit jeweils 40 u der beiden Restriktionsenzyme (*BamHI* und *XhoI*) geschnitten, und der Vektor durch CIAP dephosphoryliert. Bei der nachfolgenden „sticky end“ Ligation (Kap. 2.6.8.1) wurden jeweils ca. 100 ng des geöffneten Vektors und des mutierten pSW5 *BamHI/XhoI*-Fragments eingesetzt. Die erhaltenen Klone wurden durch eine Restriktionsanalyse und eine Sequenzierung mit den zwei über die beiden Mutationen reichenden Primer seqVIII (Deletion der DNA-Sequenz von Position 1275-1311) und seqIII (Insertion der Base Guanin) überprüft. Der positive Klon pSW7 wurde erfolgreich in DK8-Zellen transformiert und auf sein Succinat-Wachstum getestet (Kap. 2.6.11). Ein direkter Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleich vom „reparierten“ pSW7 bzw. SW7 mit pSE1/SE1 und pSE3/SE3 ist im Anhang aufgeführt.

2.7 Biochemische Arbeitsmethoden

2.7.1 Zellanzucht und Ernte von *E. coli* DK8-Mutanten

Die Zellanzucht von *E. coli* DK8-Mutanten in größeren Mengen erfolgte in drei Schritten. Gestartet wurde mit einer LB-Vorkultur von 50 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin. Diese wurde entweder mit Zellen einer Succinat-Agarplatte oder einer Stammkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (ca. 200 rpm) inkubiert. Als nächstes wurde diese LB-Vorkultur in 1 l ampicillinhaltigem Minimalmedium (MM-Vorkultur) ausgedünnt, bis die Lösung leicht trüb war, und erneut bei gleichen Bedingungen für gute 8 h inkubiert. Im letzten Schritt konnte nun die eigentliche Hauptkultur, bestehend aus 12-16x 1 l ampicillinhaltiges Minimalmedium, mit der MM-Vorkultur so angeimpft werden, dass jeder Kolben eine OD_{600 nm} von 0,05-0,1 besaß. Die Hauptkulturen wuchsen über Nacht heran (aerobe Bedingungen) und wurden am darauf folgenden Tag bei einer OD_{600nm} von ca. 1,8 geerntet. Dazu wurden die Zellen durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 6.000 UPM aufkonzentriert. Die pelletierte Biofeuchtmasse wurde mit dem Pinsel in Puffer1 so aufgenommen, dass eine Konzentration von 200-250 mg/ml vorlag. Die Suspension wurde homogenisiert und zur Lagerung in einem Plastikgefäß bei -80°C eingefroren.

2.7.2 EF₁-Präparation

2.7.2.1 EF₁-Isolierung

Die Präparation von EF₁-Komplexen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Wise et. al. (1990). Handelt es sich bei den isolierten EF₁-Komplexen um Mutanten, die mehr als ein Cystein enthielten (Kap. 3.1.1) wurden zusätzlich Puffer1 und 2 mit 5 mM DTT, sowie PufferA und B mit 1 mM DTT versetzt, wobei DTT immer erst direkt vor dem Gebrauch frisch zugesetzt wurde. Die bei -80°C eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut, mit einer Spatelspitze Desoxyribonuklease I (2-5 mg) versetzt und für 30 min auf Eis gerührt. Mit Hilfe der *French Pressure Cell Press* wurden die Zellen in 1-2 Durchgängen bei 20.000 PSI (entspricht 1380 bar) aufgeschlossen und nicht aufgebrochene Zellen und Zelltrümmer in einer 20 min Zentrifugation (15.000 UPM, 4°C) sedimentiert. Die Membranvesikel mit den gewünschten EF₀EF₁-Komplexen lagen danach im Überstand vor. Eine Ultrazentrifugation (250.000 x g bzw. 45.000 UPM, 60 min, 4°C) ermöglichte ihre Ablagerung im Pellet. Die Membranen wurden mit dem Pinsel in 130 ml Puffer2 resuspendiert und homogenisiert. Es folgte eine weitere Ultrazentrifugation unter denselben Bedingungen, wobei das Pellet anschließend in 130 ml Puffer3 aufgenommen und erneut homogenisiert wurde. Nachdem mit einer weiteren einstündigen Zentrifugation bei 250.000 g und 4°C das Pellet gereinigt, und in

130 ml Puffer4 resuspendiert und homogenisiert wurde, kam es durch das enthaltene EDTA zum Ablösen der EF₁-Komplexe von den Membranen. In der letzten einstündigen Zentrifugation (250.000 g bei 4°C) wurde das solubilisierte Protein von den Membranen abgetrennt und lag als EF₁-EDTA-Rohextrakt im Überstand vor. Zur Stabilisierung des Proteins wurde dieser noch mit 1 mM Mg²⁺-ATP versetzt.

2.7.2.2 Aufreinigung von EF₁-Komplexen

Die erste Aufreinigung der EF₁-haltigen Proteinlösung erfolgte direkt nach der Isolierung mittels einer Anionenaustauschchromatographie über eine TSK-DEAE 650(S)-Säule (30 ml Gelbettvolumen, Flussrate 8 ml/min), welche vorher mit 2 M NaCl gewaschen und mit PufferA äquilibriert wurde. Das Ablösen der Proteine von der Matrix erfolgte durch eine salzabhängige Stufenelution mit 10%, 15%, 30%, 50% und 100% PufferB. Die einzelnen Fraktionen wurde gesammelt und auf ihren Proteingehalt (Kap. 2.7.9) und ihre ATPase Aktivität (Kap. 2.7.10) untersucht. Die Fraktionen mit einer Na₂SO₄-Konzentration von 75-150 mM enthielten die gesuchte EF₁-ATPase und wurde zur Stabilisierung mit 0,1 mM Mg²⁺-ATP versetzt. Wurde das EF₁-Material nicht direkt weiter verarbeitet, konnte es mittels 70% Ammoniumsulfat gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

Die weitere Reinigung der EF₁-Euate erfolgte mittels Größenausschlußchromatographie und Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Lag das Protein als (NH₄)₂SO₂-Präzipitat vor, wurde die gewünschte Menge abzentrifugiert (10 min, 14.000 rpm, 4°C) und in KG-Puffer aufgenommen. Bei der anschließenden Gelchromatographie mit der entsprechenden Säule (Nap-5, Nap-10, PD-10, jeweils mit Sephadex G-25) wurde sowohl bei der Äquilibration als auch bei der Elution immer der KG-Puffer verwendet und so die Probe von Ammoniumsulfat befreit. Bei der Größenausschlußchromatographie werden die Moleküle aufgrund ihrer Diffusionsgeschwindigkeit in der Gelmatrix, und somit nach ihrer Größe, getrennt. Wurde allerdings das EF₁-Material nicht mit Ammoniumsulfat gefällt, sondern direkt weiter verwendet, konnte auf die Gelfiltration verzichtet werden. Der nächste Schritt war dann die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Dabei ermöglichte der His₆-tag, eine Region aus sechs aufeinander folgenden Histidinen, eine spezifische Bindung an das Ni-NTA-Material. Während andere Proteine von der Säule gewaschen wurden, konnte der reine EF₁-Komplex unter Zusatz von Imidazol, das die His-Tags von den Bindungsplätzen verdrängt, eluiert werden. Das Äquilibrieren des Ni-NTA-Materials erfolgte ebenfalls mit dem KG-Puffer. Nach der Aufgabe des EF₁-Eluats wurde mit Ni-Waschpuffer gewaschen, das Protein mit Ni-Elutionspuffer in 0,5 ml-Fractionen aufgefangen und die proteinhaltigen Fraktionen vereint.

2.7.3 Oxidation/Reduktion an EF₁-Komplexen von Cystein-Doppelmutanten

Cystein-Doppelmutanten sind ATPasen, die zwei unter oxidierenden Bedingungen verknüpfbare Cysteine enthalten. Für eine Blockade der Rotationsbewegung von der Untereinheit γ relativ zum $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon muss sich ein Cystein in γ und das andere auf einer der Untereinheiten des Hexagons befinden. Für die Verknüpfung, von zwei sich nahe liegenden Cysteinen wurden die EF₁-Proben mit verschiedenen oxidierenden Reagenzien (je 100 μ M DTNB, DTP, CuCl₂ und J₂) versetzt. Ebenso wie die Oxidation erfolgte auch die Reduktion des Proteinkomplexes (20 mM DTT) in Gegenwart von 2mM ATP im KG-Puffer über Nacht bei RT. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 20 mM NEM abgestoppt, so dass keine Disulfidbrücke mehr durch eine mögliche Oxidation mit Luftsauerstoff gebildet werden konnte, da NEM mit den Thiolen von Cysteinen reagiert. Nach einer Inkubation von etwa 5-10 min wurden die Proben durch Gelfiltration gereinigt, ihre Hydrolyse-Aktivitäten gemessen und Gelproben abgenommen (Kap. 2.7.6).

Bei einer zeitaufgelösten Verfolgung der Bildung, bzw. Rückbildung einer Quervernetzung wurden die EF₁-Mutanten nach der vollständigen Überführung in die oxidierte oder reduzierte Form gelfiltriert, ohne zwischenzeitlich mit NEM abgestoppt worden zu sein. Der Start der Kinetik erfolgte bei der oxidierten Probe durch die Zugabe von 20 mM DTT und umgekehrt bei der reduzierten Probe durch Zugabe von 100 μ M Oxidationsmittel. Zur Beobachtung des Reaktionsfortschritts wurden zu definierten Zeiten Proben abgenommen, die dann sofort mit 20 mM NEM abgestoppt wurden. Nach 5 min Inkubation wurden die Proben für das SDS-Gel mit 10 % TCA gefällt und im Kühlschrank gelagert.

2.7.4 Biotinylierung von EF₁

Bei der Biotinylierung von EF₁-ATPase-Komplexen kommt es zur kovalenten Verknüpfung von Biotin mit dem Cystein in γ 108, um eine späteren Kopplung von F-Aktin über Streptavidin zu ermöglichen (Kap. 2.8.2). Hierzu wurden die Proben, wie bereits beschrieben, aufgereinigt (Kap. 2.7.2.2) und beim KH7-EF₁ mit einem 20-fach molaren Überschuss an Biotin-PEAC₅-maleimid versehen für 20 min bei RT inkubiert. Eine Ni-NTA-Chromatographie trennte die EF₁-Probe vom überschüssigen Biotin und anderen Verunreinigungen ab. Danach wurde das biotinylierte Enzym portioniert und bei -80°C eingefroren.

Bei den Cystein-Doppelmutanten, die ebenfalls ein Cystein in Position γ 108 besitzen, musste die Biotinkonzentration auf ein äquimolares Verhältnis von 1:1 an Enzym zu Biotin-PEAC₅-maleimid reduziert werden, um die zur Quervernetzung vorgesehenen Cysteine nicht ebenfalls durch Biotin zu blockieren. Es folgte erst eine Oxidation der einen Probe über Nacht, die der Blockade des Enzyms diente. Erst jetzt wurde das Oxidationsmittel und das freie Biotin über eine Gelfiltration oder Ni-NTA-Chromatographie entfernt wurde. Dieses Proben wurden nicht eingefroren, sondern nur frisch vermessen.

2.7.5 EF₀F₁-Präparation

2.7.5.1 Herstellung von EF₀F₁-Membranen

Die EF₀F₁-Präparation gliedert sich in zwei Teile. Bei der Herstellung der EF₀F₁-Membranen wurden, wie bereits bei der EF₁-Präparation in Kapitel 2.7.2.1 beschrieben, die Zellen aufgetaut, mit der *French Press* aufgeschlossen, durch eine niedertourige Zentrifugation von Zelltrümmer befreit und in einer Ultrazentrifugation (45.000 UPM, 60 min, 4°C) die gewünschten Membranvesikel im Pellet angereichert. Die Membranen wurden nun jedoch in 130 ml EF₀F₁-Waschpuffer resuspendiert, homogenisiert und für 30 min auf Eis gerührt. Die Ultrazentrifugation, die anschließende Aufnahme der Pellets bis hin zur 30-minütigen Inkubation wurde unter denselben Bedingungen ein zweites Mal durchgeführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 90 min bei 250.000 g und 4°C war die Reinigung der EF₀F₁-Membranen abgeschlossen. Die Pellets konnten in ca. 16 ml Lagerungspuffer (gewünschte Konzentration ~30 mg/ml) aufgenommen, homogenisiert und portioniert werden. Danach wurden die 2 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.5.2 EF₀F₁-Isolierung

Das Lösen von EF₀F₁-Komplexen aus den Membranen erfolgte mit Hilfe von Detergenzien (Seifen). Zum Solubilisieren muss die Detergenzkonzentration größer sein als die kritische Mizelläre Konzentration (CMC), denn nur so können sich Mizellen bilden, in die sich die Membranlipide einlagern können. Für die Isolierung wurden 4-8 ml der aliquotierten Membranen aufgetaut und mit Extraktionspuffer auf ein Endvolumen von 25 ml aufgefüllt. Unter langsamem, permanentem Rühren der Lösung auf Eis wurde nun in zwei Schritten das Detergenz vorsichtig tropfenweise zugegeben, wobei auf die erste Zugabe eine 15 min und auf die zweite Zugabe eine 30 min Inkubation folgte. Dazu wurden 1 ml bzw. 1,2 ml einer 25% Octylglycosid (gesamt 2,2% OG; CMC: 25 mM) Stammlösung eingesetzt. Nach dieser Solubilisierung konnten durch eine Zentrifugation (90 min, 100.000 g, 4°C) aus dem Überstand die wasserlöslichen Protein-Seife-Phospholipid-Komplexe gewonnen werden.

2.7.5.3 Aufreinigung von EF₀F₁-Komplexen

Das EF₀F₁-Extrakt wurde durch Ni-NTA- und Streptactin-Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt, wobei entweder nur eine der beiden Säulen oder beide hintereinander verwendet wurden. Bei der Streptactin-Affinitätschromatographie ermöglicht der Strep-tag II eine spezifische Bindung an die Streptactin-Sepharose. Während andere Proteine von der Säule gewaschen wurden, konnte der EF₀F₁-Komplex erst durch Zusatz von Destiobiotin im Elutionspuffer die Strep-tag II von den Bindungsplätzen verdrängen. Handelte es sich bei der

ersten um eben diese Streptactin-Säule, musste das im Überstand enthaltene Biotin durch Avidin abgesättigt werden, um die Bindung des Proteins an die Streptactin-Sepharose nicht zu stören. Dazu wurde dem Extrakt 15 µg Avidin zugefügt und 30 min bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt entfällt, wenn der Überstand als erstes über Ni-NTA-Superflow gereinigt wird. Im nächsten Schritt musste das Extrakt mit dem zugehörigen, jeweils als A bezeichneten Puffer auf 1% OG verdünnt und für 15 min mit dem äquilibrierten Säulenmaterial (mit demselben Puffer) auf dem Schüttler inkubiert werden. Das Waschen der Säule erfolgte mit Nickel A oder Strep A, und die Elution des Proteinkomplexes mit Nickel B oder Strep B, wobei vorher jedem Puffer 1% OG zugegeben wurden. Nach einer Elution in 0,5 ml Fraktionen wurden die Protein-enthaltenden Proben vereinigt, vermessen und gegebenenfalls einer weiteren Affinitätschromatographie unterzogen.

2.7.6 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Das SDS denaturiert die Proteine und unterbindet die Protein-Protein-Wechselwirkungen, so dass sich diese nur noch in ihrer Größe unterscheiden. Die Trennung im elektrischen Feld erfolgt durch den Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix. Es wurden entweder kleine Probevolumina mit 8-25%-igen Gradientengelen und dem PhastGel-System aufgetrennt, oder aber bei einer größeren Probenmenge das Laemmli-System mit einem 12,5%-igen Trenngel verwendet.

2.7.6.1 PhastGel-System

Für die Auftrennung mit dem PhastGel-System wurden 60 µg einer Proteinprobe mit 10% TCA gefällt, dann für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert und für 20 min in der Tisch-Zentrifuge (4°C, 14.000 rpm) abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das sedimentierte Protein in 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen, und eine zweite Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4°C) durchgeführt. Das Aceton wurde entfernt, und das Pellet für 20-30 min an der Luft getrocknet. Dann wurden das Pellet entweder in 20 µl PufferPP oder PP+ (ohne bzw. mit β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 4 min gekocht. Es wurden ca. 0,3 µl dieser Proteinprobe (3 µg/µl) auf ein 8-25% SDS-Gel aufgetragen, was etwa einer Proteinmenge von 900 ng entspricht. Die Auftrennung der einzelnen Untereinheiten ihrer Größe entsprechend, erfolgte nach Herstellerangaben für etwa 30 min im Phast-Gel System. Mit Hilfe der Comassie-Färbung wurden die Banden auf den Gelen sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel über Nacht in der Farbstofflösung (Coomassie-Färbereagenz) getränkt und anschließend ungebundener Farbstoff mit dem Entfärber herausgewaschen. In manchen Fällen schloss sich hinterher noch eine Silberfärbung mit Hilfe der Entwicklereinheit des Phast-Gel Systems an. Dabei wurde 20% TCA zur Fixierung, Silber-Entwicklerlösung zur

Reduktion und 40% (v/v) Methanol zum Waschen verwendet. Für die Farbreaktion wurde das Gel mit 5 ml Silber-Färbereagenz A und 9 ml Silber-Färbereagenz B versetzt. Mit dem Eintreten der Bandenschwärzung wurde die Reaktion gestoppt, indem das Gel in die Stopplösung umgelagert wurde.

2.7.6.2 Laemmli-System

Für die Verwendung des Laemmli-Systems (Laemmli, 1970) wurden die Proteinproben genauso vorbereitet wie für das PhastGel-System (Kap. 2.7.6.1). Eine Ausnahme bildete dabei die Untersuchung von Ganzzellhomogenaten von *E. coli* DK8-Mutanten. Dazu mussten Zellkulturen bis zu einer optischen Dichte $OD_{600\text{ nm}} = 1$ herangezogen werden, hier enthält 1 ml Zellsuspension etwa 160-200 μg Protein, und die gewünschte Menge pelletiert, in SDS-Probenpuffer (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aufgenommen und gekocht werden. Es wurden ca. 25 μl Probe aufgetragen und unter denaturierenden Bedingungen bei 200 V in einem SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammelgel (5%) und einem Trenngel (12,5%) aufgetrennt (Tab. 2.15). Nach etwa 1 h konnte das Gel entweder ebenfalls mit Comassie gefärbt, oder einzelne Proteine immunologisch mittels Western-Blot nachgewiesen werden.

Tab. 2.15: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

	5% Sammelgel	12,5% Trenngel
Sammelgelpuffer	1,25 ml	/
Trenngelpuffer	/	2,5 ml
10% SDS	50 μl	100 μl
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (v/v)	850 μl	4,2 ml
10% Ammoniumpersulfat (w/v)	50 μl	34 μl
ddH ₂ O	ad 5 ml	ad 10 ml
TEMED	2,5 μl	2,6 μl

2.7.7 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)

Als Western Blot wird die Methode bezeichnet, bei der Proteine mit Hilfe eines Antikörpers auf einer Membran identifiziert werden können. In Anlehnung an Howe et al. (1981) wurde als erstes ein Proteintransfer, ausgehen von aufgetrennten Proteinproben in einem SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli-System), auf eine PVDF Membran durchgeführt. Diese wurde

nach dem Zuschnitt auf die entsprechende Gelgröße zunächst in Methanol gelegt, und dann zusammen mit dem Gel für 15 min im Transferpuffer inkubiert. Das Gel und die Membran wurden luftblasenfrei aufeinander gelegt, sandwichartig zwischen zwei mit dem gleichen Puffer getränkten Whatman-Papieren und Schwammtüchern geklemmt und in eine mit gekühltem Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 1 A und 4°C für eine Dauer von 70 min, wobei die Banden der aufgetrennten Gelproben aus dem Gel in die Membran wandern. Danach wurde die Membran ca. 60 min in Blockpuffer inkubiert, um nicht mit Protein besetzte Stellen zu blockieren. Es folgte die Zugabe des spezifisch an eine Untereinheit bindenden, primären Antikörpers, der in Blockpuffer entsprechend vorverdünnt wurde (entweder polyklonale Maus-Antikörper anti- α 1:200.000 oder anti- γ 1:50.000) und eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die Membranen zehnmal je 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre monoklonale Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockpuffer zugegeben. An diesen Antikörper war Peroxidase aus dem „Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Kit“ gekoppelt. Nach einer Inkubation für 30-60 min bei Raumtemperatur wurde die PVDF-Membran erneut zehnmal je 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion des sekundär-primär Antikörper-Protein-Komplexes wurde die Membran für 1 min in „Lumi-Light^{PLUS}“ Reagenz, welches vor allem Peroxid und Luminol enthält, geschwenkt. Die entstandene Chemolumineszenz beruht auf einer Reaktion, bei der die an den sekundären Antikörper gebundenen Peroxidase mit dem zugegebenen Peroxid Radikale bildet, die eine Anregung des Luminols zur Folge haben. Durch 10-30 s Belichtung eines Hyperfilms wurde die Lumineszenz detektiert, und abschließend eine Negativentwicklung durchgeführt.

2.7.8 Polymerisierung und Färbung von G-Aktin

Als Ausgangsmaterial diente Acetonpulver, der aus den Muskelzellen eines Kaninchens gewonnen und aus dem von G. Hikade (Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück) G-Aktin isolierte wurde (Pardee und Spudich, 1982). In einem weiteren Schritt wurde an diese Monomere Biotin über eine terminale Maleimid-Funktion des Biotin-PEAC₅-maleimids gebunden (hergestellt von H. Kenneweg, Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück). Für die Polymerisierung des biotinylierten G-Aktins wurde 20 mM Mops/KOH pH 7, 100 mM KCl und 10 mM MgCl₂ zugegeben. Die Färbung des Aktins erfolgte durch die anschließende Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Phalloidin-Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat (PTMR) in einem äquimolaren Verhältnis von PTMR zu G-Aktin (42 kDa). Phalloidin ist ein Gift des Weißen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, das die Depolymerisation verhindert, und so für eine Stabilisierung des entstandenen F-Aktins sorgt. Das TMR stellt den eigentlichen fluoreszierenden Farbstoff dar, der über eine Isothiocyanatgruppe an das Phalloidin gebunden ist (Abb. 2.4). Für eine vollständige F-Aktinbildung wurde die Probe etwa 3 Stunden bei 4°C gelagert. Es kommt dabei zur Anlagerung von 200-250 Farbstoffen pro μm Filamentlänge.

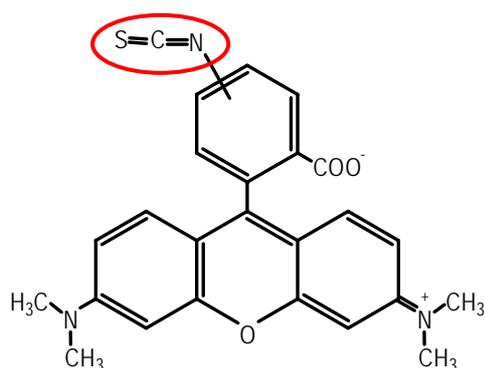


Abb. 2.4: Strukturformel des Farbstoffes TMR. Die Bindung an Phalloidin erfolgt über die Isothiocyanatgruppe (rot).

2.7.9 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Sedmark & Grossberg)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden meistens Dreifachansätze zur Mittelwertbildung gemacht, wobei, wie in Tabelle 2.16 aufgeführt, X μ l Probe mit ddH₂O auf 500 μ l aufgefüllt und mit 500 μ l S&G-Farbreagenz versetzt wurden (Sedmak und Grossberg, 1994). Danach wurde die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Die photometrische Detektion beruht auf der Absorptionsänderung des enthaltenen Farbstoffs Serva-Blau G-250. Eine Kalibrierung erfolgte über eine Standardkurve mit Lysozym (5-40 μ g/ml).

Tab. 2.16: Pipettierschema zur Bestimmung der Proteinkonzentration

	Leerwert	Probe
ddH ₂ O in μ l	500	500 – X
Probenvolumen in μ l	/	X
S&G-Reagenz	500	500

2.7.10 Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität (nach LeBel)

Die ATPase Aktivität von EF₁- und EF₀F₁-Komplexen kann aufgrund der durch ATP-Hydrolyse gebildeten Phosphatmenge (P_i), wie in LeBel et al. (1978) beschrieben, gemessen werden. Das frei in der Probe vorliegende Phosphat wird dabei nach Bildung eines Phosphomolybdat-Komplexes durch p-Methyl-Aminophenolsulfat in einem Kupferacetat-Puffer reduziert. Die Absorption der Probe wurde bei 745 nm (A_{745nm}^P) gegen einen Leerwert gemessen. Eine Kalibrierung erfolgte über eine Standardkurve mit K₂HPO₄, wobei 0,022,

0,044, 0,088, 0,131 und 0,175 μmol eingesetzt wurden. Als erstes musste das Protein auf eine Konzentration von 0,01 mg/ml oder in einigen Fällen zusätzlich von 0,1 mg/ml verdünnt werden. Die Reaktionsansätze mit 10, 20 und 30 μl wurden auf 400 μl mit ddH₂O aufgefüllt und durch die Zugabe der Testlösung gestartet (Tab. 2.17).

Tab. 2.17: Pipettierschema zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität von EF₁ und EF₀F₁

	Leerwert		Proben	
ddH ₂ O in μl	400	390	380	370
Probenvolumen in μl	/	10	20	30
Testlösung in μl	100	100	100	100

Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Lagerung auf Eis und die Zugabe von 500 μl eiskalter TCA (0,5 M) abgestoppt. Dann wurden 500 μl LeBel-Reagenz (6 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B + 1 Teil Lösung C) zugegeben und die Proben 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Absorptionsmessung lässt sich mit Hilfe der Standardkurve die Absorption ($A_{745\text{nm}}^S$) von 1 μmol freiem Phosphat (P_i) berechnen. Für die Aktivität der Probe ergibt sich daraus, mit der eingesetzten Menge an Protein (X in μg):

$$\frac{A_{745\text{nm}}^P \cdot 200}{A_{745\text{nm}}^S \cdot X} = \frac{u}{\text{mg}}$$

Die Berechnung ist nur gültig in einem Absorptionsbereich ($A_{745\text{nm}}$) von 0,1 bis 0,5.

2.7.11 Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität von membranassoziierten EF₀F₁-Komplexen

Die Messung der ATP-Hydrolyseaktivität von membranassoziierten EF₀F₁-Komplexen beruht ebenfalls auf dem Nachweis von frei in der Lösung vorliegendem Phosphat (Fiske und Subbarow, 1925). Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine Endpunktbestimmung (Kap. 2.7.10), sondern die Zunahme der Phosphatkonzentration wird zeitaufgelöst photometrisch detektiert. Der Aufbau der Messapparatur erfolgte nach Arnold et al. (1976). Nach der Probenaufgabe kommt es innerhalb des Gerätes zur automatischen, zeitabhängigen Zugabe der verschiedenen Lösungen (Ascorbat-Lösung, Molybdat-Reagenz und Stop-Reagenz), zur

Inkubation in einer auf 40°C temperierten Entwicklungsspirale und zur Detektion der Absorption bei 578 nm. Als Standard wurden 10 ml einer 50 mM KH₂PO₄-Stammlösung eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt die in Tabelle 2.18 aufgelisteten Reagenzien und wurde mit 1-10 µl EF₀F₁-Membranen versetzt. Die Verdünnung der Membranen wurde zuvor so gewählt, dass die Steigung der Absorptionsgeraden gut zu ermitteln war.

Tab. 2.18: Pipettierschema zur Bestimmung der Aktivität von EF₀F₁-Membranen

	Reaktionsansatz
100 mM MgCl ₂	0,1 ml
100 mM ATP	0,1 ml
50 mM Tris/HCl (pH 8.0)	ad 10 ml

Nach einer 2-minütigen Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C wurde die Probe noch einmal gemischt und zur Messung in die Apparatur eingezogen. Für die Messungen der DCCD-Hemmung wurden erst 1 ml des 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) mit der entsprechenden Menge an EF₀F₁-Membranen und 50 µM DCCD versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde der Ansatz ebenfalls, wie in Tabelle 2.18 beschrieben, auf 10 ml aufgefüllt, erneut 2 min inkubiert und vermessen. Die ATP-Hydrolyseaktivität der Probe ergibt sich aus der Höhe der Standardmesskurve S_a und der Steigung der Probenkurve S_e mit der eingesetzten Menge an Protein (X in mg), sowie einem Faktor der sich aus der Konzentration des Standards und der Messdauer von 10 min zusammensetzt.

$$\frac{u}{mg} = \frac{0,05}{X} * \frac{S_e}{S_a} \left[\frac{\mu mol}{min \cdot mg} \right]$$

2.7.12 Bestimmung der Aktivierungsenergien nach Arrhenius

Für die Bestimmung der Aktivierungsenergie wurde indirekt die ATP-Hydrolyseaktivität in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems photometrisch detektiert (Abb. 2.5). Indirekt deshalb, weil tatsächlich der Zeitverlauf eine Absorptionsabnahme bei 340 nm beobachtet wurde, die eine Abnahme der NADH-Konzentration wiedergab. Dieses gilt als Maß für die ATPase-Aktivität, da pro Mol ATP ein Mol NADH umgesetzt wird ($\Delta c_{NADH} = \Delta c_{ATP}$).

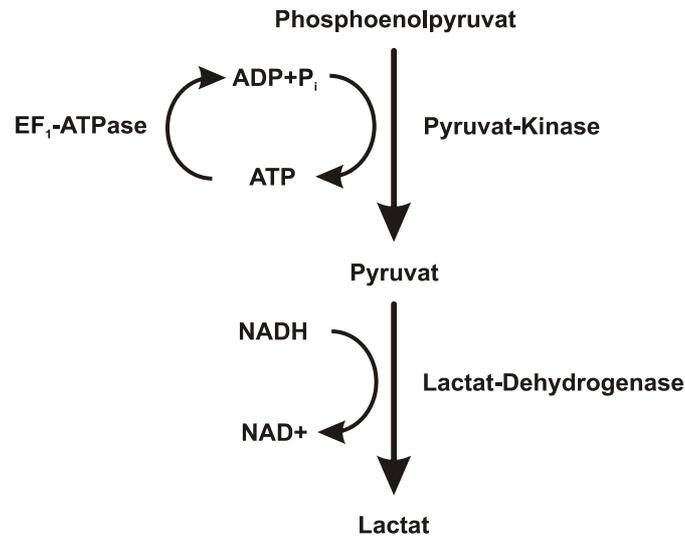


Abb. 2.5: Reaktionsschema des ATP-regenerierenden Systems

Der Aktivitätstest beruht darauf, dass das von der EF₁-ATPase zu ADP und Phosphat hydrolysierte ATP durch die Pyruvat-Kinase in Gegenwart von Phosphoenolpyruvat regeneriert wird (Stiggall et al., 1979). Das entstandene Pyruvat wird dann in einer weiteren Reaktion von der Lactat-Dehydrogenase in Anwesenheit von NADH zu Lactat reduziert. Gekoppelt an diese Reaktion ist die Oxidation von NADH zu NAD⁺ und somit die messbare Absorptionsänderung. Durch diese Reaktionskette wird sowohl eine Substratlimitierung des ATP als auch eine Produkthemmung der ATPase durch das hydrolysierte ADP verhindert. Für die Aktivitätsmessungen wurden aufgereinigte, gegebenenfalls oxidierte oder reduzierte EF₁-Proben verwendet (Kap. 2.7.3). Bei jeder Messung wurde zunächst 1 ml der auf Eis gelagerten Testlösung vortemperierte. Dazu wurde diese für 10 min bei der gewünschten Temperatur im Bereich von 10-40°C im temperierbaren Küvettenhalter des Photometers inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1-2 µg EF₁ gestartet und die Abnahme der Absorption (340 nm) für 5-30 min verfolgt. Mit dem Lambert-Beerschen Gesetzes

$$E = \varepsilon * c * d$$

folgt aus der Steigung $\Delta E / \Delta t$ im linear abfallenden Bereich der Messkurve, dem Extinktionskoeffizient ε für NADH ($6,22 * 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ bei 340 nm) und der Schichtdicke d (1 cm) die Enzymaktivität u in Abhängigkeit von der Zeit (in min), bezogen auf die Stoffmengenänderung Δn_{ATP} in 1 ml (1 cm^3) Reaktionsvolumen.

$$u = \frac{\Delta n_{ATP}}{\Delta t} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = \frac{\Delta E}{6,22 * \Delta t} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]$$

Die spezifische ATP-Hydrolyseaktivität in u/mg folgt aus der eingesetzten Enzymmenge. Die Umsatzrate, die die Zahl der hydrolysierten ATP-Moleküle pro Komplex pro Sekunde angibt, wurde unter Verwendung des Molekulargewichts von EF₁ (384000 g/mol) berechnet.

$$1 \frac{u}{mg} \triangleq 6,4 \frac{1}{s}$$

Bei einer chemischen Reaktion nimmt im allgemeinen die Geschwindigkeit mit steigender Temperatur zu. Die Arrhenius-Gleichung beschreibt dabei die Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur.

$$k = A * e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Aus der logarithmierten Darstellung der Gleichung

$$\ln k = \left(-\frac{E_a}{R} \right) * \frac{1}{T} + \ln A$$

ergibt sich mit der Auftragung der Umsatzrate als $\ln(k)$ über $1/T$ eine Gerade, wobei sich die Aktivierungsenergien E_a aus der Steigung m der Geraden und der Gaskonstanten R ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) berechnen lässt.

$$E_a = -m * R$$

2.8 Biophysikalische Arbeitsmethoden

2.8.1 Instrumenteller Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Bei der Fluoreszenzmikroskopie bzw. der Fluoreszenzmikrovideographie werden Fluorophore durch Licht einer bestimmten Wellenlänge elektronisch angeregt. Die emittierte, rotverschobene Fluoreszenz (Stokes Gesetz) wird mit einer hohen Sensibilität über eine Videokamera detektiert. Es lassen sich dadurch Objekte betrachten, die deutlich kleiner sind als die Wellenlänge sichtbaren Lichts und sich somit der klassischen Mikroskopie entziehen.

Der Strahlengang beim inversen Fluoreszenzmikroskop ist in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt.

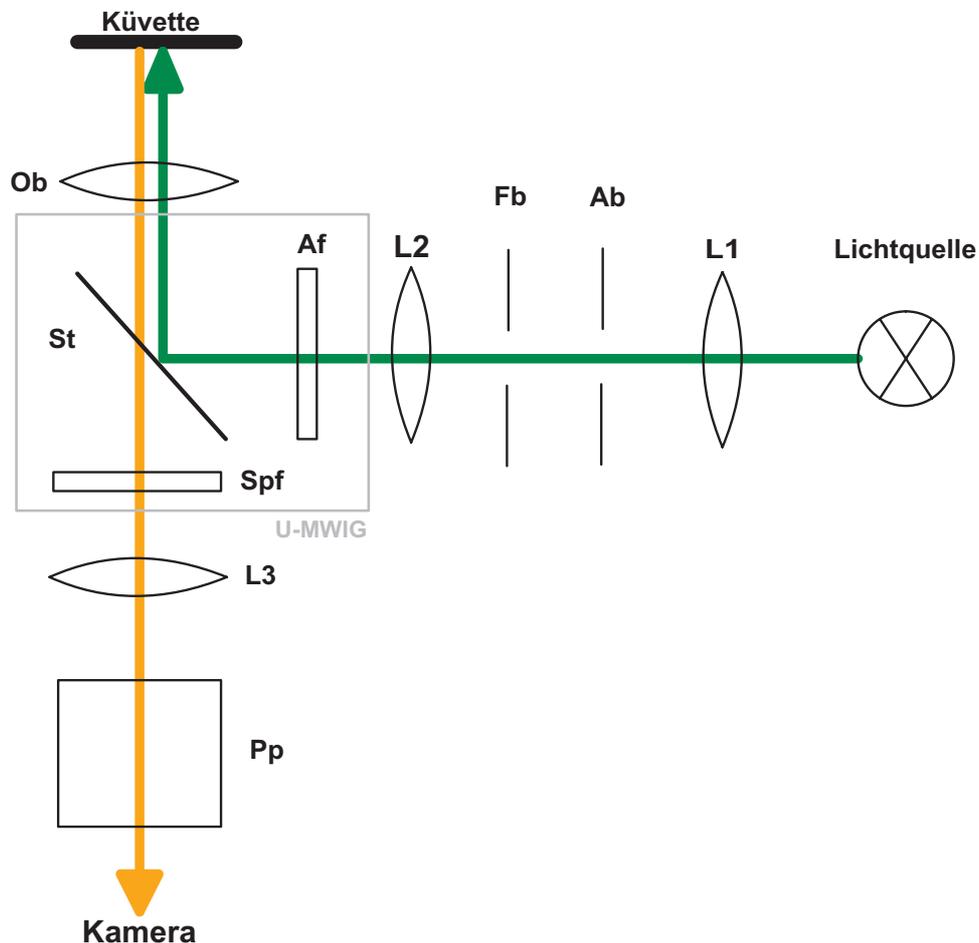


Abb. 2.6: Strahlengang des inversen Aufsicht-Hellfeld-Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70. Das Anregungslicht ist grün und die Fluoreszenz orange dargestellt. L1, L2, L3: Linsen; Ab: Aperturblende; Fb: Feldblende; Ob: Objektiv (100x); Pp: Photoprojektiv; U-MWIG: Filtertubus mit den drei Komponenten Af: Anregungsfilter (BP 520-550), St: dichroitischer Teilerspiegel (DM565) und Spf: Sperrfilter (BA580IF).

Von einer Quecksilberdampfampe ausgehendes Licht wurde im Filtertubus U-MWIG erst gefiltert (BP 520-550), und das durchgelassene Licht der Wellenlänge 520-550 nm am Teilerspiegel DM 565 gespiegelt. Das nachfolgende PlanApo100oil-Objektiv bildete das Anregungslicht auf der mit TMR-markierten Probe ab. Das entstandene rotverschobene Fluoreszenzlicht passierte auf dem umgekehrten Wege den Teilerspiegel und wurde mit Hilfe des Sperrfilters (BA580IF) vom unerwünschten Streulicht befreit. Die Detektion erfolgte mit der SIT-Kamera C2400/08 bei einer 225-fachen Gesamtvergrößerung. Diese ergab sich aus

der Objektiv-Vergrößerung (100x), der Linse L3 (1,5x) und der Photoprojektiv-Vergrößerung (1,5x). Das Beobachtungsfeld hatte damit eine Größe von $\sim 55 \times 44 \mu\text{m}^2$. Bei schwacher Intensität wurde ein Bildverstärker VS4-1845 zwischen Projektiv und Kamera geschaltet, der die Lichtsignale über eine so genannte micro channel plate verstärkt. Die Aufzeichnung erfolgte mit einem VHS-Videorekorder NV-HS950 mit 25 Bildern pro Sekunde (alle 40 ms 1 Bild).

2.8.2 Fluoreszenzmikroskopischer Einzelmolekülnachweis

Der fluoreszenzmikroskopische Einzelmolekülnachweis diente dem Nachweis der relativen Rotation bestimmter Untereinheiten der ATP-Synthase zueinander. Es kam dabei immer zu einer Immobilisierung der Stator-Untereinheit von EF_1 - oder EF_0F_1 -Komplexen auf der Glasplatte. Durch Zugabe von ATP konnte die Rotation durch ein, an die Rotor-Untereinheit gebundenes, markiertes Aktinfilament, beobachtet werden. Dieser Aufbau einer so genannten Kopplungskette beruht auf der spezifischen Bindung einzelner Komponenten und wurde durch die Beschichtung einer Durchflussküvette in der entsprechenden Reihenfolge erzielt. Die Durchflussküvette (Abb. 2.7) bestand aus jeweils einem großen ($26 \times 76 \text{mm}^2$) und einem kleinen ($24 \times 24 \text{mm}^2$) Standarddeckglas (Dicke 0,15 mm). Diese waren durch zwei gefettete Parafilmstreifen, oder später durch doppelseitiges Klebeband, voneinander getrennt. Die Proben wurden an einer Seite der Küvette in den entstandenen Hohlraum, der ein Volumen von 10-20 μl fasst, eingefüllt und gleichzeitig die überschüssige Lösung an der anderen Seite von einem Filterpapier aufgenommen.

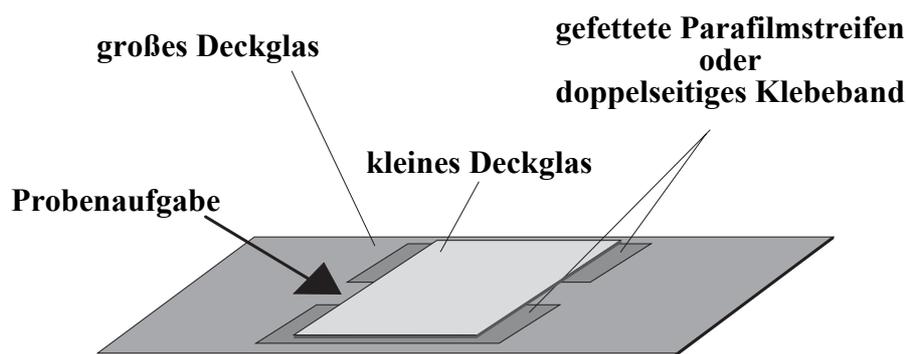
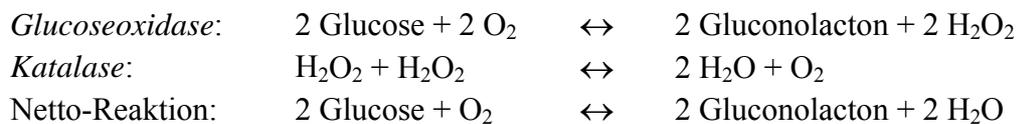


Abb. 2.7: Die Durchflussküvette

Als erstes wurde die Glasoberfläche mit Ni^{2+} -NTA-HRP beschichtet, um eine spätere spezifische Bindung des Enzyms über die His_6 -tags zu ermöglichen (s.a. Ni-NTA-Säule, Kap. 2.7.2.2). Die auf der Glasplatte verbleibenden unspezifischen Bindestellen wurden mit BSA gesättigt. Als nächstes wurde der Enzym-Komplex, entweder EF_1 , solubilisiertes EF_0F_1 oder

membranintegriertes EF_0F_1 , über die His₆-tags an die Oberfläche gebunden. Die Enzymkonzentration wurde je nach Ausgangskonzentration und gewünschter Plattenbeladung variiert, und stellte den limitierenden Faktor auf der Oberfläche dar. Bei EF_1 -Proben wurde als nächste Komponente Streptavidin, das als Verbindung des biotinylierten Cysteins in $\gamma 108$ mit dem nachfolgenden F-Aktin diente, zugegeben. Handelte es sich aber um EF_0F_1 -Proben so wurde an dieser Stelle Streptactin als Verbindungsglied zwischen den Strep-tags des Proteins und dem F-Aktin genutzt (s.a. Streptactin-Säule, Kap. 2.7.5.3). Bevor nun das biotinylierte F-Aktin auf die Platte gegeben werden konnte, musste das polymerisierte Konstrukt (Kap. 2.7.8) zur Verkürzung der F-Aktinfäden durch die Scherkräfte 3x durch eine 200 μ l Pipette gezogen werden. Es erfolgte eine Inkubation von 7-10 min für die Anlagerung der Filamente, alle anderen Komponenten wurden nur 4 min auf der Platte inkubiert. Da jede Komponente im Überschuss auf die Platte gegeben wurde, kam es vor der Zugabe der nächsten Substanz immer zu einer Spülung mit dem jeweiligen Puffer, um ungebundene Proteine zu entfernen. Im letzten Schritt wurde nun noch das Oxygen Scavenger System (OSS) zur Unterdrückung der Farbstoffbleichung zugegeben. Die Lösung beinhaltete die Enzyme Glucoseoxidase und Katalase, die mit der Hilfe von Glucose den Luftsauerstoff abbauen, wie im nachfolgenden Reaktionsschemata dargestellt, und so die lichtabhängige, irreversible Oxidation des Farbstoffes verhindern.



Des Weiteren waren β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel, und 5mM ATP standardmäßig in der Reaktionslösung enthalten.

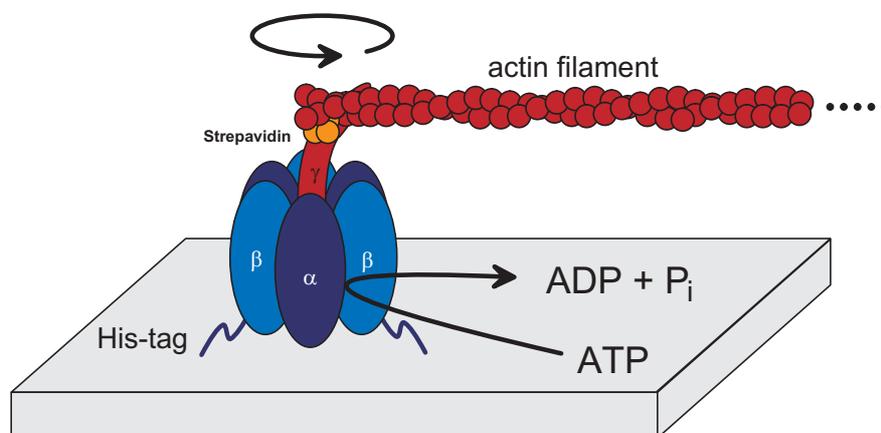


Abb. 2.8: EF_1 -Rotationsexperiment - Schematische Darstellung der Komplexbildung auf der Glasoberfläche. Der rotierende Teilkomplex ist in rot und der Stator in blau dargestellt. Verändert nach (Pänke et al. 2000).

Bei den EF₁-Rotationsexperimenten, dessen Aufbau in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt wurde, erfolgte der Aufbau der Kopplungskette nach der in Tabelle 2.19 gezeigten Reihenfolge. Jede Durchflussküvette wurde 30 min nach gegen den Uhrzeigersinn rotierenden Aktinfilamenten abgesucht.

Tab. 2.19: Reihenfolge der Oberflächenbeschichtung bei EF₁-Rotationsexperimenten

	Volumen	Komponenten	Inkubationszeit
1.	2 x 25 µl	0.8 µM Ni ²⁺ -NTA-HRP in MKM-Puffer	4 min
2.	2 x 25 µl	BMKM-Puffer	4 min
3.	2 x 25 µl	MKM-Spülung	
4.	2 x 25 µl	5-15 nM EF ₁ in MKM-Puffer	4 min
5.	2 x 25 µl	MKM-Spülung	
6.	2 x 25 µl	0.5 µM Streptavidin (SA) in MKM-Puffer	4 min
7.	3 x 25 µl	MKM-Spülung	
8.	2 x 25 µl	200 nM PTMR-markiertes F-Aktin in MKM-Puffer	7-10 min
9.	3 x 25 µl	MKM-Spülung	
10.	2 x 25 µl	Reaktionslösung in MKM-Puffer	

Für die Untersuchung der Rotationsbewegung von solubilisierten EF₀F₁-Komplexen musste der Versuch geringfügig geändert werden. Im Aufbau der Kopplungskette (Tab. 2.19) entfällt der 3. Schritt, Streptavidin wird bei gleicher Konzentration gegen Streptactin und der MKM-Puffer in den Schritten 4.-9. gegen den Puffer D ausgetauscht.

Die Rotationsexperimente an EF₀F₁-Membranen verliefen ebenfalls nach einer Variante des Protokolls für die EF₁-Rotationsexperimente. Hierbei wurden 0,5-1 mg/ml EF₀F₁-Membranen in MKM-Puffer aufgenommen und für eine verlängerte Periode von 10 min auf der Oberfläche inkubiert. Des weiteren wurde in den Schritten 4. bis 9. der MKM-Puffer durch BMKM-Puffer ersetzt.

2.9 Benutzte Software

Die folgende Software wurde zur Auswertung und Verarbeitung der Daten gebraucht:

- WORD 2003 (Microsoft) – Textverarbeitung

- MULTALIN Version 5.3.3 (Internet-Adresse: <http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>) – Sequenzenvergleich
- CHROMAS 1.43 (Conor McCarthy) – Darstellung von Sequenzen
- CLONE 4.01 (Scientific & Educational Software) – Erstellung der Plasmidkarten
- ADOBE PHOTOSHOP CS 8.0.1 (Adobe), MICROGRAFX DESIGNER 7.1 (Micrografx), COREL DRAW 12 (Corel Corporation) und RASMOL 2.7.2.1.1 (Bernstein + Sons) – Bildbearbeitung
- ORIGIN 6.1/7.5 (Microcal) – Datenauswertung
- GEL PRO ANALYSER 3.1 (Media Cybernetics) – Gelauswertung

3 Ergebnisse

3.1 Verknüpfung der γ Untereinheit mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon in

EF₁-Cystein-Doppelmutanten

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde, basierend auf den Ergebnissen mit der Mutante MM10 (Gumbiowski et al., 2001), der vermutete Bereich des Helixbruches genauer untersucht. Bei der Mutante MM10 handelt es sich um ein verändertes KH7-EF₁, der zwei zusätzliche Cysteine, sowohl in der γ -Untereinheit an Position A285, als auch in der α -Untereinheit an der Position P280 trägt. Durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Cysteinen, des C-terminalen Endes von γ mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon, trat wider Erwarten kein Aktivitäts- und Rotationsverlust ein. Im Gegensatz dazu konnte bei zwei weiteren Doppelmutanten, deren Disulfidbrücken zwischen α_{A334C} und γ_{L262C} sowie zwischen β_{D380C} und γ_{C87} gebildet wurden, durch Oxidation eine vollständige Inhibierung erzeugt werden (Gumbiowski et al., 2001; (Gumbiowski et al., 2001; Duncan et al., 1995a). Die Quervernetzung bei diesen beiden Mutanten liegt *unterhalb* des postulierten „aufgewundenen“ Bereichs γ A267-S271 (Kap. 1.1.3). Aus diesem Grund wurden für eine genauere Betrachtung dieses Bereichs, dessen Aminosäuren sich vom C-terminalen Ende der γ Helix von Position 16 bis 20 erstrecken, vier weitere Cystein-Doppelmutanten untersucht.

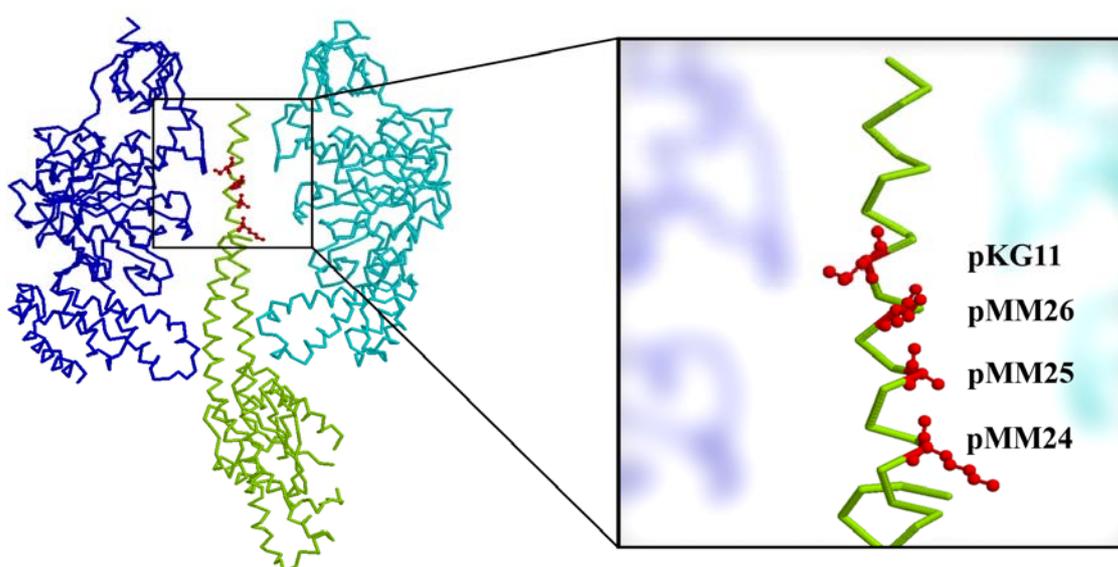


Abb. 3.1: Positionen der Cystein-Doppelmutanten innerhalb des EF₁-Komplexes. Stellvertretend für das $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon ist in dunkelblau α_a -Untereinheit und in türkis eine β_r -Untereinheit dargestellt. Auf der grünen γ -Untereinheit sind in rot die Aminosäure-Positionen der Mutanten gezeigt.

Die vier gewählten Mutanten befinden sich, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, kurz oberhalb mit pKG11 und pMM26, direkt in der postulierten Region mit pMM25 und knapp darunter der pMM24. Alle diese Aminosäure-Positionen überspannen den fraglichen Bereich immer im Abstand von 3-4 Aminosäuren. Die genauen Bezeichnungen der pKH7-Mutationsderivate mit den gewählten Punktmutationen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet (siehe auch Kap. 2.5.5-2.5.8). Im weiteren Verlauf der Charakterisierung der Doppelmutanten wird neben den Namen auch ihre Position in γ vom C-terminalen Ende der Helix mit angegeben.

Tab. 3.1: Bezeichnung der Cystein-Doppelmutanten

pKH7-Derivate	Punktmutation in α	Punktmutation in γ	Cystein-Position in γ vom C-terminalen Ende der Helix
pKG11	E284C	L276C	11
pMM26	E284C	T273C	14
pMM25	E284C	A270C	17
pMM24	D336C	K266C	21

Die Quervernetzung der Mutante pKG11 (γ 11) bildet sich zwischen γ L276C und α E284C wobei von den drei α -Untereinheiten α_a die geringste Distanz zu γ aufweist. Bei pMM26 (γ 14) und pMM25 (γ 17) wurde die Quervernetzung von γ mit derselben Aminosäure in α (E284C) gebildet, allerdings liegt hier die α_b -Untereinheit räumlich näher an den beiden Aminosäuren T273C und A270C. Auch für die Mutante pMM24 (γ 21) ist die Distanz von γ K266C zur α_b -Untereinheit am kleinsten, hier wurde das Cysteine jedoch an Position D336 in α eingebracht.

3.1.1 Herstellung der Cystein-Doppelmutanten

Die Einführung der Punktmutationen an den verschiedenen Positionen in α und γ erfolgte nach der in Abbildung 2.2 A dargestellten PCR-basierten Methode. Als Ausgangsmaterial diente das 9235 bp große Plasmid pKH7 (Kap. 2.5.4). Zur Reduzierung der Plasmidgröße, das heißt der Länge des in der PCR zu amplifizierenden DNA-Bereichs, wurde zunächst ein bestimmter Teil des ATP-Synthase-Operons in den Klonierungsvektor pBSKII eingesetzt. Für die Einführung der Cysteine in die γ -Helix wurde das *KpnI/SacI*-Fragments des pKH7 in den pBSKII eingesetzt. Der entstandene Subklon pMM4 (4306 bp) enthält somit den codierenden Bereich für die Untereinheit γ und einen Teil des codierenden Bereichs für β (β R1- β L162). Um das für die Quervernetzung notwendige zweite Cystein in α einzubringen, wurde auch

hierfür ein Subklon, der pMM3 (4302 bp), hergestellt. Der pMM3 enthält das *KpnI/XhoI*-Fragment des pKH7, das einen Teil des codierenden Bereichs für die Untereinheit α (L66-W513) und einen Teil der nichtcodierenden Region zwischen den Untereinheiten α und γ trägt. Nachdem die einzelnen Punktmutationen der entsprechenden Cystein-Paarung (Tab. 3.1) erfolgreich in die Subklone eingeführt wurden, mussten die Fragmente der erfolgreich mutierten pMM3- & pMM4-Derivate nun wieder in den pKH7-Vektor zurückgeführt werden. Es entstanden, nach einer erfolgreichen Religation, die vier pKH7-Derivate pKG11 (γ 11), pMM26 (γ 14), pMM25 (γ 17) und pMM24 (γ 21). Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung des gesamten Inserts überprüft. In Abbildung 3.2 wird exemplarisch für alle Cystein-Doppelmutanten die Restriktionsanalyse des positiven pMM24 (γ 21) gezeigt.

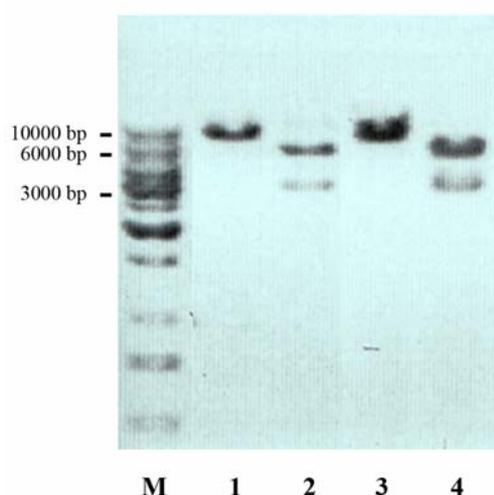


Abb. 3.2: Restriktionsanalyse der Plasmide pKH7 und pMM24.
(1% analytisches Agarosegel; schwarz/weiß invertiertes Photo);
M: λ -DNA Marker; 1 & 2: pKH7; 3 & 4: pMM24; 1 & 3: *SacI*-Schnitt; 2 & 4: *XbaI/KpnI*-Doppelschnitt.

Man erkennt, dass in den Spuren 1 und 3 die durch einen *SacI*-Schnitt linearisierten Plasmidbanden (9235 bp) auf derselben Höhe laufen. Der Nachweis der Plasmide erfolgte durch Doppelschnitte mit *XbaI* und *KpnI* (Spur 2 und 4), bei dem zwei Fragmente mit Größen entsprechend der Erwartung, 6129 bp und 3106 bp, entstanden. Es lässt sich allerdings durch die Restriktionsanalyse nur feststellen, ob die vorliegenden Plasmide die richtige Größe, und die für das ATPase-Operon charakteristische Schnittstellen besitzen. Über den Erfolg bei der Einführung der angestrebten Mutationen, oder auch eventuell falsch eingebaute Basen kann durch diese Methode allein keine Aussage gemacht werden. Die anschließenden Sequenzierungen der Cystein-Doppelmutanten über die von der Mutagenese betroffenen Bereiche bestätigten dann aber, dass die isolierten Plasmide die gewünschten Sequenzen besaßen (Daten nicht aufgeführt). Nach den anschließenden Transformationen der pKH7-

Derivate in *E. coli* DK8 wurde durch das Wachstum auf Succinat-Agarplatten die Funktionsfähigkeit der plasmidkodierte ATP-Synthasen überprüft (Kap. 2.6.11). Die Tabelle 3.2 zeigt das Succinat-Wachstum von KH7 im Vergleich zu den Mutanten. Dabei wies nur der MM26 eine deutlich verringerte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem KH7 auf. Die Doppelmutanten KG11, MM24 und MM25 zeigten ähnliche Wachstumseigenschaften. Mit erfolgreichen Komplementationen auf Succinat standen nun vier Stämme zur Verfügung, die für die Expression von ATPase-Komplexen genutzt werden konnten.

Tab. 3.2: Wachstum der Cystein-Doppelmutanten auf Succinat-Agarplatten

<i>E. coli</i> DK8 mit dem jeweiligen Plasmid	Wachstum auf Succinat-Medium bei 37°C
pKH7	++
pKG11 (γ 11)	++
pMM26 (γ 14)	+
pMM25 (γ 17)	++
pMM24 (γ 21)	++

Die Anzucht der *E. coli* DK8-Mutanten und KH7 unter Verwendung von Glycerin-haltigem Minimalmedium erfolgte, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben. Die ermittelten Verdopplungszeiten für das Wachstum schwankten zwischen 125 min für den KG11 und 200 min für den MM24 (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Verdopplungszeiten, Ernte- und Proteinausbeuten von KH7 und den Cystein-Doppelmutanten

<i>E. coli</i> DK8 mit dem jeweiligen Plasmid	Verdopplungszeiten t_d für das Wachstum in Medium bei 37°C [min] ¹	Ernteaussbeute in Biofeuchtmasse pro Liter Medium [g/l] ¹	Proteinaussbeute an EF ₁ pro Liter Medium [mg/l] ^{1,2}
pKH7	140	2,3 ± 0,2	3,5 ± 0,6
pKG11 (γ 11)	125	2,8 ± 0,4	4,0 ± 0,3
pMM26 (γ 14)	169	2,2 ± 0,3	0,3 ± 0,2
pMM25 (γ 17)	190	2,7 ± 0,4	0,7 ± 0,2
pMM24 (γ 21)	200	2,8 ± 0,3	3,8 ± 0,6

¹: bezogen auf Glycerin-haltigem Minimalmedium

²: bezogen auf die Ausbeute nach Anionenaustauschchromatographie

Die langsameren Wachstumsgeschwindigkeiten von MM25 und MM24 gegenüber den anderen Stämmen hatten aber keinerlei Einfluss auf die Zellausbeute. Hier lag die Ausbeute an Biofeuchtmasse pro Liter Anzuchtsmedium immer um 2,6 g/l. Somit konnten unabhängig von der Mutation bei einer 12 Liter Anzucht circa 30 g Biofeuchtmasse geerntet werden. Nach der Ernte wurden aus den Zellsuspensionen EF₁-Komplexe isoliert und über eine Anionenaustauschchromatographie (Kap. 2.7.2) aufgereinigt. In Abbildung 3.3 ist ein Chromatogramm der Aufreinigung von EF₁-KH7 dargestellt.

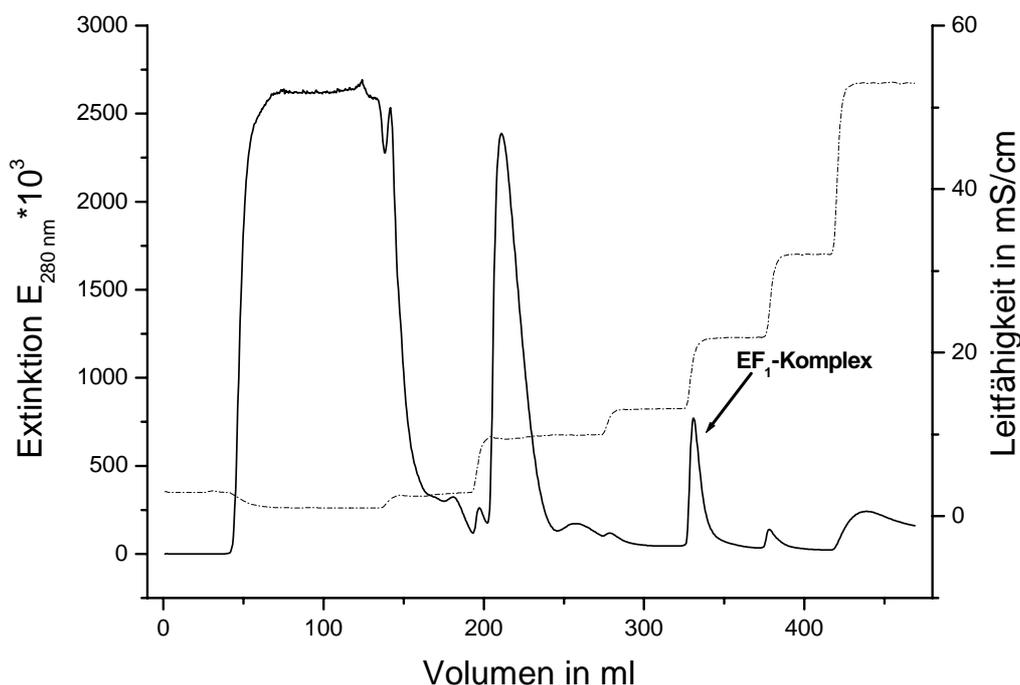


Abb. 3.3: Anionenaustauschchromatographie von EF₁-KH7-Komplexen. Extinktion bei 280 nm (—); Leitfähigkeit in mS/cm (---)

Mit steigender Salzkonzentration wurden nach und nach einzelne Fraktionen von der Säule eluiert, wobei sich die EF₁-Komplexe bei 75-150 mM NaSO₄ (15% bzw. 30% PufferB) von der Säule lösten. Die Proteinausbeute an EF₁ pro Liter Anzuchtsmedium war für KH7, KG11 und MM24 nahezu gleich. Bei einer 16 Liter Anzucht konnten zwischen 56-64 mg Protein gewonnen werden, während die Proteinmenge bei gleicher Anzucht für den MM25 gerade mal 11 mg betrug (Tab. 3.3). Am geringsten war allerdings die EF₁-Konzentration von MM26, bei dem nach schlechtem Wachstum auf Succinat, trotz unauffälliger Zellernte nur 0,3 mg/l isoliert werden konnten, das entspricht 4,8 mg aus 16 Liter Minimalmedium. Nach der Chromatographie wurden die EF₁-Präparationen entweder als Ammoniumsulfat-Präzipitate gelagert oder direkt für weitere Messungen nach den Angaben in Kapitel 2.7.2.2 aufgereinigt.

3.1.2 Auswertung der Proteinmenge über die Bandenintensität

In den nächsten Kapiteln zur Charakterisierung der Cystein-Doppelmutanten wurde der Grad der Quervernetzungsausbeute anhand der Bandenintensitäten von Comassie-gefärbten Gelen bestimmt. Um zu zeigen, dass die Intensität der Banden in einem SDS-Gel als Maß für die Proteinmenge dienen kann, wurden definierte Mengen von BSA und/oder Lysozym auf ein Gel aufgetragen und mit Hilfe des Programms Gel Pro Analyser 3.1 ausgewertet. Abbildung 3.4 zeigt Verdünnungsreihen von BSA (66 kDa) und Lysozym (14,2 kDa) in sinkenden Proteinkonzentrationen von 900 ng auf 4,5 ng (Spur 1-10), wobei das Auftragsvolumen immer 0,3 µl betragen hat.

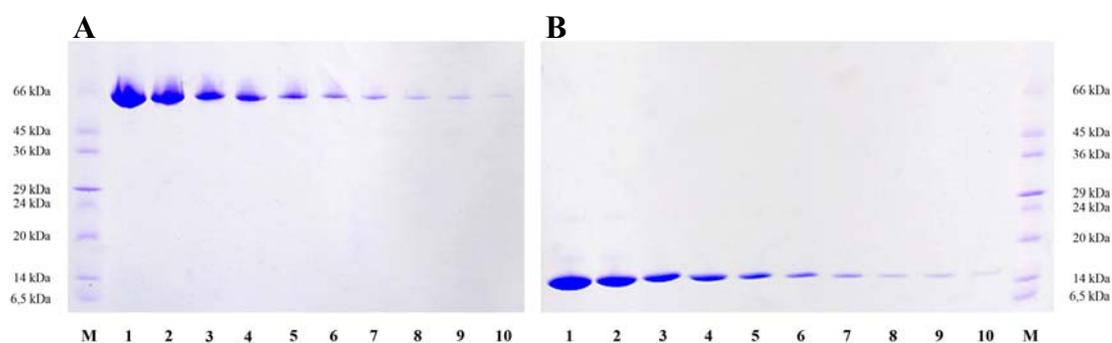


Abb. 3.4: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von BSA (A) und Lysozym (B). M: Sigma-Marker Low Range (6,5-66 kDa); Die entsprechenden Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt, wobei 100% einer Konzentration von 3 mg/ml entsprechen.

Die Auswertung der Gelbanden aus der oberen Abbildung ist in der Tabelle 3.4 dargestellt. Für einen besseren Überblick wurde die Gesamtintensität der Spur 1 gleich 100 gesetzt. Es zeigt sich, dass die computergestützte Analyse der Intensitäten sehr gut mit den erwarteten Proteinanteilen übereinstimmt. Leichte Abweichungen sind nur bei den höheren Konzentrationen zu verzeichnen.

Tab. 3.4: Auswertung der SDS-Gele aus Abbildung 3.4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Eingesetzter Proteinanteil in %	100	50	25	17	10	5	2,5	1,3	1	0,5
ermittelte BSA-Menge in % (Abb. A)	100	65	31	20	10	4,9	2,7	1,4	1	0,4
ermittelte Lysozym-Menge in % (Abb. B)	100	59	30	19	9	4,9	2,4	1,3	0,9	0,5

Da es sich bei den Cystein-Doppelmutanten um EF_1 -Komplexe handelt, sind im Gel nicht nur eine Bande sondern mehrere Banden zu erwarten. Hauptaugenmerk liegt dabei auf der γ -Bande, der α/β -Bande und dem $\alpha\gamma$ -Heterodimer. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass bei mehreren Banden die Konzentrationsverhältnisse nicht mehr mit den Bandenintensitäten korrelieren, wurde in einem weiteren Versuch BSA und Lysozym gemeinsam aufgetragen (Abb. 3.5). Während die BSA-Konzentration über alle Spuren 2-12 konstant war, wurde die Lysozym-Menge langsam von 100% (Spur 1) auf 0% (Spur 12) reduziert.

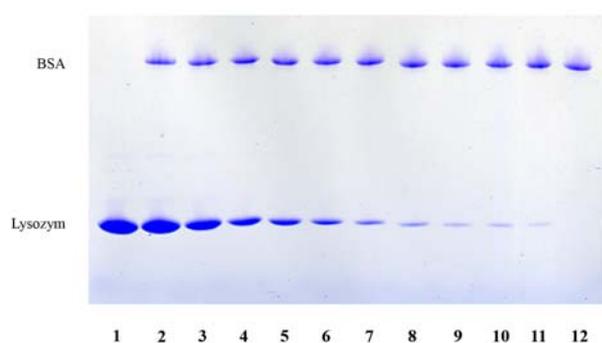


Abb. 3.5: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Lysozym in Anwesenheit von 10% BSA. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt, wobei 100% einer Konzentration von 3 mg/ml entsprechen.

Eine mögliche Beeinflussung der beiden Banden blieb aus. Die Ergebnisse der ausgewerteten Intensitäten, wie in Tabelle 3.5 dargestellt, wiesen kaum Abweichungen von den eingesetzten Proteinmengen auf.

Tab. 3.5: Auswertung der SDS-Gele aus Abbildung 3.5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
eingesetzter BSA-Anteil in %	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ermittelte BSA-Menge in %	0	9,8	10,2	10	9,9	10	10,2	10,2	10	10,1	9,9	10
eingesetzter Lysozym-Anteil in %	100	90	50	25	17	10	5	2,5	1,3	1	0,5	0
Ermittelte Lysozym-Menge in %	100	93	56	31	18	10,5	5,6	2,7	1,4	1	0,4	0

Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass die Bandenintensität direkte Rückschlüsse auf die eingesetzte Proteinmenge ermöglicht. Die über den gesamten Wertebereich vorliegende Linearität ist in Abbildung 3.6 noch einmal graphisch verdeutlicht. Hier wurden die Ergebnisse aus Tabelle 3.4 und die Lysozym-Werte aus Tabelle 3.5 dargestellt, wobei die Intensität gegen den eingesetzten Proteinanteil aufgetragen wurde. Mit Abweichungen nicht größer als $(65-50)/50$, also 30% (bei 1.5 mg/ml BSA), und insbesondere auch bei kleineren Proteinmengen im Mittel einem Fehler von unter 10% kann eine auf einen Sollwert normierte Bandenintensität als lineares Maß für Proteinmengen angesehen werden.

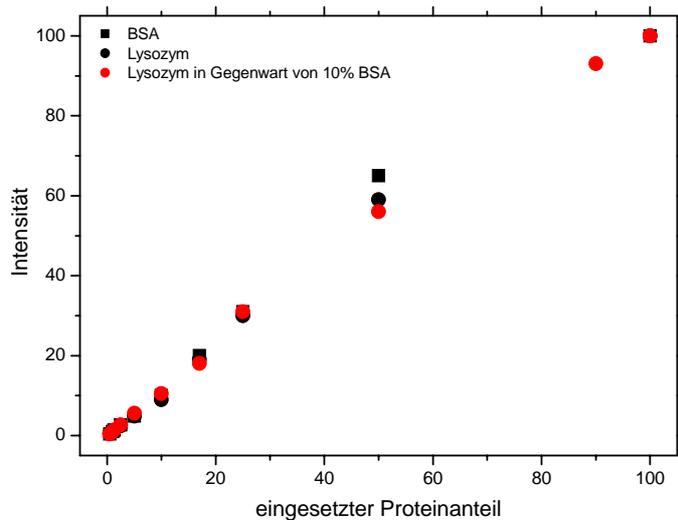


Abb. 3.6: Darstellung der Bandenintensität in Abhängigkeit vom eingesetzten Proteinanteil (3 mg/ml ist auf 100% normiert). Quadrate stellen die Ergebnisse für BSA und schwarze Kreise die für Lysozym aus Tabelle 3.4 dar. Die roten Kreise zeigen die Messwerte für Lysozym in Gegenwart von 10% BSA aus Tabelle 3.5.

Mit der hier beschriebenen Auswertung von Bandenintensitäten konnten 0.5% Amplituden nachgewiesen werden, was $0.5/100 \cdot 3 \text{ mg/ml} \cdot 0.0003 \text{ ml}$, also 4,5 ng Protein in einer Gelbande entspricht. Für die Untereinheit γ mit einer Molmasse von 31 kDa könnten somit noch geringste Mengen von $1,5 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$ nachgewiesen werden. In allen folgenden Gelauswertungen erfolgte eine Normierung auf die Summe der Bandenintensitäten von γ , α/β , $\alpha\gamma$, oder auf die Gesamtintensität jeder Spur.

3.1.3 Oxidation und Reduktion der Cystein-Doppelmutanten

3.1.3.1 Charakterisierung von KG11-EF₁ (γ 11)

Die erste untersuchte Mutante ist der KG11, dessen für die Quervernetzung des Rotors γ mit dem Stator $\alpha_3\beta_3$ benötigten Cysteine in den Positionen γ L276 und α E284 eingebaut wurden (Abb. 3.7). Sie liegt somit im Vergleich zu den folgenden Doppelmutanten vom C-terminalen Ende der γ -Helix gesehen am weitesten oben in Position γ 11. Zur Bildung der Quervernetzung von α und γ im KG11 wurden von Ammoniumsulfat und DTT befreite Proben (Kap. 2.7.2.2) in Gegenwart von 2 mM ATP mit verschiedenen oxidierenden Reagenzien (DTNB, DTT, CuCl_2 , J_2 ; Probe 3-6) versetzt. Zum Vergleich dienten eine durch DTT reduzierte Probe (1) und eine unbehandelte Probe (2). Alle

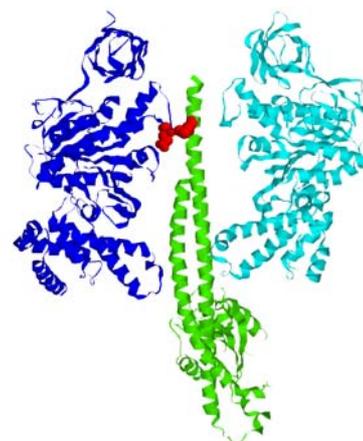


Abb. 3.7: Darstellung der Cystein-Doppelmutante KG11-EF₁. α_a : dunkelblau; β : türkis; γ : grün; Mutationspositionen α E284 und γ L276: rot.

Proben wurden für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben, wurde jede mit 20 mM NEM versetzte Probe einem ATPase-Test (Kap. 2.7.10) unterzogen und anschließend zur elektrophoretischen Analyse (Kap. 2.7.6) mit 10% TCA gefällt. Als Maß für die Bildung des $\alpha\gamma$ -Heterodimers wurden die Gelbanden aus Abbildung 3.8 A ausgewertet (siehe auch Tabelle 3.6) und in 3.8 B graphisch dargestellt (Kap. 3.1.2).

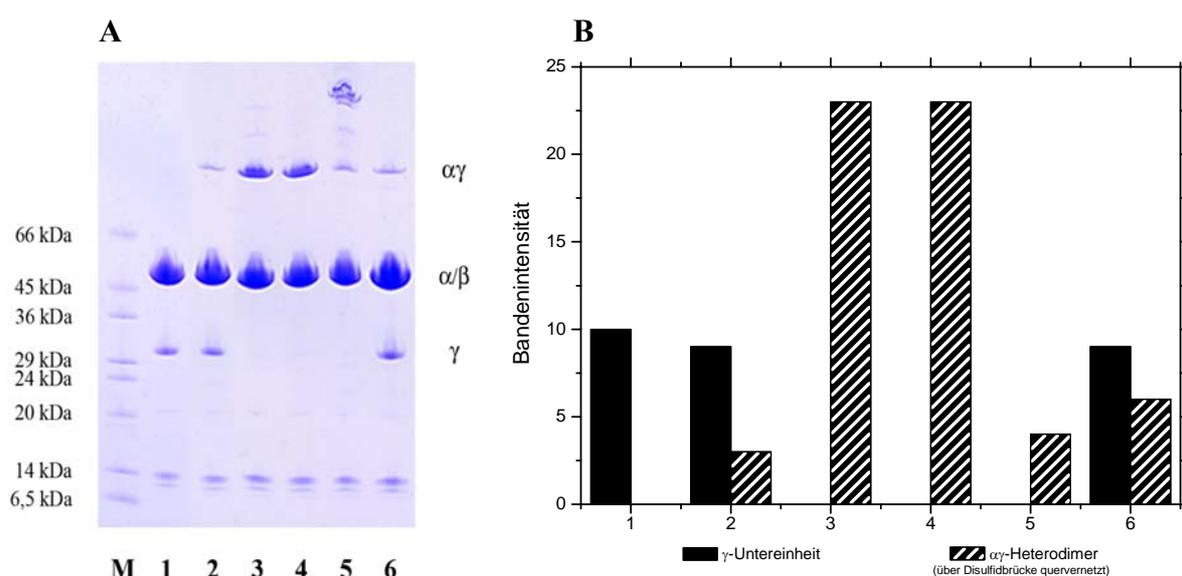


Abb. 3.8: Oxidationsverhalten von KG11-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der Proben 1-6 (mit DTT, ohne Zusatz, mit DTNB, mit DTP, mit CuCl₂, mit J₂); B: Anteil von γ und $\alpha\gamma$ -Heterodimer an der Gesamtproteinmenge der Proben 1-6 aus Tabelle 3.6; M ist der Sigma-Marker Low Range (6,5-66 kDa).

Tab. 3.6: Bandenintensitäten* und Hydrolyseaktivitäten der KG11-EF₁ Komplexe

Bande	1 - DTT	2 - ohne	3 - DTNB	4 - DTP	5 - CuCl ₂	6 - J ₂
$\alpha\gamma$	0,1	2,7	23	23	4,0	6
α/β	89	87	77	76	69	84
γ	10	9	0,29	0,32	0,01	9,3
Aktivität in u/mg	26	24	16	15	16	25

*: bestimmt aus Abbildung 3.8 A, pro Spur normiert auf 100

In der durch DTT reduzierten Probe lag die Bandenintensität für α/β bei 89 und die für γ bei 10, die Bildung einer Quervernetzung wurde erfolgreich unterbunden. Bei der unbehandelten Probe (2) zeigte sich eine leichte Bande auf Höhe der zu erwartenden Quervernetzungsbände ($\alpha\gamma$), die wahrscheinlich durch Reaktion mit Luftsauerstoff entstand. Nur bei der Oxidation des KG11 (γ 11) durch DTNB und DTP fand eine nahezu vollständige Quervernetzung statt,

wobei gleichzeitig die Intensität der γ -Bande auf fast Null sank. Durch einen Vergleich mit der Intensität der γ -Bande der DTT Probe kann man in diesen beiden oxidierten Proben auf einen Gehalt von ca. 3% γ schließen. Die Aktivität dieser Proben liegt aber bei noch 60% im Vergleich zur reduzierten Probe. Der Wert der α/β Bande, bestehend aus drei α - und drei β -Untereinheiten, reduzierte sich ebenfalls, wie zu erwarten, um etwa $\frac{1}{6}$ (also um ein α). Im Gegensatz dazu konnte die γ -Untereinheit zwar durch Kupferchlorid (CuCl_2) komplett vernetzt werden, allerdings entstanden neben der Verknüpfung von α und γ durch unbekannte Nebenreaktionen noch weitere Banden oberhalb der $\alpha\gamma$ -Bande. Die niedrige Bandenintensität für α/β von 69, und insbesondere die niedrige Intensität von $\alpha\gamma$ im Vergleich zu den DTNB oder DTP reduzierten Proben zeigen an, dass sind wahrscheinlich weitere α -Untereinheiten an den anderen Banden beteiligt. Jod (J_2) konnte keine vollständige Bildung der Disulfidbrücke im EF_1 -Komplex erzeugen. Die EF_1 -Präparation des KG11 weist im Vergleich zu KH7- EF_1 schon initial nur eine sehr niedrige Hydrolyseaktivität von 26 u/mg im reduzierten Zustand auf (Probe 1 in Tab. 3.6). Für die KH7-Aktivität liegen in unserem Labor die Werte normalerweise zwischen 90 und 150 u/mg. Bei der unbehandelten Probe sank die ATPase-Aktivität geringfügig auf 24 u/mg ab. Jedoch konnte die Oxidation in Probe 3 und 4 die Aktivität nur um gut 33% auf 16 bzw. 15 u/mg senken, nicht aber den Proteinkomplex inhibieren. In Abwesenheit von ATP verschlechterte sich sowohl die Quervernetzungsausbeute als auch die Hydrolyseaktivität nur geringfügig (Daten nicht gezeigt). Um die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidations- und Reduktionsreaktion zu ermitteln, wurden die jeweilige Reaktion in Gegenwart von 2 mM ATP durch Zugabe von 20 mM DTT oder 100 μM DTNB gestartet (Kap. 2.7.3). Hierzu wurde mit einer Proteinmenge von 0,6 mg/ml gestartet und in definierten Zeitintervallen 60 μg des KG11- EF_1 entnommen. Die Probe wurde mit 20 mM NEM gelöscht, nach 10 min die Aktivität gemessen und ein Teil mit 10% TCA gefällt. Abbildung 3.9 zeigt das SDS-Gel zur Oxidationskinetik und den Verlauf der Intensitäten der Banden γ und $\alpha\gamma$ über ein Zeitintervall von 60 min.

Tab. 3.7: Bandenintensitäten* und Aktivitäten zur Quervernetzungsbildung in KG11

Bande	0 min	0,5 min	1 min	2 min	4 min	10 min	30 min	60 min
$\alpha\gamma$	0,2	7	8	11	13	16	19	21
α/β	91	87	87	85	84	82	80	78
γ	9	6	5	4	3	2	1	0,4
Aktivität in u/mg	19	16	16	17	14	12	12	13

*: bestimmt aus Abbildung 3.9 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

Die Oxidation erfolgte sehr schnell, bereits nach 1 bis 2 Minuten waren bereits 50% von γ mit α verknüpft und nach einer Stunde die Quervernetzung vollständig abgeschlossen. Die

Intensitäten der $\alpha\gamma$ -Banden stieg dabei von 0,2 auf 21 an, während die Intensitäten der γ -Bande von 9 auf 0,4 abfiel, also ein Abfall auf weniger als 5%. Gleichzeitig sanken die Werte der α/β -Banden um etwa ein sechstel von 91 auf 78 (Tab. 3.7). Bei der Hydrolyseaktivität zeigte sich, dass der geringe Wert von 19 u/mg im reduzierten Zustand nur auf 13 u/mg nach 60 min absinkt. Es konnte daher gezeigt werden, dass die Quervernetzung der Rotor-Untereinheit γ in Position L276C mit der Stator-Untereinheit α keinen erheblichen Einfluss auf die ATPase-Aktivität besitzt.

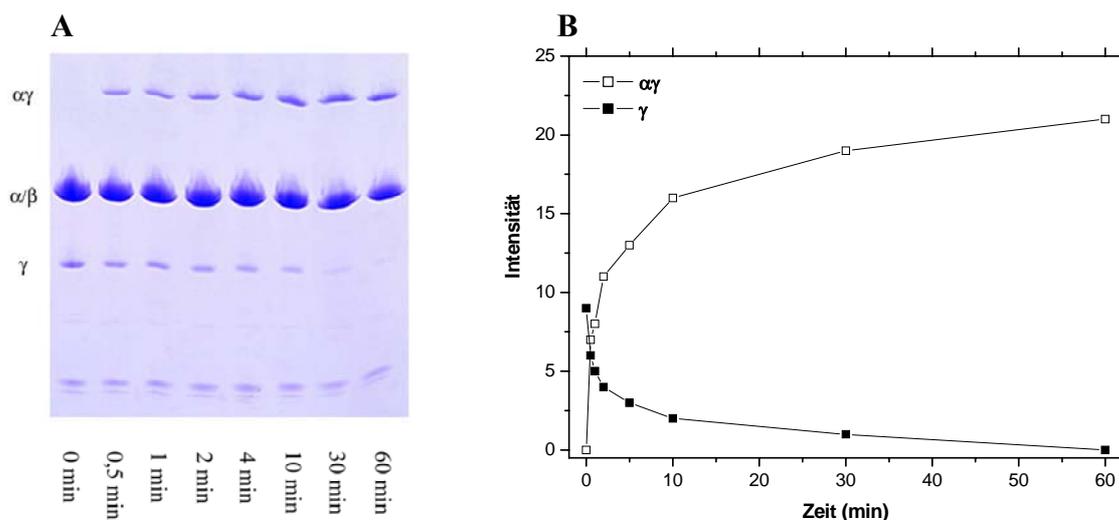


Abb. 3.9: Kinetik der Quervernetzungsbildung von γ_{C276} und α_{C284} in KG11-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der zeitabhängigen Oxidation von reduziertem KG11 durch 100 μM DTNB; B: zeitliche Abhängigkeit der Bandenintensität von γ (volle Quadrate) und $\alpha\gamma$ -Heterodimer (leere Quadrate) aus Tabelle 3.7.

Um die Reversibilität der Quervernetzung zeitlich aufzulösen, wurde genauso verfahren, wie bei der Oxidation. Nach der Zugabe von 20 mM DTT und 2 mM ATP wurden Proben entnommen (60 μg) und abgestoppt. In Tabelle 3.8 sind die Bandenintensitäten des SDS-Gels gezeigt.

Tab. 3.8: Bandenintensitäten* und Aktivitäten der Reduktion von quervernetztem KG11

Bande	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min
$\alpha\gamma$	22	9	8	7	5	3	0,0
α/β	77	86	86	86	88	90	92
γ	0,1	4	5	6	6	7	8
Aktivität in u/mg	16	15	17	19	20	20	22

*: bestimmt aus Abbildung 3.10 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

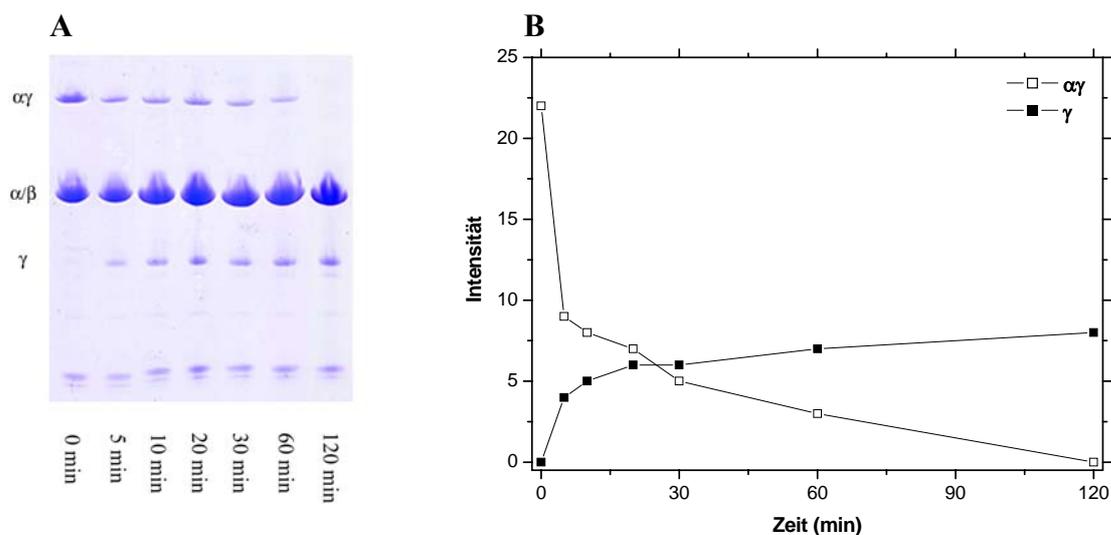


Abb. 3.10: Kinetik der Reversibilität der Quervernetzung von γ_{C276} und α_{C284} in KG11-EF₁. **A:** 8-25% SDS-Gel der zeitabhängigen Reduktion von oxidiertem KG11 durch 20 mM DTT; **B:** zeitliche Abhängigkeit der Bandenintensität von γ (volle Quadrate) und $\alpha\gamma$ -Heterodimer (leere Quadrate) aus Tabelle 3.8.

Die Rückbildung der $\alpha\gamma$ -Bande dauerte 120 min, bereit nach etwa 10 min waren nur noch 50% vorhanden (Abb. 3.10). Obwohl die Reduktion langsamer als die Oxidation ablief, ist die Reaktion nach 120 min quasi vollständig abgelaufen, das heißt es blieben innerhalb der Messgenauigkeit keinerlei nicht wieder zu lösende Quervernetzungen zurück. Die $\alpha\gamma$ -Bande reduziert sich von 22 auf 0,0, die γ -Bande steigt auf 8 an und der α/β -Wert nimmt wieder um ein sechstel zu. Die Aktivität steigt wieder von 16 u/mg auf 22 u/mg an.

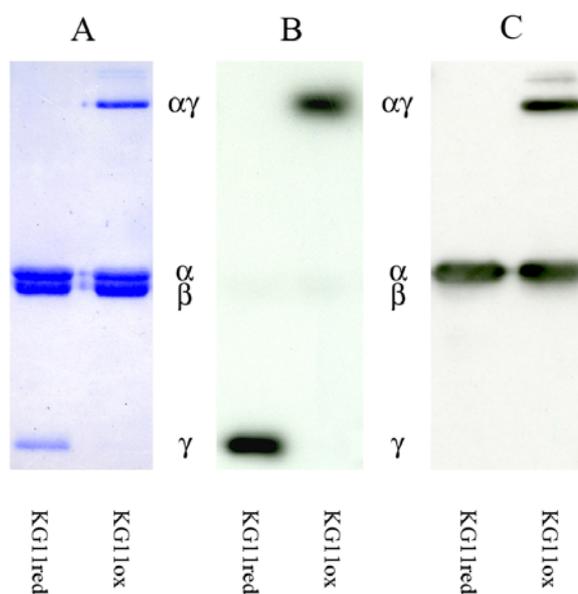


Abb. 3.11: Western Blots gegen γ (B) und α (C) des KG11 mit dem 12,5% SDS-Gel (A) zum Vergleich; Proben KG11red (DTT) und KG11ox (DTNB).

Die Zusammensetzung des Heterodimers aus α und γ wurde durch einen Western Blot (Kap. 2.7.7) mit polyklonalen Antikörpern gegen die beiden Untereinheiten überprüft (Abb. 3.11). Die Western Blots bestätigen die Zusammensetzung des Heterodimers. Der α -Antikörper reagierte mit der $\alpha\gamma$ -Bande der DTNB-Probe (KG11ox) sowie der α -Bande. Durch den Wechsel vom PhastGel-System auf das Laemmli-System (Kap. 2.7.6.2) konnte die α/β -Doppelbande getrennt werden. Der γ -Antikörper markierte die γ -Bande der reduzierten DTT-Probe (KG11red) und machte die Quervernetzungsbande von KG11ox (DTNB) sichtbar. Eine weitere Bande oberhalb des Heterodimers wurde nur im Blot gegen α sichtbar, es handelt sich wahrscheinlich um eine Verknüpfung von zwei α -Untereinheiten. Die Bandenintensitäten des Vergleichsgels aus Abbildung 3.11 A wurden ebenfalls ausgewertet (Tab. 3.9). Die Werte stimmen mit den bereits bekannten Intensitäten aus den Gradientengelen überein, da trotz optischer Bandentrennung von α und β im Gel die Banden für die Auswertung noch zu sehr überlappten, wurden sie auch hier als gemeinsame α/β -Bande aufgeführt.

Tab. 3.9: Bandenintensitäten¹, Aktivitäten und Quervernetzungsausbeute des KG11-EF₁

	KG11red	KG11ox
$\alpha\gamma$ -Bande	0	20
α/β -Bande	91	80
γ -Bande	9	0
Aktivität ²	19 ± 6 u/mg	14 ± 3 u/mg
Quervernetzungsausbeute ²	/	98%

¹: bestimmt aus Abbildung 3.9 A und normiert auf 100

²: Mittelwert (und Maximalabweichungen) von 15 Proben

Trotz der geringen Grundaktivität der reduzierten Form des KG11 von 19 ± 6 u/mg, die in den Mutationen begründet liegen könnte, ist das oxidierte KG11-EF₁ trotz ca. 98% Quervernetzung mit 14 ± 3 u/mg zu 74% aktiv.

Durch Rotationsmessungen mit reduziertem und oxidiertem KG11-EF₁ wurde die Korrelation von Hydrolyseaktivität und Rotationsverhalten untersucht. Nach Biotinylierung der Proben im äquimolaren Verhältnis von Enzym und Biotin, wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben, wurden in beiden Fällen Rotatoren gefunden. Die reduzierte Probe lieferte 3 ± 1 Dreher und im oxidierten Zustand konnten 4 ± 2 Dreher (8 Einzelerperimente) gefunden werden, wobei die Rotation jeweils über 30 Minuten beobachtet wurde (20-25 Bilder). Allerdings war es nach Biotinylierung der oxidierten Probe nicht möglich, mehr als 75 ± 5% Quervernetzung zu erzielen. Dennoch können diese Experimente als eine gute Indikation für rotierende oxidierte KG11-EF₁ angesehen werden, da in den 8 Einzelerperimenten im Durchschnitt nicht mehr als 1 Rotator zu erwarten war.

3.1.3.2 Charakterisierung von MM26-EF₁ (γ14)

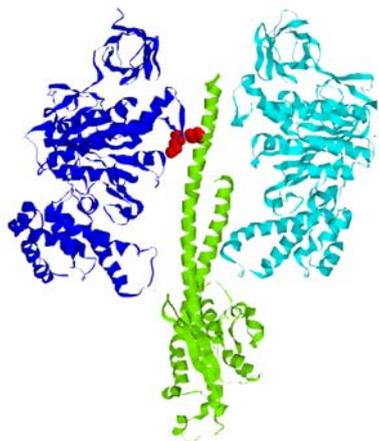
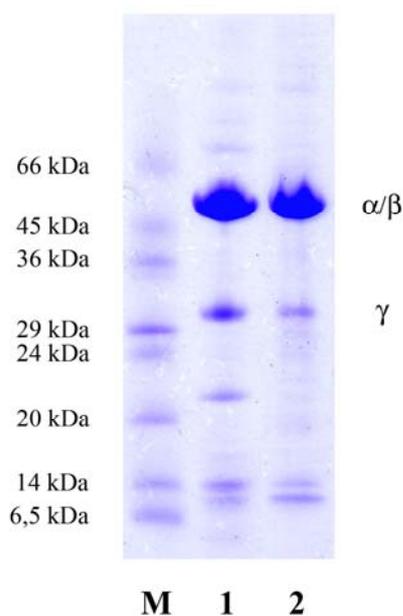


Abb. 3.12: Darstellung der Cystein-Doppelmutante MM26-EF₁. α₃: dunkelblau; β₃: türkis; γ: grün; Mutationspositionen αE284 und γT273: rot.

Die Mutante MM26 liegt auf Höhe der Position 14 vom C-terminalen Ende der γ-Helix. Um eine Quervernetzung des Rotors γ mit dem Stator α₃β₃ zu ermöglichen wurden zwei Cysteine in den Positionen γT273 und αE284 eingebaut (Abb. 3.12). Durch die geringe Proteinausbeute nach Anionenaustauschchromatographie von 0,3 mg/l wurde MM26-EF₁ nie mittels Ammoniumsulfat gefällt, sondern immer frisch weiterverarbeitet. Nach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie des gesamten EF₁-Präzipitats blieben von 5 mg Protein noch 0,4 mg gereinigtes MM26-EF₁ Enzym über. Im SDS-Gel (Abb. 3.13) zeigt sich, dass im Vergleich zum KH7-EF₁ (Spur 1)

der MM26 (Spur 2) mit 50% nur noch substöchiometrische Anteile der γ-Untereinheit besitzt. Aus den Bandenintensitäten beim KH7 ergibt sich nach Bezug auf die Molmasse ein Faktor für α/β von 0,9 und für γ von 0,3 (MW von α: 55 kDa, β: 50 kDa, γ: 31 kDa). Dieses entspricht genau der Stöchiometrie von einem Teil γ auf drei Teile α/β. Mit dem verbleibenden MM26-EF₁, das eine Hydrolyseaktivität von 14 u/mg besaß, konnte zur Bildung der Quervernetzung von α und γ nur eine Probe mit 100 μM DTNB versetzt werden. Trotz der Gegenwart von 2 mM ATP konnte nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur kein Protein mehr isoliert werden. Es wurden keine weiteren Oxidations- oder Reduktionsuntersuchungen durchgeführt.



Bande	1 - KH7	2 - MM26
αγ	/	0
α/β	90	95
γ	10	5

Abb. 3.13: Darstellung des 8-25% SDS-Gel (links) von KH7 (1) und MM26 (2) nach Ni-NTA-Chromatographie mit den zugehörigen Bandenintensitäten aus dem Gel (oben); M: Sigma-Marker Low Range (6,5-66 kDa).

3.1.3.3 Charakterisierung von MM25-EF₁ (γ 17)

Bei der dritten Mutante, dem MM25, liegen die Cysteine in den Positionen γ A270C und α E284C (Abb. 3.14). Die Position 17 in der γ -Helix vom C-terminalen Ende liegt im postulierten Bereich (γ 16-20), die Region, in der ein Aufbrechen der Helix vermutet wird. Zur Bildung der Quervernetzung von α und γ im MM25-EF₁ wurden, wie beim KG11, von Ammoniumsulfat und DTT befreite Proben in Gegenwart von 2 mM ATP mit verschiedenen oxidierenden Reagenzien (DTNB, DTT, CuCl₂, J₂; Probe 3-6) versetzt. Zum Vergleich dienten eine durch DTT reduzierte Probe (1) und eine unbehandelte Probe 2. Nach einer Inkubation von 24 h bei Raumtemperatur wurden die Proben, wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben, abgestoppt und vermessen. Die Auswertung der Bandenintensitäten aus Abbildung 3.15 A erfolgte mit dem Programm Gel Pro Analyser 3.1 (Kap. 3.1.2) und ist in 3.15 B graphisch dargestellt (siehe auch Tabelle 3.10).

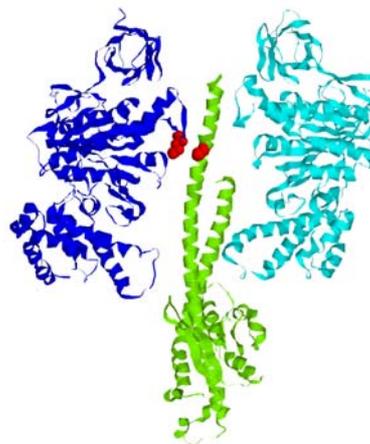


Abb. 3.14: Darstellung der Cystein-Doppelmutante MM25-EF₁. α : dunkelblau; β : türkis; γ : grün; Mutationspositionen α E284 und γ A270: rot.

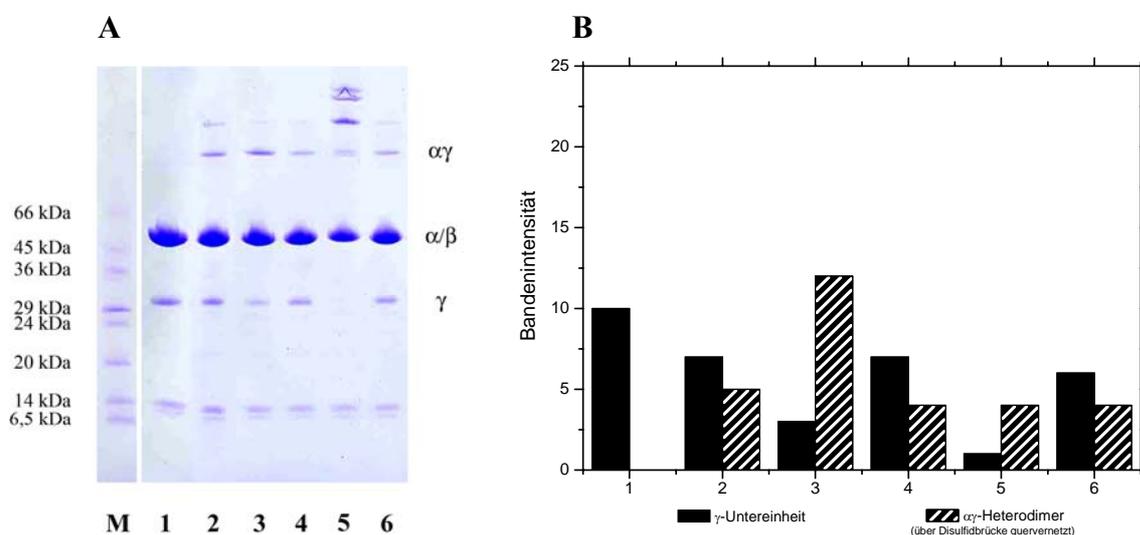


Abb. 3.15: Oxidationsverhalten von MM25-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der Proben 1-6 (mit DTT, ohne Zusatz, mit DTNB, mit DTP, mit CuCl₂, mit J₂); B: Anteil von γ und $\alpha\gamma$ -Heterodimer an der Gesamtproteinmenge der Proben 1-6 aus Tabelle 3.10; M ist der Sigma-Marker Low Range (6,5-66 kDa).

In der durch DTT vollständig reduzierten Probe (1) lag die Bandenintensität für α/β bei 90 und die für γ bei 10, wobei die Hydrolyseaktivität mit 77 u/mg nur etwas geringer ausfällt als die Aktivität des KH7 (90-150 u/mg). Bei der unbehandelten Probe (2) sank die ATPase-

Aktivität mit der entstandenen $\alpha\gamma$ -Bande durch Reaktion mit Luftsauerstoff geringfügig auf 56 u/mg ab. Weder bei der Oxidation durch DTP, CuCl_2 oder Jod (J_2) fiel die Quervernetzungsausbeute höher aus als in der unbehandelten Probe. Es zeigte sich, dass auch bei der Oxidation des MM25 (γ 17), DTNB als Oxidationsmittel effizient war. Leider konnten mit einer Bandenintensität von 12 für $\alpha\gamma$ nur maximal 70% Quervernetzung erzeugt werden. Die Probe 3 hatte mit 20 u/mg immer noch $\frac{1}{4}$ der Aktivität vom reduzierten MM25, so dass wahrscheinlich nur der Anteil ohne Quervernetzung zur Aktivität beitrug. Die 95%-ige Quervernetzung von γ in der mit 16 u/mg aktiven Probe 5 deutet aber darauf hin, dass ein derartig oxidiertes MM25-EF₁ aktiv sein könnte. Die Hydrolyseaktivität dieser Proben liegt damit bei circa 20% im Vergleich zur reduzierten Probe. Allerdings entstanden in Spur 5, wie auch beim KG11, noch weitere Banden oberhalb der $\alpha\gamma$ -Bande. Dennoch kann die 20%-ige Aktivität auf den Anteil der in den durch CuCl_2 -Oxidation entstandenen $\alpha\gamma$ erklärt werden.

Tab. 3.10: Bandenintensitäten* und Hydrolyseaktivitäten der MM25-EF₁ Komplexe

Bande	1 - DTT	2 - ohne	3 - DTNB	4 - DTP	5 - CuCl_2	6 - J_2
$\alpha\gamma$	0,2	5	12	4	4	4
α/β	90	88	84	89	73	89
γ	10	7	3	7	0,5	6
Aktivität in u/mg	77	56	20	52	16	50

*: bestimmt aus Abbildung 3.15 A, im Falle von CuCl_2 Normierung auf gesamte Gelspur, sonst Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

Für die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation und Reduktion von MM25, wurden die jeweilige Reaktion in Gegenwart von 2 mM ATP durch Zugabe von 20 mM DTT oder 100 μM DTNB gestartet (Kap. 2.7.3).

Tab. 3.11: Bandenintensitäten* und Aktivitäten zur Quervernetzungsbildung in MM25

Bande	0 min	0,5 min	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min	30 min	90 min	360 min
$\alpha\gamma$	0,1	8	9	11	13	14	16	17	18	17
α/β	90	86	86	84	83	82	81	81	80	80
γ	10	6	5	5	4	3	3	2	2	3
Aktivität in u/mg	70	42	40	35	30	27	23	21	20	21

*: bestimmt aus Abbildung 3.16 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

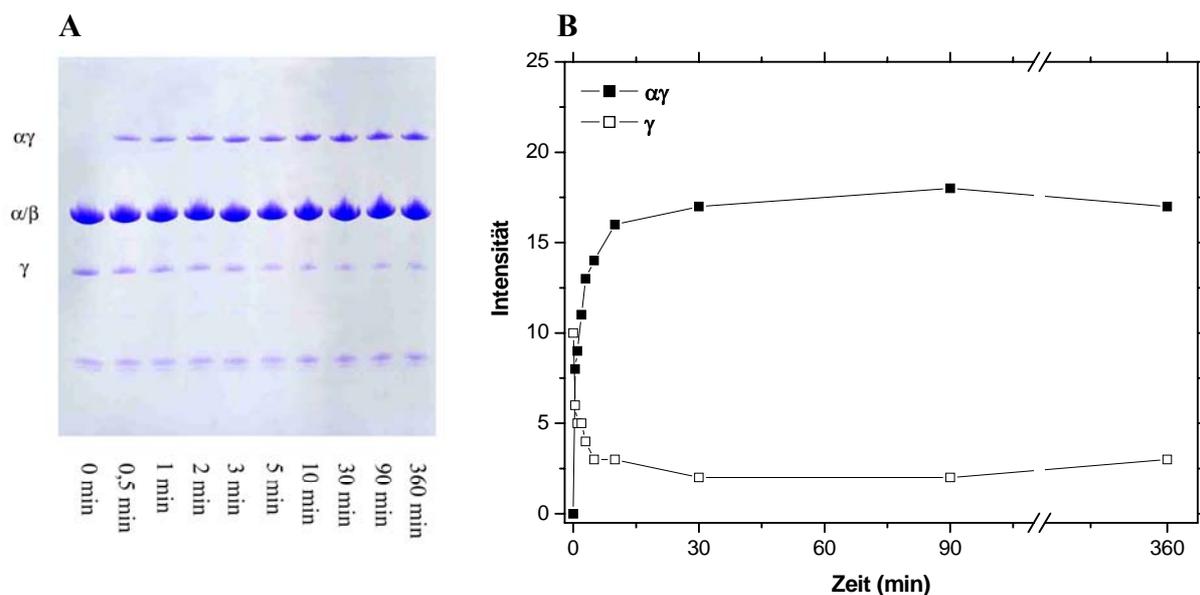


Abb. 3.16: Kinetik der Quervernetzungsbildung von γ_{C270} und α_{C284} in MM25-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der zeitabhängigen Oxidation von reduziertem MM25 durch 100 μ M DTNB; B: zeitliche Abhängigkeit der Bandenintensität von γ (leere Quadrate) und $\alpha\gamma$ -Heterodimer (volle Quadrate) aus Tabelle 3.11.

Hierzu wurde mit einer Proteinmenge von 0,8 mg/ml gestartet und in definierten Zeitintervallen 60 μ g des MM25-EF₁ entnommen. Abbildung 3.16 zeigt das SDS-Gel zur Oxidationskinetik und den Verlauf der Intensitäten der Banden γ und $\alpha\gamma$ über ein Zeitintervall von 360 min. Bereits nach einer Minute waren 50% von γ mit α verknüpft und nach 10 min stellte sich eine Sättigung der Quervernetzung bei einer Ausbeute von circa 70% ein. Die Intensitäten der $\alpha\gamma$ -Banden stieg dabei von 0 auf 17 an, während die Intensitäten der γ -Banden von 10 auf 3 abfielen (Tab. 3.11). Gleichzeitig sank die Hydrolyseaktivität von 70 u/mg im reduzierten Zustand nach 6 h auf 21 u/mg ab. Diese Aktivität kann allein auf den nicht quervernetzten Anteil zurückgeführt werden.

Tab. 3.12: Intensitäten* und Aktivitäten der Reduktion von quervernetztem MM25

Bande	0 min	0,5 min	1 min	3 min	5 min
$\alpha\gamma$	11	1	0,4	0,3	0,2
α/β	85	89	89	89	90
γ	3	9	11	10	10
Aktivität in u/mg	25	64	74	74	73

*: bestimmt aus Abbildung 3.17 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

Um die Reversibilität der Quervernetzung zeitlich aufzulösen, wurde genauso verfahren, wie bei der Oxidation. Trotz 24 h Vorinkubation mit DTNB konnte die Probe, wie die Kinetik zur Oxidation vermuten ließ, nicht zu 100% oxidiert werden, daher startet die Reaktion mit 25 u/mg und etwa 70% Disulfidbrückenbildung (Abb. 3.17 und Tab. 3.12). Nach der Zugabe von 20 mM DTT und 2 mM ATP wurden Proben entnommen und abgestoppt.

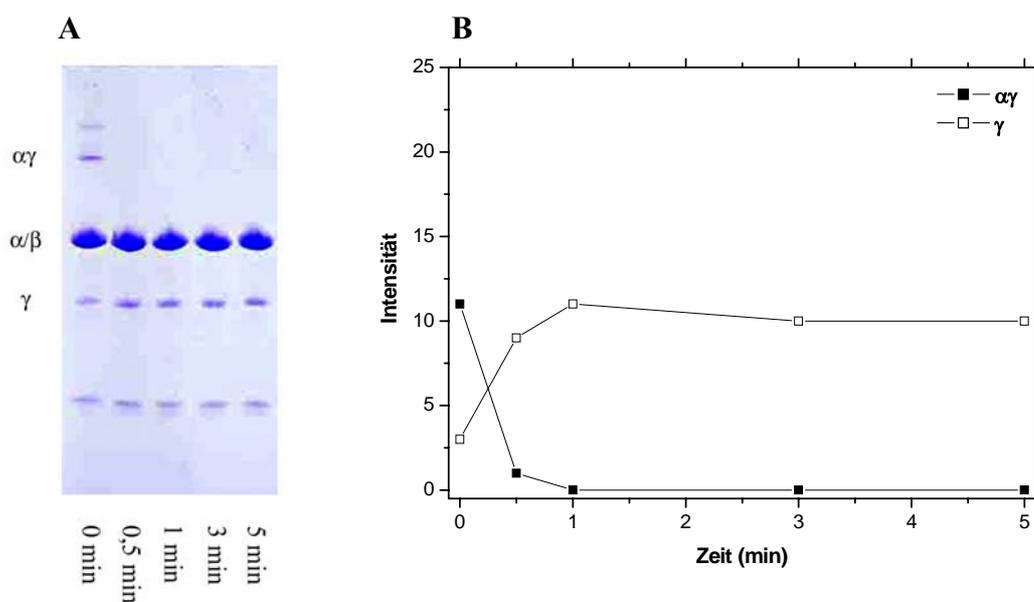


Abb. 3.17: Kinetik der Reversibilität der Quervernetzung von γ_{C270} und α_{C284} in MM25-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der zeitabhängigen Reduktion von oxidiertem MM25 durch 20 mM DTT; B: zeitliche Abhängigkeit der Bandenintensität von γ (leere Quadrate) und $\alpha\gamma$ -Heterodimer (volle Quadrate) aus Tabelle 3.12.

Die Reduktion erfolgte noch schneller als die Oxidation, nach 1 min konnte bereits die vollständige Auflösung der Disulfidbrücke verzeichnet werden. Bei den Bandenintensitäten im SDS-Gel zeigt sich innerhalb von nur 5 min Beobachtungsdauer, dass die $\alpha\gamma$ -Bande von 11 auf 0,2 reduziert wird und die γ -Bande von 3 auf 10 ansteigt. Die hohe Geschwindigkeit, mit der sich die Disulfidbrücke im MM25-EF₁, der nur zu 70% gebildet werden konnte, wieder auflöste, lässt darauf schließen, dass der Bereich um γ_{A270C} nur schwer „festzuklemmen“ ist. Die Hydrolyseaktivität stieg wieder von 25 u/mg auf 73 u/mg an. Es kam also zu keinerlei Aktivitätsverlust durch die Bildung und Rückbildung der Quervernetzung, diese Reaktion war demnach reversibel.

Als Nachweis des Heterodimers aus α und γ wurde auch hier ein Western Blot durchgeführt, wobei der α -Antikörper mit der $\alpha\gamma$ -Bande der DTNB-Probe (MM25ox) sowie der α -Bande reagiert (Abb. 3.18). Der γ -Antikörper markierte die γ -Banden und die Quervernetzungsbande von MM25ox (DTNB). Durch die Oxidation entstand neben der $\alpha\gamma$ -Bande auch noch eine α_2 -Bande, die im α -Blot sichtbar wurde. Aus den Bandenintensitäten des Vergleichsgels (Abb. 3.11 A), wie in Tabelle 3.13 angegeben, ergaben sich die bereits bekannten Intensitäten.

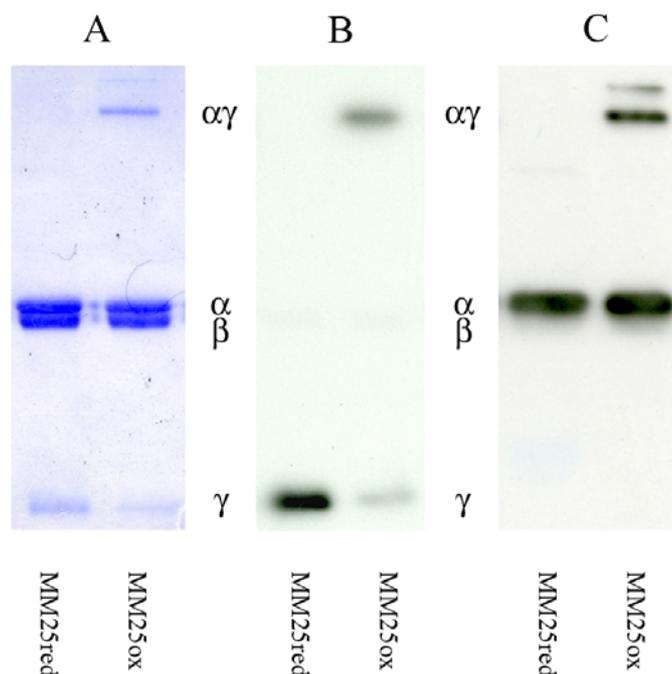


Abb. 3.18: Western Blots gegen γ (B) und α (C) des MM25 mit dem 12,5% SDS-Gel (A) zum Vergleich; Proben MM25red (DTT) und MM25ox (DTNB).

Die reduzierte Form des MM25 weist eine Hydrolyseaktivität von 66 ± 10 u/mg auf. Das oxidierte MM25-EF₁ besitzt mit 18 ± 2 u/mg eine Restaktivität von circa 30%, welche mit der Ausbeute von 70% Quervernetzung bei DTNB einhergeht. Dieses könnte bedeuten, dass der MM25 bei 100% Quervernetzung inaktiv sein könnte, aber, wie sich bei der Kupferchlorid Probe (Tab. 3.10) andeutete, nicht so sein muss. Da gezeigt werden konnte, dass die Rotor-Untereinheit γ mit der Stator-Untereinheit α nicht vollständig zu vernetzen ist, wurden keine Rotationsmessungen mehr gemacht.

Tab. 3.13: Bandenintensitäten¹, Aktivitäten und Quervernetzungsausbeute des MM25-EF₁

	MM25red	MM25ox
$\alpha\gamma$ -Bande	0	13
$\alpha\beta$ -Bande	92	84
γ -Bande	8	3
Aktivität ²	66 ± 10 u/mg	18 ± 2 u/mg
Quervernetzungsausbeute ²	/	70%

¹: bestimmt aus Abbildung 3.18 A, Summe von γ , $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$ normiert auf 100

²: Mittelwert über alle so vermessenen Proben von 12 Proben

3.1.3.4 Charakterisierung von MM24-EF₁ (γ21)

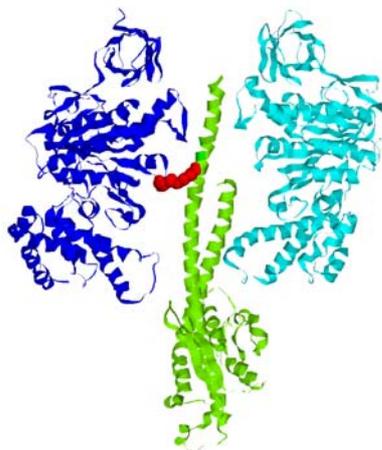


Abb. 3.19: Darstellung der Cystein-Doppelmutante MM24-EF₁. α_b: dunkelblau; β_a: türkis; γ: grün; Mutationspositionen αD336 und γK266: rot.

Die letzte der Cystein-Doppelmutanten ist der MM24. Die eingebauten Cysteine liegen bei diesem Enzym in den Positionen γK266C und αD336C (Abb. 3.19). Bei der Position γ21 handelt es sich um die erste Aminosäure, die vom C-terminalen Ende der γ Helix aus gesehen, unterhalb des Helixbruchs liegt. Wie bei allen Mutanten zuvor wurde nach Aufreinigung von MM24-EF₁ über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Ammoniumsulfat und DTT frei) in Anwesenheit von 2 mM ATP das Oxidationsverhalten unter Zugabe von DTNB, DTT, CuCl₂ oder J₂ betrachtet. Bei der Bildung der Quervernetzung von α und γ im MM24 dienen eine vollständig reduzierte Probe (1 - DTT) und eine unbehandelte Probe (2 - ohne) dem Vergleich. Nach einer 24 h Oxidation wurden die Proben auf Aktivität

und Quervernetzungsausbeute hin untersucht (Abb. 3.20 und Tab. 3.14). Die erste Spur zeigt die unter Zugabe von 20 mM DTT reduzierte Probe, die eine Hydrolyseaktivität von 74 u/mg besitzt, ähnlich wie der MM25 (γ17). Die Bandeintensitäten weisen das übliche Verhältnis von 91 (αγ) zu 9 (γ) auf. Die unbehandelte Probe (2) konnte, wie bei den Mutanten zuvor, ebenfalls leicht durch Luftsauerstoff oxidieren, mit einer Intensität von 3 für die αγ-Bande und von 7 für γ. Die Aktivität dieser Probe sank auf 60 u/mg.

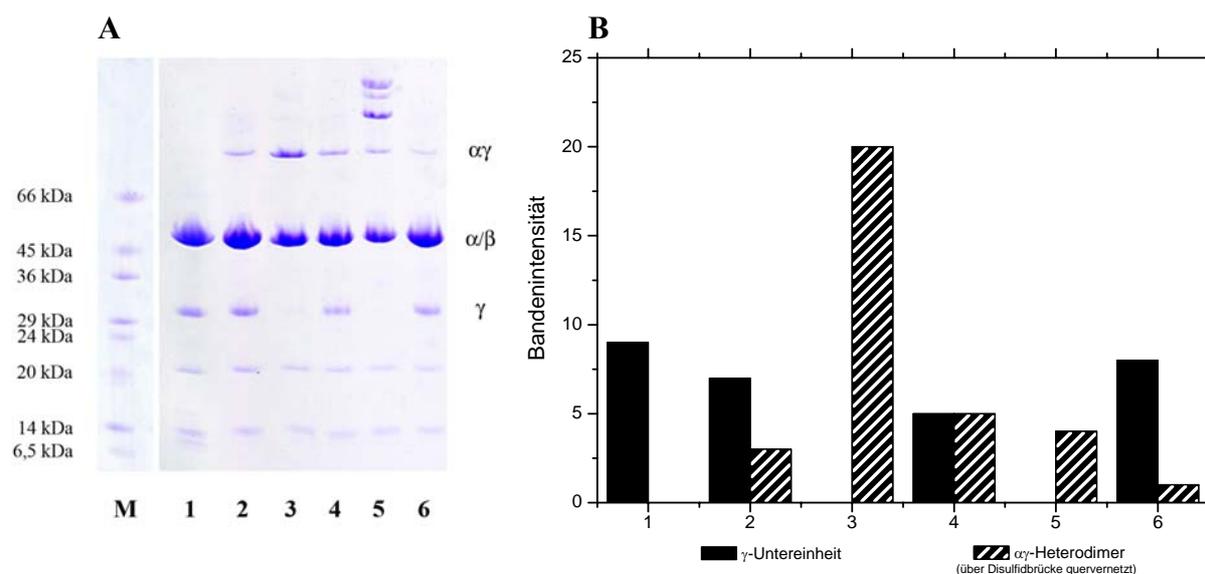


Abb. 3.20: Oxidationsverhalten von MM24-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der Proben 1-6 (mit DTT, ohne Zusatz, mit DTNB, mit DTP, mit CuCl₂, mit J₂); B: Anteil von γ und αγ-Heterodimer an der Gesamtproteinmenge der Proben 1-6 aus Tabelle 3.14; M ist der Sigma-Marker Low Range (6,5-66 kDa).

Bei den Oxidationsmitteln konnten nur DTNB und Kupferchlorid (CuCl_2) die γ -Untereinheit vollständig quervernetzen, so dass die Bandenintensität auf Null sank. Dabei zeigte die Probe 5 das für CuCl_2 bereits bekannte Bandenmuster mit einem sehr geringen Anteil an $\alpha\gamma$ -Heterodimer, einer Intensität von 4 und der niedrigsten Aktivität von 10 u/mg. Das durch DTNB oxidierte MM24- EF_1 besaß eine Intensität der $\alpha\gamma$ -Bande von 20, wobei der Wert der α/β Bande um etwa $\frac{1}{6}$ abnahm. Die Aktivität bei Probe 3 betrug mit 17 u/mg noch etwa 23% der ATPase-Aktivität des reduzierten Enzyms. Im MM24 konnte demnach eine fast 100%ige Quervernetzung nicht zur vollständigen Inhibierung des Komplexes führen. DTP (Spur 4) und Jod ($6 - \text{J}_2$) konnte keine vollständige Bildung der Disulfidbrücke im EF_1 -Komplex erzeugen.

Tab. 3.14: Bandenintensitäten* und Hydrolyseaktivitäten der MM24- EF_1 Komplexe

Bande	1 - DTT	2 - ohne	3 - DTNB	4 - DTP	5 - CuCl_2	6 - J_2
$\alpha\gamma$	0	3	20	5	4	1
α/β	91	90	80	89	66	91
γ	9	7	0,1	5	0	8
Aktivität in u/mg	74	60	17	46	10	67

*: bestimmt aus Abbildung 3.20 A und normiert auf 100

Im nächsten Schritt wurde das Oxidationsverhalten des MM24 in Gegenwart von 100 μM DTNB genauer untersucht. Die Probe wurde dazu über Nacht vorreduziert und durch Affinitätschromatographie wieder vom DTT befreit, die Proteinkonzentration betrug 0,8 mg/ml. Nach dem Start der Reaktion wurden in definierten Zeitintervallen 60 μg des MM24- EF_1 entnommen. Die Oxidation wurde über einen Zeitraum von 60 min beobachtet, dabei zeigte sich, dass nach 5 Minuten bereits die Hälfte der Disulfidbrücke ausgebildet war. Es dauerte allerdings noch weitere 55 min bis die Quervernetzung zu 99% ausgebildet war, wobei die Bandenintensität von $\alpha\gamma$ über diese Zeit stetig zunimmt (Abb. 3.21 und Tab. 3.15).

Tab. 3.15: Bandenintensitäten* und Aktivitäten zur Quervernetzungsbildung in MM24

Bande	0 min	0,5 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
$\alpha\gamma$	0	1	2	4	7	8	10	14	17	18	20
α/β	91	91	91	90	88	87	86	84	82	81	80
γ	9	8	7	6	5	5	4	2	1	1	0,2
Aktivität in u/mg	50	46	41	38	34	32	32	20	14	14	17

*: bestimmt aus Abbildung 3.21 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

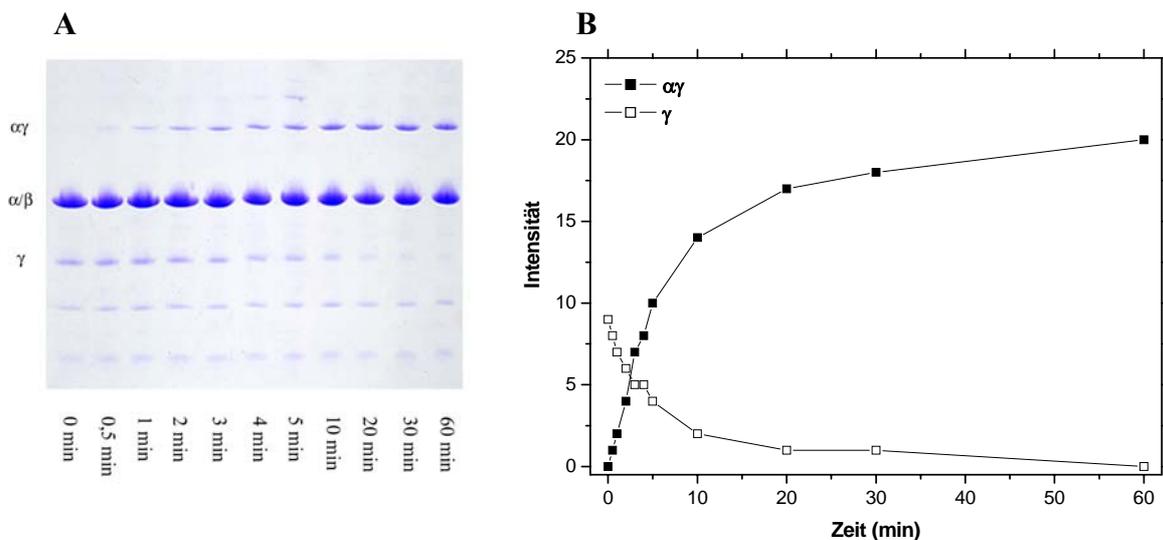


Abb. 3.21: Kinetik der Quervernetzungsbildung von γ_{C266} und α_{C336} in MM24-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der zeitabhängigen Oxidation von reduziertem MM24 durch 100 μ M DTNB; B: zeitliche Abhängigkeit der Bandenintensität von γ (leere Quadrate) und $\alpha\gamma$ -Heterodimer (volle Quadrate) aus Tabelle 3.15.

Die Intensitäten der $\alpha\gamma$ -Banden stieg dabei von 0 auf 20 an, während die Intensitäten der γ -Banden von 9 auf 0,2 abfielen. Gleichzeitig sanken die Werte der α/β -Banden um etwa ein sechstel von 91 auf 80 (Tab. 3.15). Bei der Hydrolyseaktivität zeigte sich, dass der Wert von 50 u/mg im reduzierten Zustand auf 17 u/mg nach 60 min absinkt. 34% der Aktivität vom reduzierten MM24-EF₁ blieben somit trotz der nahezu vollständig abgelaufenen Vernetzung der Rotor-Untereinheit γ mit der Stator-Untereinheit α erhalten.

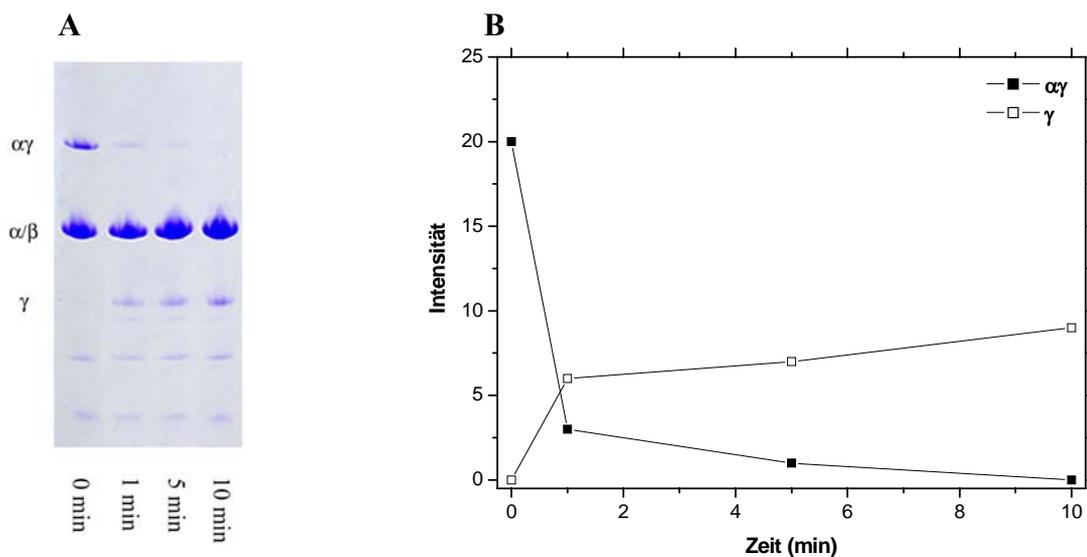


Abb. 3.22: Kinetik der Reversibilität der Quervernetzung von γ_{C266} und α_{C336} in MM24-EF₁. A: 8-25% SDS-Gel der zeitabhängigen Reduktion von oxidiertem MM24 durch 20 mM DTT; B: zeitliche Abhängigkeit der Bandenintensität von γ (leere Quadrate) und $\alpha\gamma$ -Heterodimer (volle Quadrate) aus Tabelle 3.16.

Tab. 3.16: Intensitäten* und Aktivitäten der Reduktion von quervernetztem MM24

Bande	0 min	1 min	5 min	10 min
$\alpha\gamma$	20	3	1	0,2
α/β	79	91	92	91
γ	0	6	7	9
Aktivität in u/mg	22	49	56	69

*: bestimmt aus Abbildung 3.22 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

Um die Reversibilität der Quervernetzung zeitlich aufzulösen, wurde genauso verfahren, wie bei der Oxidation. Nach der Zugabe von 20 mM DTT und 2 mM ATP zu einer voroxidierten Probe wurden 60 μg MM24- EF_1 entnommen und abgestoppt. Abbildung 3.22 zeigt, dass die Rückbildung der Disulfidbrücke sehr viel schneller als die Oxidation ablief. Die Halbwertszeit dieser Reaktion liegt unter 1 min und die 100%ige Öffnung der $\alpha\gamma$ -Vernetzung ist nach 10 min fast abgeschlossen. In Tabelle 3.16 sind die Bandenintensitäten des SDS-Gels gezeigt. Die Menge an quervernetzten Untereinheiten reduzierte sich von 20 auf 0, die γ -Bande stieg auf 9 an, und der α/β -Wert nimmt wieder um ein sechstel zu. Es kommt zur vollständigen Regeneration der Hydrolyseaktivität von 22 u/mg auf 69 u/mg.

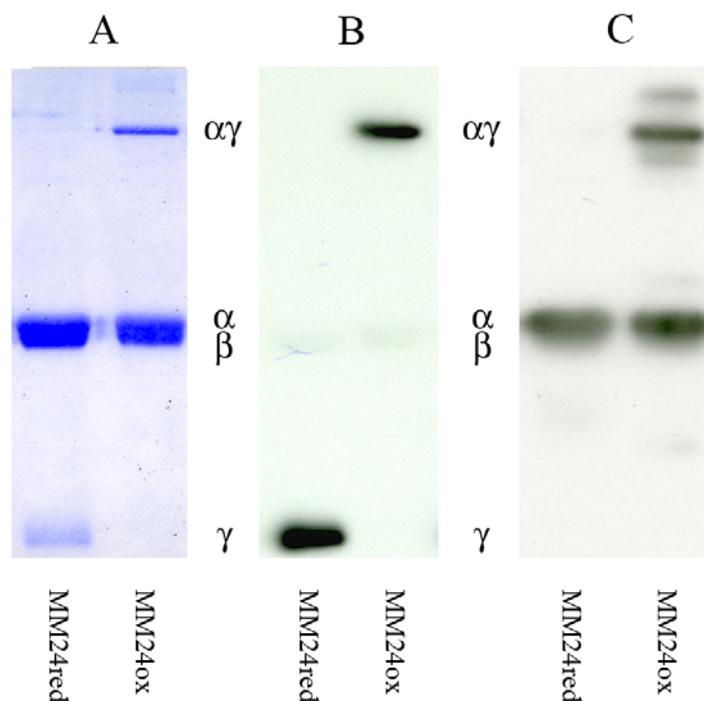


Abb. 3.23: Western Blots gegen γ (B) und α (C) des MM24 mit dem 12,5% SDS-Gel (A) zum Vergleich; Proben MM24red (DTT) und MM24ox (DTNB).

Ein Western Blot gegen die beiden Untereinheiten α und γ bestätigte die Zusammensetzung des Heterodimers. Abbildung 3.23 zeigt, dass der α -Antikörper mit der $\alpha\gamma$ -Bande der DTNB-Probe (MM24ox), der α -Bande und einer weitere Bande (α_2) oberhalb des Heterodimers reagierte. Der γ -Antikörper konnte nur in der reduzierten Probe (MM24red) ungebundenes γ detektieren, in MM24ox (DTNB) dagegen nur $\alpha\gamma$ -Herterodimer. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Bandenintensitäten des Vergleichsgels wieder. Die Werte in Tabelle 3.17 stimmen mit den bereits bekannten Intensitäten vorheriger SDS-Gele überein. Die Grundaktivität der reduzierten Form des MM24 (γ 21) betrug im Mittel 68 ± 10 u/mg. Trotz 99%-iger Quervernetzung blieb eine geringe Restaktivität des oxidierten MM24-EF₁ von 26% mit 18 ± 4 u/mg erhalten.

Tab. 3.17: Bandenintensitäten¹, Aktivitäten und Quervernetzungsausbeute des MM24-EF₁

	MM24red	MM24ox
$\alpha\gamma$ -Bande	0	18
α/β -Bande	91	82
γ -Bande	9	0
Aktivität ²	68 ± 10 u/mg	18 ± 4 u/mg
Quervernetzungsausbeute ²	/	99%

¹: bestimmt aus Abbildung 3.23 A, Summe von γ , α/β , $\alpha\gamma$ normiert auf 100

²: Mittelwert über alle so vermessenen Proben von 11 Proben

Anschließende Rotationsmessungen mit reduziertem und oxidiertem MM24-EF₁ wurden nach Biotinylierung der Proben im äquimolaren Verhältnis von Enzym zu Biotin durchgeführt (Kap. 2.7.4). Beide Proben lieferten sowohl im reduzierten, als auch im oxidierten Zustand, in 30 Minuten (20-25 Bilder) je 2-4 Dreher (6 Einzelerperimente). Bei der oxidierten Probe konnte nach der Biotinylierung des Enzyms nicht mehr als 70-80% Quervernetzung erzeugt werden, wodurch Rückschlüsse auf den Zusammenhang von vollständiger Disulfidbrückenbildung und vorhandener ATPase-Aktivität nicht möglich waren. Die gleiche Ausbeute von beobachteten Rotatoren in beiden Fällen ist dennoch ein klares Indiz für die Rotation auch bei oxidierten Proben.

3.1.4 Arrhenius-Analyse der Cystein-Doppelmutanten KG11-EF₁ (γ 11) und MM24-EF₁ (γ 21) unter oxidierten und reduzierten Bedingungen

Bei den Charakterisierungen der vier Doppelmutanten zeigte sich, dass eine vollständige Ausbildung der Quervernetzung nur durch DTNB in den Mutanten KG11 (γ 11) und MM24 (γ 21) erzeugt werden konnte. Die Kinetiken konnten weiterhin eine Reversibilität der Quervernetzung von α und γ zeigen. Beide Mutanten weisen nach Oxidation noch eine Hydrolyseaktivität im LeBel-Test (Kap. 2.7.10) auf. Der oxidierte KG11-EF₁ ist mit 11-17 u/mg noch zu 74% und der MM24-EF₁ mit 14-22 u/mg noch zu 26% aktiv. Um die Aktivierungsenergien der ATP-Hydrolyse zu bestimmen wurde auf die Arrhenius-Analyse zurückgegriffen. Die Messungen fanden bei Temperaturen von 10-40°C statt. Durch den Vorteil des ATP-regenerierenden Systems wird die Substratlimitierung des ATP als auch eine Produkthemmung der ATPase durch das hydrolysierte ADP verhindert (Kap. 2.7.12). Die Proben wurden gemäß Kap. 2.7.2.2 aufgereinigt, und über Nacht mit 20 mM DTT reduziert oder mit 100 μ M DTNB oxidiert. Es folgte eine Ni-NTA-Chromatographie, um die Proben von überschüssigen Reagenzien zu reinigen. Die Absorptionsmessung bei 340 nm wurde durch die Zugabe von 1-2 μ g EF₁ gestartet. Abbildung 3.24 zeigt den typischen Verlauf einer NADH-Absorptionsabnahme. Nach einer kurzen Übergangsphase kann anhand der Steigung des konstant abfallenden Bereichs der Messkurve die Hydrolyseaktivität des EF₁ in u/mg bestimmt werden (Kap. 2.7.12). Durch die Entnahme einer Gelprobe vor und nach der Messung wurde gewährleistet, dass eine 100% Oxidation oder Reduktion der Proben vorlag.

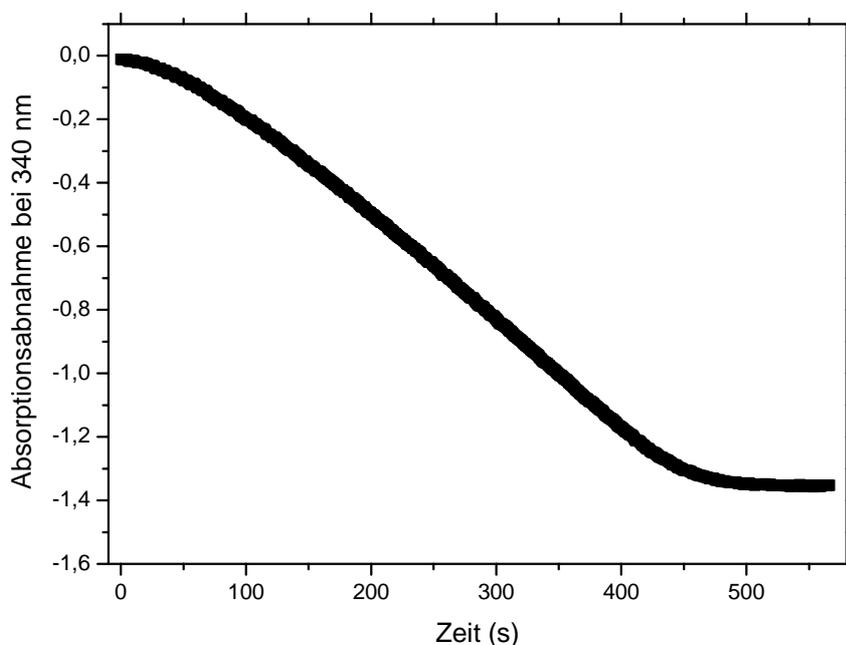


Abb. 3.24: Absorptionsmessung der NADH-Abnahme bei 340 nm als Maß für die ATPase-Aktivität von EF₁.

Tab. 3.18: ATP-Hydrolyseaktivitäten des KH7, KG11 und des MM24 bei 10-40°C

Temperatur [°C]	KH7-EF ₁ [u/mg]	KG11-EF ₁ (reduziert) [u/mg]	KG11-EF ₁ (oxidiert) [u/mg]	MM24-EF ₁ (reduziert) [u/mg]	MM24-EF ₁ (oxidiert) [u/mg]
10	10,9	3,3 ± 0	1,5 ± 0,1	7,5 ± 0	1,2 ± 0,2
15	17,8	4,2 ± 0,1	2,1 ± 0,2	13,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2
20	24,5	5,2 ± 0,3	2,7 ± 0,4	21,1 ± 0,4	3,1 ± 0,4
25	35,4	6,3 ± 0,4	3,8 ± 0,6	30,9 ± 0,6	4,5 ± 0,7
30	45,6	8,2 ± 0,5	5,0 ± 0,6	41,8 ± 1,2	6,8 ± 1,0
35	54,7	9,8 ± 1,1	6,4 ± 1,1	52,4 ± 2,5	9,3 ± 1,2
40	66	12 ± 2,1	8,5 ± 1,2	63,7 ± 4,5	13,2 ± 1,6

Die Hydrolyseaktivitäten der EF₁-Komplexe des KH7 und der Mutanten KG11 und MM24 im reduzierten und oxidierten Zustand aus Tabelle 3.18 sind noch einmal graphisch in Abbildung 3.25 dargestellt worden. Es zeigte sich, dass alle Komplexe in dem beobachteten Bereich von 10-40°C temperaturabhängig sind. So stieg die Aktivität des KH7 von 11 u/mg bei 10°C auf 66 u/mg bei 40°C an. Die reduzierte Form des MM24 wies einen ähnlichen Aktivitätsanstieg auf und blieb mit 64 u/mg bei 40°C nur leicht hinter dem KH7 zurück. Die beiden KG11 Proben hatten durchweg eine niedrigere Aktivität, wobei die Messwerte der oxidierten Form bei jeder Temperatur etwa 2 u/mg geringer waren. Die ATPase-Aktivität des oxidierten MM24-EF₁ stieg ähnlich konstant von 1,2 u/mg auf 13,2 u/mg an, wie die oxidierte des KG11.

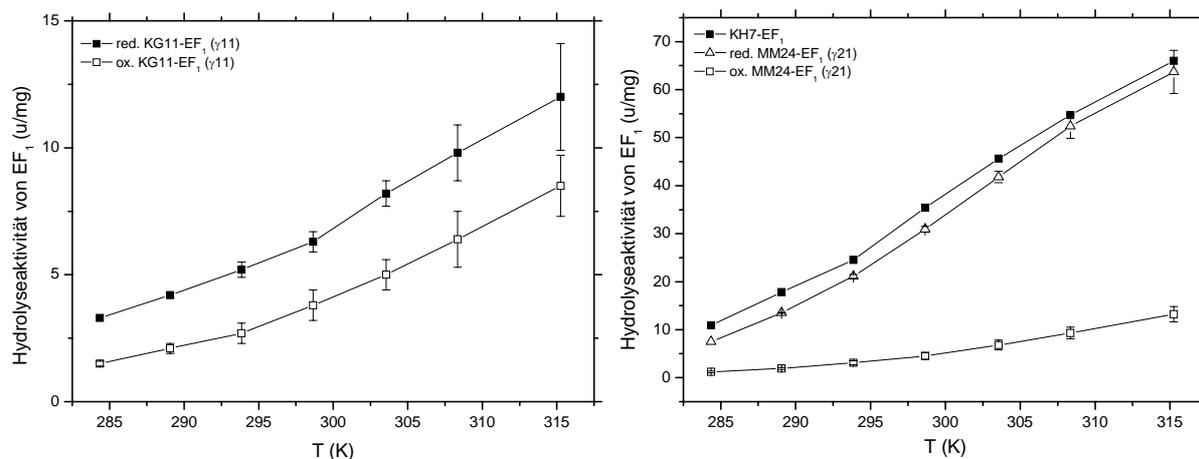


Abb. 3.25: Graphische Darstellung der ATP-Hydrolyseaktivität des KH7, KG11 und MM24 aus Tabelle 3.18 im Temperaturbereich von 10-40°C. links: reduzierter (volle Quadrate) und oxidiertes (leere Quadrate) KG11-EF₁, rechts: KH7-EF₁ (volle Quadrate), sowie reduzierter (leere Dreiecke) und oxidiertes (leere Quadrate) MM24-EF₁.

Die Aktivierungsenergien lassen sich direkt aus den Steigungen der Arrhenius-Analyse ablesen, die die Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Temperatur beschreibt. Nach der Umrechnung der Hydrolyseaktivitäten in Umsatzraten (k) wurde deren logarithmierte Form gegen $1/T$ aufgetragen und in Abbildung 3.25 dargestellt.

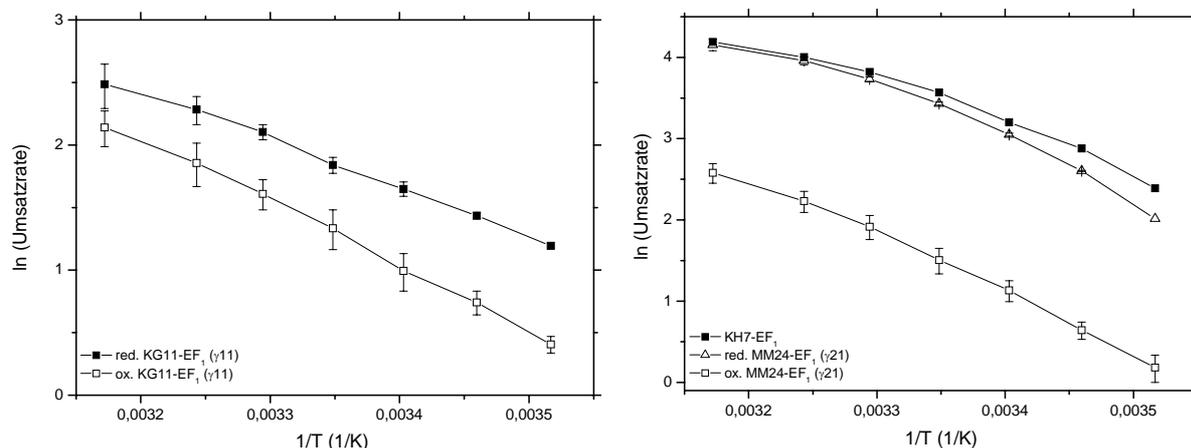


Abb. 3.26: Arrhenius-Analyse des KH7, KG11 und MM24 im Temperaturbereich von 10-40°C. links: reduzierter (volle Quadrate) und oxidierter (leere Quadrate) KG11-EF₁, rechts: KH7-EF₁ (volle Quadrate), sowie reduzierter (leere Dreiecke) und oxidierter (leere Quadrate) MM24-EF₁.

Für die Ermittlung der Aktivierungsenergie durch die Bestimmung der (negativen) Steigung einer Näherungsgeraden wurde nur der Temperaturbereich von 20-35°C betrachtet, da hier bei allen Kurven in guter Näherung ein lineares Verhalten vorlag. Bei den höchsten Temperaturen ist vor allem bei den Graphen des KH7 und des reduzierten MM24 ein von den Näherungsgeraden abweichender Werteverlauf, nämlich mit geringeren negativen Steigungen zu finden.

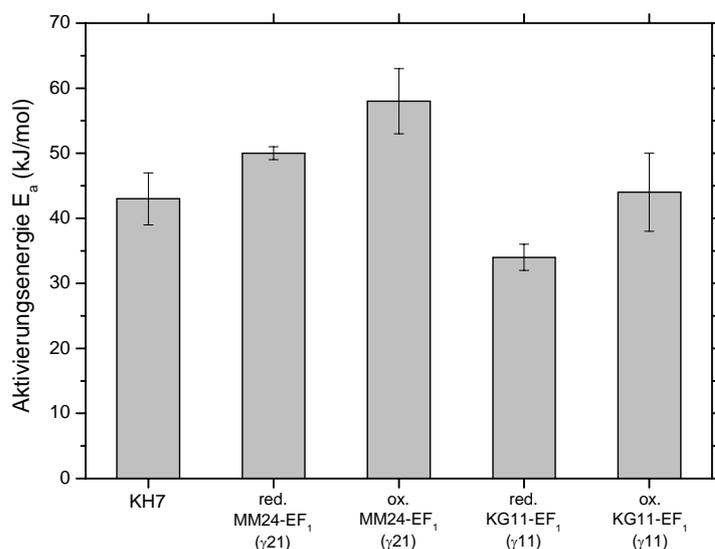


Abb. 3.27: Aktivierungsenergie E_a von reduziertem und oxidiertem KG11-EF₁ und MM24-EF₁ mit KH7-EF₁ als Vergleich im Temperaturbereich von 20-35°C. Die Werte sind noch einmal in Tabelle 3.19 aufgelistet.

Tab. 3.19: Aktivierungsenergien E_a des KG11, MM24 und des KH7 bei 20-35°C

	Aktivierungsenergie nach Arrhenius (kJ/mol)	
	reduzierte Probe	oxidiert Probe
KG11	34 ± 3	45 ± 6
MM24	50 ± 1	58 ± 5
KH7	42 ± 4	

Die Aktivierungsenergien aller untersuchten EF1-Komplexe schwanken zwischen 40-52 kJ/mol. Die oxidierten Proben vom KG11 (11) und MM24 (21) sind tendenziell eher höher als die der jeweiligen reduzierten Form. Das KH7-EF₁ besitzt eine Aktivierungsenergie von 42 kJ/mol, wobei die Werte von MM24 (red. und ox.) oberhalb und die des KG11 (red. und ox.) unterhalb der KH7-Energie liegen.

3.2 Mutagenesestudien an EF₀F₁-Konstrukten

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden EF₀F₁-Konstrukte gesucht, die für die Untersuchung der Relativrotation unter Synthesebedingungen geeignet sind. Dazu müssen EF₀F₁-Komplexe in einer elektrisch Dichten Membran fixiert werden, so dass die Rotation unter ATP-Synthesebedingungen durch eine elektrische Potenzialdifferenz angetrieben werden kann. Mit der Mutante SE1 konnte bereits in hoher Ausbeute die F₁ getriebene Rotation des c-Rings von F₀ durch die ATP-Hydrolyse nachgewiesen werden (Pänke et al., 2000). Bei der Mutante handelt es sich um einen cysteinfreien KH7, der einen Strep-tag II am C-terminalen Ende der c-Untereinheit und eine His₆-tag am N-terminalen Ende von β trägt. Durch diese tags ist es möglich das Enzym im Einzelmolekülnachweis (Kap. 2.8.2) orientiert auf der Oberfläche zu immobilisieren. Dabei steht das Enzym auf dem Kopf, wobei der F₁-Komplex mit den His-tags an der Glasfläche fixiert ist und der F₀-Teil in die Lösung ragt. Um die Rotation unter Synthesebedingungen beobachten zu können, ist es notwendig einen EF₀F₁-Komplex zu haben, der richtig herum orientiert ist, also mit dem F₀-Teil an der Oberfläche immobilisiert wird. Des Weiteren sollte das gesuchte Konstrukt einen stabilen EF₀F₁-Komplex bilden und in zuverlässigen Mengen isolierbar sein. Die Unterschiede zwischen den betrachteten Mutanten sind im Vergleich zum SE1 in Tabelle 3.20 dargestellt (Kap. 2.5.9-2.5.13) Alle Mutanten verfügen über den His-tag am C-terminalen Ende von c, der die spätere Orientierung auf der Oberfläche gewährleistet. Der SE3 und der SE4 unterscheiden sich nur durch den fehlenden Strep-tag am N-terminalen Bereich der α -Untereinheit des SE4. Dabei könnte der SE3 durch die doppelte Anzahl an Strep-tags möglicherweise eine festere Bindung des Aktinfilament ermöglichen, andererseits die Stabilität des Enzyms durch den tag in α negativ beeinflusst werden.

Tab. 3.20: Bezeichnung der EF₀F₁-Konstrukte

Plasmide	C-terminales Ende von c	N-terminales Ende von α	N-terminales Ende von β	Mutationen in intervenierenden Regionen
pSE1	Strep-tag II	/	His ₆ -tag	/
pSE3	His ₆ -tag	Strep-tag II	Strep-tag II	„alten“ Strep-tag II hinter c, Punktdeletion zwischen γ und β
pSE4	His ₆ -tag	/	Strep-tag II	„alten“ Strep-tag II hinter c, Punktdeletion zwischen γ und β
pSW7	His ₆ -tag	Strep-tag II	Strep-tag II	/
pWH1*	His ₆ -tag	Strep-tag II	Strep-tag II	/

*: ist ein pBWU13-Derivat und kein pACWU1.2-Derivat, wie die übrigen Plasmide

Bei der Herstellung des SE3 durch die Firma IBA (Göttingen) blieben zwei Mutationen in intervenierenden Regionen zurück. Zum einen wurde für eine *Xba*I-Schnittstelle eine Punktdeletion in der Region zwischen γ und β vorgenommen und zum anderen der „alten“ Strep-tag II des SE1 nicht entfernt, sondern nur in die intervenierende Region hinter *c* verschoben. Diese möglichen Störfaktoren für das Enzym wurden entfernt und der Nachfolger des SE3 als SW7 bezeichnet (Kap. 2.6.12 und 3.2.1). Der WH1 besitzt die gleichen Merkmale wie der SW7 und unterscheidet sich nur durch seinen Plasmidursprung. Im Gegensatz zu den anderen Mutanten geht der WH1 auf den pBWU13-Vektor zurück und nicht auf den pACWU1.2.

3.2.1 Mutagenese der EF₀F₁-Mutante pSW7

Bei der Mutagenese des pSW7 wurden die bereits erwähnten unerwünschten Mutationen in den intervenierenden Regionen rückgängig gemacht. Für die Baseninsertion zwischen Position 4913 und 4914 mittels PCR (Abb. 2.2 A) wurde ein Subklon erstellt, der das *Kpn*I/*Sac*I-Fragment des pSE3 im Klonierungsvektor pBSKII enthält. Der entstandene Subklon pSW4 (4308 bp) besitzt somit den codierenden Bereich für die Untereinheit γ und einen Teil des codierenden Bereichs für β (β R1- β L162). Nach der erfolgreichen Insertion wurde das entsprechende Fragment in den pSE3 zurückgesetzt. Der positive Klon pSW6 trägt nun nur noch die unerwünschte tag-Sequenz des pSE1. Um den noch verbleibenden „alten“ Strep-tag II hinter der Untereinheit *c* zu entfernen, wurde ein weiterer Subklon pSW5 benötigt, der das *Bam*HI/*Xho*I-Fragment (1783 bp) des pSE3 enthalten sollte. Es enthält Teile von *atpA* (α) und *atpB* (α), sowie die drei Gene für die Untereinheiten *c*, *b* und δ (*atpE*, *atpF* und *atpH*). Eine der Herstellung des pSW4 entsprechende Vorgehensweise führte hier jedoch trotz Überprüfung der möglichen Parameter in keinem Fall zu positiven Klonen. Aus diesem Grund wurde ein Fragment (1865 bp) des pSE3, das die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I überspannt, in einer PCR nach dem in Abbildung 2.1 gezeigten Verfahren vervielfältigt und wegen seiner fehlenden Basenüberhänge in einer „blunt end“ Ligation erfolgreich in den pSTBlue-I eingebaut. Der entstandene pSW5 umfasst 5716 bp. Die Entfernung des tags erfolgte ebenfalls in einer PCR (Abb. 2.2 B). Durch die bereits phosphorylierten Primer konnte das PCR-Fragment direkt geschlossen werden. Nach Religation des 37 bp verkürzten *Bam*HI/*Xho*I-Fragment in den pSW6 entstand der pSW7. Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse der beiden Inserts aus pSW4 und pSW5 überprüft und in Abbildung 3.26 gezeigt. Man erkennt, dass in den Spuren 1 und 4 durch einen *Xba*I-Schnitt beim Plasmid pSE3 Fragmente mit 7137 bp und 2197 bp Größe entstehen, das Plasmid pSW7 hingegen nur linearisiert (9298 bp) wird. Dieses zeigt, dass die Baseninsertion erfolgreich die *Xba*I-Schnittstelle an dieser zerstört hat. Die Richtigkeit des Plasmids pSW7 wird durch einen erfolgreichen Doppelschnitt mit *Xba*I und *Sac*I (Spur 2 und 5) bestätigt. Dabei entstehen beim pSE3 drei Fragmente (7137 bp, 1655 bp und 538 bp) und beim pSW7 nur zwei (7639 bp und 1659 bp).

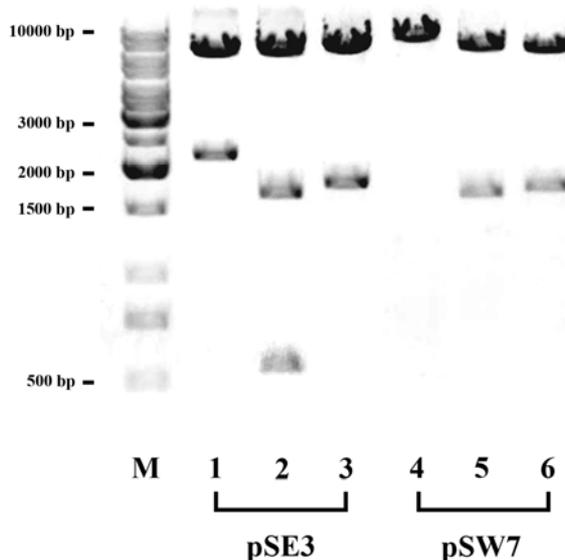


Abb. 3.28: Restriktionsanalyse der Plasmide pSE3 und pSW7. (1% analytisches Agarosegel; schwarz/weiß invertiertes Photo); M: λ -DNA Marker; 1, 2 & 3: pSE3; 4, 5 & 6: pSW7; 1 & 4: *Xba*I-Schnitt; 2 & 5: *Xba*I/*Sac*I-Doppelschnitt; 3 & 6: *Bam*HI/*Xho*I-Doppelschnitt.

Mit dem zweiten Doppelschnitt durch *Bam*HI und *Xho*I in den Spuren 3 und 6 wird das Fragment mit der tag-Deletion betrachtet. In beiden Mutanten entstehen durch diesen Schnitt zwei Fragmente, eine Bande liegt bei gut 7000 bp (pSE3: 7551 bp und pSW7: 7556 bp) und die andere zwischen 1500-2000 bp. Bei der kleineren Bande lässt sich im Gel bereits der geringe Größenunterschied erahnen (pSE3: 1783 bp und pSW7: 1746 bp). Eine Sequenzierung über die von der Mutagenese betroffenen Bereiche bestätigte, dass die isolierten Plasmide die gewünschten Sequenzen besaßen (Daten nicht aufgeführt).

3.2.2 Herstellung der EF₀F₁-Mutanten aus *E. coli* DK8

Für die Expression der EF₀F₁-Mutanten mussten die entsprechenden Plasmide zuvor in einen geeigneten *E. coli* Stamm transformiert werden. Als Wirt wurde der DK8 Stamm verwendet, dessen Genom kein *atp*-Operon besitzt. Durch das Wachstum auf Succinat-Agarplatten konnte so die Funktionsfähigkeit der plasmidkodierte ATP-Synthasen überprüft werden. Die Tabelle 3.21 zeigt das Succinat-Wachstum von BWU13 im Vergleich zu den Mutanten. Der SE1 zeigt ein sehr gutes Wachstum, vergleichbar mit dem BWU13. Das Wachstum der Mutanten SE3, SE4, SW7 und WH1 wies aber nur eine etwas geringere Geschwindigkeit auf. Diese erfolgreiche Komplementation auf Succinat ermöglichte es, alle Stämme zur Expression von ATPase-Komplexen zu nutzen.

Tab. 3.21: Wachstum der EF₀F₁-Mutanten und BWU13 auf Succinat-Agarplatten

<i>E. coli</i> DK8 mit dem jeweiligen Plasmid	Wachstum auf Succinat-Medium bei 37°C
pBWU13	+++
pSE1	+++
pSE3	++
pSE4	++
pSW7	++
PWH1	++

Für die eigentliche Anzucht der *E. coli* DK8-Mutanten wurde auf glycerinhaltigem Minimalmedium zurückgegriffen, da das Wachstum auf succinathaltigem Minimalmedium dafür zu langsam gewesen wäre. Um die Wachstumsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde die OD₆₀₀ der Anzucht in 12-16 l Minimalmedium zeitlich verfolgt und daraus die Verdopplungszeit t_d der jeweiligen Mutante ermittelt. Die Werte der ermittelten Verdopplungszeiten schwanken zwischen 122 min für den BWU13 und 166 min für den SE4 (Tab. 3.22). Diese geringfügigen Unterschiede hatten aber keinerlei Einfluss auf die Zellausbeute. Die Ausbeute an Biofeuchtmasse pro Liter Anzuchtsmedium lag immer um 2,5 g/l, somit konnten unabhängig von der Mutation bei einer 12 Liter Anzucht üblicherweise 30 g Biofeuchtmasse geerntet werden. Es zeigte sich bei beiden Messwerten aus Tabelle 3.22, dass eine große Übereinstimmung unter den Mutanten bestand, denn keine fiel durch geringe Ernteausbeuten oder langsames Wachstum auf.

Tab. 3.22: Verdopplungszeiten und Ernteausbeuten der EF₀F₁-Mutanten und BWU13

<i>E. coli</i> DK8 mit dem jeweiligen Plasmid	Verdopplungszeiten t_d für das Wachstum in Medium bei 37°C [min]*	Ernteausbeute in Biofeuchtmasse pro Liter Medium [g/l]*
pBWU13	122	2,6 ± 0,4
pSE1	128	2,4 ± 0,4
pSE3	152	2,1 ± 0,5
pSE4	166	2,4 ± 0,4
pSW7	149	2,7 ± 0,5
pWH1	161	2,5 ± 0,3

*: bezogen auf glycerinhaltigem Minimalmedium

Die ATPase-Aktivität der EF_0F_1 -Komplexe innerhalb der Membranen ist in Tabelle 3.23 zusammengefasst. Bei der zeitaufgelösten Zunahme der Phosphatkonzentration als Maß für die ATP-Hydrolyseaktivität von membranassoziierten EF_0F_1 -Komplexen (Kap. 2.7.11) hatte der BWU13 (WT) mit 58 ± 20 u/mg die höchste Aktivität. Mit großem Abstand folgte dem Wildtyp-Enzym die Hydrolyseaktivität der Mutante KH7 mit etwa 16 u/mg, wobei diese Mutante nur zur Expression von EF_1 -Komplexen verwendet wurde (siehe Kap. 3.1). Mit einer Hydrolyseaktivität vom 6 u/mg, die 10-fach kleiner ist als die des BWU13 und 3-fach kleiner ist als die des KH7, zeigt der SE1 von den EF_0F_1 -Konstrukten, die für die Rotation im Einzelmolekülnachweis geeignet sind, die beste Aktivität. Die EF_0F_1 -Mutanten für die Relativrotation unter Synthesebedingungen, der SE3, der SE4, der SW7 und der WH1, haben nur eine sehr geringe Aktivität auf Membranebene von etwa 1,7 u/mg. Die Verbesserungen des SW7 im Vergleich zum SE3 hatten scheinbar keine Auswirkungen auf die Aktivität. Gleiches galt für den Tausch des Vektorursprungs des WH1 als veränderter BWU13.

Tab. 3.23: ATPase-Aktivitäten und DCCD-Hemmung in Membranen von BWU13, KH7 und den EF_0F_1 -Mutanten

<i>E. coli</i> DK8 mit dem jeweiligen Plasmid	ATP-Hydrolyseaktivität von membranassoziierten EF_0F_1 -Komplexen [u/mg]	Hemmung der EF_0F_1 -Komplexe durch 50 μ M DCCD [%]
pBWU13	58 ± 20	86
pKH7	16 ± 3	89
pSE1	6 ± 2	90
pSE3	$2,2 \pm 1$	88
pSE4	$1,2 \pm 0,5$	83
pSW7	$2 \pm 0,2$	88
pWH1	$1,3 \pm 0,3$	85

Eine Hemmung der EF_0F_1 -Konstrukte durch 50 μ M DCCD gewährleistete, dass die gemessene Hydrolyseaktivität nicht auf frei in der Lösung vorliegende F_1 -Köpfe zurückzuführen war, sondern nur durch gekoppelte EF_0F_1 -Komplexe erzeugt wurde. DCCD hemmt den membranintegrierten F_0 -Teil, so dass die notwendige Rotation des c-Rings und damit des F_1 -Komplexes für die Hydrolyse nicht mehr erfolgen kann. Mit 83-90% Reduktion der Aktivität konnte in allen Mutanten unabhängig von ihrer Ausgangsaktivität keine vollständige Kopplung gezeigt werden. Durch den bekannten Effekt, dass DCCD sich in Membranen aufkonzentriert, könnten 50 μ M bereits einen Überschuss an DCCD darstellen.

3.2.2.1 Isolierung von EF₁- und EF₀F₁-Komplexen

Nach der Ernte wurden aus den Zellsuspensionen exemplarisch EF₁-Komplexe der Mutanten BWU13, KH7 SE1 und SE3 isoliert und über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Abbildung 3.3, weiter oben, zeigt ein Chromatogramm der Aufreinigung von EF₁-KH7). Unabhängig von der geernteten Zellausbeute sollte diese Aufreinigung ein Maß für die enthaltene Anzahl an EF₀F₁-Komplexen geben (Tab. 3.24). Es zeigte sich, dass vom Wildtyp BWU13 mit einer Proteinausbeute von 7,5 mg/l, das entspricht bei einer 12 Liter Anzucht 90 mg Protein, gut doppelt so viele EF₁-Komplexe isolierbar waren wie vom KH7. Die Hydrolyseaktivität der beiden Konstrukte von 150 u/mg des BWU13 und von 120 ± 30 u/mg unterschieden sich kaum. Die EF₁-Ausbeute reduzierte sich erneut um die Hälfte auf 1,7 mg/l, wenn man sich nun den SE1 anschaut. Bei dieser EF₀F₁-Mutante zeigten sich neben den Ausbeuteverlusten auch erstmals Aktivitätsverluste, denn diese betrug nur 42 u/mg. Am geringsten war allerdings die EF₁-Konzentration von SE3, bei dem trotz unauffälliger Zellernte nur 0,4 mg/l mit 25 u/mg isoliert werden konnten, das entspricht 4,8 mg aus 12 Liter Minimalmedium. In den Ergebnissen der EF₁-Aufreinigung spiegelt sich ein ähnliches Bild wieder, wie es bereits für die Membranaktivitäten zu sehen war. So lassen sich von der Aktivität auf Membranebene direkte Rückschlüsse auf die Anzahl enthaltener EF₀F₁-Komplexe ziehen.

Tab. 3.24: Proteinausbeuten und Aktivitäten der EF₁-Komplexe von BWU13, KH7, SE1 und SE3

<i>E. coli</i> DK8 mit dem jeweiligen Plasmid	Proteinausbeute an EF ₁ pro Liter Minimal-Medium [mg/l] ¹	ATP-Hydrolyseaktivität von EF ₁ [u/mg] ¹
pBWU13	7,5	150
pKH7	3,5 ± 0,6 ²	120 ± 30 ³
pSE1	1,7	42
pSE3	0,4	25

¹: nach Anionenaustauschchromatographie

²: aus Tabelle 3.3

³: aus Diplomarbeit S. Winkler 2001

Das Hauptaugenmerk für das Handling der EF₀F₁-Mutanten lag in der Präparation von solubilisierten EF₀F₁-Komplexen. In einem ersten Schritt wurden hier die Membranen mit Detergenz versetzt und so das Enzym herausgelöst. Es wurden dazu verschiedene Detergenzien, wie Dodecylmaltosid, Triton X-100 und Na-Cholat verwendet, aber keines erzielte in der Isolierung eine bessere Proteinausbeute als Octylglucosid (Daten nicht gezeigt). Bei der Solubilisierung durch Octylglucosid konnten beim SE4 nur 72% des Proteins, bezogen auf die eingesetzte Membranzmenge, und bei dem SE1 85% isoliert werden (Tab.

3.25). Dieses gelöste Enzym wurde dann über eine erste Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dafür gab es zwei Möglichkeiten, entweder über die eingebauten strep-tags (ST) oder über die His-tags (NI). Je nachdem, wo der entsprechende tag sich befindet, spricht man von einer Aufreinigung über den F₁-Kopf oder über den F₀-Teil. Tabelle 3.25 zeigt die mögliche Aufreinigung mit ihrer entsprechenden Proteinausbeute und Aktivität. Die zugehörigen Gelproben sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

Tab. 3.25: Proteinausbeuten und ATP-Hydrolyseaktivitäten der EF₀F₁-Mutanten nach der Solubilisierung und der 1. Affinitätschromatographie

EF ₀ F ₁ - Mutante	Proteinausbeute nach der Solubilisierung [%] ^{1,2}		Proteinausbeute nach der 1. Chromatographie [%] ^{1,2}	ATP-Hydrolyse- aktivität [u/mg] ²
SE1	85	ST	1,5 ± 0,5	56 ± 18
SE3	80	ST	1,2 ± 0,3	97 ± 30
		NI	0,4 ± 0,2	14 ± 5
SE4	72	ST	1,2 ± 0,2	77 ± 43
		NI	0,6 ± 0,2	13 ± 2
SW7	81	ST	1,0 ± 0,1	87 ± 37
		NI	0,5 ± 0,1	31 ± 5
WH1	75	ST	0,9	131

¹: bezogen auf die Proteinkonzentration in den eingesetzten Membranen

²: Mittelwert über alle so vermessenen Proben (min. 5 & max. 15)

NI: Ni-NTA-Affinitätschromatographie

ST: Streptactin-Affinitätschromatographie

Die für den SE1 optimierte Reinigung erfolgte in der ersten Chromatographie über ST, also über den F₀-Teil des Enzyms. Dabei konnten 1,5% der eingesetzten Proteinmenge mit 56 u/mg gereinigt werden. Das Gel zeigt, dass die Probe noch nicht ganz sauber ist, aber alle EF₀F₁-Untereinheiten enthalten sind. Vergleicht man das nun mit den Ergebnissen des SE3, so zeigt dieser nach einer ST-Reinigung über den F₁-Teil ein ähnliches Ausbeuteverhalten, die Aktivität weist jedoch durch ihre enorme Höhe (97 u/mg) auf einen erhöhten Anteil an F₁ hin. Die Gelprobe bestätigte diese Annahmen, denn es weist fast nur α/β - und γ -Intensitäten auf. Reinigte man den SE3 zuerst über Ni-NTA, so reduzierte sich die Ausbeute noch weiter auf 0,4%. Die Hydrolyseaktivität lag bei 14 u/mg und das Gel zeigt nur F₀, den F₁-Kopf verloren hatte. Das Verhalten des SE4 gleicht dem des SE3, die Ausbeuten und die Aktivitäten bei den verschiedenen Chromatographien waren ähnlich. Die Banden im Gel sehen bei der ST-Probe besser aus, aber in der NI-Probe war das Enzym auseinander gefallen, und es war kaum F₁ enthalten. Von der Mutante SW7 blieben nach der ST-Reinigung noch etwa 1% Protein der

Anfangskonzentration, mit einer Aktivität von 87 u/mg über. Das entsprechende Gel zeigte einen vollständigen EF_0F_1 -Komplex. Bei der NI-Probe konnten im Gel ebenfalls alle EF_0F_1 -Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Aktivität der verbliebenden 0,5% SW7 lag bei 31 u/mg. Bei der Reinigung des WH1 über Streptactin (0,9%) lag eine sehr saubere EF_0F_1 -Probe vor, obwohl auch hier durch eine hohe Hydrolyseaktivität von 131 u/mg alles auf eine F_1 -lastige Probe hindeutet.

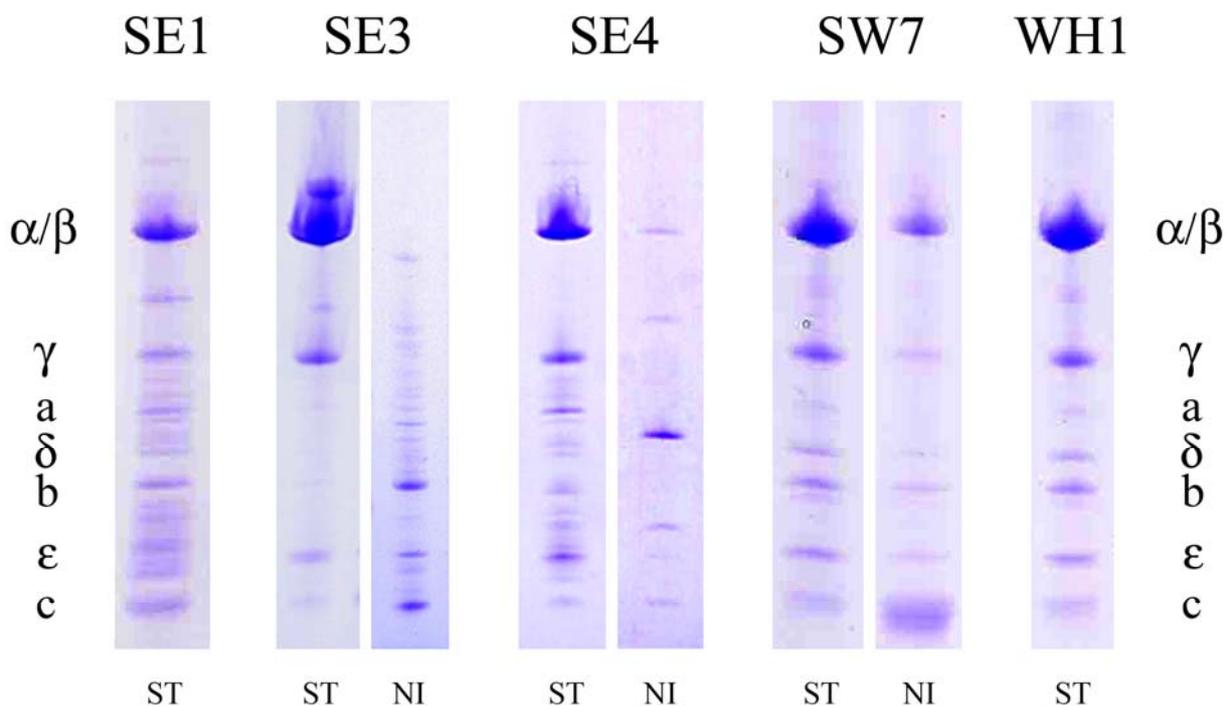


Abb. 3.29: 8-25% SDS-Gel der EF_0F_1 -Mutanten SE1, SE3, SE4, SW7 und WH1 nach der 1. Affinitätschromatographie aus Tabelle 3.25; NI: Ni-NTA-Affinitätschromatographie; ST: Streptactin-Affinitätschromatographie).

Die gereinigten Proben aus Tabelle 3.25 konnten über eine zweite Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt werden. Dazu wurde bei einer über den strep-tag gereinigten Probe eine Ni-NTA-Chromatographie angeschlossen (ST→NI) und umgekehrt bei einer His-tag Probe eine Streptactin-Chromatographie (NI→ST). In Tabelle 3.26 sind die Ergebnisse der Proteinausbeuten und Aktivitäten dargestellt. Bei einer Reinigung des ST-Eluats vom SE1 über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie konnten $0,3 \pm 0,1\%$ Protein mit einer Aktivität von 103 ± 39 u/mg isoliert werden. Durch die Problematik des EF_0F_1 -Zerfalls wurden weder beim SE3 noch beim SE4 für eine der beiden Proben ST oder NI nach einer weiteren Chromatographie Protein gefunden. Beim SW7 und WH1 lieferte nur eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie des ST-Eluats eine Proteinausbeute von jeweils 0,03% mit

Aktivitäten von 69 u/mg (SW7) und 53 u/mg (WH1). Bei einer weiteren Reinigung der NI-Probe des SW7 konnte kein Protein mehr gewonnen werden.

Tab. 3.26: Proteinausbeuten und ATP-Hydrolyseaktivitäten der EF₀F₁-Mutanten nach der 2. Affinitätschromatographie

EF ₀ F ₁ -Mutante		Proteinausbeute nach der 2. Chromatographie [%]*	ATP-Hydrolyse- aktivität [u/mg]
SE1	ST → NI	0,3 ± 0,1	103 ± 39
SE3	ST → NI	0	/
	NI → ST	0	/
SE4	ST → NI	0	/
	NI → ST	0	/
SW7	ST → NI	0,03	69
	NI → ST	/	/
WH1	ST → NI	0,03	53

*: bezogen auf die Proteinkonzentration in den eingesetzten Membranen

NI: Ni-NTA-Affinitätschromatographie

ST: Streptactin-Affinitätschromatographie

3.2.3 Rotatorische Eigenschaften der EF₀F₁-Mutanten nach der Isolierung und in Membranen

Die isolierten, solubilisierten EF₀F₁-Konstrukte aus Tabelle 3.25 und 3.26 wurden sowohl nach der ersten, als auch nach der zweiten Chromatographie auf ihre rotatorischen Eigenschaften untersucht. Die Anzahl an gefundenen Rotatoren innerhalb von 15 Minuten der jeweiligen Probe wurde in Tabelle 3.27 aufgeführt. Es zeigte sich, dass die Proben des SE3 und des SE4, die bereits ein Ungleichgewicht zwischen dem F₁-Komplex und dem F₀-Komplex im Gel aufwiesen, keinerlei Bindung von Aktinfilamenten auf der Oberfläche ermöglichten. Die SE1-Mutante lieferte nach der ST-Reinigung 9 ± 3 Rotatoren und konnte nach einer zweiten Reinigung über Ni-NTA mit einer ähnlichen Ausbeute von 12 ± 1 Drehern aufwarten. Die Mutanten, die für eine Untersuchung der Relativrotation unter Synthesebedingungen in der richtigen Orientierung auf der Oberfläche fixiert werden konnten, und noch Rotatoren lieferten, sind der SW7 und der WH1. Die EF₀F₁-Konstrukte des SW7 zeigten 5 ± 3 Dreher in der ersten ST-Probe, die nach der NI-NTA-Säule keine

Rotation mehr zeigte, aber noch Aktinbindung aufwies. Bei der ersten Isolierung über Nickel zeigte sich im Beobachtungszeitraum ein Dreher. Durch die geringe Rotationsausbeute (1 Dreher) der im Gel sehr sauber aussehenden WH1 Probe ist der SW7 die stabilste EF₀F₁-Mutante.

Tab. 3.27: Rotationsausbeute der EF₀F₁-Mutanten nach der 1. und 2. Affinitätschromatographie

EF ₀ F ₁ -Mutante	1. Chromatographie	Ausbeute an Rotatoren*	2. Chromatographie	Ausbeute an Rotatoren*
SE1	ST	9 ± 3	NI	12 ± 1
SE3	ST	k. B.	NI	/
	NI	k. B.	ST	/
SE4	ST	k. B.	NI	/
	NI	k. B.	ST	/
SW7	ST	5 ± 3	NI	0
	NI	1	ST	/
WH1	ST	1	NI	k. B.

* : bezogen auf eine Beobachtungsdauer der Durchflussküvette von 15 min

NI: Ni-NTA-Affinitätschromatographie

ST: Streptactin-Affinitätschromatographie

k. B.: keine Bindung auf der Oberfläche

Erste Messungen von EF₀F₁-Membranen im Einzelmolekülnachweis konnten bereits eine normale Fluktuation der Aktinfilamente bis hin zu 2-3 Umdrehungen in Hydrolyserichtung zeigen. Eine Rotation innerhalb einer Beobachtungsdauer von 1-1½ Stunden wurde jedoch noch nicht gefunden. Die Bindung über die Kopplungskette war jedoch gegeben und konnte durch das Weglassen einer Komponente der Kette nachgewiesen werden. In diesem Fall konnte aber keine Filamentbindung mehr beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Rotor/Stator-Verknüpfungen im „Zentrum“ des $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Komplexes

ATP-Hydrolyse treibt die Rotation von γ relativ zu $(\alpha\beta)_3$ im F_1 -Teil der EF_0EF_1 -ATP-Synthase an. Quervernetzungen zwischen den F_1 -Untereinheiten von Rotor γ und Stator $(\alpha\beta)_3$ sollten daher die ATP-Hydrolyse und die Rotationsbewegung verhindern. Untersuchungen mit der Mutante MM10 (α_{C280} und γ_{C285}), die bei Oxidation eine Disulfidbrücke im C-terminalen Ende von γ zu einer α -Untereinheit ausbildet, zeigten wider Erwarten eine unbeeinträchtigte Rotation und Aktivität trotz Brückenbildung (Gumbiowski et al., 2001). Bei anderen Quervernetzungen vom Hexagon mit γ in den Positionen $\alpha_{A334C}/\gamma_{L262C}$ oder $\beta_{D380C}/\gamma_{C87}$ konnte das Enzym hingegen blockiert werden (Gumbiowski et al., 2001; Duncan et al., 1995a). Dieses unterschiedliche Verhalten von γ bei einer Blockade im oberen beziehungsweise unteren Bereich wurde durch einen Bruch der γ -Helix begründet. Eine Rotation um Einfachbindungen der Disulfidbrücke ist allerdings nicht ganz auszuschließen. Um diese Frage zu klären wurden die in dieser Arbeit hergestellten Mutanten so gewählt, dass sie in und um den Bereich $\gamma A267$ -S271 (Position 16 bis 20 von γ) lagen, der aufgrund von Modellrechnungen als geeignet für die in Gumbiowski et al. (2001) vorgeschlagene partielle Aufwindung der Sekundärstruktur angesehen wird (D. Cherepanov, unveröffentlicht). Tabelle 4.1 fasst die Lage der quervernetzungsfähigen Cysteine und die entsprechenden Abstände der beiden Cystein- C_β -Atome vom jeweiligen α zu der Untereinheit γ der Mutanten zusammen.

Tab. 4.1: Cystein-Doppelmutanten und die Distanzen zwischen den Aminosäuren

	Punktmutation in α	Punktmutation in γ	Distanz zwischen den C_β -Atomen in Å		
			$\alpha_a - \gamma$	$\alpha_b - \gamma$	$\alpha_c - \gamma$
KG11 ($\gamma 11$)	E284C	L276C	7,8	11,8	14,2
MM26 ($\gamma 14$)	E284C	T273C	11,6	6,5	14,8
MM25 ($\gamma 17$)	E284C	A270C	14,2	7,4	14,1
MM24 ($\gamma 21$)	D336C	K266C	16,0	7,2	18,0

Dabei fällt auf, dass für alle Mutanten, von Position $\gamma 11$ bis $\gamma 17$, der ideale Partner auf α in Position E284C immer der gleiche ist. Dieses könnte einen Hub der γ -Helix bedeuten, obwohl laut Strukturdaten gemäß der anisotropen Temperaturverteilungen die Mobilität in diesem Bereich eher gering sein sollte, also eher auf eine unflexible Struktur der Helix und des betroffenen Loops in α hindeuten. Obwohl nach Careaga und Falke (Careaga et al., 1992 a & b) als Voraussetzung für die Bildung einer Disulfidbrücke ein maximaler Abstand von 4,6 Å bestehen darf, sind mit diesen vier Mutanten diejenigen mit den geringsten Abständen der Bindungspartner zueinander gefunden worden. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die Distanzen nicht mit dem EF₁-, sondern mit dem MF₁-Modell ermittelt wurden, und dass das Auswechseln zweier Aminosäuren immer auch mit einer möglichen Änderung der Struktur einhergehen kann. Die α -helikalen Strukturen sind durch die Konsistenz der Peptidbindung (C $_{\alpha}$ -Atome über alle Aminosäuren gleich) nicht von möglichen Änderungen betroffen. Abhängig von der Orientierung der Seitenketten konnte daher das Erreichen des erforderlichen Abstandes zwischen α und γ erwartet werden.

Nach dem Succinatwachstumstest und der Aufreinigung der EF₁-Komplexe deuteten schnelles Wachstum und hohe Proteinausbeute auf eine normale Funktion der Cystein-Doppelmutanten KG11, MM25 und MM24 hin. Die Verdopplungszeiten t_d für das Wachstum in Minimalmediem waren bei allen nahezu gleich. Die beobachteten Schwankungen waren gering, und können allein auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass es sich hier um Einzelmessergebnisse handelte. Bis zu diesem Zeitpunkt wiesen die Mutanten aufgrund der reduzierenden Bedingungen des *E. coli*-Cytosols keine Disulfid-Verknüpfung auf. Bei der Cystein-Doppelmutante MM26, die mit der Position T273C auf γ kurz oberhalb des möglichen Helixbruchs liegt, deutete sich bereits mit einem sehr geringen Succinatwachstum eine eventuell problematische Isolierung an. Dieses wurde bestätigt durch die nur in Spuren zu reinigenden Proteinmengen. Mit 0,3 mg/l konnte fast kein MM26-EF₁ isoliert werden. Das verbleibende Enzym besaß nur noch substöchiometrische Anteile der γ -Untereinheit (50%). Nach dem Versuch, die Probe zu oxidieren, zerfiel das Protein. Alle diese Ergebnisse weisen auf ein Faltungs- oder Assemblierungsproblem des MM26 hin, wobei wahrscheinlich die Einführung der Mutation in γ maßgeblich dafür verantwortlich ist, da die Punktmutation α_{E284C} sowohl beim KG11, als auch bei MM25 keinerlei ähnliche Phänomene hervorruft. Die Mutante wurde daraufhin nicht weiter in die biochemischen Untersuchungen mit einbezogen.

Die isolierten EF₁-Komplexe der verbleibenden drei Mutanten (KG11, MM25, MM24) wurden als erstes auf ihre ATPase-Aktivität getestet. Die Hydrolyseaktivitäten der reduzierten Komplexe, die mit Hilfe des LeBel-Tests gemessen wurden, lagen bei den beiden Mutanten MM25 ($\gamma 17$) und MM24 ($\gamma 21$) mit 66 ± 10 u/mg und 68 ± 10 u/mg (siehe a_{red} in Tab. 4.2) in einem erwarteten normalen Bereich, ähnlich dem KH7-EF₁. Die ATPase-Aktivität des KG11-EF₁ zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen Mutanten eine verringerte Aktivität im reduzierten Zustand von 19 ± 6 u/mg. Ein möglicher Einfluss der veränderten Aminosäuren ist unwahrscheinlich, da die Punktmutation in α auch beim MM25 keine negativen

Auswirkungen auf die Aktivität hatte. Die Punktmutation γ_{L276C} wurde bereit in einer früheren Arbeit als Grund für eine hydrolytische Inaktivierung ausgeschlossen (Promto, 2001). Eine mögliche Begründung für die geringe Aktivität könnte in der Lokalisation im Enzym begründet liegen. Der KG11 mit der γ Mutation in Position 11, vom C-terminalen Ende der Helix aus gesehen, liegt am weitesten oben, nämlich da, wo die Helix noch weitestgehend im Hexagon „eingeklemmt“ ist. Durch diese Verengung könnten die Aminosäureseitenketten elektrostatisch stärker interagieren, was die Aktivität herabsetzen würde. Diese Erklärung ist wahrscheinlich, da dort, wo sich vorher eine hydrophile und eine hydrophobe Aminosäure, nämlich Glutamat und Leucin, gegenüberstanden, dann zwei hydrophile Seitenketten, nämlich Cysteine, eingesetzt worden sind. Dieser Effekt bleibt beim MM25 und MM24 auf Grund des hinreichenden Platzes im Enzym aus.

Bei allen Doppelmutanten, außer dem MM26, wurde die Funktionalität des Enzymkomplexes durch den Austausch zweier Aminosäuren, wenn überhaupt nur gering beeinträchtigt. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen γ und einem α ermöglicht demnach direkte Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der Untereinheit γ .

Tab. 4.2: Zusammenfassung der Hydrolyseaktivitäten und Quervernetzungsausbeuten

	ATP Hydrolyseaktivität* (u/mg)		Quervernetzungsausbeute* η_{CL}
	a_{red}	a_{ox}	
KG11 (γ_{11})	19 ± 6	14 ± 3	98%
MM25 (γ_{17})	66 ± 10	18 ± 2	70%
MM24 (γ_{21})	68 ± 10	18 ± 4	99%

*: Mittelwert über alle so vermessenen Proben (≥ 10)

Die ersten biochemischen Untersuchungen zur Quervernetzung mit Hilfe von verschiedenen Oxidationsmitteln zeigte beim KG11, als auch beim MM24 und MM25, für Luftsauerstoff, Kupferchlorid und Jod ein ähnliches Verhalten. Mit keinem dieser Reagenzien war es möglich, in einer Mutante mehr als 50% von γ mit dem Hexagon zu vernetzen. Genauer zu betrachten sind allerdings die Auswirkungen der beiden aromatischen Disulfide DTNB und DTP. Im KG11-EF₁ und MM24-EF₁ konnte durch DTNB eine vollständige Ausbildung (99%) der Disulfidbrücke erreicht werden. Auch beim MM25-EF₁ zeigt sich die höchste Quervernetzungsausbeute (70%) nach Reaktion mit DTNB (Tab. 4.2). Bei der Oxidation durch DTP bildete sich beim KG11, dessen Cystein dem C-terminalen Ende von γ am nächsten liegt, ebenfalls eine vollständige Quervernetzung aus. Dieses Ergebnis konnte beim MM25 und MM24 nicht erzielt werden. Hier erwies sich DTP trotz der Ähnlichkeit zu DTNB

als schlechtes Oxidationsmittel. Der Unterschied zwischen dem Pyridyl-Disulfid DTP und dem substituierten Phenyl-Disulfid DTNB liegt in den funktionellen Gruppen (Carboxyl- und Aminogruppe) des DTNB begründet (Brocklehurst, 1978). Gerade in einer schwach alkalischen Umgebung, wie sie mit dem KG-Puffer bei pH 7,5 gegeben war, ermöglichen die hydrophilen Gruppen dem DTNB tiefer in das $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon einzudringen. Das unpolare DTP hingegen kann nur die beiden Cysteine des KG11 erreichen. Das Cystein des MM25 liegt dagegen bereits knapp 2 Windungen tiefer auf der γ -Helix und wird so, wie die Cysteine im MM24-EF₁, bereits durch die hydrophilen Seitenketten der oberen Loops in den α und β Untereinheiten behindert.

Die Annahme, aus den Proteinbanden in SDS-Gelen auf die Quervernetzungsausbeute zu schließen, konnte durch die bestehende Linearität zwischen der eingesetzten Proteinmenge und der Bandenintensität gestützt werden. Mit 4,5 ng Protein konnten sogar noch geringste Menge Protein nachgewiesen werden. Die Western Blots der jeweiligen oxidierten Proben bestätigten die Bildung der Disulfidbrücken zwischen γ und α in den Mutanten KG11, MM25 und MM24, wobei aber im MM25 30% der Untereinheit γ unvernetzt blieben.

Bei der Messung der ATP-Hydrolyseaktivität aller oxidierten Proben konnte keine vollständige Inaktivierung der Enzyme festgestellt werden. Es ergaben sich für den oxidierten MM25 (γ 17) und den oxidierten MM24 (γ 21) verminderte Restaktivitäten um 18 u/mg. Mit einer Aktivität des oxidierten KG11 von 14 ± 3 u/mg verblieben nicht nur 70% aktives Enzym, sondern sogar 74%. Das heißt, dass keine der drei Cystein-Doppelmutanten durch Oxidation inaktiviert werden konnte. Während die Aktivität des MM25 auf die verbleibenden nicht oxidierten Enzyme zurückgeführt wurde, ist in den beiden anderen Mutanten von einer Hydrolyseaktivität auch der quervernetzten Anteile auszugehen. Weiterhin zeigten kinetische Messungen zur Ausbildung und Rückbildung der Disulfidbrücke bei allen drei Mutanten eine vollständige Reversibilität der Quervernetzung und deren Hydrolyseaktivität. Die Halbwertszeit der Oxidation betrug dabei nur einige wenige Minuten, und die der Reduktion war beim MM25 und MM24 sogar noch schneller. Der KG11 braucht 10 Minuten um 50% der Quervernetzung zu lösen, was auf einen etwas stabileren oxidierten Zustand gegenüber den anderen beiden Mutanten hindeutet.

Im Gegensatz zum MM10 wiesen diese Mutanten nicht die gleiche Aktivität im reduzierten und oxidierten Zustand des Enzyms auf (Müller, 2004). Um zu zeigen, dass die Restaktivität wirklich auf das quervernetzte Enzym zurückzuführen ist, wurde folgende Modellrechnung durchgeführt. Die Aktivität des oxidierten Enzyms a_{ox} setzt sich zusammen aus einem Anteil η_{CL} der Aktivität des tatsächlich quervernetzten Enzyms a_{CL} und dem Anteil $(1 - \eta_{CL})$ der Aktivität des reduzierten Enzyms a_{red} . Die Gleichung sieht wie folgt aus:

$$a_{ox} = \eta_{CL} \cdot a_{CL} + (1 - \eta_{CL}) \cdot a_{red}$$

Nimmt man nun an, dass das quervernetzte Enzym inaktiv ist

$$a_{CL} = 0$$

so gilt für die maximale Quervernetzungsausbeute η_{max} :

$$\eta_{max} = 1 - \frac{a_{ox}}{a_{red}}.$$

Mit den gemessenen Werten für a_{ox} und a_{red} aus Tabelle 4.2 ergeben sich die maximalen Anteile an quervernetztem Enzym η_{max} (Tab. 4.3), mit denen die restliche Hydrolyseaktivität allein durch die Aktivität des reduzierten Enzyms erklärt werden kann. Danach könnten beim KG11 nur maximal 26%, und beim MM24 nur maximal 74% Quervernetzung durch eine alleinige ATPase-Aktivität des reduzierten Enzyms erklärt werden. Da aber in beiden Fällen mit 98 bzw. 99% Quervernetzung eine viel höhere Ausbeute gemessen wurde, lässt sich diese nur durch aktive oxidierte Enzyme begründen. Beim MM25- EF_1 liegt die gemessene Quervernetzung mit 70% noch unterhalb des Maximalwertes, somit wird wahrscheinlich die Restaktivität alleine durch den Anteil der reduzierten Form erfolgt sein. Es ist zwar möglich, dass auch hier die oxidierte Form eine, wenn gleich eine eher geringe Aktivität aufweisen könnte, was aber hier nicht nachweisbar war. Aus den Messwerten ergibt sich bei einer 99% Quervernetzung für das tatsächlich quervernetzte Enzym rechnerisch eine Hydrolyseaktivität a_{CL} von 11 ± 3 u/mg beim KG11- EF_1 und von 12 ± 3 u/mg beim MM24- EF_1 (Tab. 4.3).

Von den vier Cystein-Doppelmutanten blieben somit nur noch der KG11 (γ_{11}) und der MM24 (γ_{21}) über, die durch die Möglichkeit der vollständigen Quervernetzung bei verbleibender Aktivität Rückschlüsse auf das Verhalten von γ bei der Rotation zuließen.

Tab. 4.3: Berechnung von η_{max} und a_{CL} des quervernetzten Enzyms

	maximaler Anteil an quervernetztem Enzym η_{max} bei Aktivität allein durch reduzierte Proben	Aktivität des quervernetzten Enzyms a_{CL} (u/mg) bei 99% Quervernetzungsanteil
KG11	26%	11 ± 3
MM25	74%	~ 0
MM24	73%	12 ± 3

Erste Rückschlüsse auf die rotatorischen Eigenschaften der Enzyme konnten durch die Bestimmung der Aktivierungsenergien unter ATP-Hydrolyse gemacht werden. Dazu wurden die ATPase-Aktivitäten der reduzierten und oxidierten Form der mutierten EF₁-Komplexe in einem Temperaturbereich von 10-40°C bestimmt. Aufgrund der nichtlinearen Bereiche in der Arrhenius-Analyse, in den Ergebnissen deutlich insbesondere bei den höheren Temperaturwerten, wurde die Aktivierungsenergie für die ATP-Hydrolyse von den Cystein-Doppelmutanten nur in dem Temperaturbereich von 20-35°C ermittelt. Dabei diente das KH7-EF₁ als Vergleichsenzym. Der Aktivitätsabfall bei niedrigen Temperaturen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Dorgan et al., 1984; Baracca et al., 1989; Grüber et al., 1994), wobei Al-Shawi und Senior von einer reversiblen Kälte-Denaturierung ausgehen (Al-Shawi et al., 1988). Letztere berechnen im Temperaturbereich von 23-30°C eine Aktivierungsenergie für EF₁ von 53,6 kJ/mol. Die Aktivierungsenergien aller untersuchten EF₁-Komplexe (KH7, reduzierte und oxidierte Form des KG11 und MM24) lagen im Bereich von 40-52 kJ/mol, wobei die oxidierten Formen im Mittel jeweils etwa höhere Werte als die reduzierten Pendanten zeigten. Es konnte somit demonstriert werden, dass die Ausbildung einer Quervernetzung keinen großen Einfluss auf die Aktivierungsenergie der ATP-Hydrolyse in den oxidierten Enzymen hat. Die Erhöhung lag im Bereich der Bindungsstärke von Wasserstoffbrückenbindungen. Ähnliche E_a-Werte konnten bereits für den MM10 ermittelt werden, bei dem die oxidierte Probe mit 44 ± 9 kJ/mol etwas, aber im Rahmen der Messgenauigkeit nur wenig signifikant höher liegt als die Aktivierungsenergie von 42 ± 9 kJ/mol für die reduzierte Probe (Müller, 2004). Diese Tendenz der leicht erhöhten Aktivierungsenergie der oxidierten zur reduzierten Probe zeigten aber auch der KG11 und der MM24. Der Wert für das KH7-EF₁ lag mit 42 ± 4 kJ/mol in dieser Arbeit niedriger als bei M. Müller, der einen Wert von 54 ± 8 kJ/mol für KH7 berechnete (Müller, 2004).

Es scheint so als ob die Rotoreinheit γ unabhängig von der Disulfidbrücke die ATP-Hydrolyse unbeeindruckt antreibt. Obwohl die ATP-Hydrolyseaktivität absinkt muss nicht wie erwartet eine signifikant erhöhte Energiebarriere überwunden werden. Dieser Ausgleich zwischen Aktivität und Aktivierungsenergie kann nur in einer hohen Flexibilität der γ -Helix begründet liegen.

Als eigentlicher Nachweis für die kontinuierliche γ -Rotation wurden die Enzyme im Einzelmolekülnachweis unter ATP-Hydrolysebedingungen betrachtet. Die Rotationsmessungen zeigten bei beiden Mutanten (KG11 und MM24) sowohl im reduzierten, als auch im oxidierten Zustand im Rahmen der Messgenauigkeit die gleiche Anzahl von Drehern, ca. 4 ± 2, d.h. bei gleicher Verdünnung, Beobachtungsdauer und auch bei mehrfacher Wiederholung des Experiments. Durch die Biotinylierung des Enzyms gelang es allerdings nicht, auch hier eine fast vollständige Quervernetzung zu realisieren, die Quote lag hier bei 70-80%. Wahrscheinlich wurden bei der Biotinylierung der Proben im äquimolaren Verhältnis von 1:1 (Enzym:Biotin) nicht nur das Cystein in γ 108, sondern auch ein Teil der Cysteine, die für die Quervernetzung vorgesehen sind, gelabelt. Diese Ausbeute ist aber

dennoch groß genug, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch quervernetzte Rotatoren beobachtet wurden. Dieses ist nur durch eine Rotation von γ zu erklären.

Betrachtet man nun abschließend alle Cystein-Doppelmutanten, die eine vollständige Quervernetzung von γ mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon ausbilden konnten, so zeigt sich das in Abbildung 4.1 dargestellte Bild.

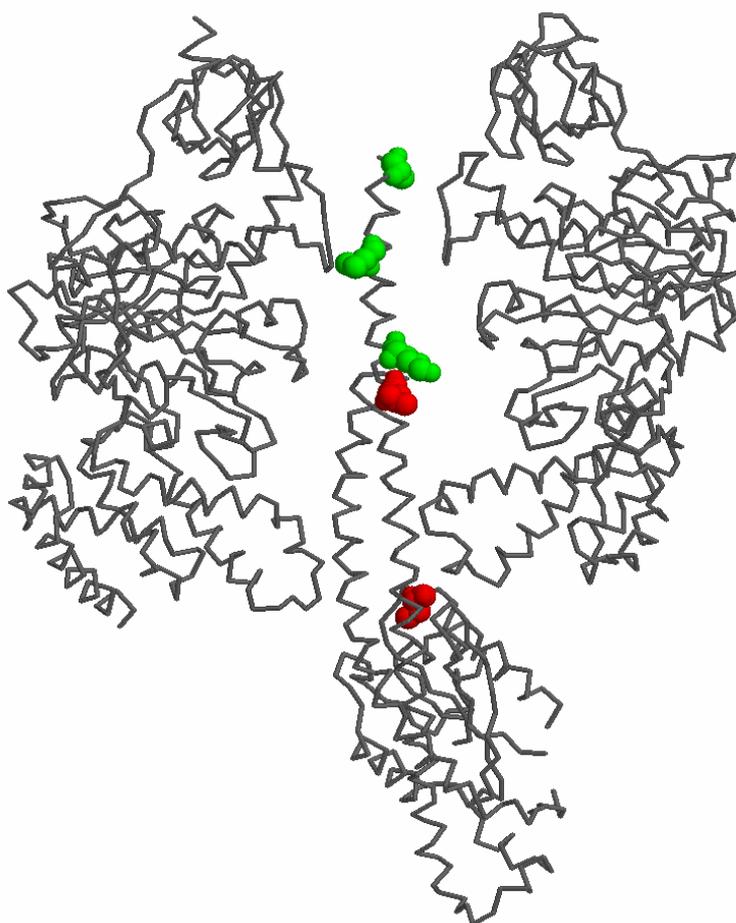


Abb. 4.1: Darstellung der Cysteine-Positionen auf γ innerhalb des EF₁-Komplexes aller nahezu vollständig oxidierbaren Mutanten. Stellvertretend für das $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon ist links α_a -Untereinheit und rechts eine β_r -Untereinheit in grau dargestellt. Auf der γ -Untereinheit in der Mitte sind in grün die Aminosäure-Positionen der Mutanten gezeigt, die nach Quervernetzung aktiv waren, und in rot, die dann inaktiv waren. Die Positionen auf γ sind von oben nach unten: A285, L276, K266, L262 und A87.

Der MM10 ($\alpha_{P280C}/\gamma_{A285C}$) am C-terminalen Ende von γ konnte neben dem KG11 ($\alpha_{E284C}/\gamma_{L276C}$) und dem MM24 ($\alpha_{D336C}/\gamma_{K266C}$) nicht durch Quervernetzung inaktiviert werden, was durch eine Grünfärbung in der Darstellung verdeutlicht wurde. Erst mit dem Beginn der zweiten, kürzeren Helix von γ ist durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke die Hemmung der Aktivität und der Rotation möglich. Dargestellt wurden die beiden Mutanten PP2 ($\alpha_{A334C}/\gamma_{L262C}$) und SW3 ($\beta_{D380C}/\gamma_{C87}$) durch ihre in rot gefärbten Positionen auf γ .

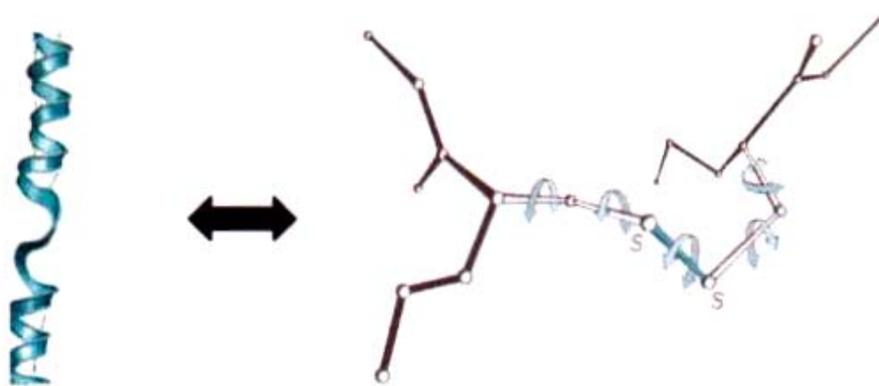


Abb. 4.3: Entwindung der α -Helix von γ (links) oder Rotation um die Einfachbindung der Disulfidbrücke (rechts).

Die Wahrscheinlichkeit, dass die signifikante Aktivität trotz Quervernetzung durch die Rotation um Einfachbindungen der Disulfidbrücke hervorgerufen wird, ist eher gering (Abb. 4.3). Im Falle des MM10 könnte allerdings die Rotation um Einfachbindungen der Disulfidbrücke und das damit verbundene Durchfädeln des letzten Rests von γ (V286) einfacher sein als das Aufbrechen der Helix. Dieses würde die unverändert hohen Aktivitäten im reduzierten und oxidierten Zustand erklären. Beim quervernetzten KG11 (γ 11) und MM24 (γ 21) ist aber kein Durchfädeln des gesamten oberen Helixbereiches und damit die Rotation um Einfachbindungen der Disulfidbrücke mehr möglich. Hier liegt die Erklärung für die Aktivität alleine in einem „aufwinden“ der Helix begründet. Die Hydrolyse von ATP kann nur durch einen Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen und einer Rotation um die dihedralen Winkel stattfinden. Diese andere Möglichkeit des Enzyms die Blockade zu überwinden ist mit größeren Anpassungen im Komplex verbunden, was sich auch direkt in den Aktivitäten niederschlägt, aber durch die Flexibilität der γ -Helix aufgefangen wird und somit keinen Unterschied in den Aktivierungsenergien hervorruft. Der vermutete Bereich des Helixbruchs liegt zwischen γ A267 und S271. Für den KG11, der oberhalb dieses Bereiches liegt, ist der Bruch an der vermuteten Stelle sehr wahrscheinlich. Bei dem MM24 muss allerdings die Helix tiefer brechen, da die Mutante mit γ K266C unterhalb des Bereiches liegt, und somit bei einem Bruch an immer der gleichen Stelle der Helix nicht aktiv sein dürfte. Die Energie von 56 pN nm reicht aus, um die Ramachandran-Barriere zu überwinden. Ein Helixbruch unterhalb des MM24 (γ 21) ist wahrscheinlich. Es scheint so als ob die γ -Untereinheit abhängig von der Blockade einen Helixbruch unterhalb der betreffenden Position zulässt, solange die Disulfidbrücke nicht im unteren, durch die zweite Helix stabilisierten, Bereich liegt. Allerdings ist davon auszugehen, dass der Auslöser für den Helixbruch die erzwungene Quervernetzung ist und unter „normalen“ Bedingungen im Enzym nicht vorkommt.

4.2 Diskussion zur Stabilität verschiedener EF₀F₁-Mutanten

Für den optischen Nachweis der Relativrotation unter Synthesebedingungen müssen in einem ersten Schritt membranintegrierte EF₀F₁-Komplexe hergestellt werden, die die Voraussetzung einer spezifischen Bindung des c-Rings an die Oberfläche und eine gerichtete Kopplung der Aktinfilamente an den F₁-Komplex gewährleisten. Mit der Mutante SE1 konnte bereits in hoher Ausbeute die F₁-getriebene Rotation des c-Rings von F₀ durch die ATP-Hydrolyse nachgewiesen werden (Pänke et al., 2000). Durch einen Strep-tag II am C-terminalen Ende der c-Untereinheit und eine His₆-tag am N-terminalen Ende von β konnte der F₁-Komplex auf der Oberfläche immobilisiert werden, und der in die Lösung ragende F₀-Teil mit dem gebundenen Filament rotieren. Die Unterschiede zwischen den hergestellten EF₀F₁-Konstrukten für die Rotation unter Synthesebedingungen sind im Vergleich zum SE1 in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tab. 4.4: Bezeichnung der EF₀F₁-Konstrukte

Plasmide	C-terminales Ende von c	N-terminales Ende von α	N-terminales Ende von β	Mutationen in intervenierenden Regionen
pSE1	Strep-tag II	/	His ₆ -tag	/
pSE3	His ₆ -tag	Strep-tag II	Strep-tag II	„alten“ Strep-tag II hinter c, Punktdeletion zwischen γ und β
pSE4	His ₆ -tag	/	Strep-tag II	„alten“ Strep-tag II hinter c, Punktdeletion zwischen γ und β
pSW7	His ₆ -tag	Strep-tag II	Strep-tag II	/
pWH1*	His ₆ -tag	Strep-tag II	Strep-tag II	/

*: ist ein pBWU13-Derivat und kein pACWU1.2-Derivat, wie die übrigen Plasmide

Alle neuen EF₀F₁-Mutanten verfügen über den His-tag am C-terminalen Ende von c und den Strep-tag II am N-terminalen Ende von β und gewährleisten so den notwendigen, gerichteten Aufbau der Kopplungskette im Einzelmolekülnachweis. Um das, für die Visualisierung der Relativrotation, optimale EF₀F₁-Konstrukt im Bezug auf Ausbeute und Stabilität zu finden, wurden, ausgehend vom SE3, weitere Mutationen vorgenommen. Dem SE4 fehlt der Strep-tag am N-terminalen Ende der α -Untereinheit, um so Aufschlüsse über eine mögliche Beeinflussung des tag zu bekommen, da auch beim Vergleichsenzym, dem SE1, keine Veränderung von α vorlag. Des Weiteren besitzen der SE3 und der SE4 klonierungsbedingte

Mutationen in intervenierenden Regionen, die beim SW7 und WH1 entfernt werden konnten. Durch die Deletion dieser unnötigerweise im *atp*-Operon zurückgebliebenen Mutationen könnte möglicherweise die Ausbeute und Stabilität der Enzyme weiter gesteigert werden. Der WH1 ist kein pACWU1.2- sondern ein pBWU13-Derivat. Da der Vektor pBWU13 zu den *high copy number* Plasmiden zählt, könnte dieses sich ebenfalls positiv auf die Ausbeute auswirken.

Mit dem Succinatwachstumstest, den Verdopplungszeiten und Ernteausbeuten deutet alles auf eine normale Funktion der EF_OF₁-Konstrukte hin. Trotz leichter Schwankungen vor allem bei den Verdopplungszeiten (t_d) fällt keine Mutante durch vermindertes Wachstum auf. Erste Unterschiede zeigten sich bei den ATP-Hydrolyseaktivitäten von membranassoziierten EF_OF₁-Komplexen. Hier waren alle neuen Mutanten noch um den Faktor 3 schlechter als der SE1, wobei der SE3 mit $2,2 \pm 1$ u/mg die höchste Aktivität aufwies. Der Wildtyp (WT) BWU13 war noch mal um einen Faktor 10 aktiver als der SE1.

Entscheidend für eine Aussage über die Stabilität der Enzyme waren die Isolierung der EF_OF₁-Mutanten aus den Membranen und die Rotation der isolierten Komplexe unter ATP-Hydrolysebedingungen. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den stabilen Ausbeuten des SE1 (56 u/mg und 9 ± 3 Rotatoren), das nur der SW7 mit 87 u/mg und 5 ± 3 Rotatoren annähernd so erfolgreich ist. Keine der anderen Konstrukte erwies sich als stabiler im Bezug auf die Kopplung zwischen F_O- und F₁-Teil, was sich bei der Zusammensetzung der verschiedenen Chromatographie-Eluate im SDS-Gel zeigte. Mit der 1. Affinitätschromatographie konnten die besten Ergebnisse erzielt werden, vor allem dann, wenn es sich um Streptactin-Material handelte. Wurde als erstes Säulenmaterial Ni-NTA verwendet so halbierte sich die gewonnene Proteinmenge und im Rotationstest zeigte sich bestenfalls ein Dreher beim SW7. Eine zweite Affinitätschromatographie reduzierte die Proteinausbeute auf 0,03 mg/ml (SW7 und WH1) und zeigte keine Rotatoren mehr. Bei den EF_OF₁-Komplexen SE3 und SE4 konnte dann bedingt durch den Zerfall in den Kopfteil F₁ und den membranständigen F_O-Teil, wie auf dem Gel zu sehen, kein Protein mehr isoliert werden.

Obwohl der WH1 die gleichen Mutationen trägt, wie der SW7, konnte durch den Einbau des *atp*-Operons in den Vektor pBWU13 keine Verbesserung der Ausbeute erzielt werden. Die Proteinausbeuten waren vergleichbar, das Gel zeigt auch alle gewünschten Banden, aber der Rotationsnachweis viel mit einem Dreher pro Platte (30 min Beobachtungsdauer) schwächer aus. Der SW7 geht auf den pACYC177 Vektor zurück, der in der Arbeitsgruppe von Nakamoto damals bewusst als *low copy number* Plasmid eingesetzt wurde, um die Expression von EF_OF₁-Komplexen in der Membran zu reduzieren (Chang et al., 1978). Der pBWU13 hingegen zählt zu den *high copy number* Plasmiden (Moriyama et al., 1991, Iwamoto et al., 1991). Bereits die Hydrolyseaktivität (150 u/mg) und die gemessene EF₁-Ausbeute (7,5 mg/l) bestätigen, dass der WT eine hohe Expression von EF_OF₁ besitzt. Es scheint aber so, dass dieser Vorteil des pBWU13 durch das mutierte *atp*-Operon im WH1 so gestört wird, dass der

Expressionsvorteil des pBWU13 gegenüber dem pACYC177 Vektor keine Auswirkungen auf die Proteinausbeute besitzt. Dabei kann die Expression des Proteins bereits geringer ausfallen, da den pBWU13 die Mutationen mehr beeinträchtigen als den pACYC177, oder die Proteine zwar vermehrt exprimiert, aber dann direkt wieder abgebaut werden, so dass eine dem SW7 ähnliche Ausbeute zurück bleibt.

Der SE3 und der SE4 besitzen beide die klonierungsbedingten Mutationen in intervenierenden Regionen (Tab. 4.4). Zum einen wurde für eine *Xba*I-Schnittstelle eine Punktdeletion in der Region zwischen γ und β vorgenommen, und zum anderen der „alte“ Strep-tag II des SE1 nicht entfernt, sondern nur in die intervenierende Region hinter c verschoben. Bei der Isolierung dieser beiden Mutanten zeigte sich, dass sie keine stabilen EF_0F_1 -Komplexe enthielten. Bei einer Reinigung über den F_1 -Kopf konnte im Gel kein F_0 -Teil mehr gefunden werden, und umgekehrt. Da der SE3 sich nur durch besagte Veränderungen in den intervenierenden Regionen vom SW7 unterscheidet, scheinen diese für die Instabilität verantwortlich zu sein. Das Fehlen des Strep-tags II am N-terminalen Ende von α im SE4 konnte keine Verbesserung der Isolierung hervorrufen. Die Probleme der Isolierung des SE3- EF_0F_1 und SE4- EF_0F_1 liegen demnach in der Regulation der Expression begründet. Bei dem *atp*-Operon von *E. coli* erfolgt die Regulation im Wesentlichen auf der Translationsebene, wobei die Effizienz der Translationsinitiation, die Stabilität der mRNA und die Translationskopplung zu betrachten sind (McCarthy et al., 1985; McCarthy, 1990). Insbesondere die Bildung von Sekundärstrukturen im Bereich der Translations-Initiations-Regionen (TIR) ist dabei relevant (McCarthy 1988). Eine Kopplung konnte sogar für die Expression der Gene *atpEFHAG* im *atp*-Operon gezeigt werden (Hellmuth et al., 1991, Angov und Brusilow, 1994). Eine Reinitiation der Translation kann eine zunehmend schwächere Expression bewirken, beeinflusst durch eine veränderte Sekundärstruktur der TIR des folgenden Gens (Rex et al., 1994). So scheint also die Mutation vor allem zwischen *atpE* (c) und *atpF* (b) dazu zu führen, dass die Translationsinitiation gestört wird, und so ein Ungleichgewicht in der stöchiometrischen Verteilung der Untereinheiten entsteht, was eine Instabilität der Komplexe zu Folge hat.

Über alle untersuchten Mutanten gesehen zeigt das SW7- EF_0F_1 die stabilsten Komplexe und Hydrolyseaktivitäten mit signifikant hohen Isolierungs- und Rotationsausbeuten. Mit diesem EF_0F_1 -Konstrukt wurde eine Mutante gefunden, die den ersten Schritt zur Realisierung des optischen Nachweises der Relativrotation unter Synthesebedingungen ebnet.

4.3 Ausblick

Durch die versuchte Blockade der Rotation konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Untereinheit γ um eine sehr elastische „Kurbel“ handelt, die selbst einen Helixbruch verkräftet, nur um die ATP-Hydrolyse aufrecht zu erhalten.

Interessant bleibt im Hinblick auf die Elastizität vor allem der Bereich von γ , in dem die beiden Mutanten MM26 ($\alpha_{E284C}/\gamma_{T273C}$) und MM25 ($\alpha_{E284C}/\gamma_{A270C}$) die Quervernetzung ausbilden sollten. Da sowohl oberhalb als auch unterhalb dieser beiden Mutanten mit dem KG11 und dem MM24 EF₁-Komplexe gefunden wurden, die durch eine Quervernetzung nicht blockiert werden konnten, ist anzunehmen, dass auch dazwischen eine Vernetzung keine Auswirkungen auf die Rotation hätte. Es scheint allerdings so, dass, gestützt durch die Computersimulation und die unverminderte Hydrolyseaktivitäten nach Oxidation bei MM10-EF₁ und KG11-EF₁, der Bereich ($\gamma_{A267} - S271$) auch im WT-Enzym eine hohe Flexibilität besitzt. Im Gegensatz dazu hat eine Quervernetzung im MM24-Komplex, dessen Disulfidbrückbildung unterhalb des betreffenden Bereiches erfolgt, eine signifikante Reduktion der Hydrolyseaktivität zur Folge. Die Rotation um Einfachbindungen scheint hier, durch eine größere Stabilität der Helix, nur mit Aktivitätseinbußen möglich. Könnte die Elastizität des Bereiches γ_{A267} bis S271 einen regulierenden Einfluss auf den *binding change* Mechanismus haben oder auf die Bindungsstellen einwirken? Um mögliche Regulierungen der ATP-Hydrolyse durch elastische Strukturen von γ im Zentrum des $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Komplexes zu untersuchen, wären weitere Mutagenesestudien sinnvoll. Eine Möglichkeit wäre, die γ -Helix durch den Austausch von Aminosäuren zu versteifen, oder mit Hilfe des Einbaus von langkettigen Aminosäuren sowohl in γ , als auch im $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon, den vorhandenen Hohlraum zu reduzieren und so einen Art „Reibung“ zu erzeugen. Wie verhielte sich unter diesen Bedingungen dann die ATP-Hydrolyse und könnten Änderungen im Rotationsverhalten beobachtet werden?

Bei den Mutagenesestudien für die Visualisierung der Relativrotation unter ATP Synthesebedingungen wurde mit dem SW7-EF₀EF₁ eine Mutante entwickelt, die über den His-tag am C-terminalen Ende von c und einen Strep-tag am N-terminalen Ende jeder der 6 Untereinheiten des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons besitzt. Von den untersuchten Komplexen (SE3, SE4, SW7, WH1) zeigt dieses EF₀EF₁-Konstrukt, unter Berücksichtigung der mutationsbedingten Einbußen, die maximalen Proteinausbeuten ohne Verlust von Stabilität, Aktivität und Rotation unter ATP-Hydrolyse. Offen bleibt, warum der Einbau des *atp*-Operons in den Vektor pBWU13 (Mutante WH1) keine weitere Verbesserung der Ausbeute gebracht hat.

Im nächsten Schritt zum Rotationsexperiment müssen nun die gereinigten SW7-Komplexe in Proteoliposomen eingebaut, und die Enzyme auf ihre Protonenleitfähigkeit hin überprüft werden. Dieses ist essentiell, um die Rotation in Syntheserichtung durch eine protonenmotorische Kraft antreiben zu können. Für den eigentlichen Aufbau des

fluoreszenzmikroskopischen Einzelmolekülnachweises steht in Folgearbeiten die Immobilisierung der membranintegrierten SW7-EF₀EF₁ Komplexe auf einer ITO-beschichteten Glasoberfläche an. ITO zeichnet sich dadurch aus, dass es elektrisch leitend ist und so durch das Anlegen einer Spannung ein Protonenfluss erzeugt werden kann. Des Weiteren wird durch seine Transparenz die optische Beobachtung des Experimentes nicht beeinträchtigt. Entscheidend für den Erfolg der Rotation unter Synthesebedingungen wird vor allem die Herstellung einer elektrisch dichten Membranoberfläche sein. Ein wichtiger Optimierungsparameter ist dabei die Phospholipid-Zusammensetzung der Membranoberfläche beziehungsweise der Proteoliposomen. Es stellt sich die Frage, ob das Ausspreiten der Proteoliposomen auf der Oberfläche ausreicht, oder ob bereits im Vorfeld die Glasträger zusätzlich mit einem Mono- oder Bilayer beschichtet werden müssen?

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stand die Auswirkung von kovalenten Quervernetzungen auf die Enzymaktivität und Rotation von EF_1 -Komplexen ($(\alpha\beta)_3\gamma$) der F-ATPasen im Vordergrund. Bei der Drehbewegung stellt γ den Rotor und das $(\alpha\beta)_3$ -Hexagon den Stator dar. Aufgrund der Resultate mit der Mutante MM10 ($\gamma_{A285C/\alpha_{P280C}}$), der trotz Disulfidbrücke zwischen α und γ am C-Terminus von γ noch unverminderte Aktivität und Rotation zeigte, wurde der Frage nachgegangen, ob der EF_1 -Komplex in der Lage ist, die Rotation durch einen Bruch der α -helikale Struktur von γ oder durch Rotation um eine Einfachbindung der Disulfidbrücke aufrechtzuerhalten (Gumbiowski et al., 2001). Quervernetzungen vom Hexagon mit γ in anderen Positionen, tiefer im Komplex gelegen ($\alpha_{A334C/\gamma_{L262C}}$ und $\beta_{D380C/\gamma_{C87}}$), konnte das Enzym hingegen blockieren (Gumbiowski et al., 2001; Duncan et al., 1995a). Aus diesem Grund wurden für eine genauere Betrachtung des Verhalten von γ Cystein-Doppelmutanten im Zentrum des $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Komplexes um den, durch eine Modellrechnung postulierten „aufgewundenen“ Bereich, der sich von $\gamma_{T253-V257}$ erstreckt, untersucht. Von den vier betrachteten Mutanten KG11 (γ_{11}), MM26 (γ_{14}), MM25 (γ_{17}) und MM24 (γ_{21}) fiel der MM26 bereits nach der Isolierung, aufgrund von Faltungs- und Assemblyproblemen, durch die nur noch substochiometrische Anteile der γ -Untereinheit (50%) enthalten waren, raus. Die verbleibenden drei Cystein-Doppelmutanten zeigten ein gutes Wachstum und normale Hydrolyseaktivitäten von 66 ± 10 u/mg und 68 ± 10 u/mg für MM25 (γ_{17}) und MM24 (γ_{21}), und eine geringere beim KG11 von 19 ± 6 u/mg im reduzierten Zustand. Nach der Oxidationsreaktion, die zur Disulfidbrückenbildung führte, besaßen alle drei Mutanten noch etwas verringerte, aber signifikante Aktivitäten von 14 ± 3 u/mg für den KG11, 18 ± 2 u/mg für den MM25 und 18 ± 4 u/mg für den MM24. Allerdings zeigte sich im Gel, bestätigt durch den Western Blot, dass der MM25 nicht mehr als 70% Quervernetzung aufwies, so dass bei dieser Mutante die verbleibende Aktivität mit hoher Wahrscheinlichkeit auf nicht vernetztes Enzym zurückgeführt werden kann. Bei dem KG11- EF_1 ($\gamma_{L276C/\alpha_{E284C}}$) und dem MM24- EF_1 ($\gamma_{K266C/\alpha_{D336C}}$) hingegen konnte jedoch eine hohe, fast 99%-ige Quervernetzung nachgewiesen werden. Zusammen mit den Hydrolyseaktivitäten im oxidierten Zustand ließ sich zeigen, dass diese Aktivitätswerte nicht mehr durch die verbleibenden reduzierten Enzyme erklärt werden können. Beide zeigten im quervernetzten Zustand jeweils nur gering, erhöhte Aktivierungsenergie, und gleichbleibende Häufigkeiten von Rotationsnachweisen im Einzelmolekülexperiment. Mit diesen zwei Cystein-Doppelmutanten wurden somit weitere Quervernetzungen gefunden, die ebenso wie der MM10 aktiv nach Oxidation sind, aber tiefer im Enzym liegen und begründet durch die hohe Elastizität im oberen Bereich der Untereinheit γ die ATP-Hydrolyse trotz Blockade durch Quervernetzung aufrecht erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Rotation um die Einzelbindungen innerhalb der Disulfidbrücke unwahrscheinlich ist, und daher die Aktivität des quervernetzten Enzyms nur durch eine Aufwindung der γ -Helix erklärt werden kann. Da

M. Müller zeigen konnte, dass der obere Bereich von γ nicht permanent fixiert ist, und somit nicht als Lager fungiert (Müller, 2004), ist es wahrscheinlich, dass die Drehung um die dihedralen Winkel nur durch die Disulfidbrücken aufgezwungen wurde, aber unter „normalen“ Bedingungen im Enzym nicht vorkommt. Da der Auslöser für den Helixbruch die erzwungene Quervernetzung ist, lässt sich auch der „aufgewundene“ Bereich der Helix nicht auf bestimmte Aminosäuren festlegen, sondern variiert wahrscheinlich mit der Position der Disulfidbrücke.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war, ein EF_0F_1 -Konstrukt zu finden, das den optischen Nachweis der Relativrotation unter Synthesebedingungen von membranintegrierte EF_0F_1 -Komplexen ermöglicht. Die erste Voraussetzung dafür war der Einbau von zwei verschiedenen Tags zur spezifischen Bindung des c-Rings an die Oberfläche, sowie eine gerichtete Kopplung der Aktinfilamente an den F_1 -Komplex zu gewährleisten. Von den vier Mutanten SE3, SE4, SW7 und WH1 zeigten, nach unauffälligem Wachstum auf Succinat und gleichen ATP-Hydrolyseaktivitäten von membranassoziierten EF_0F_1 -Komplexen, die beiden SE-Mutanten keine Stabilität bei der Isolierung im Bezug auf die Kopplung zwischen F_0 - und F_1 -Teil. Dieses konnte auf Probleme bei der Regulation der Expression, bedingt durch die klonierungsbedingten Mutationen in intervenierenden Regionen (Tab. 4.4), zurückgeführt werden. Mit dem SW7- EF_0F_1 wurde eine Mutante gefunden, die mit einer guten Aktivitäts- und Rotationsausbeute (87 ± 37 u/mg, 5 ± 3 Rotatoren) nach einer Aufreinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatographie durch ihre Stabilität als Ausgangspunkt für das Rotationsexperiment unter ATP-Synthese dienen kann. Auch die isolierte Proteinmenge ist mit den Ausbeuten des SE1- EF_0F_1 vergleichbar. Der WH1, dessen *atp*-Operon dem des SW7 gleicht, brachte trotz seines Vektorursprunges - *high copy number* Plasmid pBWU13 - keine Erhöhung der Proteinausbeute oder der Anzahl an Rotatoren.

6 Anhang

Es handelt sich bei den nachfolgenden Sequenzen um einen Vergleich des *atp*-Operons von *E.coli* K12 mit denen von pKH7, pSE1, pSE3 und pSW7 (Kap. 2.5), hergestellt mit dem Programm „Multalin“. Das *atp*-Operon befindet sich zwischen den Erkennungssequenzen von *Hind*III und *Xba*I, so dass in dem Vergleich nur dieses Fragment betrachtet wurde. Für die Basennummerierung (auf der linken Seite angegeben) wurde die erste Base der *Hind*III Erkennungssequenz gleich +1 gesetzt (Nielson et al. 1981). Über den Basensequenzen ist jeweils die Aminosäuresequenz der EF₀EF₁ Untereinheiten von *E.coli* K12 angegeben, wobei für Untereinheiten kodierende Sequenzen dick, und Abweichungen von der Basensequenz kursiv gedruckt wurden. Die Aminosäurenummerierung ist rechts angegeben. Des Weiteren wurden Erkennungssequenzen von verwendeten Schnittstellen unterstrichen, der His₆-tag (rot) und der Strep-tag II (grün) farbig abgesetzt. Nach Walker et al. (1984) wurde die „Start“ Aminosäure Methionin (M) bei den Untereinheiten γ , β und ϵ eingeklammert und nicht als erste Aminosäure gezählt, da sie dort nicht Teil des Proteins ist.

1

K12	<u>AAGCTTTCAA</u>	AGTTCTGGCG	ATGTTGGTGT	TACTGGTGGT	GGCGTTGGCG	GTTTTAAAGG
pKH7	<u>AAGCTTTCAA</u>	AGTTCTGGCG	ATGTTGGTGT	TACTGGTGGT	GGCGTTGGCG	GTTTTAAAGG
pSE1	<u>AAGCTTTCAA</u>	AGTTCTGGCG	ATGTTGGTGT	TACTGGTGGT	GGCGTTGGCG	GTTTTAAAGG
pSE3	<u>AAGCTTTCAA</u>	AGTTCTGGCG	ATGTTGGTGT	TACTGGTGGT	GGCGTTGGCG	GTTTTAAAGG
pSW7	<u>AAGCTTTCAA</u>	AGTTCTGGCG	ATGTTGGTGT	TACTGGTGGT	GGCGTTGGCG	GTTTTAAAGG

*Hind*III

61

K12	CGGTATTCTT	GCCGCTGATC	GTTACGTGGG	TTTTGGTGCT	GGTGGTTCAG	ATACTGGCAC
pKH7	CGGTATTCTT	GCCGCTGATC	GTTACGTGGG	TTTTGGTGCT	GGTGGTTCAG	ATACTGGCAC
pSE1	CGGTATTCTT	GCCGCTGATC	GTTACGTGGG	TTTTGGTGCT	GGTGGTTCAG	ATACTGGCAC
pSE3	CGGTATTCTT	GCCGCTGATC	GTTACGTGGG	TTTTGGTGCT	GGTGGTTCAG	ATACTGGCAC
pSW7	CGGTATTCTT	GCCGCTGATC	GTTACGTGGG	TTTTGGTGCT	GGTGGTTCAG	ATACTGGCAC

121

>a

9

				M	A	S	E	N	M	T	P	Q
K12	CGGCTGTAAT	TAACAACAAA	GGGTAAAAGG	CATC CATGGCT	TCAGAAAATA	TGACGCCGCA						
pKH7	CGGCTGTAAT	TAACAACAAA	GGGTAAAAGG	CATC CATGGCT	TCAGAAAATA	TGACGCCGCA						
pSE1	CGGCTGTAAT	TAACAACAAA	GGGTAAAAGG	CATC CATGGCT	TCAGAAAATA	TGACGCCGCA						
pSE3	CGGCTGTAAT	TAACAACAAA	GGGTAAAAGG	CATC CATGGCT	TCAGAAAATA	TGACGCCGCA						
pSW7	CGGCTGTAAT	TAACAACAAA	GGGTAAAAGG	CATC CATGGCT	TCAGAAAATA	TGACGCCGCA						

181 29
 D Y I G H H L N N L Q L D L R T F S L V
 K12 GGATTACATA GGACACCACC TGAATAACCT TCAGCTGGAC CTGCGTACAT TCTCGCTGGT
 pKH7 GGATTACATA GGACACCACC TGAATAACCT TCAGCTGGAC CTGCGTACAT TCTCGCTGGT
 pSE1 GGATTACATA GGACACCACC TGAATAACCT TCAGCTGGAC CTGCGTACAT TCTCGCTGGT
 pSE3 GGATTACATA GGACACCACC TGAATAACCT TCAGCTGGAC CTGCGTACAT TCTCGCTGGT
 pSW7 GGATTACATA GGACACCACC TGAATAACCT TCAGCTGGAC CTGCGTACAT TCTCGCTGGT

241 49
 D P Q N P P A T F W T I N I D S M F F S
 K12 GGATCCACAA AACCCCCCAG CCACCTTCTG GACAATCAAT ATTGACTCCA TGTTCTTCTC
 pKH7 TGATCCACAA AACCCCCCAG CCACCTTCTG GACAATCAAT ATTGACTCCA TGTTCTTCTC
 pSE1 TGATCCACAA AACCCCCCAG CCACCTTCTG GACAATCAAT ATTGACTCCA TGTTCTTCTC
 pSE3 TGATCCACAA AACCCCCCAG CCACCTTCTG GACAATCAAT ATTGACTCCA TGTTCTTCTC
 pSW7 TGATCCACAA AACCCCCCAG CCACCTTCTG GACAATCAAT ATTGACTCCA TGTTCTTCTC

301 69
 V V L G L L F L V L F R S V A K K A T S
 K12 GGTGGTGCTG GGTCTGTTGT TCCTGGTTTT ATTCCGTAGC GTAGCCAAAA AGGCGACCAG
 pKH7 GGTGGTGCTG GGTCTGTTGT TCCTGGTTTT ATTCCGTAGC GTAGCCAAAA AGGCGACCAG
 pSE1 GGTGGTGCTG GGTCTGTTGT TCCTGGTTTT ATTCCGTAGC GTAGCCAAAA AGGCGACCAG
 pSE3 GGTGGTGCTG GGTCTGTTGT TCCTGGTTTT ATTCCGTAGC GTAGCCAAAA AGGCGACCAG
 pSW7 GGTGGTGCTG GGTCTGTTGT TCCTGGTTTT ATTCCGTAGC GTAGCCAAAA AGGCGACCAG

361 89
 G V P G K F Q T A I E L V I G F V N G S
 K12 CGGTGTGCCA GGTAAGTTTC AGACCGCGAT TGAGCTGGTG ATCGGCTTTG TTAATGGTAG
 pKH7 CGGTGTGCCA GGTAAGTTTC AGACCGCGAT TGAGCTGGTG ATCGGCTTTG TTAATGGTAG
 pSE1 CGGTGTGCCA GGTAAGTTTC AGACCGCGAT TGAGCTGGTG ATCGGCTTTG TTAATGGTAG
 pSE3 CGGTGTGCCA GGTAAGTTTC AGACCGCGAT TGAGCTGGTG ATCGGCTTTG TTAATGGTAG
 pSW7 CGGTGTGCCA GGTAAGTTTC AGACCGCGAT TGAGCTGGTG ATCGGCTTTG TTAATGGTAG

421 109
 V K D M Y H G K S K L I A P L A L T I F
 K12 CGTGAAAGAC ATGTACCATG GCAAAAAGCAA GCTGATTGCT CCGCTGGCCC TGACGATCTT
 pKH7 CGTGAAAGAC ATGTACCATG GCAAAAAGCAA GCTGATTGCT CCGCTGGCCC TGACGATCTT
 pSE1 CGTGAAAGAC ATGTACCATG GCAAAAAGCAA GCTGATTGCT CCGCTGGCCC TGACGATCTT
 pSE3 CGTGAAAGAC ATGTACCATG GCAAAAAGCAA GCTGATTGCT CCGCTGGCCC TGACGATCTT
 pSW7 CGTGAAAGAC ATGTACCATG GCAAAAAGCAA GCTGATTGCT CCGCTGGCCC TGACGATCTT

481 129
 V W V F L M N L M D L L P I D L L P Y I
 K12 CGTCTGGGTA TTCCTGATGA ACCTGATGGA TTTACTGCCT ATCGACCTGC TGCCGTACAT
 pKH7 CGTCTGGGTA TTCCTGATGA ACCTGATGGA TTTACTGCCT ATCGACCTGC TGCCGTACAT
 pSE1 CGTCTGGGTA TTCCTGATGA ACCTGATGGA TTTACTGCCT ATCGACCTGC TGCCGTACAT
 pSE3 CGTCTGGGTA TTCCTGATGA ACCTGATGGA TTTACTGCCT ATCGACCTGC TGCCGTACAT
 pSW7 CGTCTGGGTA TTCCTGATGA ACCTGATGGA TTTACTGCCT ATCGACCTGC TGCCGTACAT

541 149
 A E H V L G L P A L R V V P S A D V N V
 K12 TGCTGAACAT GTACTGGGTC TGCCTGCACT GCGTGTGGTT CCGTCTGCGG ACGTGAACGT
 pKH7 TGCTGAACAT GTACTGGGTC TGCCTGCACT GCGTGTGGTT CCGTCTGCGG ACGTGAACGT
 pSE1 TGCTGAACAT GTACTGGGTC TGCCTGCACT GCGTGTGGTT CCGTCTGCGG ACGTGAACGT
 pSE3 TGCTGAACAT GTACTGGGTC TGCCTGCACT GCGTGTGGTT CCGTCTGCGG ACGTGAACGT
 pSW7 TGCTGAACAT GTACTGGGTC TGCCTGCACT GCGTGTGGTT CCGTCTGCGG ACGTGAACGT

601 169
 T L S M A L G V F I L I L F Y S I K M K
 K12 AACGCTGTCT ATGGCACTGG GCGTATTTAT CCTGATTCTG TTCTACAGCA TCAAAATGAA
 pKH7 AACGCTGTCT ATGGCACTGG GCGTATTTAT CCTGATTCTG TTCTACAGCA TCAAAATGAA
 pSE1 AACGCTGTCT ATGGCACTGG GCGTATTTAT CCTGATTCTG TTCTACAGCA TCAAAATGAA
 pSE3 AACGCTGTCT ATGGCACTGG GCGTATTTAT CCTGATTCTG TTCTACAGCA TCAAAATGAA
 pSW7 AACGCTGTCT ATGGCACTGG GCGTATTTAT CCTGATTCTG TTCTACAGCA TCAAAATGAA

661 189
 G I G G F T K E L T L Q P F N H W A F I
 K12 AGGCATCGGC GGCTTCACGA AAGAGTTGAC GCTGCAGCCG TTCAATCACT GGGCGTTCAT
 pKH7 AGGCATCGGC GGCTTCACGA AAGAGTTGAC GCTGCAGCCG TTCAATCACT GGGCGTTCAT
 pSE1 AGGCATCGGC GGCTTCACGA AAGAGTTGAC GCTGCAGCCG TTCAATCACT GGGCGTTCAT
 pSE3 AGGCATCGGC GGCTTCACGA AAGAGTTGAC GCTGCAGCCG TTCAATCACT GGGCGTTCAT
 pSW7 AGGCATCGGC GGCTTCACGA AAGAGTTGAC GCTGCAGCCG TTCAATCACT GGGCGTTCAT

721 209
 P V N L I L E G V S L L S K P V S L G L
 K12 TCCTGTCAAC TTAATCCTTG AAGGGGTAAG CCTGCTGTCC AAACCAGTTT CACTCGGTTT
 pKH7 TCCTGTCAAC TTAATCCTTG AAGGGGTAAG CCTGCTGTCC AAACCAGTTT CACTCGGTTT
 pSE1 TCCTGTCAAC TTAATCCTTG AAGGGGTAAG CCTGCTGTCC AAACCAGTTT CACTCGGTTT
 pSE3 TCCTGTCAAC TTAATCCTTG AAGGGGTAAG CCTGCTGTCC AAACCAGTTT CACTCGGTTT
 pSW7 TCCTGTCAAC TTAATCCTTG AAGGGGTAAG CCTGCTGTCC AAACCAGTTT CACTCGGTTT

781 229
 R L F G N M Y A G E L I F I L I A G L L
 K12 GCGACTGTTT GGTAACATGT ATGCCGGTGA GCTGATTTTC ATTCTGATTG CTGGTCTGTT
 pKH7 GCGACTGTTT GGTAACATGT ATGCCGGTGA GCTGATTTTC ATTCTGATTG CTGGTCTGTT
 pSE1 GCGACTGTTT GGTAACATGT ATGCCGGTGA GCTGATTTTC ATTCTGATTG CTGGTCTGTT
 pSE3 GCGACTGTTT GGTAACATGT ATGCCGGTGA GCTGATTTTC ATTCTGATTG CTGGTCTGTT
 pSW7 GCGACTGTTT GGTAACATGT ATGCCGGTGA GCTGATTTTC ATTCTGATTG CTGGTCTGTT

841 249
 P W W S Q W I L N V P W A I F H I L I I
 K12 GCCGTGGTGG TCACAGTGGA TCCTGAATGT GCCGTGGGCC ATTTTCCACA TCCTGATCAT
 pKH7 GCCGTGGTGG TCACAGTGGA TCCTGAATGT GCCGTGGGCC ATTTTCCACA TCCTGATCAT
 pSE1 GCCGTGGTGG TCACAGTGGA TCCTGAATGT GCCGTGGGCC ATTTTCCACA TCCTGATCAT
 pSE3 GCCGTGGTGG TCACAGTGGA TCCTGAATGT GCCGTGGGCC ATTTTCCACA TCCTGATCAT
 pSW7 GCCGTGGTGG TCACAGTGGA TCCTGAATGT GCCGTGGGCC ATTTTCCACA TCCTGATCAT

*Bam*HI

901 269
 T L Q A F I F M V L T I V Y L S M A S E
 K12 TACGCTGCAA GCCTTCATCT TCATGGTTCT GACGATCGTC TATCTGTCGA TGGCGTCTGA
 pKH7 TACGCTGCAA GCCTTCATCT TCATGGTTCT GACGATCGTC TATCTGTCGA TGGCGTCTGA
 pSE1 TACGCTGCAA GCCTTCATCT TCATGGTTCT GACGATCGTC TATCTGTCGA TGGCGTCTGA
 pSE3 TACGCTGCAA GCCTTCATCT TCATGGTTCT GACGATCGTC TATCTGTCGA TGGCGTCTGA
 pSW7 TACGCTGCAA GCCTTCATCT TCATGGTTCT GACGATCGTC TATCTGTCGA TGGCGTCTGA

961 >c 1
 E H M
 K12 AGAACATTAA TTTACCAACA CTACTACGTT TTAAGTAAAA CAAACTGGAG ACTGTCATGG
 pKH7 AGAACATTAA TTTACCAACA CTACTACGTT TTAAGTAAAA CAAACTGGAG ACTGTCATGG
 pSE1 AGAACATTAA TTTACCAACA CTACTACGTT TTAAGTAAAA CAAACTGGAG ACTGTCATGG
 pSE3 AGAACATTAA TTTACCAACA CTACTACGTT TTAAGTAAAA CAAACTGGAG ACTGTCATGG
 pSW7 AGAACATTAA TTTACCAACA CTACTACGTT TTAAGTAAAA CAAACTGGAG ACTGTCATGG

1021 21
 E N L N M D L L Y M A A A V M M G L A A
 K12 AAAACCTGAA TATGGATCTG CTGTACATGG CTGCCGCTGT GATGATGGGT CTGGCGGCAA
 pKH7 AAAACCTGAA TATGGATCTG CTGTACATGG CTGCCGCTGT GATGATGGGT CTGGCGGCAA
 pSE1 AAAACCTGAA TATGGATCTG CTGTACATGG CTGCCGCTGT GATGATGGGT CTGGCGGCAA
 pSE3 AAAACCTGAA TATGGATCTG CTGTACATGG CTGCCGCTGT GATGATGGGT CTGGCGGCAA
 pSW7 AAAACCTGAA TATGGATCTG CTGTACATGG CTGCCGCTGT GATGATGGGT CTGGCGGCAA

1081 41
 I G A A I G I G I L G G K F L E G A A R
 K12 TCGGTGCTGC GATCGGTATC GGCATCCTCG GGGGTAAATT CCTGGAAGGC GCAGCGCGTC
 pKH7 TCGGTGCTGC GATCGGTATC GGCATCCTCG GGGGTAAATT CCTGGAAGGC GCAGCGCGTC
 pSE1 TCGGTGCTGC GATCGGTATC GGCATCCTCG GGGGTAAATT CCTGGAAGGC GCAGCGCGTC
 pSE3 TCGGTGCTGC GATCGGTATC GGCATCCTCG GGGGTAAATT CCTGGAAGGC GCAGCGCGTC
 pSW7 TCGGTGCTGC GATCGGTATC GGCATCCTCG GGGGTAAATT CCTGGAAGGC GCAGCGCGTC

1141 61
 Q P D L I P L L R T Q F F I V M G L V D
 K12 AACCTGATCT GATTCCTCTG CTGCGTACTC AGTTCTTTAT CGTTATGGGT CTGGTGGATG
 pKH7 AACCTGATCT GATTCCTCTG CTGCGTACTC AGTTCTTTAT CGTTATGGGT CTGGTGGATG
 pSE1 AACCTGATCT GATTCCTCTG CTGCGTACTC AGTTCTTTAT CGTTATGGGT CTGGTGGATG
 pSE3 AACCTGATCT GATTCCTCTG CTGCGTACTC AGTTCTTTAT CGTTATGGGT CTGGTGGATG
 pSW7 AACCTGATCT GATTCCTCTG CTGCGTACTC AGTTCTTTAT CGTTATGGGT CTGGTGGATG

1201
 A I P M I A V G L G L Y V M F A V A
 K12 CTATCCCGAT GATCGCTGTA GGTCTGGGTC TGTACGTGAT GTTCGCTGTC GCG-----
 pKH7 CTATCCCGAT GATCGCTGTA GGTCTGGGTC TGTACGTGAT GTTCGCTGTC GCG-----
 pSE1 CTATCCCGAT GATCGCTGTA GGTCTGGGTC TGTACGTGAT GTTCGCTGTC GCTAGC----
 pSE3 CTATCCCGAT GATCGCTGTA GGTCTGGGTC TGTACGTGAT GTTCGCTGTC GCTAGCCATC
 pSW7 CTATCCCGAT GATCGCTGTA GGTCTGGGTC TGTACGTGAT GTTCGCTGTC GCTAGCCATC

1981 60
 N E Q M A E L L S G A L A P E T L A E S
 K12 AACGAACAAA TGGCAGAGCT TCTCTCTGGC GCGCTTGCGC CAGAAACGCT CGCCGAGTCG
 pKH7 AACGAACAAA TGGCAGAGCT TCTCTCTGGC GCGCTTGCGC CAGAAACGCT CGCCGAGTCG
 pSE1 AACGAACAAA TGGCAGAGCT TCTCTCTGGC GCGCTTGCGC CAGAAACGCT CGCCGAGTCG
 pSE3 AACGAACAAA TGGCAGAGCT TCTCTCTGGC GCGCTTGCGC CAGAAACGCT CGCCGAGTCG
 pSW7 AACGAACAAA TGGCAGAGCT TCTCTCTGGC GCGCTTGCGC CAGAAACGCT CGCCGAGTCG

2041 80
 F I A V C G E Q L D E N G Q N L I R V M
 K12 TTTATCGCAG TTTGTGGTGA GCAACTGGAC GAAAACGGTC AGAACCTGAT TCGGGTTATG
 pKH7 TTTATCGCAG TTGCTGGTGA GCAACTGGAC GAAAACGGTC AGAACCTGAT TCGGGTTATG
 pSE1 TTTATCGCAG TTGCTGGTGA GCAACTGGAC GAAAACGGTC AGAACCTGAT TCGGGTTATG
 pSE3 TTTATCGCAG TTGCTGGTGA GCAACTGGAC GAAAACGGTC AGAACCTGAT TCGGGTTATG
 pSW7 TTTATCGCAG TTGCTGGTGA GCAACTGGAC GAAAACGGTC AGAACCTGAT TCGGGTTATG

2101 100
 A E N G R L N A L P D V L E Q F I H L R
 K12 GCTGAAAATG GTCGTCTTAA CGCGCTCCCG GATGTTCTGG AGCAGTTTAT TCACCTGCGT
 pKH7 GCTGAAAATG GTCGTCTTAA CGCGCTCCCG GATGTTCTGG AGCAGTTTAT TCACCTGCGT
 pSE1 GCTGAAAATG GTCGTCTTAA CGCGCTCCCG GATGTTCTGG AGCAGTTTAT TCACCTGCGT
 pSE3 GCTGAAAATG GTCGTCTTAA CGCGCTCCCG GATGTTCTGG AGCAGTTTAT TCACCTGCGT
 pSW7 GCTGAAAATG GTCGTCTTAA CGCGCTCCCG GATGTTCTGG AGCAGTTTAT TCACCTGCGT

2161 120
 A V S E A T A E V D V I S A A A L S E Q
 K12 GCCGTGAGTG AGGCTACCGC TGAGGTAGAC GTCATTTCCG CTGCCGCACT GAGTGAACAA
 pKH7 GCCGTGAGTG AGGCTACCGC TGAGGTAGAC GTCATTTCCG CTGCCGCACT GAGTGAACAA
 pSE1 GCCGTGAGTG AGGCTACCGC TGAGGTAGAC GTCATTTCCG CTGCCGCACT GAGTGAACAA
 pSE3 GCCGTGAGTG AGGCTACCGC TGAGGTAGAC GTCATTTCCG CTGCCGCACT GAGTGAACAA
 pSW7 GCCGTGAGTG AGGCTACCGC TGAGGTAGAC GTCATTTCCG CTGCCGCACT GAGTGAACAA

2221 140
 Q L A K I S A A M E K R L S R K V K L N
 K12 CAGCTCGCGA AAATTTCTGC TGCGATGGAA AAACGTCTGT CACGCAAAGT TAAGCTGAAT
 pKH7 CAGCTCGCGA AAATTTCTGC TGCGATGGAA AAACGTCTGT CACGCAAAGT TAAGCTGAAT
 pSE1 CAGCTCGCGA AAATTTCTGC TGCGATGGAA AAACGTCTGT CACGCAAAGT TAAGCTGAAT
 pSE3 CAGCTCGCGA AAATTTCTGC TGCGATGGAA AAACGTCTGT CACGCAAAGT TAAGCTGAAT
 pSW7 CAGCTCGCGA AAATTTCTGC TGCGATGGAA AAACGTCTGT CACGCAAAGT TAAGCTGAAT

2281 160
 C K I D K S V M A G V I I R A G D M V I
 K12 TGCAAAATCG ATAAGTCTGT AATGGCAGGC GTTATCATCC GAGCGGGTGA TATGGTCATT
 pKH7 TGCAAAATCG ATAAGTCTGT AATGGCAGGC GTTATCATCC GAGCGGGTGA TATGGTCATT
 pSE1 TGCAAAATCG ATAAGTCTGT AATGGCAGGC GTTATCATCC GAGCGGGTGA TATGGTCATT
 pSE3 TGCAAAATCG ATAAGTCTGT AATGGCAGGC GTTATCATCC GAGCGGGTGA TATGGTCATT
 pSW7 TGCAAAATCG ATAAGTCTGT AATGGCAGGC GTTATCATCC GAGCGGGTGA TATGGTCATT

2341

	D	G	S	V	R	G	R	L	E	R	L	A	D	V	L	Q	S
K12	GATGGCAGCG	TACGCGGTCG	TCTTGAGCGC	CTTGCAGACG	TCTTGAGCGC	TCTTGAGCGC	TCTTGAGCGC	TCTTGAGCGC	TCTTGAGCGC								
pKH7	GATGGCAGCG	TACGCGGTCG	TCTTGAGCGC	CTTGCAGACG	TCTTGAGCGC												
pSE1	GATGGCAGCG	TACGCGGTCG	TCTTGAGCGC	CTTGCAGACG	TCTTGAGCGC												
pSE3	GATGGCAGCG	TACGCGGTCG	TCTTGAGCGC	CTTGCAGACG	TCTTGAGCGC												
pSW7	GATGGCAGCG	TACGCGGTCG	TCTTGAGCGC	CTTGCAGACG	TCTTGAGCGC												

> α

5

	M					Q	L	N	S
K12	TGGAGCATG-	-----	-----	-----	-----	CA	ACTGAATTCC		
pKH7	TGGAGCATG-	-----	-----	-----	-----	CA	ACTGAATTCC		
pSE1	TGGAGCATG-	-----	-----	-----	-----	CA	ACTGAATTCC		
pSE3	TGGAGCATGG	CAAGCTGGAG	CCACCCGCAG	TTCGAAAAAG	CAAGCATG	CA	ACTGAATTCC		
pSW7	TGGAGCATGG	CAAGCTGGAG	CCACCCGCAG	TTCGAAAAAG	CAAGCATG	CA	ACTGAATTCC		

Strep-tag II

2461

25

	T	E	I	S	E	L	I	K	Q	R	I	A	Q	F	N	V	V	S	E	A
K12	ACCGAAATCA	GCGAACTGAT	CAAGCAGCGC	ATTGCTCAGT	TCAATGTTGT	GAGTGAAGCT														
pKH7	ACCGAAATCA	GCGAACTGAT	CAAGCAGCGC	ATTGCTCAGT	TCAATGTTGT	GAGTGAAGCT														
pSE1	ACCGAAATCA	GCGAACTGAT	CAAGCAGCGC	ATTGCTCAGT	TCAATGTTGT	GAGTGAAGCT														
pSE3	ACCGAAATCA	GCGAACTGAT	CAAGCAGCGC	ATTGCTCAGT	TCAATGTTGT	GAGTGAAGCT														
pSW7	ACCGAAATCA	GCGAACTGAT	CAAGCAGCGC	ATTGCTCAGT	TCAATGTTGT	GAGTGAAGCT														

2521

45

	H	N	E	G	T	I	V	S	V	S	D	G	V	I	R	I	H	G	L	A
K12	CACAACGAAG	GTACTATTGT	TTCTGTAAGT	GACGGTGTTA	TCCGCATTCA	CGGCC TGGCC														
pKH7	CACAACGAAG	GTACTATTGT	TTCTGTAAGT	GACGGTGTTA	TCCGCATTCA	CGGCC TGGCC														
pSE1	CACAACGAAG	GTACTATTGT	TTCTGTAAGT	GACGGTGTTA	TCCGCATTCA	CGGCC TGGCC														
pSE3	CACAACGAAG	GTACTATTGT	TTCTGTAAGT	GACGGTGTTA	TCCGCATTCA	CGGCC TGGCC														
pSW7	CACAACGAAG	GTACTATTGT	TTCTGTAAGT	GACGGTGTTA	TCCGCATTCA	CGGCC TGGCC														

2581

65

	D	C	M	Q	G	E	M	I	S	L	P	G	N	R	Y	A	I	A	L	N
K12	GATTGCTATGC	AGGGTGAAT	GATCTCCCTG	CCGGGTAAAC	GTTACGCTAT	CGCACTGAAC														
pKH7	GATTGCTATGC	AGGGTGAAT	GATCTCCCTG	CCGGGTAAAC	GTTACGCTAT	CGCACTGAAC														
pSE1	GATTGCTATGC	AGGGTGAAT	GATCTCCCTG	CCGGGTAAAC	GTTACGCTAT	CGCACTGAAC														
pSE3	GATTGCTATGC	AGGGTGAAT	GATCTCCCTG	CCGGGTAAAC	GTTACGCTAT	CGCACTGAAC														
pSW7	GATTGCTATGC	AGGGTGAAT	GATCTCCCTG	CCGGGTAAAC	GTTACGCTAT	CGCACTGAAC														

2641

85

	L	E	R	D	S	V	G	A	V	V	M	G	P	Y	A	D	L	A	E	G
K12	CTCGAGCGCG	ACTCTGTAGG	TGCGGTTGTT	ATGGGTCCGT	ACGCTGACCT	TGCCGAAGGC														
pKH7	CTCGAGCGCG	ACTCTGTAGG	TGCGGTTGTT	ATGGGTCCGT	ACGCTGACCT	TGCCGAAGGC														
pSE1	CTCGAGCGCG	ACTCTGTAGG	TGCGGTTGTT	ATGGGTCCGT	ACGCTGACCT	TGCCGAAGGC														
pSE3	CTCGAGCGCG	ACTCTGTAGG	TGCGGTTGTT	ATGGGTCCGT	ACGCTGACCT	TGCCGAAGGC														
pSW7	CTCGAGCGCG	ACTCTGTAGG	TGCGGTTGTT	ATGGGTCCGT	ACGCTGACCT	TGCCGAAGGC														

*Xho*I

2701 105
 M K V K C T G R I L E V P V G R G L L G
 K12 ATGAAAGTTA AGTGTACTGG CCGTATCCTG GAAGTTCCGG TTGGCCGTGG CCTGCTGGGC
 pKH7 ATGAAAGTTA AGGCTACTGG CCGTATCCTG GAAGTTCCGG TTGGCCGTGG CCTGCTGGGC
 pSE1 ATGAAAGTTA AGGCTACTGG CCGTATCCTG GAAGTTCCGG TTGGCCGTGG CCTGCTGGGC
 pSE3 ATGAAAGTTA AGGCTACTGG CCGTATCCTG GAAGTTCCGG TTGGCCGTGG CCTGCTGGGC
 pSW7 ATGAAAGTTA AGGCTACTGG CCGTATCCTG GAAGTTCCGG TTGGCCGTGG CCTGCTGGGC

2761 125
 R V V N T L G A P I D G K G P L D H D G
 K12 CGTGTGGTTA ACACTCTGGG TGCACCAATC GACGGTAAAG GTCCGCTGGA TCACGACGGC
 pKH7 CGTGTGGTTA ACACTCTGGG TGCACCAATC GACGGTAAAG GTCCGCTGGA TCACGACGGC
 pSE1 CGTGTGGTTA ACACTCTGGG TGCACCAATC GACGGTAAAG GTCCGCTGGA TCACGACGGC
 pSE3 CGTGTGGTTA ACACTCTGGG TGCACCAATC GACGGTAAAG GTCCGCTGGA TCACGACGGC
 pSW7 CGTGTGGTTA ACACTCTGGG TGCACCAATC GACGGTAAAG GTCCGCTGGA TCACGACGGC

2821 145
 F S A V E A I A P G V I E R Q S V D Q P
 K12 TTCTCTGCTG TAGAAGCAAT CGCTCCGGGC GTTATCGAAC GTCAGTCCGT AGATCAGCCG
 pKH7 TTCTCTGCTG TAGAAGCAAT CGCTCCGGGC GTTATCGAAC GTCAGTCCGT AGATCAGCCG
 pSE1 TTCTCTGCTG TAGAAGCAAT CGCTCCGGGC GTTATCGAAC GTCAGTCCGT AGATCAGCCG
 pSE3 TTCTCTGCTG TAGAAGCAAT CGCTCCGGGC GTTATCGAAC GTCAGTCCGT AGATCAGCCG
 pSW7 TTCTCTGCTG TAGAAGCAAT CGCTCCGGGC GTTATCGAAC GTCAGTCCGT AGATCAGCCG

2881 165
 V Q T G Y K A V D S M I P I G R G Q R E
 K12 GTACAGACCG GTTATAAAGC CGTTGACTCC ATGATCCCAA TCGGTCGTGG TCAGCGTGAA
 pKH7 GTACAGACCG GTTATAAAGC CGTTGACTCC ATGATCCCAA TCGGTCGTGG TCAGCGTGAA
 pSE1 GTACAGACCG GTTATAAAGC CGTTGACTCC ATGATCCCAA TCGGTCGTGG TCAGCGTGAA
 pSE3 GTACAGACCG GTTATAAAGC CGTTGACTCC ATGATCCCAA TCGGTCGTGG TCAGCGTGAA
 pSW7 GTACAGACCG GTTATAAAGC CGTTGACTCC ATGATCCCAA TCGGTCGTGG TCAGCGTGAA

2941 185
 L I I G D R Q T G K T A L A I D A I I N
 K12 TTGATCATCG GTGACCGTCA GACAGGTAAA ACCGCACTGG CTATCGATGC CATCATCAAC
 pKH7 TTGATCATCG GTGACCGTCA GACAGGTAAA ACCGCACTGG CTATCGATGC CATCATCAAC
 pSE1 TTGATCATCG GTGACCGTCA GACAGGTAAA ACCGCACTGG CTATCGATGC CATCATCAAC
 pSE3 TTGATCATCG GTGACCGTCA GACAGGTAAA ACCGCACTGG CTATCGATGC CATCATCAAC
 pSW7 TTGATCATCG GTGACCGTCA GACAGGTAAA ACCGCACTGG CTATCGATGC CATCATCAAC

3001 205
 Q R D S G I K C I Y V A I G Q K A S T I
 K12 CAGCGCGATT CCGGTATCAA ATGTATCTAT GTCGCTATCG GCCAGAAAAG GTCCACCATT
 pKH7 CAGCGCGATT CCGGTATCAA AGCTATCTAT GTCGCTATCG GCCAGAAAAG GTCCACCATT
 pSE1 CAGCGCGATT CCGGTATCAA AGCTATCTAT GTCGCTATCG GCCAGAAAAG GTCCACCATT
 pSE3 CAGCGCGATT CCGGTATCAA AGCTATCTAT GTCGCTATCG GCCAGAAAAG GTCCACCATT
 pSW7 CAGCGCGATT CCGGTATCAA AGCTATCTAT GTCGCTATCG GCCAGAAAAG GTCCACCATT

3061 225
 S N V V R K L E E H G A L A N T I V V V
 K12 TCTAACGTGG TACGTAAACT GGAAGAGCAC GGCGCACTGG CTAACACCCAT CGTTGTGGTA
 pKH7 TCTAACGTGG TACGTAAACT GGAAGAGCAC GGCGCACTGG CTAACACCCAT CGTTGTGGTA
 pSE1 TCTAACGTGG TACGTAAACT GGAAGAGCAC GGCGCACTGG CTAACACCCAT CGTTGTGGTA
 pSE3 TCTAACGTGG TACGTAAACT GGAAGAGCAC GGCGCACTGG CTAACACCCAT CGTTGTGGTA
 pSW7 TCTAACGTGG TACGTAAACT GGAAGAGCAC GGCGCACTGG CTAACACCCAT CGTTGTGGTA

3121 245
 A T A S E S A A L Q Y L A P Y A G C A M
 K12 GCAACCGCGT CTGAATCCGC TGCCTGCAA TACCTGGCAC CGTATGCCGG TTGCCGCAATG
 pKH7 GCAACCGCGT CTGAATCCGC TGCCTGCAA TACCTGGCAC CGTATGCCGG TTGCCGCAATG
 pSE1 GCAACCGCGT CTGAATCCGC TGCCTGCAA TACCTGGCAC CGTATGCCGG TTGCCGCAATG
 pSE3 GCAACCGCGT CTGAATCCGC TGCCTGCAA TACCTGGCAC CGTATGCCGG TTGCCGCAATG
 pSW7 GCAACCGCGT CTGAATCCGC TGCCTGCAA TACCTGGCAC CGTATGCCGG TTGCCGCAATG

3181 265
 G E Y F R D R G E D A L I I Y D D L S K
 K12 GGCGAATACT TCCGTGACCG CGGTGAAGAT GCGCTGATCA TTTACGATGA CCTGTCTAAA
 pKH7 GGTGAATACT TCCGTGACCG CGGTGAAGAT GCGCTGATCA TTTACGATGA CCTGTCTAAA
 pSE1 GGTGAATACT TCCGTGACCG CGGTGAAGAT GCGCTGATCA TTTACGATGA CCTGTCTAAA
 pSE3 GGTGAATACT TCCGTGACCG CGGTGAAGAT GCGCTGATCA TTTACGATGA CCTGTCTAAA
 pSW7 GGTGAATACT TCCGTGACCG CGGTGAAGAT GCGCTGATCA TTTACGATGA CCTGTCTAAA

3241 285
 Q A V A Y R Q I S L L L R R P P G R E A
 K12 CAGGCTGTTG CTTACCGTCA GATCTCCCTG CTGCTCCGTC GTCCGCCAGG ACGTGAAGCA
 pKH7 CAGGCTGTTG CTTACCGTCA GATCTCCCTG CTGCTCCGTC GTCCGCCAGG ACGTGAAGCA
 pSE1 CAGGCTGTTG CTTACCGTCA GATCTCCCTG CTGCTCCGTC GTCCGCCAGG ACGTGAAGCA
 pSE3 CAGGCTGTTG CTTACCGTCA GATCTCCCTG CTGCTCCGTC GTCCGCCAGG ACGTGAAGCA
 pSW7 CAGGCTGTTG CTTACCGTCA GATCTCCCTG CTGCTCCGTC GTCCGCCAGG ACGTGAAGCA

3301 305
 F P G D V F Y L H S R L L E R A A R V N
 K12 TTCCCGGGCG ACGTTTTCTA CCTCCACTCT CGTCTGCTGG AGCGTGCTGC ACGTGTTAAC
 pKH7 TTCCCGGGCG ACGTTTTCTA CCTCCACTCT CGTCTGCTGG AGCGTGCTGC ACGTGTTAAC
 pSE1 TTCCCGGGCG ACGTTTTCTA CCTCCACTCT CGTCTGCTGG AGCGTGCTGC ACGTGTTAAC
 pSE3 TTCCCGGGCG ACGTTTTCTA CCTCCACTCT CGTCTGCTGG AGCGTGCTGC ACGTGTTAAC
 pSW7 TTCCCGGGCG ACGTTTTCTA CCTCCACTCT CGTCTGCTGG AGCGTGCTGC ACGTGTTAAC

3361 325
 A E Y V E A F T K G E V K G K T G S L T
 K12 GCCGAATACG TTGAAGCCTT CACCAAAGGT GAAGTGAAAAG GAAAAACCGG TTCTCTGACC
 pKH7 GCCGAATACG TTGAAGCCTT CACCAAAGGT GAAGTGAAAAG GAAAAACCGG TTCTCTGACC
 pSE1 GCCGAATACG TTGAAGCCTT CACCAAAGGT GAAGTGAAAAG GAAAAACCGG TTCTCTGACC
 pSE3 GCCGAATACG TTGAAGCCTT CACCAAAGGT GAAGTGAAAAG GAAAAACCGG TTCTCTGACC
 pSW7 GCCGAATACG TTGAAGCCTT CACCAAAGGT GAAGTGAAAAG GAAAAACCGG TTCTCTGACC

3421 345
 A L P I I E T Q A G D V S A F V P T N V
 K12 GCACTGCCGA TTATCGAAAC TCAGGCGGGT GACGTTTCTG CGTTCGTTCC GACCAACGTA
 pKH7 GCACTGCCGA TTATCGAAAC TCAGGCGGGT GACGTTTCTG CGTTCGTTCC GACCAACGTA
 pSE1 GCACTGCCGA TTATCGAAAC TCAGGCGGGT GACGTTTCTG CGTTCGTTCC GACCAACGTA
 pSE3 GCACTGCCGA TTATCGAAAC TCAGGCGGGT GACGTTTCTG CGTTCGTTCC GACCAACGTA
 pSW7 GCACTGCCGA TTATCGAAAC TCAGGCGGGT GACGTTTCTG CGTTCGTTCC GACCAACGTA

3481 365
 I S I T D G Q I F L E T N L F N A G I R
 K12 ATCTCCATTA CCGATGGTCA GATCTTCCTG GAAACCAACC TGTTCAACGC CGGTATTCGT
 pKH7 ATCTCCATTA CCGATGGTCA GATCTTCCTG GAAACCAACC TGTTCAACGC CGGTATTCGT
 pSE1 ATCTCCATTA CCGATGGTCA GATCTTCCTG GAAACCAACC TGTTCAACGC CGGTATTCGT
 pSE3 ATCTCCATTA CCGATGGTCA GATCTTCCTG GAAACCAACC TGTTCAACGC CGGTATTCGT
 pSW7 ATCTCCATTA CCGATGGTCA GATCTTCCTG GAAACCAACC TGTTCAACGC CGGTATTCGT

3541 385
 P A V N P G I S V S R V G G A A Q T K I
 K12 CCTGCGGTTA ACCCGGGTAT TTCCGTATCC CGTGTGGTG GTGCAGCACA GACCAAGATC
 pKH7 CCTGCGGTTA ACCCGGGTAT TTCCGTATCC CGTGTGGTG GTGCAGCACA GACCAAGATC
 pSE1 CCTGCGGTTA ACCCGGGTAT TTCCGTATCC CGTGTGGTG GTGCAGCACA GACCAAGATC
 pSE3 CCTGCGGTTA ACCCGGGTAT TTCCGTATCC CGTGTGGTG GTGCAGCACA GACCAAGATC
 pSW7 CCTGCGGTTA ACCCGGGTAT TTCCGTATCC CGTGTGGTG GTGCAGCACA GACCAAGATC

3601 405
 M K K L S G G I R T A L A Q Y R E L A A
 K12 ATGAAAAAAC TGTCCGGTGG TATCCGTACC GCTCTGGCAC AGTATCGTGA ACTGGCAGCG
 pKH7 ATGAAAAAAC TGTCCGGTGG TATCCGTACC GCTCTGGCAC AGTATCGTGA ACTGGCAGCG
 pSE1 ATGAAAAAAC TGTCCGGTGG TATCCGTACC GCTCTGGCAC AGTATCGTGA ACTGGCAGCG
 pSE3 ATGAAAAAAC TGTCCGGTGG TATCCGTACC GCTCTGGCAC AGTATCGTGA ACTGGCAGCG
 pSW7 ATGAAAAAAC TGTCCGGTGG TATCCGTACC GCTCTGGCAC AGTATCGTGA ACTGGCAGCG

3661 425
 F S Q F A S D L D D A T R K Q L D H G Q
 K12 TTCTCTCAGT TTGCATCCGA CCTTGACGAT GCAACACGTA AGCAGCTTGA CCACGGTCAG
 pKH7 TTCTCTCAGT TTGCATCCGA CCTTGACGAT GCAACACGTA ACCAGCTTGA CCACGGTCAG
 pSE1 TTCTCTCAGT TTGCATCCGA CCTTGACGAT GCAACACGTA AGCAGCTTGA CCACGGTCAG
 pSE3 TTCTCTCAGT TTGCATCCGA CCTTGACGAT GCAACACGTA AGCAGCTTGA CCACGGTCAG
 pSW7 TTCTCTCAGT TTGCATCCGA CCTTGACGAT GCAACACGTA AGCAGCTTGA CCACGGTCAG

3721 445
 K V T E L L K Q K Q Y A P M S V A Q Q S
 K12 AAAGTGACCG AACTGCTGAA ACAGAAACAG TATGCGCCGA TGTCCGTTGC GCAGCAGTCT
 pKH7 AAAGTGACCG AACTGCTGAA ACAGAAACAG TATGCGCCGA TGTCCGTTGC GCAGCAGTCT
 pSE1 AAAGTGACCG AACTGCTGAA ACAGAAACAG TATGCGCCGA TGTCCGTTGC GCAGCAGTCT
 pSE3 AAAGTGACCG AACTGCTGAA ACAGAAACAG TATGCGCCGA TGTCCGTTGC GCAGCAGTCT
 pSW7 AAAGTGACCG AACTGCTGAA ACAGAAACAG TATGCGCCGA TGTCCGTTGC GCAGCAGTCT

3781 465
 L V L F A A E R G Y L A D V E L S K I G
 K12 CTGGTTCTGT TCGCAGCAGA ACGTGGTTAC CTGGCGGATG TTGAACTGTC GAAAATTGGC
 pKH7 CTGGTTCTGT TCGCAGCAGA ACGTGGTTAC CTGGCGGATG TTGAACTGTC GAAAATTGGC
 pSE1 CTGGTTCTGT TCGCAGCAGA ACGTGGTTAC CTGGCGGATG TTGAACTGTC GAAAATTGGC
 pSE3 CTGGTTCTGT TCGCAGCAGA ACGTGGTTAC CTGGCGGATG TTGAACTGTC GAAAATTGGC
 pSW7 CTGGTTCTGT TCGCAGCAGA ACGTGGTTAC CTGGCGGATG TTGAACTGTC GAAAATTGGC

3841 485
 S F E A A L L A Y V D R D H A P L M Q E
 K12 AGCTTCGAAG CCGCTCTGCT GGCTTACGTC GACCGTGATC ACCTCCGTT GATGCAAGAG
 pKH7 AGCTTCGAAG CCGCTCTGCT GGCTTACGTC GACCGTGATC ACCTCCGTT GATGCAAGAG
 pSE1 AGCTTCGAAG CCGCTCTGCT GGCTTACGTC GACCGTGATC ACCTCCGTT GATGCAAGAG
 pSE3 AGCTTCGAAG CCGCTCTGCT GGCTTACGTC GACCGTGATC ACCTCCGTT GATGCAAGAG
 pSW7 AGCTTCGAAG CCGCTCTGCT GGCTTACGTC GACCGTGATC ACCTCCGTT GATGCAAGAG

3901 505
 I N Q T G G Y N D E I E G K L K G I L D
 K12 ATCAACCAGA CCGGTGGCTA CAACGACGAA ATCGAAGGCA AGCTGAAAAG CATCCTCGAT
 pKH7 ATCAACCAGA CCGGTGGCTA CAACGACGAA ATCGAAGGCA AGCTGAAAAG CATCCTCGAT
 pSE1 ATCAACCAGA CCGGTGGCTA CAACGACGAA ATCGAAGGCA AGCTGAAAAG CATCCTCGAT
 pSE3 ATCAACCAGA CCGGTGGCTA CAACGACGAA ATCGAAGGCA AGCTGAAAAG CATCCTCGAT
 pSW7 ATCAACCAGA CCGGTGGCTA CAACGACGAA ATCGAAGGCA AGCTGAAAAG CATCCTCGAT

3961
 S F K A T Q S W
 K12 TCCTTCAAAG CAACCCAATC CTGGTAAACGT CTGGCGGGCTT GCCTTAGGGC AGGCCGCAAG
 pKH7 TCCTTCAAAG CAACCCAATC CTGGTAAACGT CTGGCGGGTA CCCTTAGGGC AGGCCGCAAG
 pSE1 TCCTTCAAAG CAACCCAATC CTGGTAAACGT CTGGCGGGTA CCCTTAGGGC AGGCCGCAAG
 pSE3 TCCTTCAAAG CAACCCAATC CTGGTAAACGT CTGGCGGGTA CCCTTAGGGC AGGCCGCAAG
 pSW7 TCCTTCAAAG CAACCCAATC CTGGTAAACGT CTGGCGGGTA CCCTTAGGGC AGGCCGCAAG

KpnI

4021 >Y 13
 (M) A G A K E I R S K I A S V
 K12 GCATTGAGGA GAAGCTCATG GCCGGCGCAA AAGAGATACG TAGTAAGATC GCAAGCGTCC
 pKH7 GCATTGAGGA GAAGCTCATG GCCGGCGCAA AAGACATACG TAGTAAGATC GCAAGCGTCC
 pSE1 GCATTGAGGA GAAGCTCATG GCCGGCGCAA AAGAGATACG TAGTAAGATC GCAAGCGTCC
 pSE3 GCATTGAGGA GAAGCTCATG GCCGGCGCAA AAGAGATACG TAGTAAGATC GCAAGCGTCC
 pSW7 GCATTGAGGA GAAGCTCATG GCCGGCGCAA AAGAGATACG TAGTAAGATC GCAAGCGTCC

4081 33
 Q N T Q K I T K A M E M V A A S K M R K
 K12 AGAACACGCA AAAGATCACT AAAGCGATGG AGATGGTTCG CGCTTCCAAA ATGCGTAAAT
 pKH7 AGAACACGCA AAAGATCACT AAAGCGATGG AGATGGTTCG CGCTTCCAAA ATGCGTAAAT
 pSE1 AGAACACGCA AAAGATCACT AAAGCGATGG AGATGGTTCG CGCTTCCAAA ATGCGTAAAT
 pSE3 AGAACACGCA AAAGATCACT AAAGCGATGG AGATGGTTCG CGCTTCCAAA ATGCGTAAAT
 pSW7 AGAACACGCA AAAGATCACT AAAGCGATGG AGATGGTTCG CGCTTCCAAA ATGCGTAAAT

4141 53
 S Q D R M A A S R P Y A E T M R K V I G
 K12 CGCAGGATCG CATGGCGGCC AGCCGTCCTT ATGCAGAAAC CATGCGCAAA GTGATTGGTC
 pKH7 CGCAGGATCG CATGGCGGCC AGCCGTCCTT ATGCAGAAAC CATGCGCAAA GTGATTGGTC
 pSE1 CGCAGGATCG CATGGCGGCC AGCCGTCCTT ATGCAGAAAC CATGCGCAAA GTGATTGGTC
 pSE3 CGCAGGATCG CATGGCGGCC AGCCGTCCTT ATGCAGAAAC CATGCGCAAA GTGATTGGTC
 pSW7 CGCAGGATCG CATGGCGGCC AGCCGTCCTT ATGCAGAAAC CATGCGCAAA GTGATTGGTC

4201 73
 H L A H G N L E Y K H P Y L E D R D V K
 K12 ACCTTGACA CGGTAATCTG GAATATAAGC ACCCTTACCT GGAAGACCGC GACGTTAAAC
 pKH7 ACCTTGACA CGGTAATCTG GAATATAAGC ACCCTTACCT GGAAGACCGC GACGTTAAAC
 pSE1 ACCTTGACA CGGTAATCTG GAATATAAGC ACCCTTACCT GGAAGACCGC GACGTTAAAC
 pSE3 ACCTTGACA CGGTAATCTG GAATATAAGC ACCCTTACCT GGAAGACCGC GACGTTAAAC
 pSW7 ACCTTGACA CGGTAATCTG GAATATAAGC ACCCTTACCT GGAAGACCGC GACGTTAAAC

4261 93
 R V G Y L V V S T D R G L C G G L N I N
 K12 GCGTGGGCTA CCTGGTGGTG TCGACCGACC GTGGTTTGTG CGGTGGTTTG AACATTAACC
 pKH7 GCGTGGGCTA CCTGGTGGTG TCGACCGACC GTGGTTTGGC GGGTGGTTTG AACATTAACC
 pSE1 GCGTGGGCTA CCTGGTGGTG TCGACCGACC GTGGTTTGGC GGGTGGTTTG AACATTAACC
 pSE3 GCGTGGGCTA CCTGGTGGTG TCGACCGACC GTGGTTTGGC GGGTGGTTTG AACATTAACC
 pSW7 GCGTGGGCTA CCTGGTGGTG TCGACCGACC GTGGTTTGGC GGGTGGTTTG AACATTAACC

4321 113
 L F K K L L A E M K T W T D K G V Q C D
 K12 TGTTCAAAAA ACTGCTGGCG GAAATGAAGA CCTGGACCGA CAAAGGCGTT CAATGCGACC
 pKH7 TGTTCAAAAA ACTGCTGGCG GAAATGAAGA CCTGGACCGA CTGCGGCGTT CAAGCCGACC
 pSE1 TGTTCAAAAA ACTGCTGGCG GAAATGAAGA CCTGGACCGA CAAAGGCGTT CAAGCCGACC
 pSE3 TGTTCAAAAA ACTGCTGGCG GAAATGAAGA CCTGGACCGA CAAAGGCGTT CAAGCCGACC
 pSW7 TGTTCAAAAA ACTGCTGGCG GAAATGAAGA CCTGGACCGA CAAAGGCGTT CAAGCCGACC

4381 133
 L A M I G S K G V S F F N S V G G N V V
 K12 TCGCAATGAT CGGCTCGAAA GCGGTGTCGT TCTTCAACTC CGTGGGCGGC AATGTTGTTG
 pKH7 TCGCAATGAT CGGCTCGAAA GCGGTGTCGT TCTTCAACTC CGTGGGCGGC AATGTTGTTG
 pSE1 TCGCAATGAT CGGCTCGAAA GCGGTGTCGT TCTTCAACTC CGTGGGCGGC AATGTTGTTG
 pSE3 TCGCAATGAT CGGCTCGAAA GCGGTGTCGT TCTTCAACTC CGTGGGCGGC AATGTTGTTG
 pSW7 TCGCAATGAT CGGCTCGAAA GCGGTGTCGT TCTTCAACTC CGTGGGCGGC AATGTTGTTG

4441 153
 A Q V T G M G D N P S L S E L I G P V K
 K12 CCCAGGTCAC CGGCATGGGG GATAACCCCTT CCCTGTCCGA ACTGATCGGT CCGGTAAAAAG
 pKH7 CCCAGGTCAC CGGCATGGGG GATAACCCCTT CCCTGTCCGA ACTGATCGGT CCGGTAAAAAG
 pSE1 CCCAGGTCAC CGGCATGGGG GATAACCCCTT CCCTGTCCGA ACTGATCGGT CCGGTAAAAAG
 pSE3 CCCAGGTCAC CGGCATGGGG GATAACCCCTT CCCTGTCCGA ACTGATCGGT CCGGTAAAAAG
 pSW7 CCCAGGTCAC CGGCATGGGG GATAACCCCTT CCCTGTCCGA ACTGATCGGT CCGGTAAAAAG

4501 173
 V M L Q A Y D E G R L D K L Y I V S N K
 K12 TGATGTTGCA GGCCTACGAC GAAGGCCGTC TGGACAAGCT TTACATTGTC AGCAACAAAT
 pKH7 TGATGTTGCA GGCCTACGAC GAAGGCCGTC TGGACAAACT TTACATTGTC AGCAACAAAT
 pSE1 TGATGTTGCA GGCCTACGAC GAAGGCCGTC TGGACAAACT TTACATTGTC AGCAACAAAT
 pSE3 TGATGTTGCA GGCCTACGAC GAAGGCCGTC TGGACAAACT TTACATTGTC AGCAACAAAT
 pSW7 TGATGTTGCA GGCCTACGAC GAAGGCCGTC TGGACAAACT TTACATTGTC AGCAACAAAT

4561 193
 F I N T M S Q V P T I S Q L L P L P A S
 K12 TTATTAACAC CATGTCTCAG GTTCCGACCA TCAGCCAGCT GCTGCCGTTA CCGGCATCAG
 pKH7 TTATTAACAC CATGTCTCAG GTTCCGACCA TCAGCCAGCT GCTGCCGTTA CCGGCATCAG
 pSE1 TTATTAACAC CATGTCTCAG GTTCCGACCA TCAGCCAGCT GCTGCCGTTA CCGGCATCAG
 pSE3 TTATTAACAC CATGTCTCAG GTTCCGACCA TCAGCCAGCT GCTGCCGTTA CCGGCATCAG
 pSW7 TTATTAACAC CATGTCTCAG GTTCCGACCA TCAGCCAGCT GCTGCCGTTA CCGGCATCAG

4621 213
 D D D D L K H K S W D Y L Y E P D P K A
 K12 ATGATGATGA TCTGAAACAT AAATCCTGGG ATTACCTGTA CGAACCCGAT CCGAAGGCGT
 pKH7 ATGATGATGA TCTGAAACAT AAATCCTGGG ATTACCTGTA CGAACCCGAT CCGAAGGCGT
 pSE1 ATGATGATGA TCTGAAACAT AAATCCTGGG ATTACCTGTA CGAACCCGAT CCGAAGGCGT
 pSE3 ATGATGATGA TCTGAAACAT AAATCCTGGG ATTACCTGTA CGAACCCGAT CCGAAGGCGT
 pSW7 ATGATGATGA TCTGAAACAT AAATCCTGGG ATTACCTGTA CGAACCCGAT CCGAAGGCGT

4681 233
 L L D T L L R R Y V E S Q V Y Q G V V E
 K12 TGCTGGATAC CCTGCTGCGT CGTTATGTCG AATCTCAGGT TTATCAGGGC GTGGTTGAAA
 pKH7 TGCTGGATAC CCTGCTGCGT CGTTATGTCG AATCTCAGGT TTATCAGGGC GTGGTTGAAA
 pSE1 TGCTGGATAC CCTGCTGCGT CGTTATGTCG AATCTCAGGT TTATCAGGGC GTGGTTGAAA
 pSE3 TGCTGGATAC CCTGCTGCGT CGTTATGTCG AATCTCAGGT TTATCAGGGC GTGGTTGAAA
 pSW7 TGCTGGATAC CCTGCTGCGT CGTTATGTCG AATCTCAGGT TTATCAGGGC GTGGTTGAAA

4741 253
 N L A S E Q A A R M V A M K A A T D N G
 K12 ACCTGGCCAG CGAGCAGGCC GCCCGTATGG TGGCGATGAA AGCCCGGACC GACAATGGCG
 pKH7 ACCTGGCCAG CGAGCAGGCC GCCCGTATGG TGGCGATGAA AGCCCGGACC GACAATGGCG
 pSE1 ACCTGGCCAG CGAGCAGGCC GCCCGTATGG TGGCGATGAA AGCCCGGACC GACAATGGCG
 pSE3 ACCTGGCCAG CGAGCAGGCC GCCCGTATGG TGGCGATGAA AGCCCGGACC GACAATGGCG
 pSW7 ACCTGGCCAG CGAGCAGGCC GCCCGTATGG TGGCGATGAA AGCCCGGACC GACAATGGCG

4801 273
 G S L I K E L Q L V Y N K A R Q A S I T
 K12 GCAGCCTGAT TAAAGAGCTG CAGTTGGTAT ACAACAAAGC TCGTCAGGCC AGCATTACTC
 pKH7 GCAGCCTGAT TAAAGAGCTG CAGTTGGTAT ACAACAAAGC TCGTCAGGCC AGCATTACTC
 pSE1 GCAGCCTGAT TAAAGAGCTG CAGTTGGTAT ACAACAAAGC TCGTCAGGCC AGCATTACTC
 pSE3 GCAGCCTGAT TAAAGAGCTG CAGTTGGTAT ACAACAAAGC TCGTCAGGCC AGCATTACTC
 pSW7 GCAGCCTGAT TAAAGAGCTG CAGTTGGTAT ACAACAAAGC TCGTCAGGCC AGCATTACTC

5221 105
 R I M N V L G E P V D M K G E I G E E E
 K12 CCGTATCATG AACGTACTGG GTGAACCGGT CGACATGAAA GGCGAGATCG GTGAAGAAGA
 pKH7 CCGTATCATG AACGTACTGG GTGAACCGGT CGACATGAAA GGCGAGATCG GTGAAGAAGA
 pSE1 CCGTATCATG AACGTACTGG GTGAACCGGT CGACATGAAA GGCGAGATCG GTGAAGAAGA
 pSE3 CCGTATCATG AACGTACTGG GTGAACCGGT CGACATGAAA GGCGAGATCG GTGAAGAAGA
 pSW7 CCGTATCATG AACGTACTGG GTGAACCGGT CGACATGAAA GGCGAGATCG GTGAAGAAGA

5281 125
 R W A I H R A A P S Y E E L S N S Q E L
 K12 GCGTTGGGCG ATTCACCGCG CAGCACCTTC CTACGAAGAG CTGTCAAACCT CTCAGGAACT
 pKH7 GCGTTGGGCG ATTCACCGCG CAGCACCTTC CTACGAAGAG CTGTCAAACCT CTCAGGAACT
 pSE1 GCGTTGGGCG ATTCACCGCG CAGCACCTTC CTACGAAGAG CTGTCAAACCT CTCAGGAACT
 pSE3 GCGTTGGGCG ATTCACCGCG CAGCACCTTC CTACGAAGAG CTGTCAAACCT CTCAGGAACT
 pSW7 GCGTTGGGCG ATTCACCGCG CAGCACCTTC CTACGAAGAG CTGTCAAACCT CTCAGGAACT

5341 145
 L E T G I K V I D L M C P F A K G G K V
 K12 GCTGGAAACC GGTATCAAAG TTATCGACCT GATGTGTCCG TTCGCTAAGG GCGGTAAAGT
 pKH7 GCTGGAAACC GGTATCAAAG TTATCGACCT GATGGCTCCG TTCGCTAAGG GCGGTAAAGT
 pSE1 GCTGGAAACC GGTATCAAAG TTATCGACCT GATGGCTCCG TTCGCTAAGG GCGGTAAAGT
 pSE3 GCTGGAAACC GGTATCAAAG TTATCGACCT GATGGCTCCG TTCGCTAAGG GCGGTAAAGT
 pSW7 GCTGGAAACC GGTATCAAAG TTATCGACCT GATGGCTCCG TTCGCTAAGG GCGGTAAAGT

5401 165
 G L F G G A G V G K T V N M M E L I R N
 K12 TGGTCTGTTC GGTGGTGC GG GTG TAGGTAA AACCGTAAAC ATGATGGAGC TCATTCTGTA
 pKH7 TGGTCTGTTC GGTGGTGC GG GTG TAGGTAA AACCGTAAAC ATGATGGAGC TCATTCTGTA
 pSE1 TGGTCTGTTC GGTGGTGC GG GTG TAGGTAA AACCGTAAAC ATGATGGAGC TCATTCTGTA
 pSE3 TGGTCTGTTC GGTGGTGC GG GTG TAGGTAA AACCGTAAAC ATGATGGAGC TCATTCTGTA
 pSW7 TGGTCTGTTC GGTGGTGC GG GTG TAGGTAA AACCGTAAAC ATGATGGAGC TCATTCTGTA

SacI

5461 185
 I A I E H S G Y S V F A G V G E R T R E
 K12 CATCGCGATC GAGCACTCCG GTTACTCTGT GTTTGCGGGC GTAGGTGAAC GTACTCGTGA
 pKH7 CATCGCGATC GAGCACTCCG GTTACTCTGT GTTTGCGGGC GTAGGTGAAC GTACTCGTGA
 pSE1 CATCGCGATC GAGCACTCCG GTTACTCTGT GTTTGCGGGC GTAGGTGAAC GTACTCGTGA
 pSE3 CATCGCGATC GAGCACTCCG GTTACTCTGT GTTTGCGGGC GTAGGTGAAC GTACTCGTGA
 pSW7 CATCGCGATC GAGCACTCCG GTTACTCTGT GTTTGCGGGC GTAGGTGAAC GTACTCGTGA

5521 205
 G N D F Y H E M T D S N V I D K V S L V
 K12 GGGTAACGAC TTCTACCACG AAATGACCGA CTCCAACGTT ATCGACAAAAG TATCCCTGGT
 pKH7 GGGTAACGAC TTCTACCACG AAATGACCGA CTCCAACGTT ATCGACAAAAG TATCCCTGGT
 pSE1 GGGTAACGAC TTCTACCACG AAATGACCGA CTCCAACGTT ATCGACAAAAG TATCCCTGGT
 pSE3 GGGTAACGAC TTCTACCACG AAATGACCGA CTCCAACGTT ATCGACAAAAG TATCCCTGGT
 pSW7 GGGTAACGAC TTCTACCACG AAATGACCGA CTCCAACGTT ATCGACAAAAG TATCCCTGGT

5581 225
 Y G Q M N E P P G N R L R V A L T G L T
 K12 GTATGGCCAG ATGAACGAGC CGCCGGGAAA CCGTCTGCGC GTTGCTCTGA CCGGTCTGAC
 pKH7 GTATGGCCAG ATGAACGAGC CGCCGGGAAA CCGTCTGCGC GTTGCTCTGA CCGGTCTGAC
 pSE1 GTATGGCCAG ATGAACGAGC CGCCGGGAAA CCGTCTGCGC GTTGCTCTGA CCGGTCTGAC
 pSE3 GTATGGCCAG ATGAACGAGC CGCCGGGAAA CCGTCTGCGC GTTGCTCTGA CCGGTCTGAC
 pSW7 GTATGGCCAG ATGAACGAGC CGCCGGGAAA CCGTCTGCGC GTTGCTCTGA CCGGTCTGAC

5641 245
 M A E K F R D E G R D V L L F V D N I Y
 K12 CATGGCTGAG AAATTCCGTG ACGAAGGTCG TGACGTTCTG CTGTTTCGTTG ACAACATCTA
 pKH7 CATGGCTGAG AAATTCCGTG ACGAAGGTCG TGACGTTCTG CTGTTTCGTTG ACAACATCTA
 pSE1 CATGGCTGAG AAATTCCGTG ACGAAGGTCG TGACGTTCTG CTGTTTCGTTG ACAACATCTA
 pSE3 CATGGCTGAG AAATTCCGTG ACGAAGGTCG TGACGTTCTG CTGTTTCGTTG ACAACATCTA
 pSW7 CATGGCTGAG AAATTCCGTG ACGAAGGTCG TGACGTTCTG CTGTTTCGTTG ACAACATCTA

5701 265
 R Y T L A G T E V S A L L G R M P S A V
 K12 TCGTTACACC CTGGCCGGTA CGGAAGTATC CGCACTGCTG GGCCGTATGC CTTCAGCGGT
 pKH7 TCGTTACACC CTGGCCGGTA CGGAAGTATC CGCACTGCTG GGCCGTATGC CTTCAGCGGT
 pSE1 TCGTTACACC CTGGCCGGTA CGGAAGTATC CGCACTGCTG GGCCGTATGC CTTCAGCGGT
 pSE3 TCGTTACACC CTGGCCGGTA CGGAAGTATC CGCACTGCTG GGCCGTATGC CTTCAGCGGT
 pSW7 TCGTTACACC CTGGCCGGTA CGGAAGTATC CGCACTGCTG GGCCGTATGC CTTCAGCGGT

5761 285
 G Y Q P T L A E E M G V L Q E R I T S T
 K12 AGGTTATCAG CCGACCCTGG CGGAAGAGAT GGGCGTTCTG CAGGAACGTA TCACCTCCAC
 pKH7 AGGTTATCAG CCGACCCTGG CGGAAGAGAT GGGCGTTCTG CAGGAACGTA TCACCTCCAC
 pSE1 AGGTTATCAG CCGACCCTGG CGGAAGAGAT GGGCGTTCTG CAGGAACGTA TCACCTCCAC
 pSE3 AGGTTATCAG CCGACCCTGG CGGAAGAGAT GGGCGTTCTG CAGGAACGTA TCACCTCCAC
 pSW7 AGGTTATCAG CCGACCCTGG CGGAAGAGAT GGGCGTTCTG CAGGAACGTA TCACCTCCAC

5821 305
 K T G S I T S V Q A V Y V P A D D L T D
 K12 CAAAAC TGGT TCTATCACCT CCGTACAGGC AGTATACGTA CCTGCGGATG ACTTGACTGA
 pKH7 CAAAAC TGGT TCTATCACCT CCGTACAGGC AGTATACGTA CCTGCGGATG ACTTGACTGA
 pSE1 CAAAAC TGGT TCTATCACCT CCGTACAGGC AGTATACGTA CCTGCGGATG ACTTGACTGA
 pSE3 CAAAAC TGGT TCTATCACCT CCGTACAGGC AGTATACGTA CCTGCGGATG ACTTGACTGA
 pSW7 CAAAAC TGGT TCTATCACCT CCGTACAGGC AGTATACGTA CCTGCGGATG ACTTGACTGA

5881 325
 P S P A T T F A H L D A T V V L S R Q I
 K12 CCCGTCTCCG GCAACCACCT TTGCGCACCT TGACGCAACC GTGGTACTGA GCCGTCAGAT
 pKH7 CCCGTCTCCG GCAACCACCT TTGCGCACCT TGACGCAACC GTGGTACTGA GCCGTCAGAT
 pSE1 CCCGTCTCCG GCAACCACCT TTGCGCACCT TGACGCAACC GTGGTACTGA GCCGTCAGAT
 pSE3 CCCGTCTCCG GCAACCACCT TTGCGCACCT TGACGCAACC GTGGTACTGA GCCGTCAGAT
 pSW7 CCCGTCTCCG GCAACCACCT TTGCGCACCT TGACGCAACC GTGGTACTGA GCCGTCAGAT

5941 345
 A S L G I Y P A V D P L D S T S R Q L D
 K12 CGCGTCTCTG GGTATCTACC CGGCCGTTGA CCCGCTGGAC TCCACCAGCC GTCAGCTGGA
 pKH7 CGCGTCTCTG GGTATCTACC CGGCCGTTGA CCCGCTGGAC TCCACCAGCC GTCAGCTGGA
 pSE1 CGCGTCTCTG GGTATCTACC CGGCCGTTGA CCCGCTGGAC TCCACCAGCC GTCAGCTGGA
 pSE3 CGCGTCTCTG GGTATCTACC CGGCCGTTGA CCCGCTGGAC TCCACCAGCC GTCAGCTGGA
 pSW7 CGCGTCTCTG GGTATCTACC CGGCCGTTGA CCCGCTGGAC TCCACCAGCC GTCAGCTGGA

6001 365
 P L V V G Q E H Y D T A R G V Q S I L Q
 K12 CCCGCTGGTG GTTGGTCAGG AACACTACGA CACCGCGCGT GGCATTTCAGT CCATCCTGCA
 pKH7 CCCGCTGGTG GTTGGTCAGG AACACTACGA CACCGCGCGT GGCATTTCAGT CCATCCTGCA
 pSE1 CCCGCTGGTG GTTGGTCAGG AACACTACGA CACCGCGCGT GGCATTTCAGT CCATCCTGCA
 pSE3 CCCGCTGGTG GTTGGTCAGG AACACTACGA CACCGCGCGT GGCATTTCAGT CCATCCTGCA
 pSW7 CCCGCTGGTG GTTGGTCAGG AACACTACGA CACCGCGCGT GGCATTTCAGT CCATCCTGCA

6061 385
 R Y Q E L K D I I A I L G M D E L S E E
 K12 ACGTTATCAG GAACTGAAAG ACATCATCGC CATCCTGGGT ATGGATGAAC TGTCTGAAGA
 pKH7 ACGTTATCAG GAACTGAAAG ACATCATCGC CATCCTGGGT ATGGATGAAC TGTCTGAAGA
 pSE1 ACGTTATCAG GAACTGAAAG ACATCATCGC CATCCTGGGT ATGGATGAAC TGTCTGAAGA
 pSE3 ACGTTATCAG GAACTGAAAG ACATCATCGC CATCCTGGGT ATGGATGAAC TGTCTGAAGA
 pSW7 ACGTTATCAG GAACTGAAAG ACATCATCGC CATCCTGGGT ATGGATGAAC TGTCTGAAGA

6121 405
 D K L V V A R A R K I Q R F L S Q P F F
 K12 AGACAAACTG GTGGTAGCGC GTGCTCGTAA GATCCAGCGC TTCCTGTCCC AGCCGTTCTT
 pKH7 AGACAAACTG GTGGTAGCGC GTGCTCGTAA GATCCAGCGC TTCCTGTCCC AGCCGTTCTT
 pSE1 AGACAAACTG GTGGTAGCGC GTGCTCGTAA GATCCAGCGC TTCCTGTCCC AGCCGTTCTT
 pSE3 AGACAAACTG GTGGTAGCGC GTGCTCGTAA GATCCAGCGC TTCCTGTCCC AGCCGTTCTT
 pSW7 AGACAAACTG GTGGTAGCGC GTGCTCGTAA GATCCAGCGC TTCCTGTCCC AGCCGTTCTT

6181 425
 V A E V F T G S P G K Y V S L K D T I R
 K12 CGTGGCAGAA GTATTCACCG GTTCTCCGGG TAAATACGTC TCCCTGAAAAG ACACCATCCG
 pKH7 CGTGGCAGAA GTATTCACCG GTTCTCCGGG TAAATACGTC TCCCTGAAAAG ACACCATCCG
 pSE1 CGTGGCAGAA GTATTCACCG GTTCTCCGGG TAAATACGTC TCCCTGAAAAG ACACCATCCG
 pSE3 CGTGGCAGAA GTATTCACCG GTTCTCCGGG TAAATACGTC TCCCTGAAAAG ACACCATCCG
 pSW7 CGTGGCAGAA GTATTCACCG GTTCTCCGGG TAAATACGTC TCCCTGAAAAG ACACCATCCG

6241 445
 G F K G I M E G E Y D H L P E Q A F Y M
 K12 TGGCTTTAAA GGCATCATGG AAGGCGAATA CGATCACCTG CCGGAGCAGG CGTTCTACAT
 pKH7 TGGCTTTAAA GGCATCATGG AAGGCGAATA CGATCACCTG CCGGAGCAGG CGTTCTACAT
 pSE1 TGGCTTTAAA GGCATCATGG AAGGCGAATA CGATCACCTG CCGGAGCAGG CGTTCTACAT
 pSE3 TGGCTTTAAA GGCATCATGG AAGGCGAATA CGATCACCTG CCGGAGCAGG CGTTCTACAT
 pSW7 TGGCTTTAAA GGCATCATGG AAGGCGAATA CGATCACCTG CCGGAGCAGG CGTTCTACAT

6661 117
 K R K A E E H I S S S H G D V D Y A Q A
 K12 **AAACGTAAGG CTGAAGAGCA CATTAGCAGC TCTCACGGCG ACGTAGATTA CGCTCAGGCG**
 pKH7 **AAACGTAAGG CTGAAGAGCA CATTAGCAGC TCTCACGGCG ACGTAGATTA CGCTCAGGCG**
 pSE1 **AAACGTAAGG CTGAAGAGCA CATTAGCAGC TCTCACGGCG ACGTAGATTA CGCTCAGGCG**
 pSE3 **AAACGTAAGG CTGAAGAGCA CATTAGCAGC TCTCACGGCG ACGTAGATTA CGCTCAGGCG**
 pSW7 **AAACGTAAGG CTGAAGAGCA CATTAGCAGC TCTCACGGCG ACGTAGATTA CGCTCAGGCG**

6721 137
 S A E L A K A I A Q L R V I E L T K K A
 K12 **TCTGCGGAAC TGGCCAAAGC GATCGCGCAG CTGCGCGTTA TCGAGTTGAC CAAAAAAGCG**
 pKH7 **TCTGCGGAAC TGGCCAAAGC GATCGCGCAG CTGCGCGTTA TCGAGTTGAC CAAAAAAGCG**
 pSE1 **TCTGCGGAAC TGGCCAAAGC GATCGCGCAG CTGCGCGTTA TCGAGTTGAC CAAAAAAGCG**
 pSE3 **TCTGCGGAAC TGGCCAAAGC GATCGCGCAG CTGCGCGTTA TCGAGTTGAC CAAAAAAGCG**
 pSW7 **TCTGCGGAAC TGGCCAAAGC GATCGCGCAG CTGCGCGTTA TCGAGTTGAC CAAAAAAGCG**

6781
 M
 K12 **ATGTAAACC GGCTTGAAAA GCACAAAAGC CAGTCTGGAA ACAGGCTGGC TTTTTTTTTGC**
 pKH7 **ATGTAAACC GGCTTGAAAA GCACAAAAGC CAGTCTGGAA ACAGGCTGGC TTTTTTTTTGC**
 pSE1 **ATGTAAACC GGCTTGAAAA GCACAAAAGC CAGTCTGGAA ACAGGCTGGC TTTTTTTTTGC**
 pSE3 **ATGTAAACC GGCTTGAAAA GCACAAAAGC CAGTCTGGAA ACAGGCTGGC TTTTTTTTTGC**
 pSW7 **ATGTAAACC GGCTTGAAAA GCACAAAAGC CAGTCTGGAA ACAGGCTGGC TTTTTTTTTGC**

6841
 K12 **GCGTGTGACC CGTCCTGAAT AGCGTTCACA TAGATCCTGC TGATATAAAA CCCCCCTGTT**
 pKH7 **GCGTGTGACC CGTCCTGAAT AGCGTTCACA TAGATCCTGC TGATATAAAA CCCCCCTGTT**
 pSE1 **GCGTGTGACC CGTCCTGAAT AGCGTTCACA TAGATCCTGC TGATATAAAA CCCCCCTGTT**
 pSE3 **GCGTGTGACC CGTCCTGAAT AGCGTTCACA TAGATCCTGC TGATATAAAA CCCCCCTGTT**
 pSW7 **GCGTGTGACC CGTCCTGAAT AGCGTTCACA TAGATCCTGC TGATATAAAA CCCCCCTGTT**

6901
 K12 **TTCCTGTTTA TTCATTGATC GAAATAAGAG CAAAAACATC CACCTGACGC TTAAATTAAG**
 pKH7 **TTCCTGTTTA TTCATTGATC GAAATAAGAG CAAAAACATC CACCTGACGC TTAAATTAAG**
 pSE1 **TTCCTGTTTA TTCATTGATC GAAATAAGAG CAAAAACATC CACCTGACGC TTAAATTAAG**
 pSE3 **TTCCTGTTTA TTCATTGATC GAAATAAGAG CAAAAACATC CACCTGACGC TTAAATTAAG**
 pSW7 **TTCCTGTTTA TTCATTGATC GAAATAAGAG CAAAAACATC CACCTGACGC TTAAATTAAG**

6961
 K12 **GTACTGCCTT AATTTTCTGC AGACAAAAGG CGTGACGATG GTCGAAAATG GCGCTTTCGT**
 pKH7 **GTACTGCCTT AATTTTCTGC AGACAAAAGG CGTGACGATG GTCGAAAATG GCGCTTTCGT**
 pSE1 **GTACTGCCTT AATTTTCTGC AGACAAAAGG CGTGACGATG GTCGAAAATG GCGCTTTCGT**
 pSE3 **GTACTGCCTT AATTTTCTGC AGACAAAAGG CGTGACGATG GTCGAAAATG GCGCTTTCGT**
 pSW7 **GTACTGCCTT AATTTTCTGC AGACAAAAGG CGTGACGATG GTCGAAAATG GCGCTTTCGT**

7021

K12	CAGCGGGGAT	AATCCGTTAT	TGAACAATTT	ATCCTCTGTC	CATTTACACGA	TGAAAAAAAAAT
pKH7	CAGCGGGGAT	AATCCGTTAT	TGAACAATTT	ATCCTCTGTC	CATTTACACGA	TGAAAAAAAAAT
pSE1	CAGCGGGGAT	AATCCGTTAT	TGAACAATTT	ATCCTCTGTC	CATTTACACGA	TGAAAAAAAAAT
pSE3	CAGCGGGGAT	AATCCGTTAT	TGAACAATTT	ATCCTCTGTC	CATTTACACGA	TGAAAAAAAAAT
pSW7	CAGCGGGGAT	AATCCGTTAT	TGAACAATTT	ATCCTCTGTC	CATTTACACGA	TGAAAAAAAAAT

7081

K12	GTAGTTTTTTT	CAAGGTGAAG	CGGTTTAAAT	TCGTT
pKH7	GTAGTTTTTTT	CAAGGTGAAG	CGGTTTGACT	<u>CTAGA</u>
pSE1	GTAGTTTTTTT	CAAGGTGAAG	CGGTTTGACT	<u>CTAGA</u>
pSE3	GTAGTTTTTTT	CAAGGTGAAG	CGGTTTGACT	<u>CTAGA</u>
pSW7	GTAGTTTTTTT	CAAGGTGAAG	CGGTTTGACT	<u>CTAGA</u>

*Xba*I

7 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., & Walker, J. E. (1994) "The structure of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria determined at 2.8 Å resolution" *Nature* **370**, 621-628.
- Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (2000) "Stepping rotation of F₁-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 7243-7247.
- Aggeler, R., Haughton, M. A., & Capaldi, R. A. (1995) „Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the beta subunits and the gamma and epsilon subunits of the *Escherichia coli* F₁-ATPase“ *J. Biol. Chem.* **270**, 9185-9191.
- Al-Shawi, M. K. und Senior, A. E. (1988) „Complete kinetic and thermodynamic characterization of the unisite catalytic pathway of *Escherichia coli* F₁-ATPase“ *J. Biol. Chem.* **263**, 19640-19648.
- Angov, E. & Brusilow, W. S. A. (1994) „Effects of deletions in the *uncA-uncG* intergeneric regions on expression of *uncG*, the gene for the γ subunit of the *Escherichia coli* F₀F₁-ATPase“ *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 499-503.
- Arnold, A., Wolf, H. U., Ackermann, B. P. und Bader, H. (1975) „An automated continued assay of membrane-bound and soluble ATPase and related enzymes“ *Anal. Biochem.* **71**, 209-213.
- Baracca, A., Amler, E., Solaini, G., Parenti Castelli, G., Lenaz, G. und Houstek, J. (1989) „Temperature-induced states of isolated F₁-ATPase affect catalysis, enzyme conformation and high-affinity nucleotide binding sites“ *Biochim. Biophys. Acta* **976**, 77-84.
- Boogerd, F. C., Boe, L., Michelsen, O. und Jensen, P. R. (1998) „*atp* mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency“ *J. Bacteriol.* **180**, 5855-5859.
- Boyer, P. D. & Kohlbrenner, W. E. (1981) "The present status of the binding-change mechanism and its relation to ATP formation by chloroplasts" *In* Energy coupling in photosynthesis. Selman, B. R. & Selman-Reimer, S., editors. Elsevier, Amsterdam. 231-241.

- Boyer, P. D. (1997) "The ATP synthase - a splendid molecular machine" *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.
- Brocklehurst, K. (1978) „Specific covalent modification of thiols: applications in the study of enzymes and other biomolecules“ *Int. Biochem.* **10**, 259-274.
- Careaga, C. L. und Falke, J. J. (1992a) „Thermal motions of surface α -helices in the D-galactose chemosensory receptor“ *J.Mol. Biol.* **226**, 1219-1235.
- Careaga, C. L. und Falke, J. J. (1992b) „Structur and dynamics of *Escherichia coli* chemosensory receptors“ *Biophys. J.* **62**, 209-216.
- Cesareni, G., Muesing, M. A. und Polisky, B. (1982) „Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 6313-6317
- Chang, A. & 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. & Junge, W. (2001) "Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F-ATPase: Curvature as an indicator of the torque" *Biophys. J.* **81**, 1234-1244.
- Cherepanov, D. A., Mulkidjanian, A., & Junge, W. (1999) "Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase" *FEBS Lett.* **449**, 1-6.
- Cross, R. L. & Duncan, T. M. (1996) "Subunit rotation in F_0F_1 -ATP synthases as a means of coupling proton transport through F_0 to the binding changes in F_1 " *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 403-408.
- Del Rizzo, P. A., Bi, Y., Dunn, S. D. und Shilton, B. H. (2002) „Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 428-442.
- Diez, M., Zimmermann, B., Börsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekyan, S., Kudryavtsev, V., Seidel, C. A. M. und Gräber, P. (2004) „Protonen-powered subunit rotation in single membrane-bound F_0F_1 -ATP synthase“ *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 135-141.

- Dmitriev, O. Y., Altendorf, K. und Fillingame, R. H. (2004) „Subunit a of the *E. coli* ATP synthase: reconstitution and high resolution NMR with protein purified in a mixed polarity solvent“ *FEBS lett.* **556**, 35-38.
- Dorgan, L. J., Urbauer, J. L. und Schuster, S. M. (1984) „Metal dependence and thermodynamic characteristics of the beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase“ *J. Biol. Chem.* **259**, 2816-2821.
- Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L., & Cross, R. L. (1995a) "Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10964-10968.
- Duncan, T. M., Zhou, Y., Bulygin, V. V., Hutcheon, M. L., & Cross, R. L. (1995b) "Mitochondrial and bacterial ATPases" *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 736-741.
- Dunn, S. D., McLachlin, D. T., & Revington, M. (2000) "The second stalk of *Escherichia coli* ATP synthase" *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 356-363.
- Fillingame, R. H., Jones, P. C., Jiang, W., Valiyaveetil, F. I., & Dmitriev, O. Y. (1998) "Subunit organization and structure in the F₀ sector of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase" *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 135-142.
- Fiske, C. H. und Subbarow, Y. (1925) „The colorimetric determination of phosphorus“ *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400
- Foster, T. J., Davis, M. A., Roberts, D. E., Takeshita, K. und Kleckner, N. (1981) „Genetic organization of Transposon Tn10“ *Cell* **23**, 201-213.
- Foster, D. L. & Fillingame, R. H. (1982) "Stoichiometry of subunits in the proton-ATPase complex of *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem.* **257**, 2009-2015.
- 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**, 1055-1061.
- Grüber, G., Godovac-Zimmermann, J. und Nawroth, T. (1994) „ATP synthesis and hydrolysis of the ATP-synthase from *Micrococcus luteus* regulated by an inhibitor subunit and membrane energization“ *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 43-51.
- Gumbiowski, K., Cherepanov, D., Müller, M., Pänke, O., Promto, 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.

- Hanahan, D. (1983) "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Häsler, K., Engelbrecht, S., & Junge, W. (1998) "Three-stepped rotation of subunits γ and ϵ in single molecules of F-ATPase as revealed by polarized, confocal fluorometry" *FEBS Lett.* **426**, 301-304.
- Häsler, K., Pänke, O., & Junge, W. (1999) "On the stator of rotary ATP synthase: the binding strength of subunit δ to $(\alpha\beta)_3$ as determined by fluorescence correlation spectroscopy" *B* **38**, 13759-13765.
- Hausrath, A. C., Capaldi, R. A. und Matthews, B. W. (2001) „The conformation of the ϵ - and γ -subunit within the *Escherichia coli* F1-ATPase“ *J. Biol. Chem.* **276**, 47227-47232.
- 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.* **5**, 813-24.
- Howe, J. G. und Hershey, J. W. B. (1981) „A sensitive immuno-blotting method for measuring protein synthesis initiation-faktor levels in lysates of *Escherichia coli*“ *J. Biol. Chem.* **256**, 2836-2839.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, R. und Kinosita, K. Jr. (2004) „Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase“ *Nature* **427**, 465-468.
- Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M. und Futai, M. (1991) „Mutations in Ser¹⁷⁴ and the Glycine-rich sequence (Gly¹⁴⁹, Gly¹⁵⁰, and Thr¹⁵⁶) in the β subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase“ *J. Biol. Chem.* **266**, 16350-16355.
- 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. & 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**, 29701-29705.
- Jones, P. C. (2001) "Introduction of a carboxyl group in the first transmembrane helix of *Escherichia coli* F₁F₀ ATPase subunit *c* and cytoplasmic pH regulation" *J. Bacteriol.* **183**, 1524-1530.

- Junge, W., Lill, H., & Engelbrecht, S. (1997) "ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics" *TIBS* **22**, 420-423.
- Junge, W. (1999b) "ATP synthase and other motor proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4735-4737.
- Ketchum, C. J., Al-Shawi, M. K. und Nakamoto, R. K. (1998) „Intergenic suppression of the gM23K uncoupling mutation in F₀F₁ ATP synthase by bGlu-381 substitutions: the role of the b³⁸⁰DELSEED³⁸⁶ segment in energy coupling“ *Biochem. J.* **330**, 707-712.
- Kuo, P. H., Ketchum, C. J., & Nakamoto, R. K. (1998) "Stability and functionality of cysteine-less F₁F₀ ATP synthase from *Escherichia coli*" *FEBS Lett.* **426**, 217-220.
- Laemmli, U. K. (1970) „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“ *Nature* **227**, 680-685.
- LeBel, D., Poirier, G. G., & Beaudoin, A. R. (1978) "A convenient method for the ATPase assay" *Anal. Biochem.* **85**, 86-89.
- 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. (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. (1988) „Expression of the *unc* genes in *Escherichia coli*“ *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 19-39.
- Mitchell, P. (1961) "Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism" *Nature* **191**, 144-148.
- Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M. und Futai, M. (1991) „One-step purification of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (F₀F₁) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters“ *J. Biol. Chem.* **266**, 22141-22146.
- Müller, M. (2004) „Das molekulare Drehlager der ATP-Synthase. Dissertation“ Universität Osnabrück
- Mülhardt, C. (2003) „Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics 4. Auflage“ Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

- Nielson, J., Hansen, F. G., Hoppe, J., Friedl, P. und von Meyenburg, K. (1981) „The nucleotide sequence of the *atp* genes coding for the F₀ subunit a, b, c and the F₁ subunit δ of the membrane bound ATP synthase of *Escherichia coli*“ *Mol. Gen. Genet.* **184**, 33-39.
- Nishio, K., Iwamoto-Kihara, A., Yamamoto, A., Wada, Y und Futai, M. (2002) „Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes: α or β subunit rotation relative to the c subunit ring“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13448-13452.
- Noji, H., Häslner, K., Junge, W., Kinoshita, K., Jr., Yoshida, M., & Engelbrecht, S. (1999) "Rotation of *Escherichia coli* F₁-ATPase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 597-599.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. (1997) "Direct observation of the rotation of F-ATPase" *Nature* **386**, 299-302.
- Omote, H., Sambonmatsu, N., Saito, K., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihara, A., Yanagida, T., Wada, Y., & Futai, M. (1999) "The γ subunit rotation and torque generation in F₁-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7780-7784.
- Pardee, J. D. & Spudich, J. A. (1982) "Purification of muscle actin" *Methods Enzymol.* **85**, 164-170.
- Pänke, O. & Rumberg, B. (1999) "Kinetic modeling of rotary CF₀F₁-ATP synthase: storage of elastic energy during energy transduction" *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 118-128.
- Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W., & Engelbrecht, S. (2000) "F-ATPase: specific observation of the rotating c-subunit oligomer of EF₀EF₁" *FEBS Lett.* **472**, 34-38.
- Pänke, O., Cherepanov, D. A., Gumbiowski, K., Engelbrecht, S., & Junge, W. (2001) "Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F-ATPase: Torque profile of the enzyme" *Biophys. J.* **81**, 1220-1233.
- Prompt, P. (2001) „Blockierung der ATP-Hydrolyse durch Disulfid-Brücken. Diplomarbeit“ Universität Osnabrück
- 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.

- Rodgers, A. J. & Wilce, M. C. (2000) "Structure of the γ - ϵ complex of ATP synthase" *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1051-1054.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S., & Junge, W. (1997) "Functional and idling rotatory motion within F-ATPase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4401-4405.
- 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 (FoF1): direct observation" *Science* **286**, 1722-1724.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sedmak, J. J. & Grossberg, S. E. (1994) "A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250" *Anal. Biochem.* **79**, 544-552.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H., & Mueller, D. J. (2000) "Proton-powered turbine of a plant motor" *Nature* **405**, 418-419.
- Senior, A. E. & Wise, J. G. (1983) "The proton-ATPase of bacteria and mitochondria" *J. Membr. Biol.* **73**, 105-124.
- Shimabukuro, K., Yasuda, R., Muneyuki, E., Hara, K. Y., Kinoshita, K. Jr. Und Yoshida, M. (2003) „Catalysis and rotation of F₁ motor: cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 degree substep rotation“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 14731-14736.
- Stiggall, D. L., Galante, Y. M. und Hatefi, Y. (1979) „Preparation and properties of complex V“ *Methods Enzymol.* **55**, 308-315.
- Stock, D., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (1999) "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase" *Science* **286**, 1700-1705.
- 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**, 15269-15274.
- Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Noji, H., Kinoshita, K., Yoshida, M., & Capaldi, R. A. (2000) "Observations of rotation within the F₀F₁-ATP synthase: deciding between rotation of the F(o)c subunit ring and artifact" *FEBS Lett.* **470**, 244-248.

- 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. U. S. A* **98**, 898-902.
- 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.
- Vonck, J., von Nidda, T. K., Meier, T., Matthey, U., Mills, D. J., Kühlbrandt, W. und Dimroth, P. (2002) „Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na⁺-ATP synthase“ *J. Mol. Biol.* **321**, 307-316.
- Walker, J. E., Saraste, M. und Gay, N. J. (1984) „The *unc* operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase“ *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 164-200.
- Weber, J. & Senior, A. E. (1996) "Binding and hydrolysis of TNP-ATP by *Escherichia coli* F₁-ATPase" *J. Biol. Chem.* **271**, 3474-3477.
- 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.
- Weber, J. und Senior, A. E. (2003) „ATP synthesis driven by proton transport in F₀F₁-ATP synthase“ *FEBS Lett.* **545**, 61-70.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., & Bauer, J. C. (1994) "Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by polymerase chain reaction" *Gene*.
- Wilkens, S., Zhou, J., Nakayama, R., Dunn, S. D., & Capaldi, R. A. (2000) "Localization of the delta subunit in the *Escherichia coli* F(1)F(0)-ATP synthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F(1)" *J. Mol. Biol.* **295**, 387-391.
- Winkler, S. (2001) „Viskoelastische Eigenschaften von F-Aktin und die rotierende ATP-Synthase. Diplomarbeit“ Universität Osnabrück
- Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, L. R., Cox, D. N., & Senior, A. E. (1983) "Properties of F₁-ATPase from the *uncD412* mutant of *Escherichia coli*" *Biochem. J.* **215**, 343-350.
- Wise, J. G. (1990) "Site-directed mutagenesis of the conserved beta subunit tyrosine 331 of *Escherichia coli* ATP synthase yields catalytically active enzymes" *J. Biol. Chem.* **265**, 10403-10409.

- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., & Yoshida, M. (1998) "F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps" *Cell* **93**, 1117-1124.
- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr., & Itoh, H. (2001) "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase" *Nature* **410**, 898-904.

Publikationsliste

- Clausen, J., Winkler, S., Hays, A. M. A., Hundelt, M., Debus, R. J. und Junge, W. (2001) „Photosynthetic water oxidation in *Synechocystis* sp. PCC6903: mutations D1-E189K R and Q are without influence on electron transfer at the donor side of photosystem II“ *Biochim. Biophys. Acta* **1506**, 224-235.
- Gumbiowski, K., Cherepanov, D. A., Müller, M., Pänke, O., Promtp, P., Winkler, S., Junge, W. und Engelbrecht, S. (2001) „F-ATPase: Forced Full Rotation of the Rotor Despite Covalent Cross-link with the Stator“ *J. Biol. Chem.* **276**, 42287-42292.
- Müller, M., Gumbiowski, K., Cherepanov, D., Winkler, S., Junge, W. & Engelbrecht, S. und Pänke, O. (2004) „Rotary F₁-ATPase. Is the C-terminus of subunit γ fixed or mobile?“ *Eur. J. Biochem.* **271**, 3914-3922

Danksagung

Am Ende noch ein Dank an,

Prof. Dr. Wolfgang Junge
apl. Prof. Dr. Siegfried Engelbrecht-Vandré

Dr. Ralf Ahlbrink
Dr. Jürgen Clausen
Dr. Gabriele Deckers-Hebestreit
Dr. Karin Gumbiowski
Gabriele Hikade
Dr. Monika Hundelt
Hella Kenneweg
Dr. Ulrich Kunze
Hendrik März
Sigrid März
Andreas Müller
Dr. Martin Müller
Dr. Natascha Voskoboinikova

allen weiteren KollegInnen

und besonders Ralf, meiner Familie und Freunden.

