

# **Untersuchungen zur Struktur der $b_2$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP-Synthase aus *Escherichia coli***

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
eingereichte

**Dissertation**  
(D 386)

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Tassilo Hornung**

Betreuerin: Prof. Dr. Pia D. Vogel

Kaiserslautern 2004

Die vorliegende Arbeit entstand von August 2000 bis Oktober 2004 im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie, der Technischen Universität Kaiserslautern und im Department of Biological Science der Southern Methodist University of Dallas, Texas.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Pia D. Vogel für die Betreuung und den mir gewährten Freiraum bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-SYNTASE .....	2
1.1.1 Die F <sub>1</sub> -ATPase.....	3
1.1.2 Der katalytische Mechanismus der F <sub>1</sub> -ATPase.....	5
1.1.3 Der F <sub>0</sub> -Teil der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATPase.....	7
1.1.3.1 Die Untereinheiten a und c .....	7
1.1.3.2 Der „second stalk“ bzw. die b <sub>2</sub> -Untereinheit.....	8
1.2 ESR-SPEKTROSKOPIE.....	10
<b>2 PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>12</b>
<b>3 EIGENE ERGEBNISSE</b> .....	<b>14</b>
3.1 DIE VERKÜRZTE, WASSERLÖSLICHE FORM DER B <sub>2</sub> -UNTEREINHEIT DER F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-SYNTASE: B <sub>SYN</sub> .....	14
3.1.1 Einführung von Cysteinen in b <sub>syn</sub> : Herstellung der Plasmide pTH1 - 6.....	15
3.1.1.1 Gezielte Mutagenese .....	15
3.1.1.2 Umklonierung der mutierten Regionen in pDM3.....	16
3.1.2 Expression, Isolierung und Modifizierung der b <sub>syn</sub> -Mutanten .....	17
3.1.3 Expression und Isolierung der F <sub>1</sub> -ATPase aus <i>Escherichia coli</i> .....	18
3.1.4 Strukturelle Untersuchungen von b <sub>syn</sub> .....	19
3.1.4.1 Bestimmung von Spin-Spin-Abständen .....	19
3.1.4.2 Strukturelle Änderungen von b <sub>syn</sub> bei Zugabe von F <sub>1</sub> .....	25
3.1.4.2.1 Untersuchungen mit Hilfe von IAAT.....	26
3.1.4.2.2 Untersuchungen mit Hilfe von MTS .....	30
3.1.4.2.3 Labelgrade.....	35
3.1.5 Zusammenfassung und Vergleich der bisherigen Ergebnisse.....	38
3.2 DER F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-SYNTASE-KOMPLEX.....	40
3.2.1 Austausch des FLAG-Tag- gegen ein His-Tag-Gen.....	41
3.2.2 Einführung von Cysteinen in die b <sub>2</sub> -Untereinheit der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-Synthase .....	48
3.2.2.1 Herstellung des Subclones pTH12.....	48

3.2.2.2 Gezielte Mutagenese .....	49
3.2.2.3 Umklonierung der mutierten Bereiche in pTH11 .....	50
3.2.3 Wachstumskontrolle der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Mutanten .....	53
3.2.4 Isolierung der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Mutanten und Nachweis ihrer b <sub>2</sub> -Untereinheiten .....	54
3.2.4.1 Expression, Modifizierung und Aufreinigung der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Mutanten.....	54
3.2.4.2 Nachweis der b <sub>2</sub> -Untereinheiten in den unterschiedlichen ATP-Synthase-Mutanten.....	57
3.2.5 MPB-Labeling der einzelnen F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Mutanten .....	58
3.2.6 ESR-spektroskopische Untersuchung der verschiedenen F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Mutanten.....	60
3.2.7 Das Plasmid pTH24: F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Mutante bA105C .....	64
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>67</b>
<b>5 EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>71</b>
5.1 MATERIAL.....	71
5.1.1 <i>E.coli</i> Stämme .....	71
5.1.2 Plasmide und Vektoren .....	71
5.1.3 Oligonukleotide.....	74
5.1.4 Enzyme.....	76
5.1.5 Verwendete Chemikalien und weitere Materialien.....	78
5.1.6 Verwendete Geräte.....	80
5.2 KULTIVIERUNG UND LAGERUNG DER <i>E. COLI</i> -KULTUREN.....	81
5.2.1 Medien, Medienzusätze und Kulturbedingungen .....	81
5.2.2 Wachstumsmessungen.....	85
5.2.3 Lagerung der <i>E. coli</i> Kulturen.....	85
5.3 ALLGEMEINE METHODEN.....	85
5.3.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	85
5.3.2 Plasmid-Minipräparation.....	87
5.3.3 DNA-Restriktion .....	87
5.3.4 Agarosegel-Elektrophorese .....	87
5.3.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	89
5.3.6 Ligation .....	89
5.3.7 Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	90
5.3.8 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und Oligonukleotiden.....	90

5.3.9 Gezielte Mutagenese .....	91
5.3.10 Sequenzierung neu generierter Plasmide .....	91
<b>5.4 KLONIERUNG DER PLASMIDE</b> .....	<b>92</b>
5.4.1 Einführung von Cysteinen in $b_{syn}$ .....	92
5.4.1.1 Gezielte Mutagenese .....	92
5.4.1.2 Umklonierung der mutierten Regionen in pDM3.....	94
5.4.2 Umklonierung eines FLAG- in einen His-Tag.....	95
5.4.2.1 Plasmid pTH7 .....	95
5.4.2.2 Insertion einer HindIII-Schnittstelle in pTH7: Plasmid pTH8 .....	95
5.4.2.3 Das Plasmid pTH9: Substitution der FLAG-Tag-Sequenz aus pTH8 gegen eine His-Tag-Sequenz .....	96
5.4.2.4 Das Plasmid pTH10: Entfernen der HindIII-Schnittstellen aus pTH9 .....	97
5.4.2.5 Das Plasmid pTH11 .....	98
5.4.3 Einführung von Cysteinen in die $b_2$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP-Synthase .....	99
5.4.3.1 Herstellung von pTH12.....	99
5.4.3.2 Gezielte Mutagenese .....	100
5.4.3.3 Umklonierung der mutierten Regionen in pTH11 .....	102
<b>5.5 PROTEINSPEZIFISCHE ARBEITEN</b> .....	<b>104</b>
5.5.1 Isolierung der $b_{syn}$ -Mutanten .....	104
5.5.1.1 Aufzucht und Ernte der Zellen.....	104
5.5.1.2 Isolierung und Aufreinigung der $b_{syn}$ -Mutanten.....	104
5.5.1.3 Site-specific Spin Labeling der $b_{syn}$ -Mutanten.....	105
5.5.2 Isolierung der $F_1$ -ATPase bzw. der $F_0F_1$ -ATP-Synthase aus <i>E.coli</i> .....	106
5.5.2.1 Aufzucht und Ernte der Zellen.....	106
5.5.2.2 Präparation der $F_0F_1$ -enthaltenden Membranvesikel .....	107
5.5.2.3 Isolierung der $F_1$ -ATPase bzw. der $F_0F_1$ -ATP-Synthase .....	108
5.5.2.3.1 Isolierung der Wildtyp- $F_1$ -ATPase aus SWM1 .....	108
5.5.2.3.2 Modifizierung bzw. Isolierung der His-getaggten $F_0F_1$ -ATP-Synthase .....	109
<b>5.6 ANALYTIK</b> .....	<b>111</b>
5.6.1 Konzentrationsbestimmung der Proteine .....	111
5.6.2 Ermittlung der ATPase-Aktivität .....	111
5.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	112
5.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	112
5.6.3.2 Native Gelelektrophorese .....	112

5.6.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	112
5.6.4 Western Blot (Immunoblot) .....	113
5.6.5 MPB-Labeling.....	115
5.6.6 ESR-Spektroskopie .....	117
5.6.6.1 Messungen von $b_{\text{syn}}$ mit und ohne $F_1$ .....	117
5.6.6.2 Messungen von $F_0F_1$ .....	120
5.6.6.3 Bestimmung des Labelgrades der einzelnen mit Spinlabel modifizierten $b_{\text{syn}}$ -Mutanten .....	121
<b>6 LITERATUR.....</b>	<b>122</b>
<b>7 ANHANG.....</b>	<b>126</b>
7.1 DNA-ISOLIERUNG MIT DEM QIAPREP <sup>®</sup> SPIN MINIPREP SYSTEM DER FA. QIAGEN .....	126
7.2 EXTRAKTION VON DNA-FRAKMENTEN AUS AGAROSEGELEN MIT DEM QIAEX II SYSTEM DER FA. QIAGEN .....	128
7.3 RESTRIKTIONSKARTEN.....	131

# Aufstellung der Abkürzungen

ADP/ATP	Adenosin-5'-di-/triphosphat
Amp	Ampicillin
BSA	Rinderserumalbumin
Cm	Chloramphenicol
DEAE	N,N-Diethylaminoethyl
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EACA	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
IAAT	4-(2-Iodacetamido)-TEMPO oder 4-(3-Iodoacetamido)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LHCC	linkshändiges coiled-Coil
MTS	1-Oxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methanthiosulfonat
PAB	4-Aminobenzamidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RHCC	rechtshändiges coiled-Coil
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spin Label
TEMPO	1-Oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
TES	2-(Tris-(hydroxymethyl)-methylamino)-ethansulfonsäure
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (international units) ( $\mu$ mol Substratumsatz pro min)
UV	elektromagnetische Strahlung im Ultraviolett-Bereich

# 1 Einleitung

Betrachtet man die Vorgänge, die sich in einem lebenden Organismus abspielen, so wird man feststellen, dass dem Begriff der Energie eine zentrale Bedeutung beizumessen ist. Denn sowohl bei der Aufnahme, als auch bei der Umwandlung und dem Abbau von Stoffen wird Energie freigesetzt oder verbraucht. Bei aerob lebenden Organismen erfolgt dies hauptsächlich durch die Kopplung der exergonischen (spontanen, energieliefernden) Reaktionen der Nährstoffoxidation an die endergonischen (erzwungenen, energieverbrauchenden) Prozesse, die zur Aufrechterhaltung des lebenden Zustands notwendig sind (z.B. die Verrichtung von mechanischer Arbeit oder die Biosynthese komplexer Moleküle).

Chemotrophe aerobe Organismen, (z.B. der Mensch), gewinnen ihre Energie durch die Oxidation organischer Verbindungen (Kohlenhydrate, Lipide und Proteine), die sie von anderen, letztlich von phototrophen Organismen, wie z.B. Pflanzen, erhalten. Meistens wird die so gewonnene Energie den endergonischen Reaktionen über zwischengeschaltete Synthesen von energiereichen Phosphatverbindungen zur Verfügung gestellt. Die wichtigste dieser Verbindungen stellt das Adenosin-5'-triphosphat (ATP) dar, das zwei energiereiche Phosphorsäureanhydridbindungen besitzt, bei deren Hydrolyse unter zellulären Bedingungen ca. 31 kJ / mol an Energie frei werden (Klinge & Silbernagel, 1996).

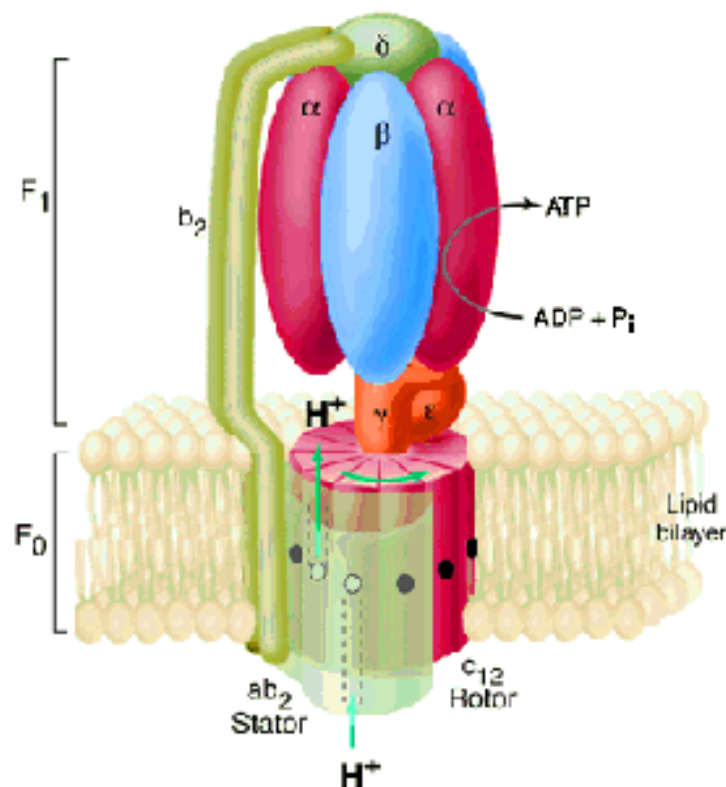
ATP entsteht durch die Phosphorylierung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP), wobei die hierzu notwendige Energie hauptsächlich durch den Abbau eines Protonengradienten über eine Membran erzeugt wird. Durch die Oxidation von Nährstoffen entsteht dieser Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran oder der Plasmamembran von Bakterien. Bei Pflanzen kommt es durch die Photosynthese noch zu einer Gradientenbildung an der Thylakoidmembran. Der Enzymkomplex, an dem das ATP gebildet wird, ist die sogenannte  $F_0F_1$ -ATP-Synthase, die in ähnlicher Form in allen Lebewesen vorkommt.



## 1.1 Die $F_0F_1$ -ATP-Synthase

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase besteht aus zwei Teilen. Während der hydrophobe, membrangebundene Teil als  $F_0$  bezeichnet wird und den Protonenkanal des Komplexes darstellt, enthält der wasserlösliche  $F_1$ -Teil die Bindungsstellen zur Synthese bzw. zur Hydrolyse von ATP. Die Synthese und Freisetzung von ATP findet nur dann statt, wenn  $F_0$  in einer Membran integriert und mit dem  $F_1$ -Teil verbunden ist. Liegt die von der  $F_0$ -Einheit getrennte  $F_1$  alleine vor, so fehlt die treibende Kraft aus dem Protonengradienten, um gebildetes ATP aus den Bindungsstellen freizusetzen.

Der  $F_0F_1$ -Komplex aus *Escherichia coli* (siehe Abb. 1.1), der meist als Prototyp für Untersuchungen dient, hat die Zusammensetzung  $ab_2c_9-12$  für  $F_0$  und  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  für den  $F_1$ -Teil (Fillingame, 1998).



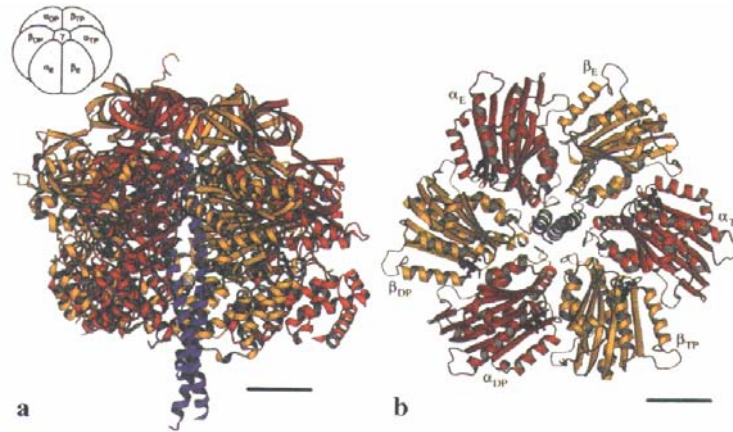
**Abbildung 1.1:** Schematischer Aufbau der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase aus *Escherichia coli* (Fillingame, 1999) basierend auf den bisherigen Kenntnissen.  $F_0$  liegt fast vollständig in der Membran, während  $F_1$  in die cytosolische Seite ragt.

### 1.1.1 Die F<sub>1</sub>-ATPase

Da die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase in ähnlicher Form und Funktion in praktisch allen Lebewesen vorliegt, besteht nicht nur die F<sub>1</sub>-ATPase aus *Escherichia coli* (*E. coli*) aus fünf Untereinheiten der Zusammensetzung  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Alle weiteren F<sub>1</sub>-ATPasen aus Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien haben einen ähnlichen Aufbau, wobei die mitochondriale F<sub>1</sub> noch weitere Untereinheiten besitzt. Die Verwandtschaft der unterschiedlichen F<sub>1</sub>-ATPasen geht sogar soweit, dass isolierte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten verschiedener Spezies zu einer funktionsfähigen ATPase zusammengesetzt werden können (Lill *et al.*, 1993). Allen F<sub>1</sub>-ATPasen besitzen insgesamt sechs Nukleotidbindungsstellen (Cross & Nalin, 1982; Wise *et al.*, 1983; Xue *et al.*, 1987), wovon jeweils drei die Nukleotide schnell genug austauschen, um an der Katalyse beteiligt zu sein (katalytische Nukleotidbindungsstellen). Die Funktion der übrigen drei Bindungsstellen, den nichtkatalytischen Nukleotidbindungsstellen, ist noch nicht geklärt. Es zeigte sich, dass Mutationen, welche die Nukleotidbindung an den nichtkatalytischen Bindungsstellen der F<sub>1</sub> aus *E. coli* (EF<sub>1</sub>) verhindern, keinen Einfluss auf die ATPase-katalysierte ATP-Hydrolyse oder das Zellwachstum haben (Weber *et al.*, 1995). Allerdings gibt es auch Hinweise auf einen regulatorischen Effekt bei der Chloroplasten-F<sub>1</sub> (CF<sub>1</sub>), falls diese Bindungsstellen mit bestimmten Adenin- oder Guaninnukleotiden besetzt werden (Milgrom *et al.*, 1993).

Wesentlich beigetragen zum Verständnis des Aufbaus der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase haben deren Kristallstrukturen aus Hefezellen (Stock *et al.*, 1999) bzw. von isolierter mitochondrialer F<sub>1</sub> (MF<sub>1</sub>) aus Rinderherzen (Abrahams *et al.*, 1994) und Rattenleber (Bianchet *et al.*, 1998). Die hohe Sequenzhomologie der F<sub>1</sub>-Untereinheiten aus Rinderherzen und *E. coli* lässt eine große Ähnlichkeit in den Tertiärstrukturen vermuten.

Aus der Kristallstruktur der MF<sub>1</sub> aus Rinderherzen lässt sich erkennen, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, vergleichbar den Scheiben einer Orange, alternierend um ein coiled-Coil von zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices der  $\gamma$ -Untereinheit angeordnet sind. Crosslink-Experimente ergaben, dass sich  $\gamma$  von der Membran mit der dort positionierten F<sub>0</sub> bis zur Oberseite von F<sub>1</sub> zieht (Watts *et al.*, 1995). Die katalytischen Nukleotidbindungsstellen, die sich hauptsächlich auf den  $\beta$ -Untereinheiten befinden, liegen genau wie die nichtkatalytischen Bindungsstellen in der Nähe der  $\alpha/\beta$ -Kontaktbereiche.



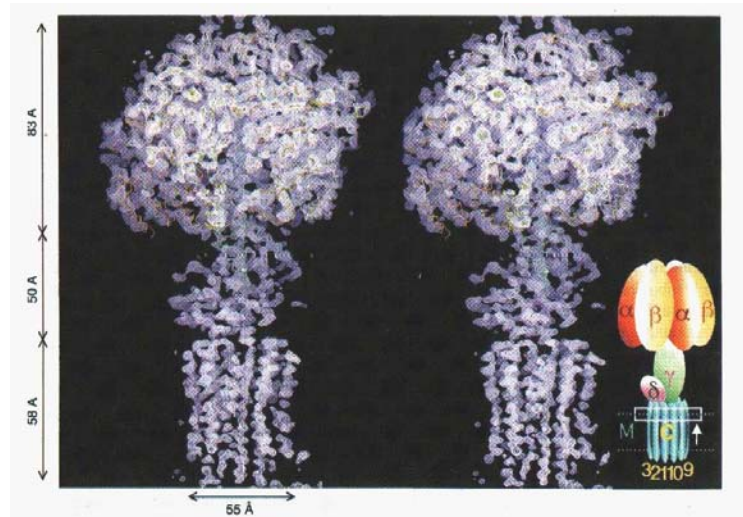
**Abbildung 1.2:** Kristallstrukturmodell der F<sub>1</sub>-ATPase (Abrahams *et al.*, 1994): a: Seitenansicht; b: Ansicht von unten (Schnitt durch das Modell in der Ebene der Nukleotidbindungsstellen).

Aufgrund kinetischer Untersuchungen postulierte Boyer schon 1982 ein Modell, wonach es zu einer Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit im  $\alpha\beta$ -Hexamer kommt (Gresser *et al.*, 1982). Die direkte Beobachtung der Rotation eines an  $\gamma$  befestigten Aktinfilamentes zeigte, dass sich  $\gamma$  während der ATP-Hydrolyse in eine Richtung dreht (Noji *et al.*, 1997; Noji *et al.*, 1999; Omote *et al.*, 1999; Hisabori *et al.*, 1999)

Die auf der Außenseite von  $(\alpha\beta)_3$  sitzende  $\delta$ -Untereinheit, steht sowohl mit der  $b_2$ -Untereinheit der F<sub>O</sub>-Einheit als auch mit dem aminoterminalen Ende von  $\alpha$ -Untereinheiten in Wechselwirkung (Rodgers *et al.*, 1997; McLachlin *et al.*, 1998; Dunn & Chandler, 1998). Die Struktur von isolierter  $\delta$ -Untereinheit in Lösung wurde durch NMR-Analyse weitgehend aufgeklärt. Hierbei zeigte sich, dass  $\delta$  in zwei Domänen aufgeteilt ist (Wilkins *et al.*, 1997). Der aminoterminal Bereich besteht aus kompakten Bündeln von sechs  $\alpha$ -Helices mit Helix-turn-Helix-Motiven. Die carboxyterminale Domäne ist weniger gut charakterisiert, da ihr offenbar eine geordnete Struktur fehlt. Man vermutet, dass beide Domänen an die F<sub>1</sub> binden, allerdings soll nur das carboxyterminale Ende für die Wechselwirkung von F<sub>1</sub> mit F<sub>O</sub> zuständig sein, während der Aminoterminus nichts zu dieser Bindung beizutragen scheint.

Ebenfalls aus zwei Domänen besteht die  $\epsilon$ -Untereinheit (Wilkins & Capaldi, 1998b), welche sich wahrscheinlich zwischen  $(\alpha\beta)_3$  und dem F<sub>O</sub>-Teil befindet (Lötscher *et al.*, 1984; Dallmann *et al.*, 1992; Aggeler *et al.*, 1995). Der direkt an F<sub>O</sub> angrenzende Aminoterminus besteht aus einem zehnrängigen  $\beta$ -Faß bzw. Sandwich, während das carboxyterminale Ende als haarnadelförmige Doppelhelix erscheint und wahrscheinlich mit  $\alpha$  und  $\beta$  in Wechselwirkung steht. Die  $\delta$ -Untereinheit der MF<sub>1</sub> aus Hefezellen, die der  $\epsilon$ -Untereinheit aus

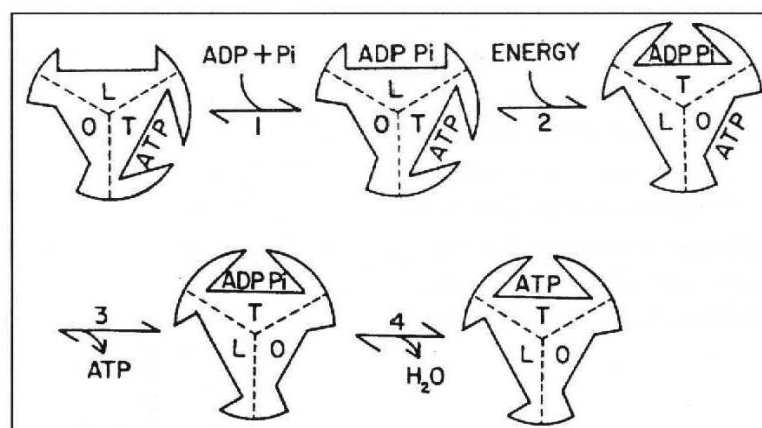
EF<sub>1</sub> entspricht, bildet mit der  $\gamma$ -Untereinheit eine fuß-ähnliche Struktur am unteren Ende der F<sub>1</sub> (siehe Abb. 1.3), den sogenannten „Stiel“ oder „stalk“.



**Abbildung 1.3:** Kristallstrukturmodell des F<sub>1</sub>c<sub>10</sub>-Komplexes (Stock *et al.*, 1999): Seitenansicht

### 1.1.2 Der katalytische Mechanismus der F<sub>1</sub>-ATPase

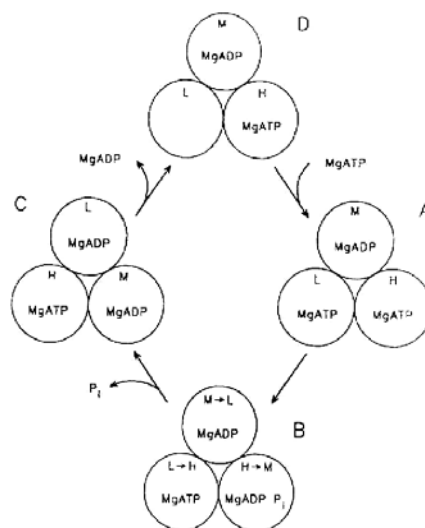
Bereits 1973 schlug P. Boyer (Boyer *et al.*, 1973) einen katalytischen Mechanismus für die F<sub>1</sub>-ATPase vor. Der sogenannte „binding-change“-Mechanismus erklärt das Zusammenspiel von zwei Bindungsstellen und wurde 1981 auf drei sequentiell arbeitende Bindungsstellen pro F<sub>1</sub> erweitert (Cross, 1981). Diesem Modell zufolge sind die drei katalytischen Bindungsstellen zwar prinzipiell gleich, allerdings zu keinem Zeitpunkt funktionell und strukturell äquivalent.



**Abbildung 1.4:** Der *binding-change*-Mechanismus (Boyer, 1993)

Nach dem erweiterten *binding-change*-Mechanismus liegt zu jedem Zeitpunkt der Katalyse eine der katalytischen Bindungsstellen in der offenen, unbesetzten Form (O; „open“) vor und hat eine niedrige Substrataffinität. Eine zweite liegt in der L-Form („loose“) vor, welche die Substrate locker bindet, aber katalytisch inaktiv ist. Die dritte Bindungsstelle liegt in der T-Form vor, welche ADP und  $P_i$  fest („tight“) bindet. Befindet sich ATP in einem T-Zentrum und binden ADP und  $P_i$  an ein L-Zentrum (1) (siehe Abb. 1.4), so bewirkt die Energie aus dem Protonengradienten eine Umwandlung der Zentren (2), wodurch ATP aus dem neuen O-Zentrum (ehemals T) freigesetzt (3) bzw. ATP am neuen T-Zentrum (vorher L) aus ADP und  $P_i$  gebildet wird (4). Beim vorliegenden Modell geht man davon aus, dass die Konformationsänderung der Bindungsstellen durch Rotation einer asymmetrischen Gruppe von Untereinheiten relativ zum Enzymrest verursacht wird (Cross, 1981). Die Prozesse der Bindung von ADP und  $P_i$ , der ATP-Bildung und dessen Freisetzung finden an den drei Bindungsstellen gleichzeitig statt, wobei die ATP-Synthese aus ADP und  $P_i$  spontan, d.h. ohne Energiezufuhr abläuft. Die Energie aus dem Protonengradienten, und das ist der wesentliche Punkt des postulierten Modells, wird lediglich zur Freisetzung des ATP aus der Bindungsstelle benötigt.

Wie schon erwähnt, ist die  $F_1$ -ATPase bei Abtrennung von  $F_0$  nur noch zur ATP-Hydrolyse, welche reversibel zur ATP-Synthese sein soll (Murataliev & Boyer, 1994), fähig, da die notwendige Energie aus dem Protonengradienten fehlt. Für die  $Mg^{2+}$ -abhängige Hydrolyse postulierten Weber & Senior einen Mechanismus, der sich in entscheidenden Punkten von Boyers Modell unterscheidet (Weber & Senior, 1997).



**Abbildung 1.5:** Katalytischer Zyklus der ATP-Hydrolyse nach Weber *et al.* (1996). H, M und L (High, Intermediate und Low) entsprechen T, L und O im Boyer-Modell.

In dem Modell von Weber und Senior müssen alle drei katalytischen Bindungsstellen bei der  $F_1$  mit ATP besetzt sein, um eine „steady-state“-Katalyse im Zustand maximaler Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Hierbei stellt die MgADP-Freisetzung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (siehe Abb. 1.5 C nach D), woraus folgt, dass die Substratbindung und die Produktfreisetzung an den verschiedenen Nukleotidbindungsstellen nicht gleichzeitig ablaufen.

### 1.1.3 Der $F_0$ -Teil der $F_0F_1$ -ATPase

Der membrangebundene  $F_0$ -Teil der  $F_0F_1$ -ATPase aus *E. coli* besteht aus drei Untereinheiten der Zusammensetzung  $ab_2c_{9-12}$ . Man geht, davon aus, dass die Untereinheiten a und c am Protonentransport durch die Membran beteiligt sind (Junge *et al.*, 1997), während b zusammen mit der  $\delta$ -Untereinheit eine weitere Verbindung zwischen  $F_0$  und  $F_1$  bilden, den sogenannten „zweiten Stiel“ oder „second stalk“.

#### 1.1.3.1 Die Untereinheiten a und c

Die a-Untereinheit des  $F_0$ -Teils der ATP-Synthase, die aus mindestens fünf transmembranen  $\alpha$ -Helices besteht (Fillingame *et al.*, 1998), wechselwirkt sowohl mit b (Aris & Simoni, 1983; Hermolin *et al.*, 1983), als auch mit c. Die Bildung eines  $(ac_{9-12})$ -Komplex, der fähig ist, Protonen durch die Membran zu transportieren (Schneider & Altendorf, 1984 & 1985), wird auf eine Wechselwirkung zwischen einer  $\alpha$ -Helix von a und einer  $\alpha$ -Helix von c zurückgeführt (Jiang & Fillingame, 1998).

Die c-Untereinheit ist ein kleines hydrophobes Protein bestehend aus zwei  $\alpha$ -Helices, die durch einen kurzen polaren „Loop“ auf der Cytoplasmaseite verbunden sind (Girvin *et al.*, 1998). Die genaue Stöchiometrie der c-Untereinheiten ist noch nicht bekannt. Man geht davon aus, dass 9-12 c-Untereinheiten vorliegen, die vermutlich in Form eines Ringes angeordnet sind (Fillingame *et al.*, 1998).

### 1.1.3.2 Der „second stalk“ bzw. die $b_2$ -Untereinheit

Wie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Wilkins und Capaldi, 1998 a und b) belegt, erfolgt die Bindung von  $F_0$  an  $F_1$  über zwei Stiele. Während der erste Stiel, der wahrscheinlich von den Untereinheiten  $\gamma$  und  $\epsilon$  gebildet wird, zentral in der  $F_1$  sitzt, befindet sich der zweite Stiel („second stalk“) an der Außenseite des  $F_0F_1$ -Komplexes und wird durch die Untereinheiten  $b$  und  $\delta$  gebildet, worauf Crosslink-Experimente und Untersuchungen mit Fluoreszenz-Labeln hindeuten (Ogilvie *et al.*, 1997; Rodgers *et al.*, 1997; Rodgers & Capaldi, 1998; Engelbrecht *et al.*, 1998).

Bzgl. der Funktion der  $b_2$ -Untereinheit gibt es bisher nur sehr wenige Erkenntnisse. Eine Antwort dazu liefert womöglich die ungewöhnliche Stöchiometrie der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase, d.h. während einer kompletten  $360^\circ$ -Drehung von  $\gamma$  wird in jeder der drei  $\beta$ -Untereinheiten ein ATP gebildet und dann freigesetzt. Gleichzeitig transportiert jede der 9 - 12  $c$ -Untereinheiten ein Proton durch die Membran. Dies ergibt ein Verhältnis von 4 transportierten Protonen zu je einem gebildeten ATP (Cross & Taiz, 1990; Van Walraven *et al.*, 1996; Jones & Fillingame, 1998). Eine mögliche Erklärung wie diese beiden Prozesse miteinander gekoppelt sein könnten bieten für den Fall eines  $c_{12}$ -Ringes ein Modell, wonach die Energie von drei  $30^\circ$ -Drehungen des  $c_{12}$ -Ringes (relativ zu  $a$ ) als elastische Energie im  $b_2\delta$ -Stator gespeichert wird (Cherepanov *et al.*, 1999). Während des Transportes des vierten Protons erfolgt in diesem Modell die Freisetzung der Energie aus dem  $b_2\delta$ -Komplex und  $\gamma$  dreht sich in einem Schritt um  $120^\circ$ .

Einem anderen Modell zufolge verläuft die Drehung von  $\gamma$  nicht in einem Schritt um  $120^\circ$ , sondern in vier Schritten um je  $30^\circ$  synchron zur Drehung einer  $c$ -Untereinheit (Cross, 2000). Hierbei entfällt dann die Speicherung von Energie im  $b_2\delta$ -Komplex.

Um zu verstehen welches Modell eher der Realität entspricht bzw. um den Mechanismus von Protonentranslokation und ATP-Synthese zu verstehen, ist es unerlässlich die genaue Struktur von  $b$  aufzuklären. Bisher bekannt ist, dass die  $b$ -Untereinheit, die in der Regel als  $b_2$ -Dimer auftritt (Aris & Simoni, 1983; Hermolin *et al.*, 1983), aus 156 Aminosäuren besteht, wovon 33 hydrophobe Aminosäuren am Aminoterminal in die Membran eingebettet sind. Die Struktur des transmembranen Teils konnte hierbei durch NMR-spektroskopische Untersuchungen aufgeklärt werden (Dmitriev *et al.*, 1999). Die restlichen, zumeist hydrophilen Aminosäuren befinden sich außerhalb der Membran und bilden zu 80 % eine  $\alpha$ -Helix und zu 14 % eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aus, was durch CD-spektroskopische

Untersuchungen festgestellt werden konnte (Greie *et al.*, 2000). Dass es sich bei b um kein starres, sondern um ein sehr flexibles Protein handelt, konnte durch Insertions- bzw. Deletionsexperimente gezeigt werden (Sorgen *et al.*, 1998b und Sorgen *et al.*, 1999). Selbst nach der Insertion von bis zu 14 bzw. nach Deletion von bis zu 11 Aminosäuren in b war es immer noch möglich aktive F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> zu isolieren.

Bereits 1997 gelang es gentechnisch eine verkürzte, wasserlösliche Variante der b<sub>2</sub>-Untereinheit herzustellen. Das für b-codierende Gen wurde durch 8 aneinandergelagerte Oligonukleotide aufgebaut und in die Multicloningsite (MCS) des Plasmides pUC8 eingefügt (McLachlin & Dunn, 1997). Zur Steigerung der Wasserlöslichkeit des so exprimierten Proteins b<sub>syn</sub> (oder b<sub>24-156</sub>) wurde der membrangebundene Teil von b (Position 1 - 23) durch eine MTMITNSH-Sequenz ersetzt. Die natürliche Aminosäuresequenz von b startet dann mit der Position bY24.

Alle Versuche b<sub>syn</sub> bzw. andere verkürzte Formen von b als Dimer zu kristallisieren schlugen bislang fehl, es war nur möglich Kristalle des Monomers der Dimerisierungsdomäne von b (Aminosäurenreste 62 bis 122) zu züchten und kristallographisch zu untersuchen (Del Rizzo *et al.*, 2000). Aus diesen Untersuchungen und durch Betrachtungen der Primärstruktur der b-Untereinheit erstellte die Gruppe um Dunn ein Modell, wonach die Dimerisierungsdomäne als rechtshändiges coiled-Coil vorliegen soll (Del Rizzo *et al.*, 2002). Um ein rechtshändiges coiled-Coil, eine Struktur, die bisher noch nie bei einem Dimer beobachtet wurde, zu bilden muss ein Protein ein sich alle elf Reste wiederholendes Strukturmotiv aufweisen, das an seinen Positionen a und h hydrophobe Aminosäuren besitzt und man undecad nennt. Im Gegensatz dazu weist ein linkshändiges coiled-Coil ein sogenanntes heptad-Motiv auf, bei dem es alle sieben Aminosäuren zur Wiederholung kommt. Die Positionen a und d müssen hier mit hydrophoben Aminosäuren besetzt sein. Wie aus Abb. 1.6 hervorgeht, passt bei der Dimerisierungsdomäne von b das undecad besser als eine heptad-Abfolge, die im mittleren Teil der Sequenz keinerlei Übereinstimmung mit dieser aufweist.

$\text{cdefgabc} \mathbf{cdefgabc} \mathbf{cdefgabc} \mathbf{cdefgabc} \mathbf{cdefgabc} \mathbf{cdefgabc} \mathbf{cdefgabc}$	$\mathbf{abc} \mathbf{defg} \mathbf{abc} \mathbf{defg} \mathbf{abc} \mathbf{defg} \mathbf{abc} \mathbf{defg} \mathbf{abc} \mathbf{defg} \mathbf{abc}$
53 DLDLAKASATDQLKKAKAEAQVIEEQANKRRSQILDEAKAEAEQERTKIWAQAQAEIEAERKRAREELRKQVAILAV 129	
$\text{def} \mathbf{ghij} \mathbf{k} \mathbf{abc} \mathbf{def} \mathbf{ghij} \mathbf{k} \mathbf{abc} \mathbf{def} \mathbf{ghij} \mathbf{k} \mathbf{abc} \mathbf{def} \mathbf{ghij} \mathbf{k} \mathbf{abc} \mathbf{def} \mathbf{ghij} \mathbf{k} \mathbf{abc} \mathbf{def} \mathbf{ghij} \mathbf{k} \mathbf{abc}$	

**Abbildung 1.6:** Sequenz der Dimerisierungsdomäne von b (aus *E. coli*) verglichen mit einer heptad-Aminosäurenabfolge (oben) bzw. einer undecad-Abfolge (unten) eines möglichen linkshändigen bzw. rechtshändigen coiled-Coils. Die Positionen der hydrophoben Aminosäuren a und d in der heptad-Wiederholung bzw. die Positionen der undecad-Abfolge sind fett gedruckt (Del Rizzo *et al.*, 2002).



## 1.2 ESR-Spektroskopie

Erkenntnisse über biologische Makromoleküle zu erhalten erweist sich aufgrund deren Komplexität häufig als recht schwierig. Die meisten zur Verfügung stehende physikalische und chemische Meßmethode kann oft nur Ausschnitte des betrachteten Systems zeigen, weil immer nur eine bestimmte Eigenschaft der Moleküle betrachtet werden kann. Eine dieser besonders nützlichen biophysikalischen Methoden, die Elektronenspinresonanz-(ESR)Spektroskopie, ermöglicht die Messung von paramagnetischen Substanzen, d.h. von Verbindungen, die mindestens ein ungepaartes Elektron in einem ihrer (Atom- oder Molekül-) Orbitale besitzen.

Es gibt in biologischen Systemen Verbindungen, die schon von Natur aus paramagnetische Eigenschaften haben, wie z.B. Metall-Proteinkomplexe mit Übergangsmetallionen wie Cu, Fe bzw. Mn. Besitzt ein Biomolekül selbst keine paramagnetische Eigenschaft, so ist es möglich, stabile organische Radikale, sogenannte Spinsonden oder Spinlabel, einzuführen (z.B. Trommer, 1987). Hierbei können die Spinlabel entweder Teil des Enzymsubstrates sein, wie z.B. spinlabelte Nukleotide (z.B. Vogel *et al.*, 1992), oder kovalent an bestimmte Aminosäure-Seitenketten gebunden werden. Hierfür eignen sich Cystein-Reste besonders gut, da sie im physiologischen pH-Bereich ausreichend chemisch aktiv sind und kaum störende Konkurrenzreaktionen auftreten, da der Spinlabel spezifisch an die SH-Gruppen bindet (Lundblad, 1991).

Zunehmend mehr Bedeutung erlangt in diesem Zusammenhang die sogenannte „Site-Specific-Spin-Labeling“-Methode, bei der durch die gezielte Mutagenese in einem Protein Aminosäuren gegen Cystein ausgetauscht werden, die dann kovalent mit Spinlabeln modifiziert werden können (Feix & Klug, 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik eingesetzt, um Informationen über strukturelle Besonderheiten der  $b_2$ -Untereinheit des  $F_0$ -Teils der ATP-Synthase bzw. über die Wechselwirkung von  $b$  mit der  $F_1$  zu erhalten. Durch die gentechnische Einführung von Cysteinen an unterschiedlichen Positionen von  $b_{syn}$  (McLachlin & Dunn, 1997) bzw. der  $b_2$ -Untereinheit einer komplett cysteinfreien  $F_0F_1$ -Mutante (Kuo *et al.*, 1998) erhielt man zwei Serien von Mutanten, die nach Modifizierung mit Spinlabeln ESR-spektroskopisch untersucht werden konnten.

Mittels der Continuous-Wave-ESR-Spektroskopie können dipolare Wechselwirkungen zwischen zwei proteingebundenen Spinlabeln, die weniger als 20 Å voneinander entfernt sind, beobachtet werden. Die dipolaren Wechselwirkungen, die auf der gegenseitigen Beein-

---

flussung der beiden Spins beruhen, sind umso größer je kleiner der Spin-Spin-Abstand ist. Voraussetzung für die Bestimmung der dipolaren Wechselwirkungen ist die völlige Immobilisierung der Spinlabel, weshalb mit gefrorenen Lösungen gearbeitet wird. Anhand der durch dipolare Wechselwirkungen bewirkten Linienverbreiterungen in ESR-Spektren und Anpassen von simulierten Spektren an die so erhaltenen experimentellen Daten können Spin-Spin-Abstände berechnet werden (z.B. Steinhoff *et al.*, 1997 und Hustedt *et al.*, 1999), die ihrerseits Rückschlüsse auf die Proteinstruktur zulassen.

## 2 Problemstellung

Wie schon erwähnt erfolgt die Bindung von  $F_1$  an  $F_0$  über zwei Stiele. Während man davon ausgeht, dass der erste Stiel (bestehend aus  $\gamma$  und  $\epsilon$ ) direkt an der ATP-Synthese beteiligt ist, so ist die Funktion des zweiten Stiels, der aus den Untereinheiten  $b$  und  $\delta$  besteht, noch recht unklar. Wie in Kap. 1.1.3.2 (S. 8) dargelegt gibt es hierzu zwar einige Modelle, die aber noch experimentell belegt werden müssen.

Ein erster Schritt die Funktion des zweiten Stiels aufzuklären ist das Verständnis der Struktur der als Dimer auftretenden Untereinheit  $b$ . Aus CD-spektroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass  $b$  zu 80 %  $\alpha$ -helikal ist (Greie *et al.*, 2000) und mittels NMR konnte die Struktur des membrangebundenen Teils aufgeklärt werden (Dmitriev *et al.*, 1999). Als Dimer konnte  $b$  bislang noch nicht kristallisiert werden, nur als Monomer im Bereich der Aminosäurepositionen 62 - 122, der Dimerisierungsdomäne von  $b$  (Del Rizzo *et al.*, 2002). Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen führten in Kombination mit Betrachtungen der Primärstruktur von  $b$  zu der Annahme, dass  $b_2$  im Bereich seiner Dimerisierungsdomäne in Form eines rechtshändigen coiled-Coils (RHCC), einer bei einem Dimer noch nie beobachteten Struktur, vorliegt. Ob  $b_2$  tatsächlich solch eine Quartärstruktur ausbildet oder ob ein linkshändiges coiled-Coil (LHCC) vorliegt bzw.  $b$  in Form zweier zueinander paralleler Helices dimerisiert, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Continuous-Wave-ESR-Spektroskopie untersucht werden. Wie aus Kap. 1.2 (S. 10) bekannt, können mittels dieser Technik dipolare Wechselwirkungen zwischen zwei Spins beobachtet werden, falls der Abstand zwischen den beiden weniger als 20 Å beträgt. Da sich die dipolaren Wechselwirkungen in ESR-Spektren durch Linienverbreiterungen bemerkbar machen und die Stärke der Wechselwirkungen vom Abstand zwischen den Spins abhängt, können Spin-Spin-Abstände aus ESR-Spektren mit Hilfe geeigneter Simulationsprogramme bestimmt werden (z.B. Steinhoff *et al.*, 1997 und Hustedt *et al.*, 1999).

Für die Untersuchungen an  $b$  bedeutete dies, dass in einem ausgewählten Bereich entlang der Helix jede natürliche Aminosäure gegen ein Cystein ausgetauscht werden sollte. Auf diese Art wollte man einen ganzen Satz von Mutanten herstellen bei dem jede Mutante ein Cystein an einer anderen Aminosäureposition tragen sollte. Da  $b$  als Dimer vorliegt, sollte es so möglich sein aufgrund der Spin-Spin-Wechselwirkungen an den untersuchten Positionen Abstände zwischen den beiden Monomeren zu bestimmen. Anhand dieser Abstände sollte es möglich

sein zu entscheiden welche der fraglichen Quartärstrukturen  $b_2$  im untersuchten Bereich einnimmt.

Einerseits sollten die Untersuchungen an einer verkürzten, wasserlöslichen Form, die als  $b_{\text{syn}}$  oder  $b_{24-156}$  bezeichnet wird (McLachlin & Dunn, 1997) und andererseits am gesamten  $F_0F_1$ -Komplex erfolgen (Kuo *et al.*, 1998).

Von  $b_{\text{syn}}$  lagen in unserem Arbeitskreis 8 Cysteinmutanten vor, die an den Positionen 103 - 110 die Mutationen enthielten. Um ein umfassenderes Bild zu bekommen sollten weitere Mutanten, welche die Mutationen an den Positionen 101, 102 und 111 - 114 enthielten hergestellt werden. Insgesamt sollte so ein Bereich von 14 Aminosäuren, d.h. von knapp vier Helixumdrehungen (3,6 Aminosäuren pro Umdrehung) untersucht werden. Die Proteine sollten mit verschiedenen Spinlabeln markiert und sowohl in Lösung als auch im gefrorenen Zustand untersucht werden. Da  $b_2$  im Komplex mit  $F_1$  teilweise von Wasser abgeschirmt wird, sollten die b-b-Wechselwirkungen anders sein, als in dem Fall wo  $b_2$  nur von Wasser umgeben ist. Hydrophobe Aminosäuren, die vorher im b-b-Interface orientiert waren könnten sich nun in Richtung von  $F_1$  drehen. Die modifizierten Proteine sollten im Komplex mit  $F_1$  vermessen werden, um so mögliche Strukturänderungen bei der Bindung von  $b_2$  an  $F_1$  zu bestimmen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit sich die Ergebnisse, die bei den Untersuchungen an  $b_{\text{syn}}$  erhalten wurden, mit den Gegebenheiten im gesamten  $F_0F_1$ -ATP-Synthasekomplex decken. Es ist nämlich durchaus möglich, dass es durch die Wechselwirkung von  $b_2$  mit der Untereinheit a bzw. der Membran zu Änderungen in der Packungswechselwirkung der beiden b-Untereinheiten kommt. Es stand dem Arbeitskreis eine komplett cysteinfreie Mutante der  $F_0F_1$  zur Verfügung (Kuo *et al.*, 1998), in die gezielt Cysteine eingeführt und mit Spinlabel modifiziert werden sollte. Die Isolierung der einzelnen  $F_0F_1$ -Mutanten sollte ursprünglich über einen am Protein befindlichen FLAG-Tag erfolgen. Da sich dies als zu kostspielig herausstellte, sollte dazu übergegangen werden den FLAG-Tag gegen einen His-Tag auszutauschen und die Proteine über Nickel-NTA-Agarose zureinigen.

## 3 Eigene Ergebnisse

### 3.1 Die verkürzte, wasserlösliche Form der $b_2$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP-Synthase: $b_{syn}$

Wie schon erwähnt geht man davon aus, dass die  $b$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase als überwiegend elongierte  $\alpha$ -Helix (Greie *et al.*, 2000) in Form eines  $b_2$ -Dimer vorliegt und zusammen mit  $\delta$  neben  $\gamma$  und  $\epsilon$  als zweite Verbindung zwischen  $F_0$  und  $F_1$  fungiert (Dunn, 1992 und Sorgen *et al.*, 1998a). Mittels NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte bisher nur die Struktur des transmembranen Teils von  $b$  geklärt werden (Dmitriev *et al.*, 1999). Kristallographische Untersuchungen waren bislang nur an Kristallen des Monomers der Dimerisierungsdomäne (Aminosäuren 62 - 122) möglich (Del Rizzo *et al.*, 2002), da es noch nicht gelang  $b$  als Dimer zu kristallisieren. Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Untersuchungen und durch Betrachtung der Aminosäuresequenz von  $b$  stellte die Gruppe um Dunn ein Modell auf, wonach  $b_2$  im Bereich der Aminosäurepositionen 62 - 122 als rechtshändiges coiled-Coil (RHCC) vorliegt. Ob  $b_2$  tatsächlich solch eine Quartärstruktur ausbildet oder ob ein linkshändiges coiled-Coil (LHCC) vorliegt bzw. ob  $b$  in Form zweier zueinander paralleler Helices dimerisiert, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht. Mit dieser Technik ist es möglich über dipolare Wechselwirkungen, die auf der gegenseitigen Beeinflussung zweier Spins beruhen, Abstandsinformationen zwischen diesen zu erhalten (siehe Kap. 1.2; S. 10).

Die Untersuchungen wurden an 14 (etwa 4 Windungen einer Helix) Mutanten einer verkürzten, wasserlöslichen Form von  $b$  ( $b_{syn}$  oder auch  $b_{24-156}$ ; McLachlin & Dunn, 1997) durchgeführt. Die natürlichen Aminosäuren im Bereich der Aminosäurepositionen 101 - 114 wurden jeweils gegen ein Cystein pro  $b_{syn}$ -Monomer ausgetauscht, das dann mit verschiedenen Spinlabeln modifiziert werden konnte. Die  $b_{syn}$ -Proteine 103 - 110 wurden unserem Arbeitskreis in Form von Plasmiden von S.D. Dunn zur Verfügung gestellt (Revington *et al.*, 1999). Die Mutationen an den Positionen 101, 102 und 111 - 114 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt. Da jedes  $b$ -Dimer zwei Spinlabel enthielt, konnten so für jede Position Spin-Spin-Abstände bestimmt werden. Anhand dieser sollte es möglich sein zu entscheiden welche der fraglichen Quartärstrukturen  $b_2$  im untersuchten Bereich einnimmt.

### 3.1.1 Einführung von Cysteinen in $b_{syn}$ : Herstellung der Plasmide pTH1 - 6

#### 3.1.1.1 Gezielte Mutagenese

Ausgehend von dem Plasmid pDM3 (McLachlin & Dunn, 1997 / siehe Kap. 5.1.2; S. 71) wurden unter Verwendung der Oligonukleotide 101A/B, 102 A/B und 111A/B-114A/B (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) die entsprechenden, natürlich vorkommenden Aminosäuren gegen je ein Cystein ausgetauscht, was mit Hilfe der Quick-Change™-Methode der Fa. Stratagene (siehe Kap. 5.3.9; S. 91) erfolgte.

Das Plasmid pDM3, das entsprechend Kap. 5.3.2 (S. 87) aus DH5 $\alpha$  isoliert worden war, wurde mit dem entsprechenden Primerpaar einer Polymerasenkettenreaktionen (PCR) unterworfen, woran sich je ein *DpnI*-Verdau bei 37 °C anschloss, was zum Abbau der während der PCR als Vorlage dienenden Ausgangs-DNA diente. Danach wurden die gesamten Ansätze in kompetente DH5 $\alpha$  transformiert (siehe Kap. 5.3.7; S. 90).

In Tabelle 3.1 sind die in  $b_{syn}$  ausgetauschten Aminosäuren bzw. der Ort der Mutation, die hierzu benutzten Primer und die Bezeichnungen der so erzeugten Plasmide zusammengestellt.

Position der Mutation in $b_{syn}$	Verwendete Primer	Plasmidbezeichnung
I101C	101 A und 101 B	pTH1'
V102C	102 A und 102 B	pTH2'
A111C	111 A und 111 B	pTH3'
E112C	112 A und 112 B	pTH4'
R113C	113 A und 113 B	pTH5'
K114C	114 A und 114 B	pTH6'

**Tabelle 3.1:** Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten Cystein-Mutanten von  $b_{syn}$  und der zu ihrer Herstellung verwendeten Primer (siehe Kap. 5.1.3; S. 74). Die nach der PCR gewonnenen Plasmide wurden mit einem ' markiert, was ihrer Unterscheidung von den Expressionsplasmiden diente, deren Herstellung in Kap. 3.1.1.2 (S. 16) beschrieben ist.

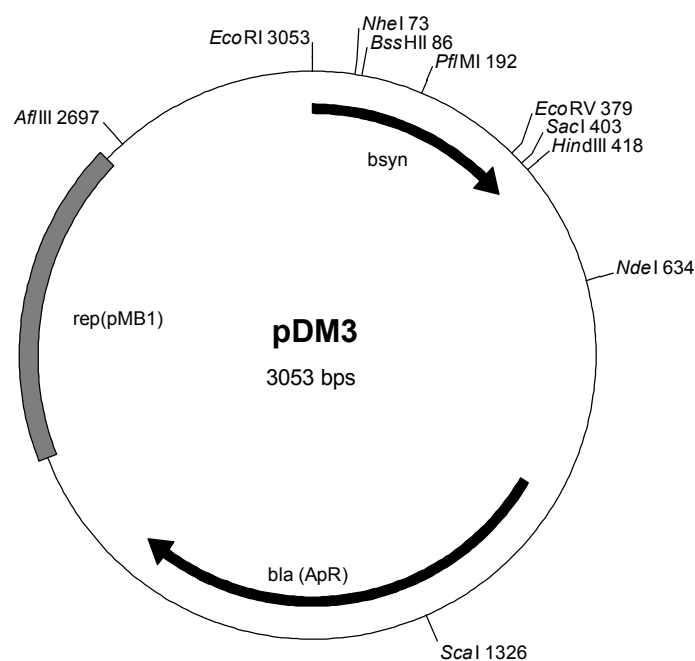
In obigen Tabelle ist zu beachten, dass es sich bei den dort aufgeführten Plasmiden nicht um die zur Proteinexpression verwendeten Plasmide handelt, sondern um diejenigen, die nach der gezielten Mutagenese erhalten wurden. Diese sind mit einem ' gekennzeichnet, um sie von

den Expressionsplasmiden zu unterscheiden. Die Herstellung der Expressionsplasmide erfolgte durch Umklonierung der mutierten Bereiche aus pTH1' - 6' in den Vektor von pDM3 und ist in Kap. 3.1.1.2 (S. 16) beschrieben.

### 3.1.1.2 Umklonierung der mutierten Regionen in pDM3

Jedes der in Kap. 3.1.1.1 (S. 15) beschriebenen neuen Plasmide wurde, bevor es zur Proteinexpression verwendet wurde, einer DNA-Sequenzierung unterzogen. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die gewünschte Mutation eingefügt war bzw. keine ungewollte sonstige Mutation vorhanden war.

Zur Sequenzierung wurden pUC-Standardprimer verwendet, da die Herstellung von pDM3 in der Art erfolgte, dass das für  $b_{syn}$ -codierende Gen durch 8 aneinandergelagerte Oligonukleotide aufgebaut wurde, die Stück für Stück in die Multicloning site (MCS) des Plasmides pUC8 zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* eingesetzt wurden (McLachlin & Dunn, 1997). Bei den pUC-Standardprimern handelt es sich um Oligonukleotide, die derart an einen pUC-Vektor anlagern, dass eine Sequenzierung der MCS bzw. darin einklonierter Gene ermöglicht wird.



**Abbildung 3.1:** Restriktionskarte des Plasmids pDM3 (McLachlin & Dunn, 1997), das für das cysteinfreie  $b_{syn}$  kodiert und als Matrice bei der Herstellung der Cysteinmutanten von  $b_{syn}$  diente.

Um nun den zu sequenzierenden Bereich aus Kostengründen möglichst klein zu halten, wurden die mutierten Bereiche aus den Plasmiden pTH1' - 3', 5' und 6' durch die Enzyme *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten und gegen die ursprüngliche Sequenz im Ausgangsplasmid substituiert. Im Falle von pTH4' war dies allerdings nicht möglich, da durch die durchgeführte Mutagenese eine zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle generiert wurde. Deshalb erfolgte hier ein Doppelverdau mit *EcoRI* und *SacI*.

Bei dem Verdau von pDM3 bzw. pTH1' - 3', 5' und 6' mit *EcoRI* und *HindIII* erhielt man je zwei Fragmente in der Größe von 418 bp bzw. 2635 bp.

Der Verdau von pDM3 und pTH4' mit *EcoRI* und *SacI* lieferte je zwei Fragmente von 407 bp und 2646 bp.

Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kap. 5.3.4; S. 87) und mit Hilfe des QIAEX<sup>®</sup>II Gel Extraction Kits der Fa. QIAGEN aus dem Agarosegel isoliert (siehe Kap. 5.3.5; S. 89).

Alle Ligationen der 2635-bp- bzw. 2646-bp-Fragmente von pDM3 mit den jeweiligen 418 bp großen Fragmenten von pTH1' - 3', 5' und 6' bzw. des 407 bp großen Fragments von pTH4' erfolgten unter Verwendung einer *T4*-DNA-Ligase für 5 Stunden bei 37 °C oder für 16 - 18 Stunden bei 16 °C. Nach thermischer Deaktivierung der Ligase erfolgte die Transformation aller Ansätze in kompetente DH5 $\alpha$ . Hieraus wurden die Plasmide pTH1 - 6 wieder isoliert und von der Firma MWG-BIOTECH (München, Deutschland) zur Bestätigung der Richtigkeit ihrer Sequenzen unter Verwendung von pUC-Standardprimern sequenziert.

### 3.1.2 Expression, Isolierung und Modifizierung der b<sub>syn</sub>-Mutanten

Die Expression der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten b<sub>syn</sub>-Mutanten erfolgte in Zellen des *E. coli* Stammes JM109 (siehe Kap. 5.1.1; S. 71), wobei die Bakterienaufzucht in 2YT-Medium erfolgte (siehe Kap. 5.2.1; S. 81 und 5.1.1.1).

Die Isolierung der Proteine (siehe Kap. 5.5.1.2; S. 104) wurde nach einer Vorschrift von McLachlin & Dunn (1997) durchgeführt und lieferte 5 - 16 mg reines Protein pro Liter Wachstumsmedium. Die für die ESR-spektroskopischen Untersuchungen notwendigen Modifizierungen der Mutanten mit IAAT- oder MTS-Spinlabeln erfolgte wie in Kap. 5.5.1.3 (S. 105) beschrieben. Gelagert wurden die isolierten oder mit Spinlabel modifizierten Proteine bei -80 °C.



In Tabelle 3.2 sind die unterschiedlichen  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten mit ihren zur Expression notwendigen Plasmiden zusammengestellt.

Protein	Plasmid	Literatur
$b_{\text{syn}}\text{I101C}$	pTH1	diese Arbeit
$b_{\text{syn}}\text{V102C}$	pTH2	diese Arbeit
$b_{\text{syn}}\text{A103C}$	pDM52	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{Q104C}$	pDM53	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{A105C}$	pDM54	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{Q106C}$	pDM55	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{A107C}$	pDM56	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{E108C}$	pDM57	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{I109C}$	pAC1	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{E110C}$	pAC2	Revington <i>et al.</i> , 1999
$b_{\text{syn}}\text{A111C}$	pTH3	diese Arbeit
$b_{\text{syn}}\text{E112C}$	pTH4	diese Arbeit
$b_{\text{syn}}\text{R113C}$	pTH5	diese Arbeit
$b_{\text{syn}}\text{K114C}$	pTH6	diese Arbeit

**Tabelle 3.2:** Überblick über die zur Expression der unterschiedlichen  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten verwendeten Plasmide.

### 3.1.3 Expression und Isolierung der $F_1$ -ATPase aus *Escherichia coli*

Die Wildtyp- $F_1$ -ATPase wurde in dem Stamm SWM1 (siehe Kap. 5.1.1; S. 71) exprimiert und nach einer modifizierten Vorschrift von Wise (1990) isoliert. Das für die Bakterienaufzucht verwendete Medium ist in Kap. 5.2.1 (S. 81) bzw. Kap. 5.5.2 (S. 106) beschrieben. Im Unterschied zur Originalvorschrift wurde nach Aufschluss der Zellen mittels EmulsiFlex kürzer zentrifugiert, um eine leichtere Resuspension der Membran-Pellets zu gewährleisten (siehe Kap. 5.5.2.2; S. 107 und 5.5.2.3.1; S. 108).

Aus 1 l Medium gelang es nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung eine mittlere Ausbeute von 2 - 3 mg  $F_1$  mit einer spezifischen Aktivität von 10 - 15 U / mg (siehe Kap. 5.6.2; S. 111) zu erhalten.

### 3.1.4 Strukturelle Untersuchungen von $b_{syn}$

Es wurden zur Untersuchung struktureller Gegebenheiten der  $b_2$ -Untereinheit bzw. Strukturänderungen bei der Bindung von  $b_{syn}$  an  $F_1$  (Beginn von Kap. 3.1; S. 14) ESR-Spektren der  $b_{syn}$ -Mutanten 101 - 114, die entweder mit 4-(3-Iodoacetamido)-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl (IAAT) oder mit 1-Oxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methanthiosulfonat (MTS) spinmarkiert waren, aufgenommen. Die Spinmarkierung erfolgte hierbei durch Reaktion der Spinlabel mit den im Protein befindlichen Cysteinen (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.3) und wurde analog Kap. 5.5.1.3 (S. 105) durchgeführt.

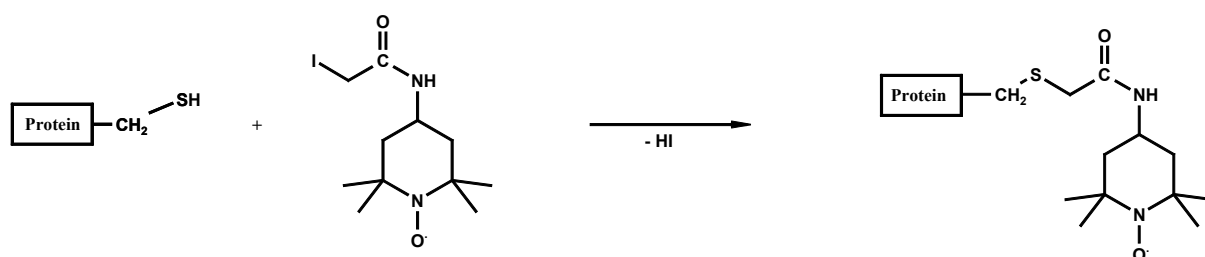


Abbildung 3.2: Reaktion von IAAT mit der SH-Gruppe eines Cysteins

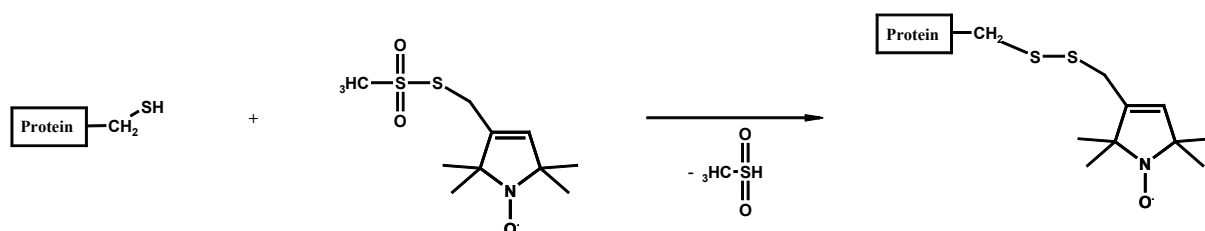


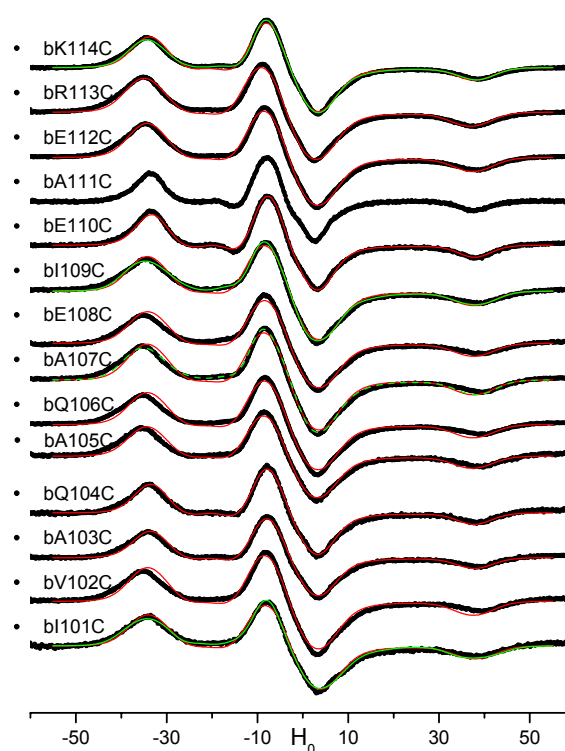
Abbildung 3.3: Reaktion von MTS mit der SH-Gruppe eines Cysteins

#### 3.1.4.1 Bestimmung von Spin-Spin-Abständen

Zur Bestimmung der dipolaren Wechselwirkungen zwischen den proteingebundenen Spinlabeln, wurden die 14 mit IAAT modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten bei 193 K ESR-spektroskopisch vermessen.

Dipolare Wechselwirkungen bewirken in ESR-Spektren eine Linienverbreiterung, aus der durch Anpassen simulierter Spektren an experimentelle Daten Abstandsinformationen gewonnen werden können. In Zusammenarbeit mit Eric Hustedt von der Vanderbilt

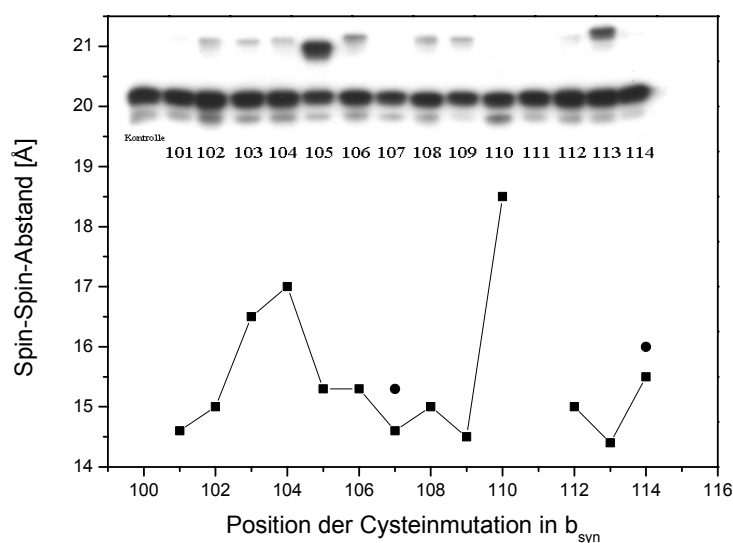
University (Nashville, Tennessee, USA) wurden unsere bei 193 K auf einem Bruker EMX EPR Spektrometer aufgenommenen Spektren der mit IAAT modifizierten  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten 101 - 114 simuliert. Die Simulationsmethode berücksichtigt ausgehend vom Hamiltonoperator die unterschiedlichen Verteilungen und Orientierungen der Label und benötigt als Ausgangspunkt ein wechselwirkungsfreies Spektrum (Hustedt *et al.*, 1999). Im vorliegenden Fall wurde die Mutante mit der geringsten Linienbreite ( $b_{\text{syn}}\text{A111C}$ ), d.h. mit den schwächsten dipolaren Wechselwirkungen und somit dem größten Spin-Spin-Abstand als Ausgangspunkt verwendet. In Abb. 3.4 sind alle gemessenen und simulierten Spektren aufgeführt.



**Abbildung 3.4:** ESR-Spektren der mit IAAT modifizierten  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten 101 - 114, die bei 193 K aufgenommen (siehe Kap. 5.6.6.1; S. 118) und von Eric Hustedt (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA) simuliert wurden. In schwarz sind die gemessenen Spektren und in rot bzw. grün sind die simulierten Spektren dargestellt. Die Proben lagen in Konzentrationen von 45 - 300  $\mu\text{M}$  (bezogen auf  $b_2$ ) in TMK-Puffer vor (siehe Kap. 5.5.1.3; S. 105). Die Messungen erfolgten an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,8 GHz; Mikrowellenleistung 0,63 mW; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 1G; Konversionszeit 41 ms; Receiver Gain 75 dB; Spektrenbreite 120 G; Zeitkonstante 10 ms; Zentralfeld 3475 G.

Um die Simulationsergebnisse zu untermauern wurden die 14  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken untersucht. Hierzu wurden die SH-Gruppen der Cysteine eines  $b$ -Dimers in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  miteinander zur Reaktion gebracht

(McLachlin & Dunn, 1997). Um unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden, enthielten die Reaktionsansätze 10 mM freies Cystein. Da die Ausbeute an Crosslinks abhängig von der Nähe und Orientierung der Cysteine zueinander ist, sind so Rückschlüsse auf die Proteinstruktur möglich. Die in Zusammenarbeit mit Stan Dunn von der University of Western Ontario (London, Ontario, Kanada) erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3.5 vergleichend zu den durch Spektrensimulation erhaltenen Spin-Spin-Abständen dargestellt.



**Abbildung 3.5:** Vergleich der Ergebnisse aus den Crosslink-Untersuchungen der verschiedenen  $b_{syn}$ -Mutanten, die in Gegenwart von 10  $\mu$ M  $\text{CuCl}_2$  und 10 mM freiem Cystein durchgeführt wurden, mit den simulierten Interspinabständen. Die Proteine wurden hierbei durch MAb10-6D1-Antikörper (Geschenk von Karlheinz Altendorf (Universität Osnabrück, Osnabrück, Deutschland) an Stan Dunn) sichtbar gemacht. Die Punkte stammen aus wiederholt durchgeführten Simulationen, da die jeweils ersten Fits nicht zufriedenstellend waren.

Die aus den Crosslink-Studien erhaltenen Ergebnisse korrelieren in weiten Teilen mit den simulierten Interspinabständen. So zeigten die Mutanten A105C und R113C sehr starke Crosslinks, die mit ihren Spin-Spin-Abständen von 14,4 Å bzw. 15,3 Å korrelieren. Andererseits zeigten die Mutanten E110C und I111C, welche die größten simulierten Interspinabstände aufwiesen ( $> 18,5$  Å), keinerlei Crosslinks, was als Hinweis auf einen großen Cystein-Cystein-Abstand verstanden werden kann. Die Mutanten mit den Mutationen an den Positionen 102, 103, 104, 106, 108 und 109, deren durch Simulation ermittelte Abstände 14,6 Å - 17 Å betragen, zeigten mittelstarke Crosslinks. Die Positionen 101, 107, 112 und 114 bildeten Ausnahmen. Hier wurden keinerlei Kreuzreaktionen zwischen den b-Monomeren festgestellt, obwohl Abstände von 14,6 Å (101), 14,6 Å bzw. 15,3 Å (107), 15,0

Å (112) und 15,3 Å bzw. 16,0 Å (114) erhalten wurden. Allerdings fielen die Fits bei 107 und 114 nicht sehr zufriedenstellend aus, weshalb die in diesen Fällen erhaltenen Werte wohl nicht sehr aussagekräftig sein dürften.

In Tabelle 3.3 sind die bei den in Abb. 3.4 gezeigten Simulationen erhaltenen Spin-Spin-Abstände und die Neigungen der einzelnen Mutanten zur Bildung von Disulfidbindungen, wie sie durch die Crosslink-Experimente aus Abb. 3.5 (oben) erhalten wurden, aufgeführt. Ein - bedeutet keine und ++++ eine sehr starke Tendenz zur Ausbildung von Disulfidbrücken.

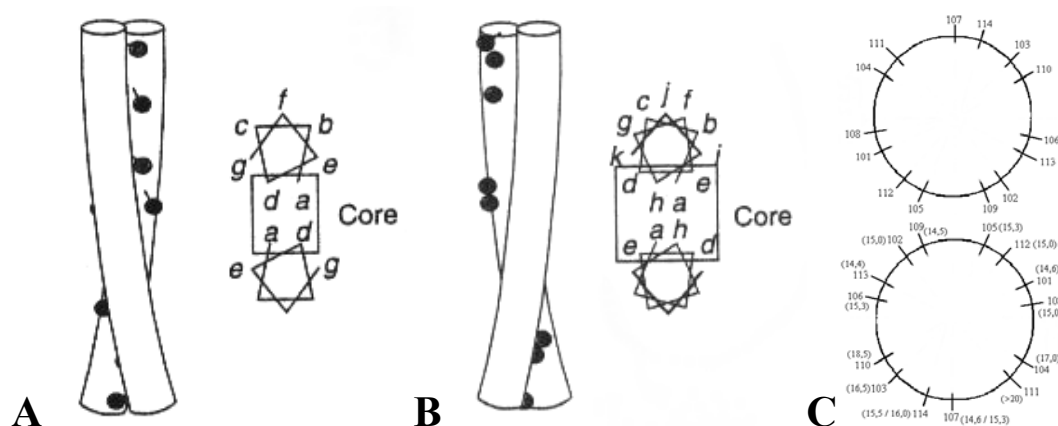
Position der Mutation in $b_{syn}$	Simulierte Spin-Spin-Abstände [Å]	Disulfidbildung	Mögliche Heptad position (LHCC)	Mögliche Undecad position (RHCC)	$b_2$ als zwei zueinander parallele Helices
101	14,6	-	g (mittel)	h (nah)	(nah / mittel)
102	15,0	+	a (nah)	i (mittel)	(nah)
103	16,5	+	b (weit)	j (weit)	(weit)
104	17,0	+	c (weit)	k (mittel)	(weit)
105	15,3	++++	d (nah)	a (nah)	(nah)
106	15,3	+	e (mittel)	b (weit)	(mittel)
107	14,6 / 15,3 *)	-	f (weit)	c (weit)	(weit)
108	15,0	+	g (mittel)	d (mittel)	(mittel)
109	14,5	+	a (nah)	e (mittel)	(nah)
110	18,5	-	b (weit)	f (weit)	(weit)
111	> 20	-	c (weit)	g (weit)	(weit)
112	15,0	-	d (nah)	h (nah)	(nah)
113	14,4	+++	e (mittel)	i (mittel)	(nah / mittel)
114	15,5 / 16,0 *)	-	f (weit)	j (weit)	(weit)

**Tabelle 3.3:** Spin-Spin-Abstände, wie sie durch Simulation der in Abb. 3.4 dargestellten Tieftemperaturspektren erhalten wurden. Dem gegenüber steht die Tendenz der einzelnen Mutanten zur Disulfidbildung, wie sie durch Crosslink-Experimente bestimmt wurde (siehe Abb. 3.5, oben). Ein - bedeutet keine und ++++ eine sehr starke Tendenz zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Es werden den Mutanten eine mögliche heptad-Abfolge, falls  $b_2$  als linkshändiges coiled-Coil vorliegen würde und eine undecad-Folge ( $b_2$  als rechtshändiges coiled-Coil) zugeordnet (Del Rizzo *et al.*, 2002). Für den Fall, dass  $b_2$  als zwei zueinander parallele Helices vorliegt erfolgt ebenfalls eine Zuordnung. In Klammern sind die relativen Abstände, die diese Positionen voneinander einnehmen sollten, angegeben.

\*) Doppelbestimmung, da der erste Fit nicht zufriedenstellend war.

Wie in Kap. 1.1.3.2 (S. 8) erwähnt, erstellte die Gruppe um Dunn ein Modell (Del Rizzo *et al.*, 2002), wonach b im Bereich seiner Dimerisierungsregion die Struktur eines

rechtshändigen coiled-Coils (RHCC) einnehmen soll. Ein Vergleich der simulierten Spin-Spin-Abstände und der Ergebnisse aus den Crosslink-Experimenten mit einem für ein RHCC typischen undecad Strukturmotiv zeigt keine perfekte Deckungsgleichheit. Diese ist allerdings auch nicht bei einer Gegenüberstellung mit einer für ein linkshändiges coiled-Coil (LHCC) typischen heptad-Abfolge bzw. einem Modell zweier zueinander paralleler Helices erkennbar. Trägt man die simulierten Spin-Spin-Abstände in das Helical Wheel des Modells zweier zueinander paralleler Helices ein (siehe Abb. 3.6C), so kann man zwei Bereiche definieren. Auf der einen Helixseite, welche die b-b-Kontaktstelle darstellt, befinden sich die Aminosäurepositionen 101, 102, 105, 106, 108, 109, 112 und 113, die alle kurze Interspinabstände (14,4 Å - 15,3 Å) aufweisen. Auf der dazu gegenüberliegenden Seite sind die Aminosäurepositionen 103, 104, 110 und 111 lokalisiert, die alle recht große Spin-Spin-Abstände ( $>16,5$  Å) besitzen. Auch die Aminosäuren 107 und 114, deren Spin-Spin-Abstände mit 14,6 Å bzw. 15,3 Å und 15,5 Å bzw. 16,0 Å relativ klein sind (was allerdings auf die nicht zufriedenstellenden Fits zurückzuführen sein dürfte), sind auf dieser Seite positioniert.



**Abbildung 3.6:** A: Struktur und Helical Wheel eines linkshändigen coiled-Coils. Während sich die Positionen der Aminosäuren a und d im Interface bzw. im Helical Core der beiden Helices befinden, liegen die Positionen b, c und f auf der Außenseite der Helices. Die Positionen e und g liegen dazwischen. B: Struktur und Helical Wheel eines rechtshändigen coiled-Coils. Hier liegen die Positionen a und h im Interface bzw. im Helical Core der beiden Helices, und b, c, f, g und j befinden sich auf der Außenseite der Helices. Dazwischen positioniert sind i und k. Die bearbeiteten Abbildungen sind entnommen aus Lupas (1996). C: Helical Wheel zweier zueinander paralleler Helices, die so orientiert sind, dass die Positionen mit den kleinsten Spin-Spin-Abständen im Interface liegt. Angegeben sind die Aminosäurepositionen und in Klammern die Spin-Spin-Abstände an der jeweiligen Position in [Å].

Die Ergebnisse aus den Crosslink-Studien untermauern diese Einteilung, denn an den Positionen 102, 105, 106, 108, 109 und 113 waren zum Teil sehr starke Reaktionen zwischen den b-Monomeren zu erkennen (siehe Abb. 3.5). Nur die Ergebnisse, die bei den Untersuchungen an den Positionen 101 und 112 bzw. an den Positionen 103 und 104 erhalten wurden, fallen etwas aus dem Rahmen. So hätten die Mutanten 101 und 112 nach Abb. 3.6C Crosslinks zeigen müssen, was sie aber nicht taten. Umgekehrt hätte es bei den Mutanten 103 und 104 zu keinen Reaktionen kommen dürfen, was aber der Fall war.

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für das Modell des LHCC. Die Positionen 103, 104, 107, 110, 111 und 114 (b, c und f in Abb. 3.6A; weit nach Tabelle 3.3) befinden sich, wie bei dem Modell der zueinander parallelen Helices, auf der selben Seite. Nach Abb. 3.6A sollte eine Unterscheidung möglich sein zwischen den Positionen a (102 und 109) und d (105 und 112), die nach Tabelle 3.3 nah beisammen sein sollten und den Positionen e (106 und 113) und g (101 und 108), die mittlere Abstände einnehmen sollten. Aufgrund der simulierten Spin-Spin-Abstände und Crosslink-Studien ist diese Unterscheidung allerdings nicht möglich, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Unterschiede zwischen diesen Positionen so klein sind, dass sie mit der angewandten Mess- und Simulationsmethode nicht aufgelöst werden konnten.

Eine ähnliche Einteilung wie bei den beiden vorigen Modellen lässt sich auch bei einem RHCC vollziehen. So befinden sich die Positionen 103, 106, 107, 110, 111 und 114 (b, c, f, g und j in Abb. 3.6B; weit nach Tabelle 3.3) auf der vom b-b-Interface abgewandten Seite, wohingegen die Positionen 101, 105, 108, 109 und 112 in der b-b-Kontaktstelle lokalisiert sind. 102, 104 und 113 sind zwischen den beiden Seiten positioniert. Das Modell eines RHCC passt nicht so gut wie die beiden anderen zu den experimentellen Daten, denn den Positionen 104 wird nach diesem Modell ein mittlerer Abstand und 106 ein weiter Abstand zugeordnet. Aus den Simulationen wissen wir aber, dass an den Positionen 104 mit 17,0 Å ein recht großer und an den Positionen 106 mit 15,3 Å ein eher kleiner bis mittlerer Interspinatstand ermittelt wurde.

Aus den obigen Ergebnisse geht nicht hervor, dass eines der drei betrachteten Strukturmodelle im untersuchten Bereich der Aminosäurepositionen 101 - 114 von b bevorzugt wird. Vielmehr lassen die aufgeführten Daten den Schluss zu, dass b alle drei Strukturen einnehmen kann. Daran ändert auch der Umstand nichts, dass die simulierten Interspinabstände an den Positionen 104 und 106 etwas besser zu einem LHCC bzw. zum Modell zueinander paralleler Helices als zu einem RHCC passen.

Aus Untersuchungen bei der die  $b_2$ -Untereinheit verlängert bzw. verkürzt wurde wissen wir, dass bis zu 14 Aminosäuren eingefügt und bis zu 11 Aminosäuren deletiert werden können und es immer noch möglich ist eine funktionsfähige  $F_0F_1$  zu isolieren (Sorgen *et al.*, 1998b und Sorgen *et al.*, 1999).  $b$  scheint also keine starre, unbewegliche Struktur zu haben, sondern eine sehr flexible, denn sonst wären solche Befunde nicht erklärbar.

Bezogen auf unsere Ergebnisse und die Frage, welche Struktur  $b$  letztlich besitzt, könnte dies bedeuten, dass  $b$  im betrachteten Bereich abwechselnd jeder der drei möglichen Quartärstrukturen einnimmt. Dies wiederum könnte eine Möglichkeit sein während der ATP-Synthese elastische Energie zu speichern bzw. zu übertragen, was schon in Kap. 1.1.3.2 (S. 8) diskutiert wurde. Es ist durchaus denkbar, dass die Speicherung von Energie während der ATP-Synthese durch einen Wechsel von einem LHCC zu einem RHCC (oder umgekehrt) erfolgt. Als Zwischenschritt könnte dabei ein Zustand durchlaufen werden, in dem die beiden Helices parallel zueinander stehen.

Ob dem wirklich so ist bzw. wie dies im Einzelnen funktionieren könnte, lässt sich nur vermuten. Auch ist es nicht möglich aus den vorliegenden Ergebnissen Rückschlüsse auf die Struktur der gesamten  $b_2$ -Untereinheit zu ziehen, da der untersuchte Bereich nur etwa 10 % der Gesamtlänge von  $b$  ausmacht und man aus anderen Untersuchungen weiß, dass  $b$  zu etwa 80 %  $\alpha$ -helikal ist und zu etwa 14 % eine  $\beta$ -Faltblattstruktur einnimmt (Greie *et al.*, 2000). Es ist durchaus denkbar, dass Untersuchung an Aminosäurepositionen, die oberhalb bzw. unterhalb nahe dem betrachteten Bereiche liegen, andere Gegebenheiten zu Tage fördern würden.

#### **3.1.4.2 Strukturelle Änderungen von $b_{syn}$ bei Zugabe von $F_1$**

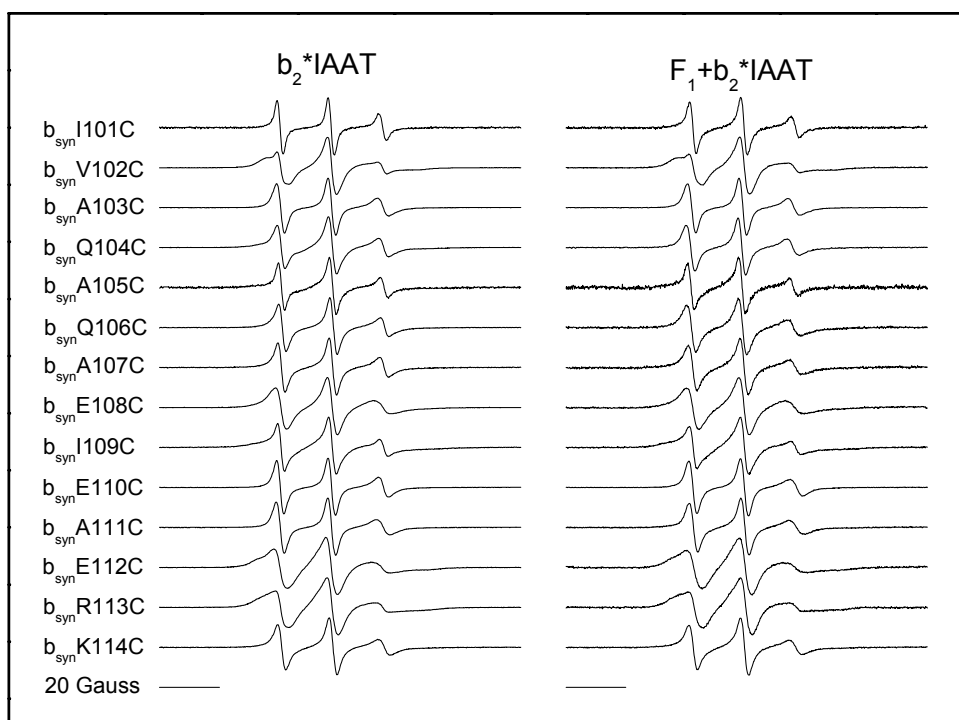
Liegt  $b_2$  alleine in Lösung vor, so ist es komplett von Wasser umgeben, was zu einer Packung der beiden Monomere führen dürfte, bei der sich die hydrophoben Aminosäuren so weit wie möglich in der  $b$ - $b$ -Kontaktfläche befinden, um so den direkten Kontakt mit Wasser zu vermeiden. Bei der Bindung von  $b_2$  an  $F_1$  sollte  $b_2$  zum Teil vom Wasser abgeschirmt werden, was dazu führen kann, dass sich hydrophobe Aminosäuren von  $b_2$  in Richtung von  $F_1$  orientieren können, wodurch es zu einer Strukturänderung in  $b$  kommen kann. Um diese zu untersuchen wurden die 14  $b_{syn}$ -Mutanten erneut mit IAAT modifiziert und mit und ohne  $F_1$  bei 293 K und 193 K gemessen. Da es durchaus möglich ist, dass ein Spinlabel einen bestimmten Einfluss auf ein Protein bzw. auf die Messungen haben kann, wurden die



Mutanten auch mit MTS modifiziert und bei 293 K vermessen. Alle folgenden Messungen wurden auf einem Bruker EMX EPR Spektrometer durchgeführt.

### 3.1.4.2.1 Untersuchungen mit Hilfe von IAAT

Die bei 293 K durchgeführten ESR-Messungen an den Systemen  $b_2$ \*IAAT bzw.  $F_1b_2$ \*IAAT (siehe Abb. 3.7) lieferten untereinander sehr ähnliche Spektren, was Spektrenform und Aufspaltung anbelangt.



**Abbildung 3.7:** ESR-Spektren der einzelnen IAAT-modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten (Cysteinmutationen an den Positionen 101 - 114), die alleine (links) und im Komplex mit  $F_1$  (rechts) bei 293 K vermessen wurden (siehe Kap. 5.6.6.1; S. 118). Die Proben lagen in Konzentrationen von 10 - 300  $\mu$ M (bezogen auf  $b_2$ ) in TMK-Puffer vor (siehe Kap. 5.5.1.3; S. 105). Die Messungen erfolgten an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,7 GHz; Mikrowellenleistung 12,7 mW; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 1G; Konversionszeit 41 ms; Receiver Gain  $6,32 \cdot 10^4$  (ohne  $F_1$ ) bzw.  $5,64 \cdot 10^5 - 1,00 \cdot 10^6$  (mit  $F_1$ ); Spektrenbreite 120 G; Zeitkonstante 10 ms; Zentralfeld 3450 G K.

Bei den Proteinen mit den Mutationen an den Positionen 102, 108, 112 und 113 wurden Mehrkomponentenspektren mit einem mobileren und einem immobilere Anteil erhalten. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass sich die betrachteten Aminosäurepositionen nach allen drei Strukturmodellen in oder in der Nähe der b-b-Kontaktstelle befinden (siehe Kap. 3.1.4.1; S. 19). D.h. die Einschränkung in der Beweglichkeit von IAAT an diesen Positionen könnte durch das jeweils andere b-Monomer erfolgt sein.

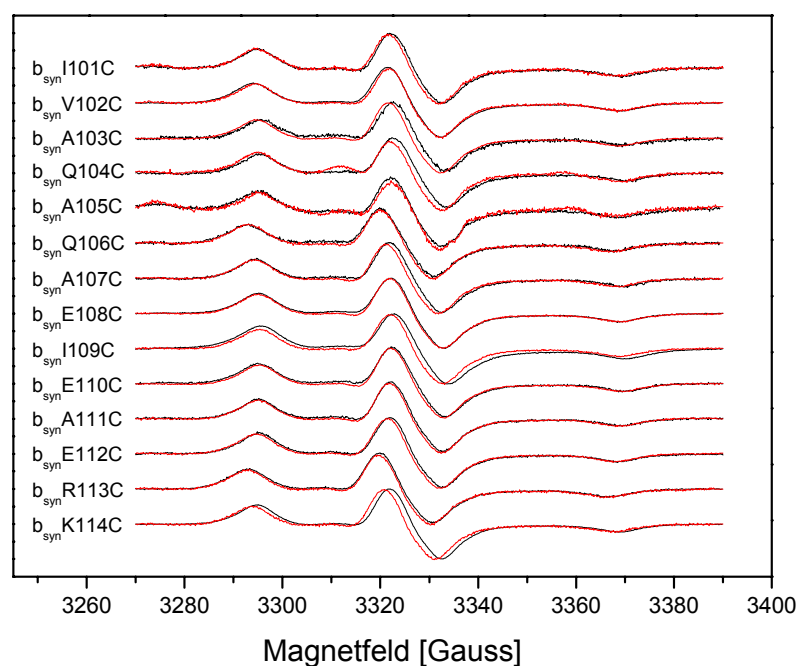
Eine weitere mögliche Erklärung für die immobilen Anteile in den erhaltenen Spektren liefert ein Blick auf die Proteinsequenz. Denn es ist auffällig, dass sich jeweils 3 bzw. 4 Aminosäuren (eine Helixumdrehung) oberhalb bzw. unterhalb der betrachteten Positionen, Aminosäuren befinden, die recht voluminöse Reste aufweisen (R98 und Q106 bei 102; Q104 und E112 bei 108; E108, I109 und R115 bei 112; I109, E110 und R117 bei 113). Es ist denkbar, dass die Beweglichkeit von IAAT durch diese großen Reste eingeschränkt wurde.

Die Zugabe von F<sub>1</sub> hatte bei den untersuchten b<sub>syn</sub>-Mutanten im allgemeinen keinen großen Einfluss. Um diese durch einen rein optischen Vergleich gemachte Aussage zu untermauern wurden die Hochfeld/Mittelfeld-Verhältnisse (H/M-Verhältnis), die ein Maß für die Spinlabelmobilität darstellen, bestimmt (Tabelle 3.4).

Position der Mutation in b <sub>syn</sub>	H/M-Verhältnis b <sub>2</sub> *IAAT	H/M-Verhältnis b <sub>2</sub> *IAAT+F <sub>1</sub>	Differenz H/M b <sub>2</sub> *IAAT - b <sub>2</sub> *IAAT+F <sub>1</sub>
101	0,47	0,35	0,12
102	0,19	0,18	0,01
103	0,31	0,29	0,02
104	0,32	0,30	0,02
105	0,34	0,32	0,02
106	0,35	0,27	0,08
107	0,35	0,26	0,09
108	0,22	0,22	±0,00
109	0,30	0,22	0,08
110	0,34	0,29	0,05
111	0,26	0,25	0,01
112	0,17	0,16	0,01
113	0,16	0,15	0,01
114	0,27	0,26	0,01

**Tabelle 3.4:** Gegenüberstellung der H/M-Verhältnisse der bei 293 K aufgenommen Systeme b<sub>2</sub>\*IAAT und b<sub>2</sub>\*IAAT+F<sub>1</sub>Spektren.

Es zeigte sich, dass die H/M-Verhältnisse bei Zugabe von  $F_1$  bei den meisten Mutanten sich nur um bis zu 0,02 änderten, was als vernachlässigbar angesehen werden kann. Nur bei den Mutanten I101C, Q106C, A107C, I109C und E110C waren die Änderungen etwas größer, was einerseits auf eine Drehung der beiden b-Monomere relativ zueinander zurückzuführen sein könnte. Andererseits könnte der Spinlabel an diesen Stellen aber auch durch direkten Kontakt mit  $F_1$  in seiner Beweglichkeit eingeschränkt worden sein. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass sich die H/M-Verhältnisse bei Bindung von  $b_2$  an  $F_1$  oberhalb der Aminosäure-position 138, d.h. im Bereich des an  $\delta$  bindenden C-terminalen Endes von b, um 0,15 - 0,23 ändern (Motz, 1999). Die im Vergleich dazu kleinen Änderungen in den H/M-Verhältnissen im Bereich von 101 -114 lassen den Schluss zu, dass dieser Bereich weiter von  $F_1$  entfernt ist und somit weniger von ihr beeinflusst wird, als die Region oberhalb der Position 138.



**Abbildung 3.8:** ESR-Spektren der einzelnen IAAT-modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten (Cysteinmutationen an den Positionen 101 - 114), die alleine (schwarze Linien) und im Komplex mit  $F_1$  (rote Linien) bei 193 K vermessen wurden (siehe Kap. 5.6.6.1; S. 118). Die Proben lagen in Konzentrationen von 10 - 300  $\mu$ M (bezogen auf  $b_2$ ) in TMK-Puffer vor (siehe Kap. 5.5.1.3; S. 105). Die Messungen erfolgten an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,7 GHz; Mikrowellenleistung 12,7 mW; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 1G; Konversionszeit 41 ms; Receiver Gain:  $1.59 \cdot 10^5$  -  $2,52 \cdot 10^6$ ; Spektrenbreite 120 G; Zeitkonstante 10 ms; Zentralfeld 3450 G K.

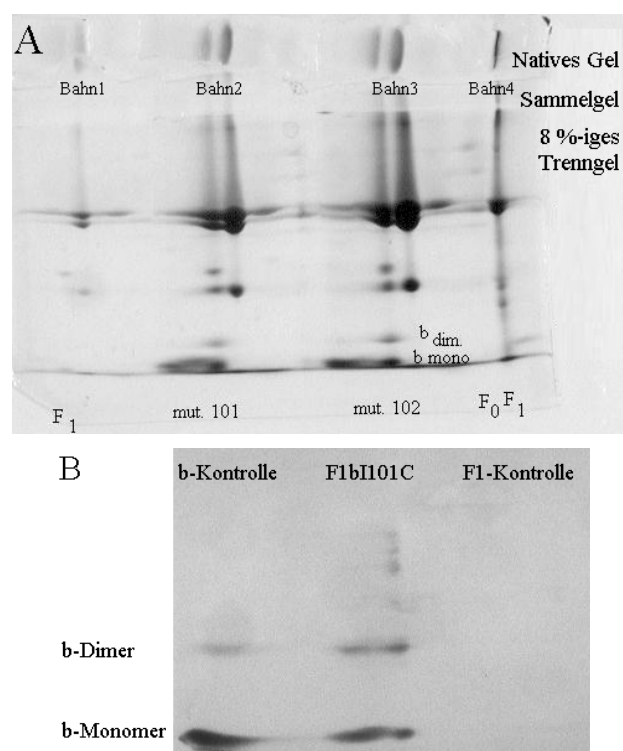
Die gleichen Proben, die bei 293 K gemessen worden waren, wurden nochmals bei 193 K vermessen. Zum besseren Vergleich wurden die Spektren der Systeme  $b_2$ \*IAAT (schwarze Linien) und  $b_2$ \*IAAT+  $F_1$  (rote Linien) in Abb. 3.8 direkt übereinandergelegt.

Im Gegensatz zu Messungen bei Raumtemperatur, wo sich Änderungen in der Beweglichkeit eines Spinlabels erkennen lassen, können bei Tieftemperaturmessungen Unterschiede bei den dipolaren Wechselwirkungen, die mit den Spin-Spin-Abständen korrelieren, bestimmt werden. Bei den in Abb. 3.8 dargestellten Spektren zeigten sich nur kleine bis gar keine Unterschiede, die durch die Zugabe von  $F_1$  hervorgerufen wurden. Dies ist als weiteres starkes Indiz zu werten, dass im Bereich der Aminosäurepositionen 101 - 114 kein oder nur geringer Kontakt zwischen  $b_2$  und  $F_1$  besteht

Da aus den ESR-Spektren nicht ersichtlich war, ob die modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten überhaupt an  $F_1$  binden, wurde mit allen  $F_1b_2$ \*IAAT-Komplexen eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt.

Die erste Dimension bestand aus einem nichtdenaturierenden Gel, worin  $F_1$  und  $b_2$  gemeinsam als Komplex wanderten, sofern Bindung stattgefunden hatte. Die Bande, welche den  $F_1b_2$ \*IAAT-Komplex enthielt, wurde an das Sammelgel eines SDS-Gels, das zur Auftrennung des Gesamtkomplexes diente, angefügt. Abb. 3.9A zeigt als Beispiel die zweidimensionalen Gele der Mutanten  $b_{syn}I101C$  und  $b_{syn}V102C$ , die mit IAAT modifiziert waren und im Komplex mit  $F_1$  vorlagen. Wie aus den Bahnen 2 und 3 hervorgeht, lag bei den untersuchten Proben  $F_1$ -gebundenes  $b_2$  vor, das hier sowohl als Monomer wie auch als Dimer erscheint, was durch Western Blots gezeigt werden konnte. Als Beispiel ist in Abb. 3.9B der Western Blot, der am System  $F_1+b_{syn}I101C$ \*IAAT mit anti-b-Antikörpern durchgeführt wurde, dargestellt.

Die Bindung der anderen Mutanten an  $F_1$  wurde auf die gleiche Weise nachgewiesen.



**Abbildung 3.9:** Nachweis der Bindung von  $b_{syn}$  an  $F_1$  mittels zweidimensionalem Gel (A) und Western Blot (B). Für das zweidimensionale Gel wurden die mit IAAT modifizierten Proben von  $b_{syn}I101C$  und  $b_{syn}V102C$  im Komplex mit  $F_1$  verwendet, nachdem sie ESR-spektroskopisch vermessen wurden (siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Bahn 1:  $F_1$ , Bahn 2:  $b_{syn}I101C*IAAT + F_1$ , Bahn 3:  $b_{syn}V102C*IAAT + F_1$ , Bahn 4:  $F_0F_1$ . Für den Western Blot wurde die mit IAAT modifizierte Probe von  $b_{syn}I101C$  im Komplex mit  $F_1$  nach ESR-spektroskopischer Messung verwendet, wobei der Nachweis von  $b$  mit anti- $b$ -Antikörpern erfolgte. Bahn 1:  $b_2$ ; Bahn 2:  $b_{syn}I101C*IAAT + F_1$ ; Bahn 3:  $F_1$ .

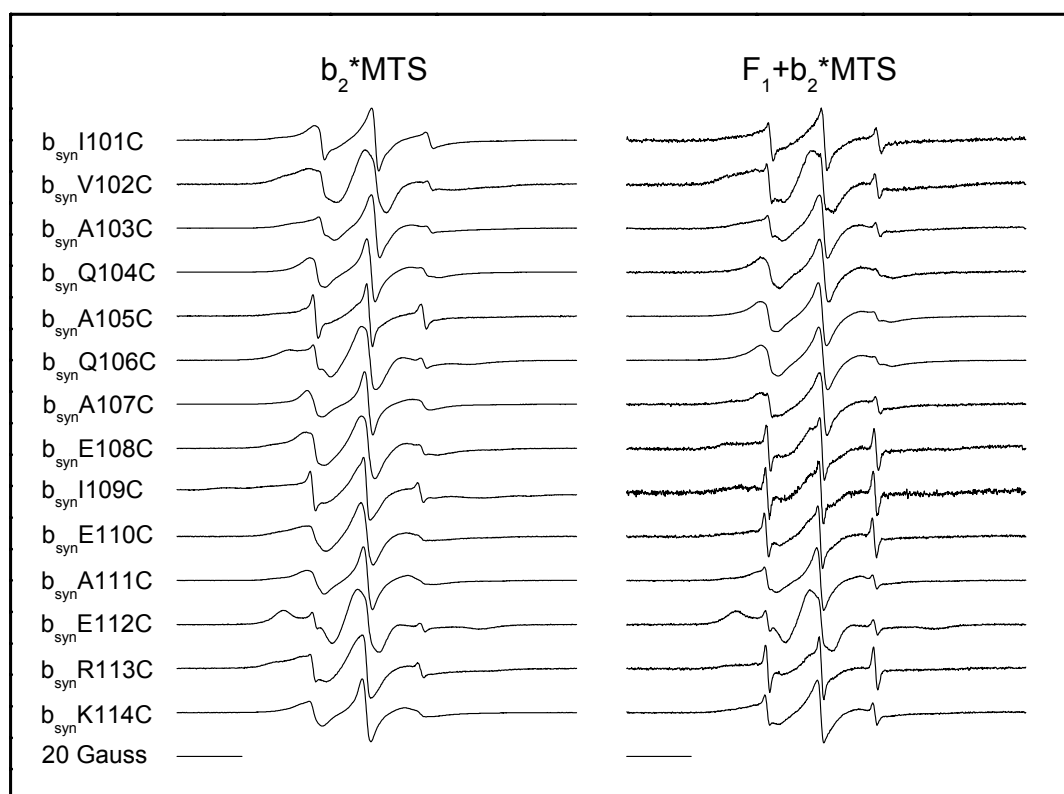
Durch die Bindung der unterschiedlichen mit IAAT modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten an  $F_1$  konnte auch belegt, dass alle untersuchten  $b$ -Proteine in Lösung dimerisierten, denn aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass eine Bindung von  $b$  an  $F_1$  nur dann möglich ist, wenn das  $b$ -Dimer und nicht das Monomer vorliegt (Sorgen *et al.*, 1998a).

### 3.1.4.2.2 Untersuchungen mit Hilfe von MTS

Die Spektren ohne  $F_1$  (Abb. 3.10 links) zeigten generell eine recht hohe Immobilisierung des Spinlabels, was am relativ kleinen Verhältnis Hochfeld- zu Mittelfeldamplitude (H/M-Verhältnis) zu erkennen ist. Wie schon bei den Messungen mit IAAT lieferten die  $b_{syn}$ -Mutanten V102C, E108C, E112C und R113C Mehrkomponentenspektren mit einer mobileren

und einer immobileren Komponente. Ähnliche Spektren wurden dieses Mal auch bei den Mutanten Q106C und E110C erhalten. Wie in Kap. 3.1.4.2.1 (S. 26) erwähnt sind für das Auftreten der zusätzlichen Signale zwei Erklärungen vorstellbar, d.h. die Beweglichkeit des Spinlabel könnte einerseits von voluminösen Nachbargruppen oder durch das jeweils andere b-Monomer eingeschränkt worden sein. Da die Aminosäureposition 110 sowohl im Modell zweier zueinander paralleler Helices, wie auch bei einem LHCC bzw. einem RHCC auf der äußeren Helixseite lokalisiert ist (siehe Tabelle 3.3; S. 22), ist wohl davon auszugehen, dass die Beweglichkeit des Spinlabels an dieser Position von den großen Aminosäurenresten an den Positionen 106 (Glutamin) und 114 (Lysin) eingeschränkt wurde. An den anderen fünf betrachteten Positionen könnte die Einschränkung der Spinlabelbeweglichkeit sowohl durch das jeweils andere b-Monomer wie auch durch Nachbargruppen erfolgt sein (R98 und Q106 bei 102; I109 und E110 bei 106; Q104 und E112 bei 108; E108, I109 und R115 bei 112; I109, E110 und R117 bei 113). Besonders stark ist dieser Effekt bei der Mutante 112 zu beobachten. Hier erinnert die Linienform schon fast an ein Festkörper- bzw. Tieftemperaturspektrum, was dafür spricht, dass der Label an dieser Stelle so stark im Protein immobilisiert ist, dass kaum noch Bewegung möglich ist. Da die Position 112 in der b-b-Kontaktfläche lokalisiert zu sein scheint und mit Glutamat (108), Isoleucin (109) und Arginin (115) drei recht große Nachbargruppen in direkter Umgebung (etwa eine Helixdrehung oberhalb bzw. unterhalb) besitzt, ist die starke Immobilisierung an dieser Stelle nicht weiter verwunderlich.

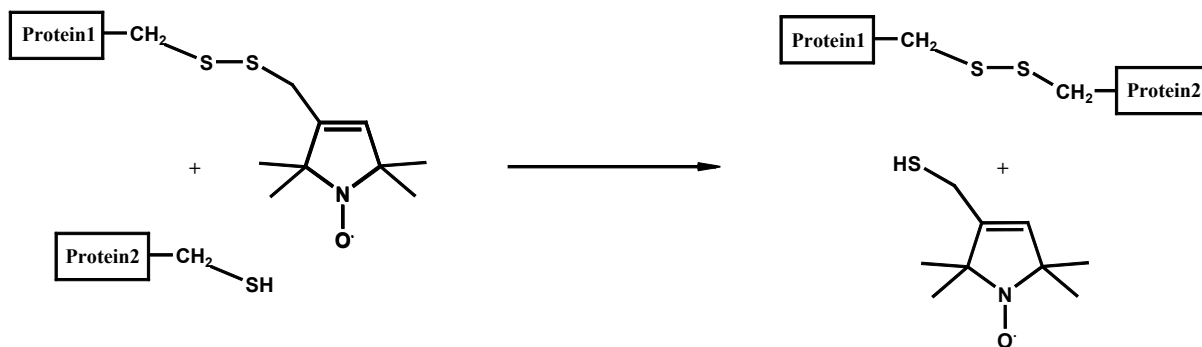
Bei den Mutanten 101, 105, 109 und 113 fällt auf, dass hier das Hochfeldsignal nicht wie bei den restlichen Proteinen sehr stark verbreitert ist, sondern relativ scharf erscheint. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Positionen 101, 105, 109 und 113 jeweils um vier Aminosäuren von einander entfernt sind, was bei Annahme einer  $\alpha$ -helikalen Struktur (3,6 Aminosäuren sind für eine Helixumdrehung notwendig) von b bedeuten würde, dass sich diese Aminosäuren auf einer Seite der Helix befinden würden. Hierbei könnte es sich um die vom b-b-Interface abgewandte Seite handeln, denn dort hätte der Spinlabel die wohl größte Bewegungsfreiheit, was sich in den relativ zu den anderen Proteinen größeren Hochfeldsignalen ausdrücken würde.



**Abbildung 3.10:** ESR-Spektren der einzelnen MTS-modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten (Cysteinmutationen an den Positionen 101 - 114), die alleine (links) und im Komplex mit  $F_1$  (rechts) bei 293 K vermessen wurden (siehe Kap. 5.6.6.1; S. 118). Die Proben lagen in Konzentrationen von 10 - 297  $\mu$ M (bezogen auf  $b_2$ ) in TMK-Puffer vor (siehe Kap. 5.5.1.3; S. 105). Die Messungen erfolgten an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,7 GHz; Mikrowellenleistung 12,7 mW; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 1G; Konversionszeit 41 ms; Receiver Gain  $5,64 \cdot 10^4$  -  $1,00 \cdot 10^6$ ; Spektrenbreite 120 G; Zeitkonstante 10 ms; Zentralfeld 3450 G K.

Diese Theorie steht aber in krassem Gegensatz zu den in Kap. 3.1.4.1 (S. 19) gezeigten Untersuchungen, wonach sich diese Aminosäurepositionen im b-b-Interface befinden. Allerdings lässt sich für das Auftreten der scharfen Signale gerade bei diesen Mutanten eine Erklärung finden, die mit den Ergebnissen aus Kap. 3.1.4.1 (S. 19), wonach sich die Cysteine an den Positionen 101, 105, 109 und 113 sehr nahe kommen, in Einklang steht. Und zwar dann, wenn die Signale nicht von an Protein gebundenem Label, sondern von freiem stammen. Da die Kopplung von MTS am Protein über Disulfidbrücken erfolgte, ist es leicht denkbar, dass diese, wie in Abb. 3.11 dargestellt, gespalten und zwischen den b-Monomeren neu geknüpft worden sind, wobei Spinlabel freigesetzt wurde. Da eine solche Reaktion nicht ablaufen kann, wenn die beiden Cysteine weit voneinander entfernt sind, ist die Freisetzung

von Spinlabel und der damit verbundenen Anstieg des Hochfeldsignals als Indiz für eine große Nähe zwischen den beiden b-Monomeren an den Positionen 101, 105, 109 und 113 zu werten.



**Abbildung 3.11:** Bei günstiger Geometrie und ausreichender Nähe der beiden Cysteingruppen kommt es zur Freisetzung von MTS bzw. zur Verbindung der beiden Proteine.

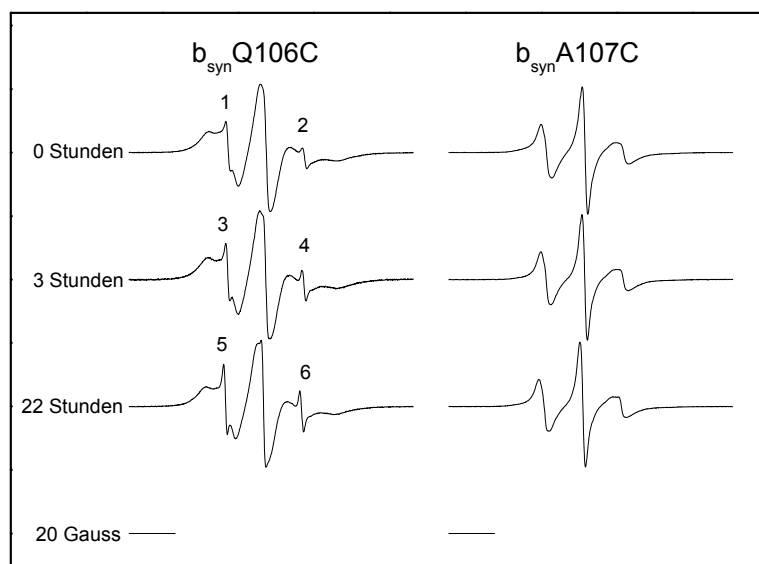
Dass der Spinlabel leicht abgelöst werden kann, zeigte sich bei der Zugabe von F<sub>1</sub> zu den mit MTS modifizierten b<sub>syn</sub>-Mutanten (siehe Abb. 3.10 rechts). Am deutlichsten war dies bei den Mutanten 108, 109, 110 und 112 zu beobachten. Bei allen anderen Mutanten war dieses Phänomen schwächer und bei 104 und 106 gar nicht zu beobachten. Bei der Mutante 105 war sogar eine Abnahme des Hochfeldsignals bzw. eine Signalverbreiterung im Vergleich zu der Messung ohne F<sub>1</sub> zu sehen. Erklärbar ist dies dadurch, dass die b<sub>syn</sub>A105C\*MTS- bzw. die F<sub>1</sub>-Proben nach dem Auftauen auf Eis gelagert und dort auch vermischte wurden. Bei der Reaktion von b<sub>2</sub> mit F<sub>1</sub> könnte es zu einer Veränderung der Packungswirkung der beiden b-Monomere gekommen sein, was die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Monomeren und somit die Spinlabel freisetzung verhinderte.

Eine weitere Erklärung für die Spinlabel freisetzung an den Positionen 109 und 110 wäre, dass es zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen b<sub>2</sub> und F<sub>1</sub> gekommen ist. Dafür sprechen die Ergebnisse aus Studien, wo es bei der Umsetzung der b<sub>syn</sub>-Mutanten I109C und E110C mit F<sub>1</sub> zur Ausbildung von Crosslinks zwischen den b-Proteinen und der α-Untereinheit von F<sub>1</sub> kam (McLachlin *et al.*, 2000). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass bei diesen Untersuchungen länger-kettige Verbindungen als Crosslinker (Spacer) verwendet und nur sehr schwache Reaktionen erhalten wurden. Dies spricht eher dafür, dass der Abstand zwischen b<sub>2</sub> und α recht groß ist. Vielleicht so groß, dass es ohne die Verwendung von Crosslinker gar nicht zur Ausbildung von Crosslinks gekommen wäre. Bezogen auf unsere Ergebnisse bedeutet dies, dass es durchaus möglich aber recht unwahrscheinlich ist, dass die Freisetzung



von Spinlabel bei der Zugabe von  $F_1$  auf der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen  $b_2$  und  $\alpha$  beruht.

Bei manchen Mutanten konnte unabhängig von der Anwesenheit von  $F_1$  eine zeitabhängige Freisetzung des Spinlabels beobachtet werden, wie Abb. 3.12 verdeutlicht. Hier sind die Ergebnisse der zeitabhängigen Messungen an den Systemen  $b_2Q106C*MTS$  bzw.  $b_2A107C*MTS$  zusammengestellt. Die Proben wurden nach Auftauen auf Eis gelagert und dann bei 293 K vermessen. Nach erfolgter Inkubation für 3 Stunden bei 293 K erfolgte die zweite und nach weiteren 19 Stunden bei 293 K die dritte Messung



**Abbildung 3.12:** ESR-Spektren der mit MTS modifizierten  $b_{syn}$ -Mutanten Q106C und A107C, die bei 293 K nach unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen wurden (siehe Kap. 5.6.6.1; S. 118). Die Proben lagen in Konzentrationen von  $96 \mu\text{M}$  (106) bzw.  $197 \mu\text{M}$  (107) bezogen auf  $b_2$  in TMK-Puffer vor (siehe Kap. 5.5.1.3; S. 105) und wurden direkt nach dem Auftauen, dann nach einer dreistündigen Inkubation bei 293 K und zum Schluss nach weiteren 19 Stunden bei 293 K vermessen. Die Messungen erfolgten an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,7 GHz; Mikrowellenleistung 12,7 mW; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 1G; Konversionszeit 41 ms; Receiver Gain  $6,32 \cdot 10^4$ ; Spektrenbreite 120 G; Zeitkonstante 10 ms; Zentralfeld 3450 G K.

Während bei der Mutante 107 keine Veränderungen auftraten, zeigen die Spektren von 106 deutlich die Freisetzung von Spinlabel, was an der Vergrößerung der scharfen Tieffeldsignale (Abb. 3.12 links, 1- $\rightarrow$  3- $\rightarrow$  5) bzw. der Hochfeldsignale (Abb. 3.12 rechts, 2- $\rightarrow$  4- $\rightarrow$  6) deutlich wird. Erklärbar ist dies damit, dass während der Inkubation aufgrund dynamischer Prozesse

alle SH-Gruppen, die sich einigermaßen nahe am Spinlabel befanden, diesen substituierten. Dass es bei der Mutante  $b_{\text{syn}}A107C$  zu keiner Freisetzung von Spinlabel gekommen ist, deutet darauf hin, dass die Positionen 107 so weit voneinander entfernt sind, dass die dort befindlichen Cysteine keine S-S-Brücken ausbilden konnten.

Die Mutanten 101, 108, 109 und 110 zeigten ein ähnliches Verhalten wie 106. Ein Blick auf Tabelle 3.3 (S. 22) zeigt, dass dies sehr gut mit den drei möglichen Quartärstrukturen übereinstimmt, wonach sich die betrachteten Positionen (mit Ausnahme von 110) mittel oder nah kommen sollten. Ein ähnliches Verhalten wie  $b_{\text{syn}}A107C$  zeigten auch die Mutanten 111, 112 und 114, die bis auf 112 in allen drei Strukturen weit voneinander entfernt sein sollten (siehe Tabelle 3.3). Die restlichen Proteine wurden auf diese Weise nicht untersucht.

Es bleibt festzuhalten, dass MTS für unser System ungeeignet ist, da es sowohl ohne als auch mit  $F_1$  zu einer Ablösung von proteingebundenem Spinlabel kommen kann (siehe Abb. 3.10 und Abb. 3.12).  $b_{\text{syn}}$  scheint so mobil zu sein, dass es jederzeit zu einer Drehung der beiden Monomere zueinander bzw. zu anderen dynamischen Prozessen kommen kann, was in Kombination mit der hohen Ablösungstendenz von MTS zu einer Freisetzung an Spinlabel führt. Allerdings kann diese Mobilität von  $b_2$  nicht sehr stark sein, wie die Ergebnisse von den mit IAAT modifizierten  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten nach Zugabe von  $F_1$  zeigten.

Was die Untersuchungen mit MTS gezeigt haben ist, dass es zu einer Bindung von  $b_2$  an  $F_1$  und zu einer Änderung der Struktur von  $b$  während bzw. nach dieser Bindung gekommen ist.

### 3.1.4.2.3 Labelgrade

Eine weitere Möglichkeit Hinweise auf die relative Struktur von  $b_{\text{syn}}$  zu erhalten besteht in der Bestimmung der Labelgrade, d.h. der Ausbeute an mit Spinlabel modifiziertem Protein in den jeweiligen Messlösungen. Angenommen, dass ein Cystein, das sich im b-b-Interface befindet, schwerer für Spinlabel zugänglich ist, als eine entsprechende Aminosäure an der Proteinoberfläche, dann müsste es möglich sein über einen Vergleich von Labelgraden verschiedener Mutanten Aussagen auf die etwaige Proteinstruktur zu treffen. Allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die b-b-Dimerisierung nicht dynamisch ist, sondern eine relativ fixierte Struktur vorliegt.

Anhand der in 3.1.4.2.1 und 3.1.4.2.2 gezeigten Spektren der  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten (ohne  $F_1$ ) wurden die Labelgrade der einzelnen Proben untersucht. Um diese zu bestimmen, wurden die Raumtemperaturspektren unter Verwendung des Programmes *Microcal™ Origin®* der Fa.

Microcal Software, Inc. einer Doppelintegration unterworfen. Der Vergleich mit einer 10  $\mu$ M Standardlösung des entsprechenden Spinlabels lieferte die Spindichte in der untersuchten Proteinprobe. Die Spindichte bezogen auf die Proteinkonzentration (bestimmt nach Bradford, 1976) lieferte dann den Labelgrad (siehe Kap. 5.6.6.3; S. 122).

Da sich MTS, wie aus Kap. 3.1.4.2.2 (S. 30) hervorgeht, mit der Zeit ablöst, ist davon auszugehen, dass in den Proben freier Spinlabel vorhanden war. Da dieser aber zumindest bis nach der säulenchromatographischen Reinigung am Protein gebunden war und man hier über den Grad der Modifizierung Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit der Cysteine ziehen will, spielt es keine Rolle, ob der Spinlabel zum Zeitpunkt der eigentlichen Messung frei oder gebunden war.

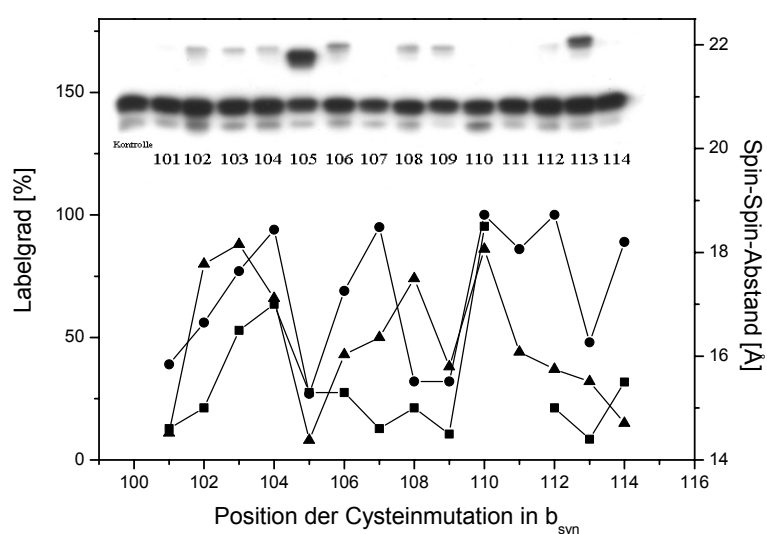
In Tabelle 3.5 sind die auf diese Art erhaltenen Labelgrade für die mit IAAT bzw. MTS modifizierten  $b_{\text{syn}}$ -Dimere zusammengestellt.

<b>Position der Mutation in <math>b_{\text{syn}}</math></b>	<b>Labelgrad der mit IAAT modifizierten Proteine [%]</b>	<b>Labelgrad der mit MTS modifizierten Proteine [%]</b>
I101C	11	39
V102C	80	56
A103C	88	77
Q104C	66	94
A105C	8	27
Q106C	43	69
A107C	50	95
E108C	74	32
I109C	38	32
E110C	86	100
A111C	44	86
E112C	37	100
R113C	32	48
K114C	15	89

**Tabelle 3.5:** Ausbeute an spinmarkiertem Protein bei der Modifizierung der  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten 101 - 114 mit IAAT bzw. MTS.

Vergleicht man die Werte aus Tabelle 3.5 miteinander, so fällt auf, dass MTS mit Ausnahme der Mutanten V102C, A103C, E108C und I109C bessere Labelausbeuten zeigt. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Mutante A105C in beiden Fällen das am schlechtesten modifizierte Protein ist. Das ist gerade die Mutante, die bei den Crosslink-Experimenten (siehe Abb. 3.13) die stärkste Tendenz zur Ausbildung von S-S-Bindungen zeigte. Auch die

Mutante R113C, die den zweitstärksten Crosslink zeigte, wurde schlechter modifiziert als die meisten anderen Mutante. Auch weisen die Mutanten I101C im Falle von IAAT bzw. I109C im Falle von MTS mit die niedrigsten Labelgrade auf. Dies korreliert mit den geringen Spin-Spin-Abständen von I101C, A105C, I109C und R113C und passt zu allen drei möglichen Strukturen, wo sich die betrachteten Positionen mittel bzw. nah kommen sollten (siehe Tabelle 3.3; S. 22). Die Mutanten A103C, Q104C und E110C weisen die mitunter höchsten Labelgrade auf. Dies passt ebenfalls gut zu allen drei möglichen Strukturen (LHCC, RHCC und parallele Helices) bzw. den durch Simulation ermittelten Spin-Spin-Abständen (siehe Abb. 3.13), die an diesen Positionen mit die größten sind.



**Abbildung 3.13:** Vergleich der unterschiedlichen Labelgrade mit den durch Simulation bestimmten Spin-Spin-Abständen und den Crosslink-Studien (siehe Kap. 3.1.4.1; S. 19). Spin-Spin-Abstände sind als Quadrate, die MTS-Labelgrade als Punkte und die IAAT-Labelgrade als Dreiecke dargestellt.

### 3.1.5 Zusammenfassung und Vergleich der bisherigen Ergebnisse

Das Ziel der bisherigen Untersuchungen war es, herauszufinden ob  $b_{\text{syn}}$  im Bereich der Aminosäurepositionen 101 - 114 als zwei zueinander parallele Helices oder als linkshändiges (LHCC) bzw. rechtshändiges coiled-Coil (RHCC) vorliegt. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist es allerdings nicht möglich einer der drei fraglichen Quartärstrukturen den Vorzug zu geben. Vom jetzigen Stand ist es sehr wahrscheinlich, dass sogar alle drei Strukturen vorliegen und ein Wechsel zwischen ihnen stattfinden kann. Es ist durchaus denkbar, dass ein Wechsel von einem LHCC in ein RHCC (oder umgekehrt) eine Möglichkeit darstellt, wie  $b_2$  zur Speicherung von elastischer Energie während der ATP-Synthese dienen könnte. Als Zwischenschritt könnte dabei ein Zustand durchlaufen werden, in dem die beiden Helices parallel zueinander stehen.

Die simulierten Interspinabstände, die Ergebnisse der Crosslink-Studien sowie die Labelgrade der verschiedenen Mutanten deuten darauf hin, dass sich die Positionen 101, 105, 108, 109 und 113 im oder in der Nähe des b-b-Interfaces befinden. Die Positionen 107, 110, 111 und 114 hingegen scheinen aufgrund der gezeigten Ergebnisse auf der vom Interface abgewandten Seite zu liegen.

Die Untersuchungen, die nach Bindung von  $b_2$  an  $F_1$  erfolgten, wurden mit Hilfe zweier Spinlabel durchgeführt. So sollten spinlabelspezifische Einflüsse auf das Protein ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen mit IAAT zeigten keinen oder nur sehr schwachen Einfluss von  $F_1$  auf die Struktur von  $b_2$ . Denn sowohl bei 193 K als auch bei 293 K konnten keine gravierenden Unterschiede in den Spektren mit und ohne  $F_1$  festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es bei Verwendung von MTS nach der Zugabe von  $F_1$  zu  $b_2$  an manchen Aminosäurepositionen zu einer vermehrten Freisetzung des Spinlabels vom Protein. Beide Ergebnisse lassen sich derart deuten, dass es durch  $F_1$  zu einer Strukturänderung im b-Dimer gekommen ist, die aber mit Hilfe der verwendeten Spinlabel nicht quantifizierbar war. Insbesondere IAAT war in diesem Fall ein wenig geeigneter Spinlabel, da er durch seine größeren Rotationsfreiheitsgrade (im Vergleich zu MTS) kleine Strukturänderungen nicht gut anzeigen kann.

Die Bestimmung der Labelgrade sollte eine Abschätzung auf die Zugänglichkeit der einzelnen Positionen liefern. Die an den Positionen 105 und 113 gefundenen geringen Labelausbeuten passen sehr gut zu den Crosslinks an diesen Positionen bzw. zu den kleinen Spin-Spin-Abständen. Andererseits passen die teilweise sehr hohen Labelgrade bei den Positionen 103, 104, 107, 110, 111 und 114 zu den hier gefundenen Abständen aus ESR-Spektren bzw. den

---

Ergebnissen aus den Crosslink-Studien. Allgemein lässt sich eine gute Korrelation zwischen Labelgrad und Spin-Spin-Abständen bzw. den Ergebnissen aus den Crosslink-Studien feststellen.

### 3.2 Der $F_0F_1$ -ATP-Synthase-Komplex

Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus Kap. 3.1 stellt sich natürlich die Frage, inwieweit die Ergebnisse aus den an  $b_{syn}$  durchgeführten Untersuchungen, wonach  $b_2$  im Bereich von 101-114 sowohl als zwei zueinander parallele Helices oder als linkshändiges (LHCC) bzw. rechtshändiges coiled-Coil (RHCC) vorliegen kann, mit den Gegebenheiten im  $F_0F_1$ -Gesamtkomplex übereinstimmen. Strukturelle Unterschiede zwischen isoliertem  $b_2$  und der  $b_2$ -Untereinheit im ATP-Synthasekomplex sind denkbar, da im Gesamtkomplex aufgrund der Wechselwirkung von  $b_2$  mit  $a$ , der Membran und Untereinheiten von  $F_1$  andere  $b$ -Wechselwirkungen als bei isoliertem  $b_2$  zu erwarten sind. Möglicherweise ist eine Bevorzugung einer der fraglichen Quartärstrukturen zu erkennen.

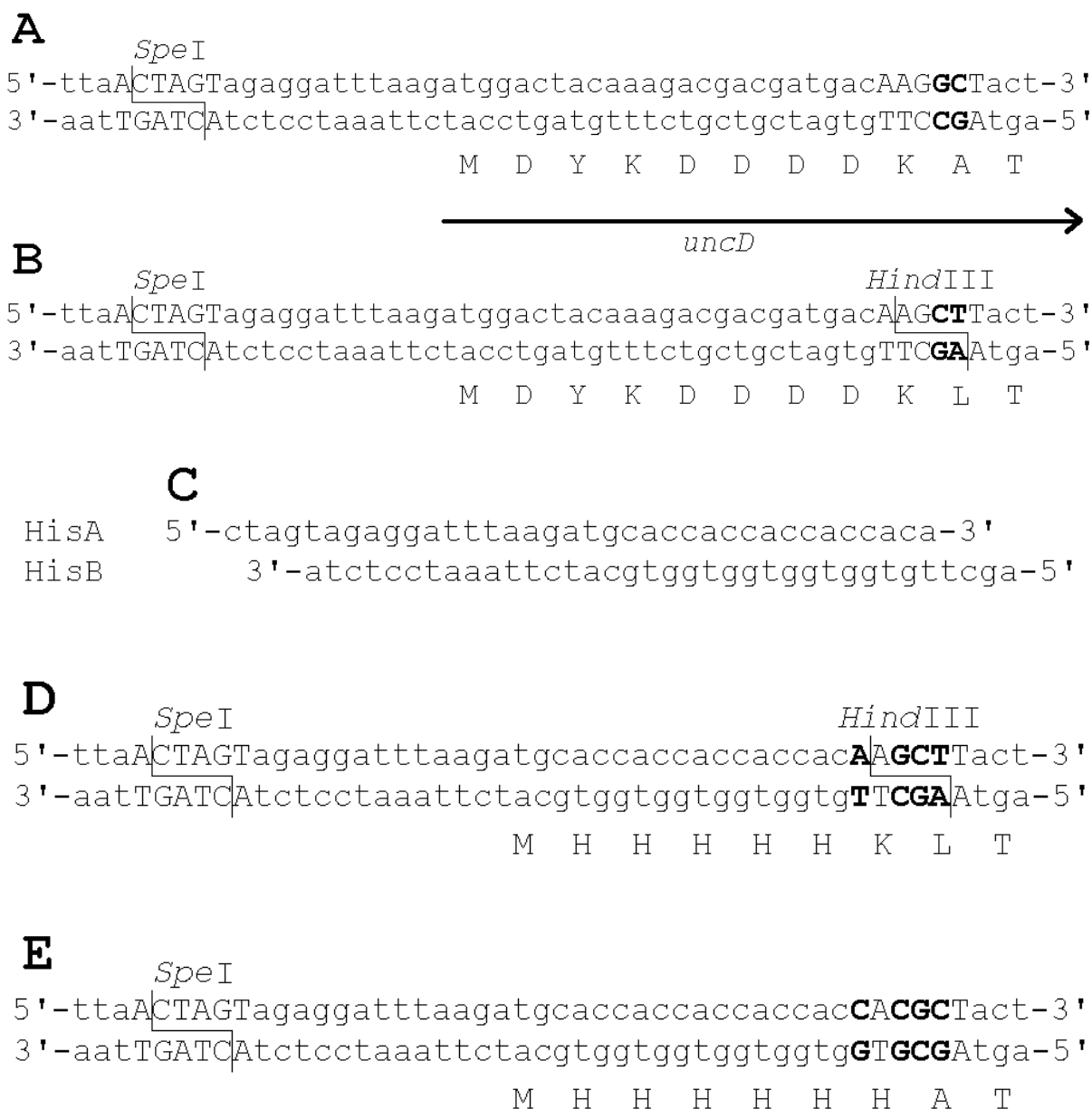
Um dies näher zu untersuchen benötigt man eine komplett cysteinfreie ATP-Synthase in deren  $b_2$ -Untereinheit gezielt Cysteine eingeführt werden können. Unserem Arbeitskreis wurde von Robert K. Nakamoto ein Plasmid (pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys) zur Verfügung gestellt, das für eine cysteinfreie  $F_0F_1$ -ATP-Synthase kodiert. Die von dem Plasmid kodierte  $F_0F_1$  enthielt am N-terminalen Ende der  $\beta$ -Untereinheiten sogenannte FLAG-Tags. Hierbei handelt es sich um eine Aminosäuresequenz aus acht Aminosäuren (DYKDDDDK), gegen die sich anti-FLAG-Antikörper richten. Unter Verwendung von kommerziell erwerblicher anti-FLAG-Agarose, d.h. Agarose mit der anti-FLAG-Antikörper verknüpft sind, gelingt es, die  $F_0F_1$  relativ einfach und schnell in hoher Reinheit zu isolieren (Kuo *et al.*, 1998).

Problematisch ist hierbei, dass die anti-FLAG-Agarose und das zur Proteinelution notwendige FLAG-Peptid relativ teuer sind. Da für die ESR-spektroskopischen Untersuchungen relativ große Proteinmengen benötigt werden, gelangten wir zu dem Entschluss, den FLAG-Tag gegen einen anderen Affinitätstag, einen Polyhistidin- oder His-Tag, auszutauschen.

Bei der (6\*)His-Tag-Methode wird ein mehrzähliger, Nickel komplexierender Ligand, in diesem Fall Nitrilotriessigsäure (NTA), z.B. an Agarose gebunden. Das Nickel hat hierbei noch zwei Bindungsstellen frei, woran Histidine binden können und es zur Bildung eines Chelatkomplexes kommt. Die Elution des gebundenen Proteins wird dann mit Puffer, der unterschiedliche Konzentrationen an Imidazol enthält, durchgeführt.

### 3.2.1 Austausch des FLAG-Tag- gegen ein His-Tag-Gen

Der einfachste Weg zum Austausch des FLAG-Tags gegen einen (6\*)His-Tag ist die direkte Substitution der entsprechenden DNA-Sequenz.



**Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung des Austausches des FLAG-Tag-Gens gegen einen His-Tag. Sequenz des FLAG-Tag und *SpeI*-Schnittstelle in pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys (A) bzw. Einführung einer *HindIII*-Erkennungssequenz (B). Austausch der ursprünglichen DNA-Abfolge gegen die His-kodierende Sequenz (C und D) und Entfernung der *HindIII*-Schnittstelle bzw. Wiederherstellung der ursprünglichen Proteinsequenz von  $\beta$ . Restriktionsenzymkennungssequenzen und AAGCT-Abfolge in Großbuchstaben; ausgetauschte Basen fett gedruckt.

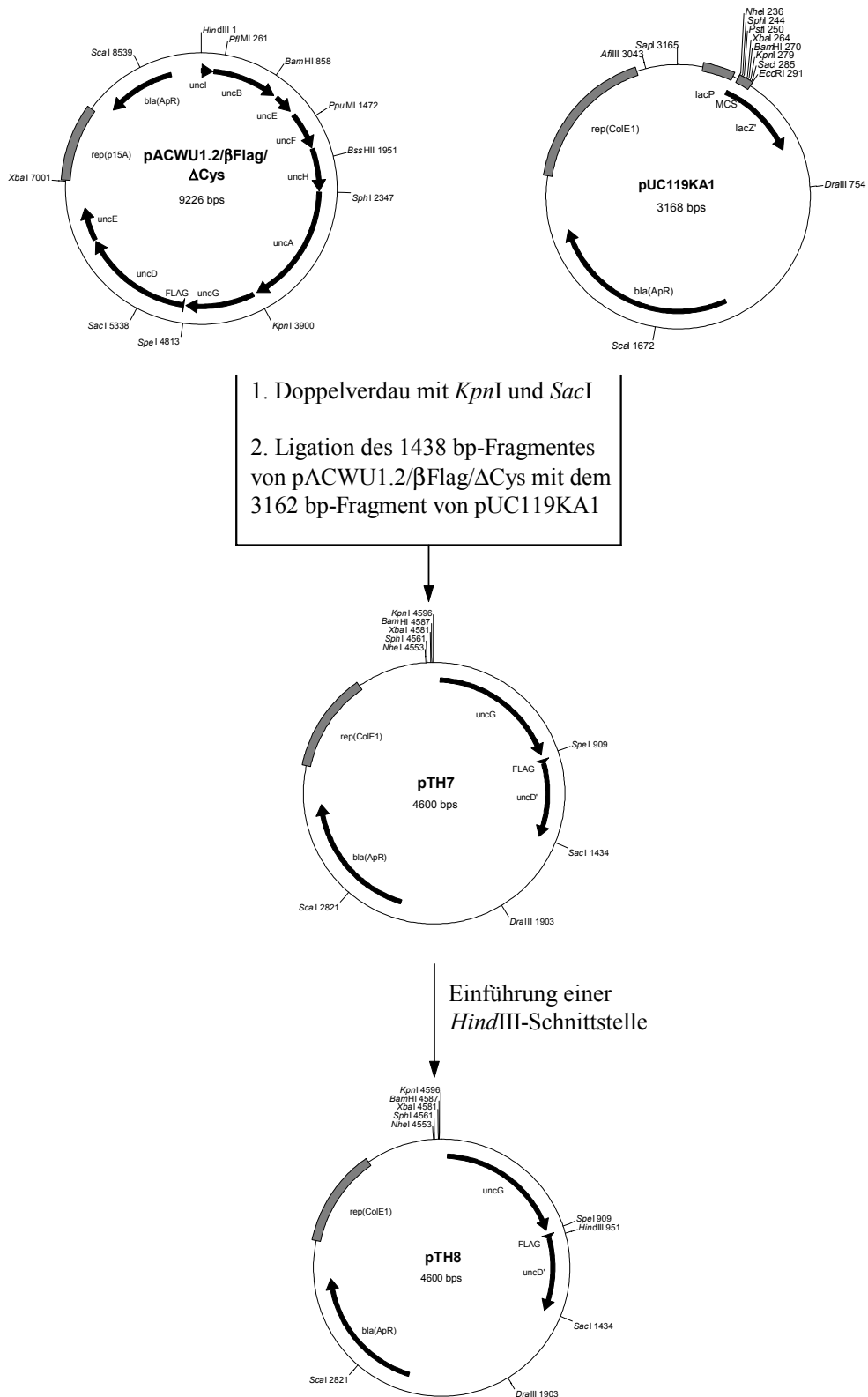


Bei der Herstellung von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys wurde die für den FLAG-Tag kodierende Sequenz in das für die  $\beta$ -Untereinheit kodierende *uncD*-Gen mittels PCR zwischen das Startcodon und der für  $\beta$  kodierenden Sequenz eingebracht (Kuo *et al.*, 1998). Betrachtet man sich die DNA-Sequenz in diesem Bereich, so fällt auf, dass stromaufwärts vom *uncD*-Startcodon eine *SpeI*-Schnittstelle vorhanden ist (Abb. 3.14A). Weiterhin befindet sich beim Übergang der FLAG-Tag-Sequenz zur eigentlichen Proteinsequenz eine AAGCTT-Abfolge, die sich durch Austausch von zwei Basen leicht in AAGCTT, also eine *HindIII*-Erkennungsequenz, umwandeln lässt (siehe Abb. 3.14B).

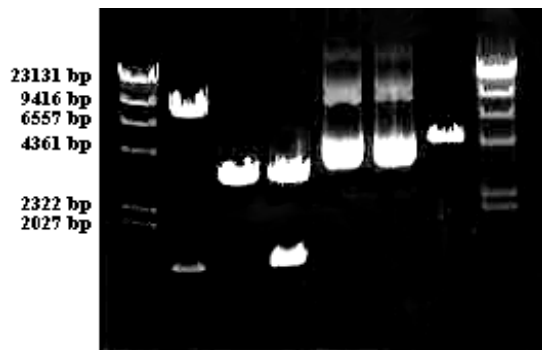
Hat man nun die *HindIII*-Schnittstelle eingefügt, so kann man die für den FLAG-Tag kodierende Sequenz leicht mittels eines *HindIII/SpeI*-Doppelverdau entfernen und durch die aneinandergelagerten Primer HisA und HisB (siehe Abb.3.14C) ersetzen, was wie in Abb. 3.14D dargestellt, zur Insertion eines 5\*His-Tags führt. Durch die anschließend durchgeführte Mutagenese wird die *HindIII*-Schnittstelle wieder entfernt, das vorliegende Lysin-Codon in das sechste Histidin des Tags und das Leucin-Codon in das ursprüngliche Alanin-Codon umgewandelt (siehe Abb.3.14E).

Da in pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys bereits eine *HindIII*-Schnittstelle vorlag, erfolgte analog Abb. 3.15 die Herstellung eines *HindIII*-freien Subclones, der den zu modifizierenden Anfangsbereich von *uncD* enthielt. Hierzu wurde ein 1438 bp großes DNA-Stück analog Kap. 5.4.2.1 (S. 95) aus pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys mit den Enzymen *KpnI* und *SacI* ausgeschnitten, über eine Agarosegel-Elektrophorese gereinigt (siehe kleines Fragment in Bahn 2 von Abb. 3.16) und in die Multicloningsite von pUC119KA1 (Ansorge, 1997) eingebracht (siehe Kap. 5.1.2; S. 71). pUC119KA1 wurde vorher ebenfalls mit *KpnI* und *SacI* (siehe Bahn 3 von Abb. 3.16).

Das so erhaltene Plasmid pTH7 wurde zur Kontrolle einem *KpnI/SacI*-Doppelverdau und einem *HindIII*-Verdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 5.3.4; S. 87) unterzogen. Aus Abb. 3.16 geht hervor, dass die Größen der Banden von pTH7 nach *KpnI/SacI*-Verdau (Bahn 4) mit denjenigen von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys und pUC119KA1 (Bahnen 2 und 3) korrelieren. pTH7 wurde nicht von *HindIII* geschnitten (Bahn 5), was ein Vergleich mit unverdaulichem pTH7 zeigt (Bahn 6).



**Abbildung 3.15:** Herstellung von pTH7 und pTH8: pTH7 wurde aus einem 1438 bp großen Fragment aus pACWU1.2/βFlag/ΔCys und einem 3162-er Fragment aus pUC119KA1, welche durch Doppelverdau der beiden Plasmide mit *KpnI* und *SacI* erhalten wurden, aufgebaut. pTH8 entstand aus pTH7 durch Einführung einer *HindIII*-Schnittstelle.



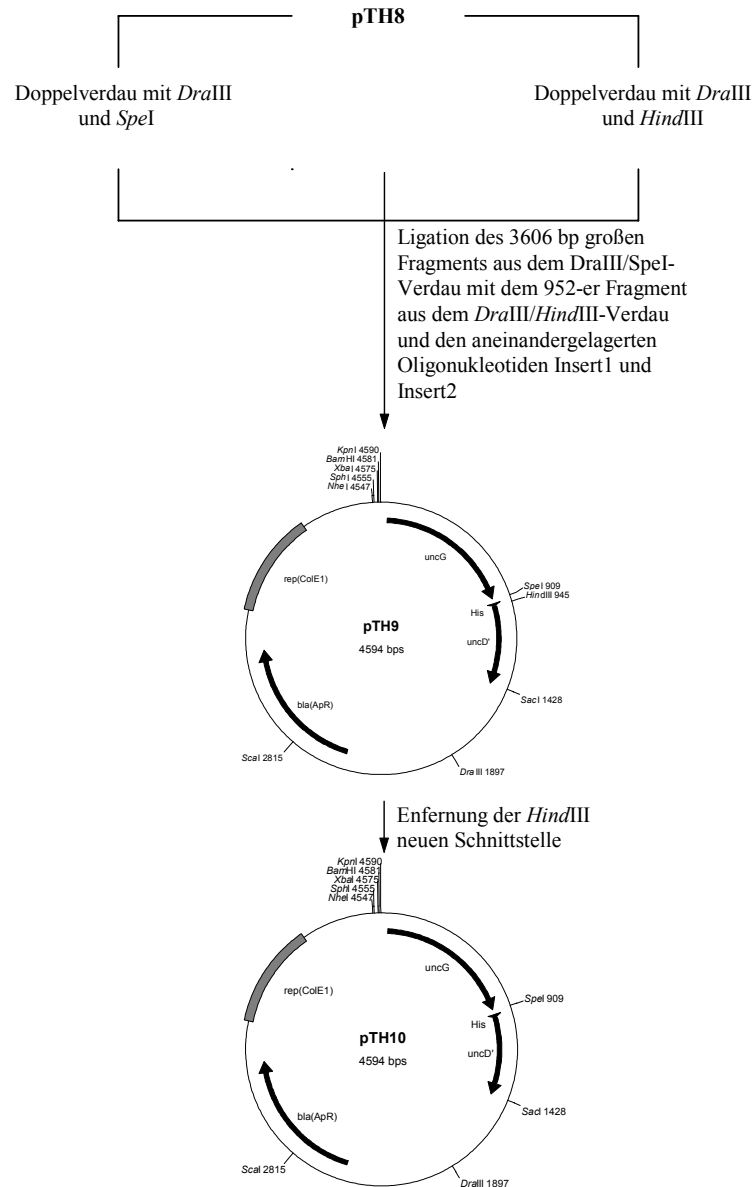
**Abbildung 3.16:** Verdau der Plasmide pACWU1.2/βFlag/ΔCys, pUC119KA1, pTH7 und pTH8 mit den Enzymen *HindIII*, *KpnI* und *SacI* aufgetragen auf ein 0,9 %-iges Agarosegel: Bahn 1: λ-DNA/*HindIII*, Bahn 2: pACWU1.2/βFlag/ΔCys/*KpnI/SacI*, Bahn 3: pUC119KA1/ *KpnI/SacI*, Bahn 4: pTH7/*KpnI/SacI*, Bahn 5: pTH7/*HindIII*, Bahn 6: pTH7 unverdaut, Bahn 7: pTH8/*HindIII* und Bahn 8: λ-DNA/*HindIII*.

Die Einführung der neuen *HindIII*-Schnittstelle am Ansatzpunkt des FLAG-Tags in pTH7 erfolgte mittels der Oligonukleotide *HindIII*ein 1 und 2 (siehe Kap. 5.1.3; S. 74 / 5.4.2.2) nach der Quick-Change™-Methode der Fa. Stratagene (siehe Kap. 5.3.9; S. 91) und wurde mittels eines *HindIII*-Verdau des erhaltenen Plasmids pTH8 überprüft (Bahn 7 in Abb. 3.16).

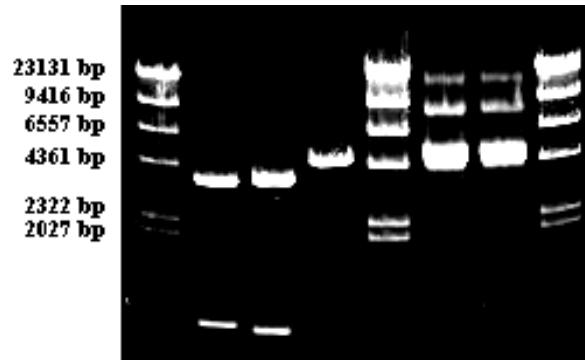
Durch einen Doppelverdau von pTH8 mit *HindIII* und *SpeI* sollte danach die FLAG-Tag-Sequenz ausgeschnitten werden. Der 4558 bp große Vektor wurde mit einem etwa 7000-fachen molaren Überschuss an der für den His-Tag kodierenden Oligonukleotide Insert1 und Insert2 versetzt (siehe Kap. 5.1.3; S. 74), für 5 Stunden bei 37°C mit *T4*-DNA-Ligase inkubiert und in kompetente DH5α transformiert. Nach Isolierung (siehe Kap. 5.3.2; S. 87) und Sequenzierung (siehe Kap. 5.3.10; S. 91) der DNA zeigte sich jedoch, dass das Ausgangsplasmid pTH8 erhalten wurde. Als auch zum wiederholten Male nur pTH8 isoliert werden konnte, lag der Verdacht nahe, dass der Doppelverdau mit *HindIII* und *SpeI* nicht funktioniert bzw. nicht vollständig war.

Nun wurde pTH8, wie in Abb. 3.17 skizziert, zweimal doppelt verdaut, einmal mit *DraIII* und *HindIII* und das andere Mal mit *DraIII* und *SpeI*, was beim ersten Verdau zwei Fragmente mit den Größen von 952 bp und 3648 bp lieferte (siehe Abb. 3.18, Bahn 3) und beim zweiten Verdau Fragmente der Größe 994 bp und 3606 bp (siehe Abb. 3.18, Bahn 2) lieferte (siehe Kap. 5.4.2.3; S. 96). Das Ziel hierbei war es sicher zu gehen, dass die auszutauschende FLAG-Tag-Sequenz auch tatsächlich entfernt wurde. Deshalb wurde die 952 bp und 3606 bp großen Fragmente, die zusammen pTH8 ohne das FLAG-Gen ergaben, nach Isolierung aus dem Agarosegel, mit einem etwa 7000-fachen molaren Überschuss an Insert1 und Insert2

versetzt, für 5 Stunden bei 37°C mit *T4*-DNA-Ligase inkubiert und in kompetente DH5 $\alpha$  transformiert. Der erfolgreiche Sequenzaustausch konnte durch Sequenzierung (siehe Kap. 5.3.10; S. 91) von pTH9 mit den Sequenzierprimern 1 und 2 bestätigt (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) werden.



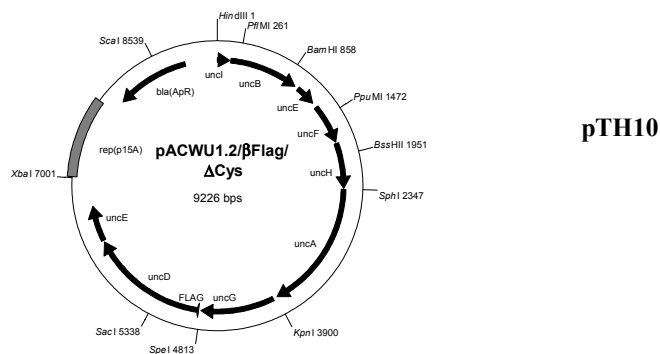
**Abbildung 3.17:** Herstellung von pTH9 bzw. pTH10: Das Plasmid pTH8 wurde zum einen mit den Enzymen *DraIII* und *SpeI* und andererseits mit *DraIII* und *HindIII* verdaut. Hierbei erhielt man ein Fragment mit der Größe von 3606 bp aus dem *DraIII/SpeI*-Verdau und ein 952 bp großes Fragment aus dem *DraIII/HindIII*-Verdau. Die Ligation dieser beiden DNA-Stücke mit den beiden Oligonukleotiden Insert1 und Insert2 (siehe Kap. 5.1.3; S. 74), die für einen His-Tag kodieren, lieferte das Plasmid pTH9. Durch eine gezielte Mutagenese wurde die *HindIII*-Schnittstelle aus pTH9 entfernt bzw. die ursprüngliche Proteinsequenz von  $\beta$  wiederhergestellt, was das Plasmid pTH10 ergab.



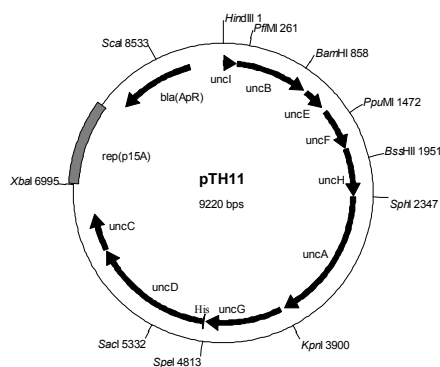
**Abbildung 3.18:** Verdau der Plasmide pTH8, pTH9 und pTH10 mit den Enzymen *DraIII*, *HindIII* und *SpeI* aufgetragen auf ein 0,9 %-iges Agarosegel: Bahn 1:  $\lambda$ -DNA/*HindIII*, Bahn 2: pTH8/*DraIII/SpeI*, Bahn 3: pTH8/*DraIII/HindIII*, Bahn 4: pTH9/*HindIII*, Bahn 5:  $\lambda$ -DNA/*HindIII*, Bahn 6: pTH10/*HindIII*, Bahn 7: pTH10 unverdaut und Bahn 8:  $\lambda$ -DNA/*HindIII*.

Da die Einführung der *HindIII*-Schnittstelle ein Alanin-Codon in ein Leucin (siehe Abb. 3.14 A und B) umwandelte, musste diese zur Wiederherstellung der ursprünglichen Aminosäuresequenz von  $\beta$  wieder entfernt werden. Desweiteren diente die gezielte Mutagenese von pTH9 mit den Primern HisA und HisB (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) dazu das vorliegende Lysin-Codon in das sechste Histidin-Codon des 6\*His-Tags zu verwandeln. Der Erfolg wurde durch einen *HindIII*-Verdau mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese des so entstandenen Plasmids pTH10 kontrolliert. Bahn 6 und 7 von Abb. 3.18 zeigen das gleiche Bandenmuster, wobei in Bahn 6 das mit *HindIII* verdaute und in Bahn 7 unverdautes pTH10 aufgetragen ist (zum Vergleich ist in Bahn 4 mit *HindIII* verdautes pTH9 aufgetragen).

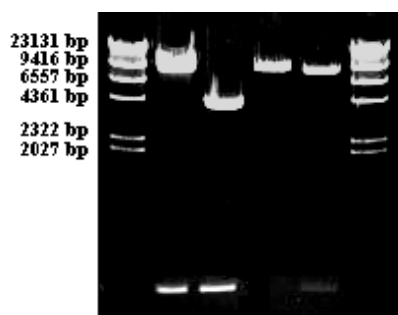
Der letzte Schritt zur Herstellung eines Plasmides mit dessen Hilfe man eine cysteinfreie His-getaggte F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> exprimieren kann, bestand im Umklonieren des modifizierten Bereiches aus pTH10 in das Ausgangsplasmid pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys (siehe Abb. 3.19). Hierzu wurden beide Plasmide einem Doppelverdau mit *SacI* und *SpeI* unterzogen. Die so erhaltenen 8701 bp (von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys; siehe Abb. 3.20, Bahn 2, große Bande) und 519 bp (von pTH10; siehe Abb. 3.20, Bahn 3, kleine Bande) großen Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt und für 5 Stunden bei 37°C und im Anschluss für 16 Stunden bei 16°C mittels *T4*-DNA-Ligase ligiert. Das auf diese Art erhaltene Plasmid pTH11, das zur Kontrolle nur mit *SacI* bzw. mit *SacI* und *SpeI* verdaut wurde (siehe Abb. 3.20, Bahn 4 bzw. Bahn 5), wurde von der Firma MWG-Biotech erneut mit den Sequenzierprimern 1 und 2 sequenziert. Erst danach wurde pTH11 zur Proteinexpression verwandt.



1. Doppelverdau mit *SpeI* und *SacI*
2. Ligation des 8701 bp-Fragmentes von pACWU1.2/βFlag/ΔCys mit dem 519 bp-Fragment von pTH10



**Abbildung 3.19:** Herstellung von pTH11: Umklonierung des His-Tag enthaltenden Bereiches aus pTH10 in pACWU1.2/βFlag/ΔCys. Durch Doppelverdau von pACWU1.2/βFlag/ΔCys bzw. pTH10 mit den Enzymen *SacI* und *SpeI* erhielt man zwei Fragmente von 8701 bp bzw. 519 bp Größe deren Ligation pTH11 ergab.



**Abbildung 3.20:** Verdau der Plasmide pACWU1.2/βFlag/ΔCys, pTH10 und pTH11 mit den Enzymen *SacI* und *SpeI* aufgetragen auf ein 0,9 %-iges Agarosegel: Bahn 1: λ-DNA/*HindIII*, Bahn 2: pACWU1.2/βFlag/ΔCys/*SacI/SpeI*, Bahn 3: pTH10/*SacI/SpeI*, Bahn 4: pTH11/*SacI*, Bahn 5: pTH11/*SacI/SpeI*, Bahn 6: λ-DNA/*HindIII*.

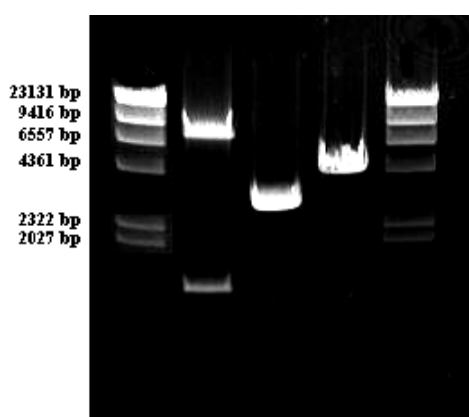
## 3.2.2 Einführung von Cysteinen in die b<sub>2</sub>-Untereinheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase

### 3.2.2.1 Herstellung des Subclones pTH12

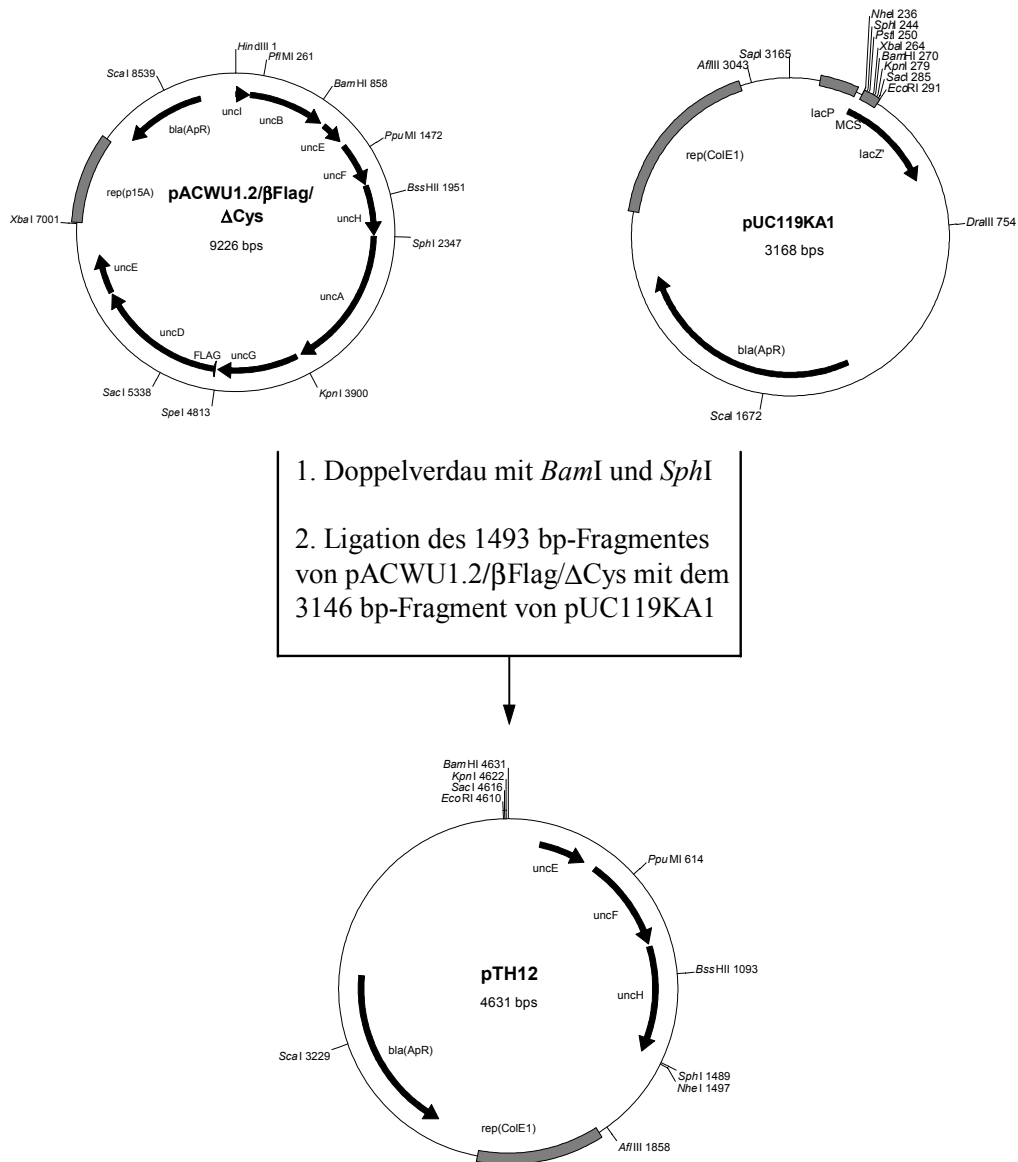
Erste Versuche, Mutationen in das für b kodierende Gen *uncF* am gesamten Plasmid pACWU1.2/βFlag/ΔCys einzubringen verliefen nicht erfolgreich. Es wurde deshalb in der Folge ein kleiner Subclone designt, der die Mutagenese erleichtern sollte. Hierzu wurde ein *uncF*-enthaltender Bereich aus pACWU1.2/βFlag/ΔCys ausgeschnitten und in die Multicloningsite von pUC119KA1 eingefügt. Das daraus resultierende Plasmid wurde mit pTH12 bezeichnet (siehe Abb. 3.22).

pACWU1.2/βFlag/ΔCys und pUC119KA1 wurden jeweils einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sph*I unterzogen (siehe Kap. 5.4.3.1; S. 99). Durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese wurden die unterschiedlichen DNA-Fragmente, wie in Abb. 3.21 dargestellt, aufgetrennt. Das 1493 bp große Fragment aus pACWU1.2/βFlag/ΔCys und das 3146-er Fragment aus pUC119KA1 wurden aus der Gelmatrix isoliert und für 2 Stunden bei 37 °C und 17 Stunden bei 16 °C ligiert. Im Anschluss daran wurde der komplette Ansatz in kompetente DH5α transformiert.

Der korrekte Einbau wurde mit Hilfe eines *Bam*HI-Verdaus und anschließender Agarosegelelektrophorese, was eine Bande mit einer Größe von 4631 bp lieferte, bestätigt (siehe Abb. 3.21, Bahn 4).



**Abbildung 3.21:** Verdau von pACWU1.2/βFlag/ΔCys, pUC119KA1 und pTH12 mit *Bam*HI, *Hind*III und *Sph*I aufgetragen auf ein 0,9 %-iges Agarosegel: Bahn 1: λ-DNA/*Hind*III, Bahn 2: pACWU1.2/βFlag/ΔCys/*Bam*HI/*Sph*I, Bahn 3: pUC119KA1/*Bam*HI/*Sph*I, Bahn 4: pTH12/*Bam*HI, Bahn 5: λ-DNA/*Hind*III.



**Abbildung 3.22:** Herstellung des Subclones pTH12 aus einem 1493 bp großen Fragment von pACWU1.2/βFlag/ΔCys und einem 3146-er Fragment von pUC119KA1, die durch einen *Bam*HI/*Sph*I-Doppelverdau der beiden Plasmide erhalten wurden.

### 3.2.2.2 Gezielte Mutagenese

Ausgehend von pTH12 sollten mittels der Quick-Change™-Methode der Fa. Stratagene (siehe Kap. 5.3.9; S. 91) unter Verwendung der Oligonukleotide 103A/B, 105 A/B, 106 A/B und 108A/B - 114A/B (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) die entsprechenden Aminosäuren gegen je ein Cystein ausgetauscht werden (siehe Kap. 5.4.3.2; S. 100).

pTH12 wurde mit dem entsprechenden Primerpaar einer Polymerasenkettenreaktionen (PCR) unterworfen, woran sich je ein *Dpn*I-Verdau bei 37 °C anschloss, was zum Abbau der

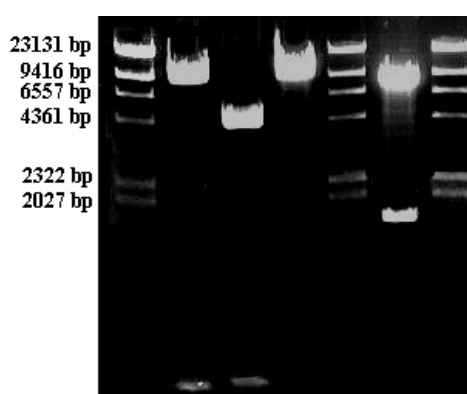


während der PCR als Vorlage dienenden Ausgangs-DNA führte. Danach wurden die gesamten Ansätze in kompetente DH5 $\alpha$  transformiert (siehe Kap. 5.3.7; S. 90), woraus die Plasmide nach ihrer Vervielfältigung analog Kap. 5.3.2 (S. 87) wieder isoliert werden konnten.

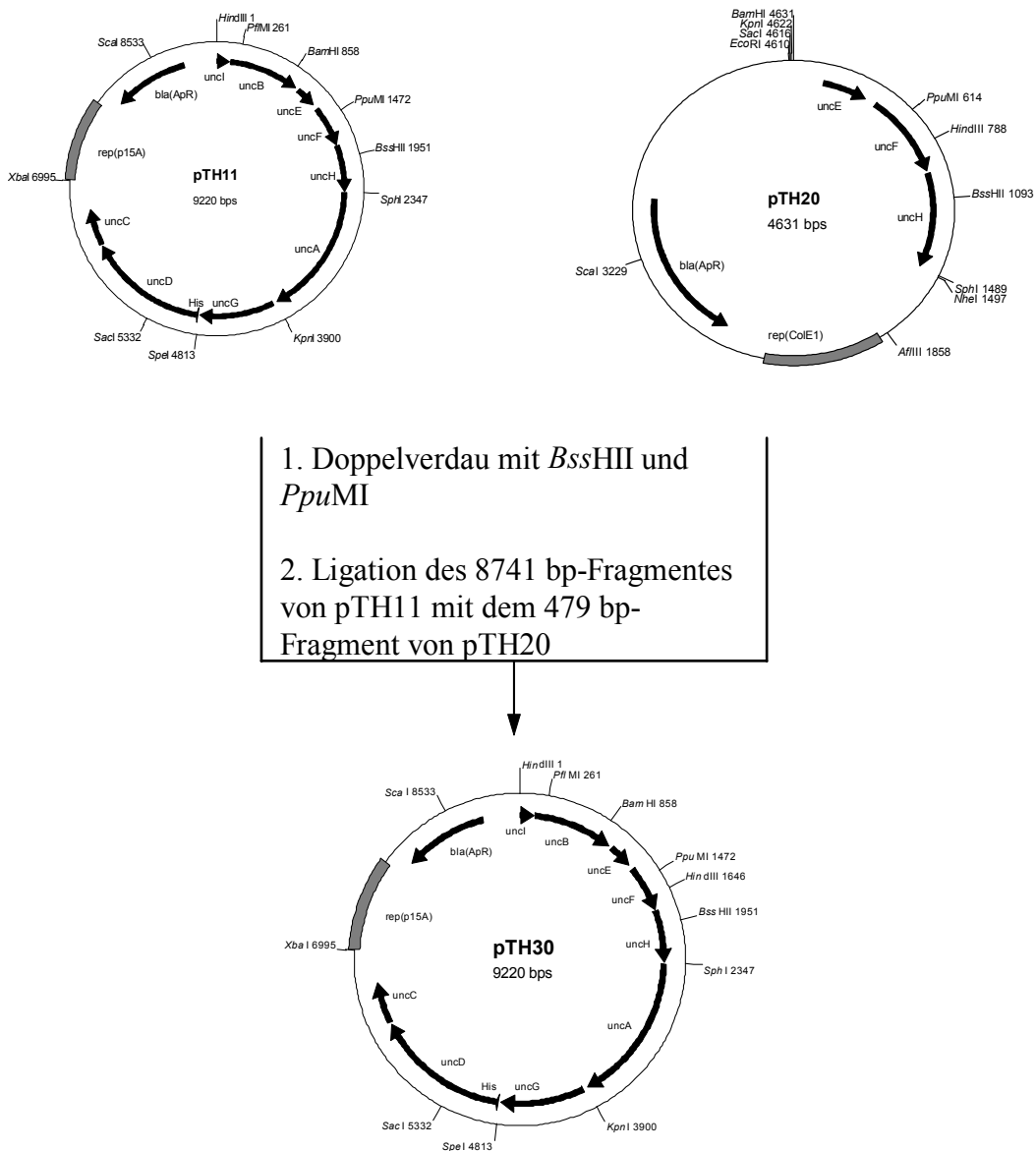
### 3.2.2.3 Umklonierung der mutierten Bereiche in pTH11

Zum Abschluss wurden die mutierten Bereiche aus den Plasmiden pTH13 - 22 ausgeschnitten und in das Expressionsplasmid pTH11 eingesetzt. In den Abb. 3.23 und 3.24 ist dies am Beispiel des Plasmids pTH20 bzw. dessen Expressionsplasmids pTH30, welche die Mutation bE112C tragen, gezeigt. Durch die Mutation war eine zusätzliche *Hind*III-Schnittstelle entstanden.

pTH11 bzw. pTH13 - 22 wurden mit den Restriktionsenzymen *Bss*HII und *Ppu*MI verdaut. Auf dem anschließend angefertigten Agarosegel waren in beiden Fällen zwei Banden zu erkennen, die im Falle von pTH11 479 bp und 8741 bp (siehe Abb. 3.23, Bahn 2) und im Falle von pTH13 - 22 479 bp und 4152 bp groß waren (siehe Abb. 3.23, Bahn 3). Nach Isolierung, analog Kap. 5.3.5 (S. 89), wurden die verschiedenen kleinen Fragmente der Plasmide pTH13 - 22 mit dem 8741 bp großen Fragment von pTH11 ligiert (5 Stunden bei 37°C oder für 16 - 18 Stunden bei 16°C) und in DH5 $\alpha$  transformiert.



**Abbildung 3.23:** Verdau der Plasmide pTH11, pTH20 und pTH30 mit den Enzymen *Bss*HII, *Hind*III und *Ppu*MI aufgetragen auf ein 0,9 %-iges Agarosegel: Bahn 1:  $\lambda$ -DNA/*Hind*III, Bahn 2: pTH11/*Bss*HII/*Ppu*MI, Bahn 3: pTH20/*Bss*HII/*Ppu*MI, Bahn 4: pTH20/*Hind*III, Bahn 5:  $\lambda$ -DNA/*Hind*III, Bahn 6: pTH30/*Hind*III und Bahn 7:  $\lambda$ -DNA/*Hind*III.



**Abbildung 3.24:** Umklonierung der mutierten Bereiche aus pTH13 - 22 in pTH11 dargestellt am Beispiel von pTH20. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BssHIII* und *PpuMI* wurden die mutierten Bereiche aus den Plasmiden pTH13 - 22 (hier: pTH20) ausgeschnitten und mit dem 8741 bp großen Fragment aus einem pTH11/*BssHIII*/*PpuMI*-Verdau ligiert. Die entstandenen Expressionsplasmide wurden mit pTH23 - 32 (hier: pTH30) bezeichnet.

Das Gelingen des Umklonierens ist in Abb. 3.23 am Beispiel von pTH30 gezeigt. Wie aus der Plasmidkarte von pTH11 (siehe Abb. 3.24) hervorgeht, enthält dieses nur eine *HindIII*-Schnittstelle. Da durch die Mutation in *uncF* des Plasmids pTH20 eine weitere eine *HindIII*-Schnittstelle generiert und der mutierte Bereich in pTH11 umkloniert wurde, sollte das resultierende Plasmid pTH30 nach Abb. 3.24 zwei solche Schnittstellen enthalten. Dies konnte durch einen pTH30/*HindIII*-Verdau nachgewiesen werden (Abb. 3.23, Bahn 6). Zum

Vergleich wurde auf Bahn 4 das mit *HindIII* nur einmal geschnittene Plasmid pTH20 aufgetragen.

Die in die Expressionsplasmide pTH23 - 32 eingefügten mutierten Bereiche wurden zur Bestätigung der Richtigkeit ihrer Sequenzen mit den Sequenzierprimern 3 und 4 (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) von der Firma Davissequencing aus Kalifornien sequenziert. Die Plasmide pTH23 und pTH25 - 32 wiesen die korrekten Sequenzen auf. Bei pTH24 hingegen stellte sich heraus, dass es bei dessen Herstellung im Bereich der verwendeten Primer zur Deletion einer Base an der Aminosäureposition b109 gekommen war. Die so exprimierten b<sub>2</sub>-Untereinheiten besitzen zwar die gewünschte Mutation A105C, haben aber aufgrund der durch die Deletion hervorgerufenen Verschiebung des Leserahmens eine andere Länge und ab der Aminosäureposition b109 eine andere Sequenz als geplant (siehe Kap. 3.2.7; S. 64).

In Tabelle 3.6 sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Untereinheit b von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> durchgeführten Mutationen, die hierzu benutzten Primer und die Bezeichnungen der so erzeugten Plasmide (sowohl der Subclone als auch der Expressionsplasmide) zusammengestellt.

Position der Mutation in b	Verwendete Primer	Plasmidbezeichnung der Subclone	Bezeichnung der Expressionsplasmide
A103C	103 A und 103 B	pTH13	pTH23
A105C	105 A und 105 B	pTH14	pTH24
Q106C	106 A und 106 B	pTH15	pTH25
E108C	108 A und 108 B	pTH16	pTH26
I109C	109 A und 109 B	pTH17	pTH27
E110C	110 A und 110 B	pTH18	pTH28
A111C	111 A und 111 B	pTH19	pTH29
E112C	112 A und 112 B	pTH20	pTH30
R113C	113 A und 113 B	pTH21	pTH31
K114C	114 A und 114 B	pTH22	pTH32

**Tabelle 3.6:** Zusammenstellung der im Rahmen dieser Arbeit bzgl. der b<sub>2</sub>-Untereinheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase durchgeführten Mutationen mit den resultierenden Plasmiden.

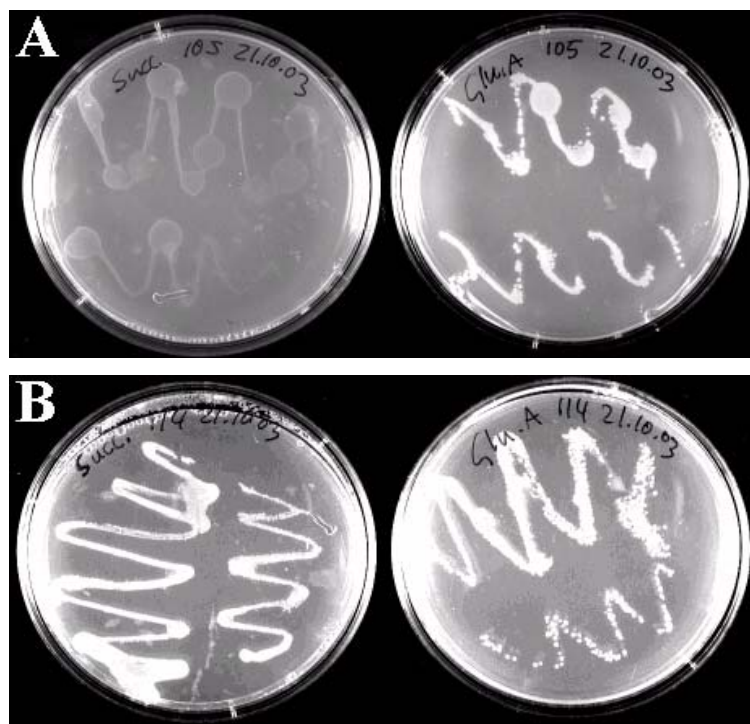
### 3.2.3 Wachstumskontrolle der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten

Da der *E. coli*-Stamm DK8  $\Delta(uncB-uncC)$  ist und somit von sich aus keine F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> herstellen kann, wurde er zur Expression der unterschiedlichen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten verwendet. Zur Kontrolle, ob eine funktionsfähige F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> exprimiert wurde, erfolgte der Ausstrich der mit den einzelnen Expressionsplasmiden pTH11 und pTH23 - 32 transformierten DK8 auf succinat- bzw. glucosehaltigem Minimalmedium (siehe Kap. 5.2.1; S. 81). Im Falle des succinathaltigen Minimalmediums erfolgt die ATP-Synthese ausschließlich über die oxidative Phosphorylierung, wobei Succinat durch die Succinat-Dehydrogenase in Fumarat umgewandelt wird und aus FAD FADH<sub>2</sub> entsteht, das Elektronen in die Atmungskette auf Ubichinon übertragen kann. Im Gegensatz dazu kann bei Verwendung von glucosehaltigem Minimalmedium ATP über die Glykolyse gewonnen werden, sodass die oxidative Phosphorylierung zum Überleben bzw. für das Wachstum der Zellen nicht zwingend erforderlich ist.

Werden nun *E. coli*-Zellen, die nicht fähig sind F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> zu exprimieren, auf succinathaltigem Minimalmedium ausgestrichen, so wird im Gegensatz zu Zellen, die auf glucosehaltigem Minimalmedium ausgestrichen wurden, kein Zellwachstum sichtbar sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen DK8, die mit den Plasmiden pTH11 und pTH23 - 32 transformiert waren und in Form von Glycerinkulturen vorlagen, mittels einer Impföse jeweils zuerst auf succinathaltigem und dann ohne die Impföse zwischendurch auszuglühen auf glucosehaltigem Minimalmedium ausgestrichen.

Nach 48 Stunden bei 37 °C konnte auf allen succinat- und glucosehaltigen Minimalmedium-Platten mehr oder minder starkes Wachstum festgestellt werden. Als Negativkontrolle, um zu sehen, dass die verwendeten DK8 ansonsten gesund waren, wurden diese Zellen ohne Plasmid in gleicher Weise ausgestrichen. Es zeigte sich, dass bei den succinathaltigen Platten keine Kolonien erhalten wurden, hingegen bei glucosehaltigen und LB-Platten gutes Wachstum vorlag. In der Abbildung 3.25 sind die Agarplatten mit succinathaltigem (jeweils links) und glucosehaltigem (jeweils rechts) Minimalmedium dargestellt, die zur Kontrolle des Zellwachstums von DK8pTH24 (A) und von DK8pTH32 (B) angefertigt wurden. Auffallend hierbei ist, dass auf succinathaltigem Minimalmedium die DK8pTH24 (A, links) ein deutlich schlechteres Wachstum aufweisen als die DK8pTH32 (B, links). Möglicherweise ist dies auf die Deletion im *uncF*-Gen von pTH24 und die damit veränderte Länge bzw. Aminosäuresequenz von b<sub>2</sub> zurückzuführen (siehe Kap. 3.2.2.3; S. 50 und 3.2.7; S. 64). Diese

Vermutung wird dadurch unterstützt, dass alle anderen untersuchten Systeme (DK8pTH11, pTH23 und pTH25 - 31) ein ähnliches Wachstum zeigten wie die DK8pTH32.



**Abbildung 3.25:** Wachstumskontrolle von DK8pTH24 (A) und DK8pTH32 (B): Die Bakterienkulturen, die in Form von Glycerinkulturen vorlagen, wurden mit Hilfe einer Impföse jeweils zuerst auf succinathaltigem (links dargestellt) und dann ohne die Impföse auszuglühen auf glucosehaltigem Minimalmedium (rechts dargestellt) ausgestrichen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte für 48 Stunden bei 37°C.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten  $b$ -Mutanten funktionsfähige  $F_0F_1$  exprimiert haben, die ein Wachstum auf succinathaltigen Platten erlaubte.

### 3.2.4 Isolierung der $F_0F_1$ -Mutanten und Nachweis ihrer $b_2$ -Untereinheiten

#### 3.2.4.1 Expression, Modifizierung und Aufreinigung der $F_0F_1$ -Mutanten

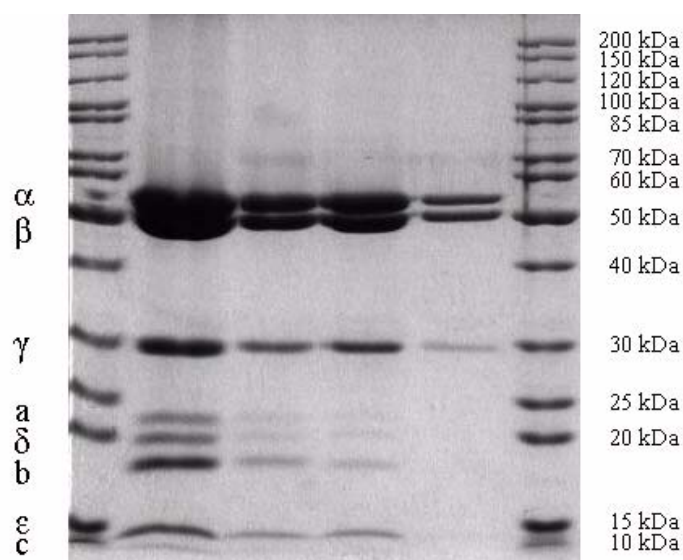
Die unterschiedlichen  $F_0F_1$ -Mutanten wurden in DK8-Zellen exprimiert, wobei aus einem Liter TB + 1,1% Glucose-Medium 10 - 15 g Zellen erhalten wurde (siehe Kap. 5.5.2; S. 106). Nach einem einmaligen Waschen der Zellen in STEM-Puffer wurden die Bakterien im gleichen Puffer resuspendiert und mittels einem EmulsiFlex-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen und unlöslichen Zelltrümmern in einer

Beckman Kühlzentrifuge erfolgte eine Zentrifugation in einem Ti 60 Rotor bei 55000 rpm zur Abtrennung der bei dem Aufschluss entstandenen  $F_0F_1$ -enthaltenen Inside-out-Vesikeln. Diese wurden der Reihe nach mit TES50+PAB-Puffer, TES5+PAB-Puffer und His1-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Resuspendierungsschritt eine Zentrifugation wie oben folgte (siehe Kap. 5.5.2.2; S. 107 und Kap. 5.5.2.3.2; S. 109).

Für gewöhnlich wird die Modifizierung von Proteinen mit Spinlabeln an gereinigtem Protein durchgeführt. Nach einer Reihe von Untersuchungen, bei denen unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet wurden, erfolgte das Labeling der  $b_2$ -Untereinheit während der Solubilisierung des  $F_0F_1$ -Komplexes aus den Inside-out-Vesikeln. Als Detergenz wurde *n*-Octyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid verwendet. Als Folge davon entfielen sowohl ein separater Labelingschritt, der bei einer Modifizierung von gereinigtem Protein notwendig gewesen wäre, als auch ein weiterer säulenchromatographischer Schritt zum Abtrennen von nicht gebundenen Spinlabel. Dies führte zu einer Zeiteinsparung und durch den Wegfall des zusätzlichen Reinigungsschrittes auch zu einer Erhöhung der Ausbeute an modifiziertem Protein. Die gereinigten *E. coli*-Membrane wurden pro 100 mg Membranpellet mit je 2 ml His2-Puffer (siehe Kap. 5.5.2.3.2; S. 109) und 2  $\mu$ l einer 100 mM IAAT-Lösung (in DMSO) versetzt, resuspendiert und für 2 Stunden bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach Abtrennung von ungelösten Bestandteilen in einer Eppendorf Tischzentrifuge, wurde der Überstand auf eine mit His2-Puffer vorbereitete Ni-NTA-Agarose-Säule aufgetragen. Nach Waschen mit 20 ml His2-Puffer, erfolgte die Elution mit viermal 1,5 ml His3-Puffer (siehe Kap. 5.5.2.3.2; S. 109). Die unterschiedlichen  $F_0F_1$ -Mutanten eluierten im allgemeinen in den Fraktionen 2 und 3.

Aus einem Liter Medium (10- 15 g Zellen) wurden 1,1 - 2,3 mg reine  $F_0F_1$  mit einer spezifischen Aktivität von 14,4 - 26,2 U / mg (siehe Kap. 5.6.2; S. 111) erhalten. Eine Ausnahme bildete hierbei die schon erwähnte Mutante bA105C, die aus dem System DK8pTH24 (Deletion einer Base im *uncF* von pTH24) isoliert wurde. In diesem Falle wurde aus einem Liter Medium nur 0,3 mg Protein mit einer nicht messbaren Aktivität isoliert.

Abb. 3.26 zeigt ein 12 %-iges SDS-Gel auf dem jeweils Proben der Elutionsfraktionen 2 und 3 von Isolierungen der mit IAAT gelabelten  $F_0F_1$ -Mutanten bA111C und bE112C aufgetragen wurden. Die Zuordnung der unterschiedlichen Banden zu den einzelnen  $F_0F_1$ -Untereinheiten erfolgte durch eine Gegenüberstellung (siehe Tabelle 3.7) der mittels Vergleich mit den Banden des Proteinmarkers grob abgeschätzten Massen der einzelnen Proteine aus Abb. 3.14 mit Literaturwerten (Senior & Wise, 1983).



**Abbildung 3.26:** 12 %iges SDS-Gel mit Proben (14 - 45 mg Protein) der Elutionsfraktionen 2 und 3, die aus Isolierungen der  $F_0F_1$ -Mutanten bA111C und bE112C stammten. Als Standard wurde der Proteinmarker #SM0661 von MBI Fermentas, der Banden im Bereich von 10 -200 kDa besitzt, aufgetragen. Bahn 1: #SM0661, Bahn 2: Fraktion 2 von  $F_0F_1$ bA111C, Bahn 3: Fraktion 3 von  $F_0F_1$ bA111C, Bahn 4: Fraktion 2 von  $F_0F_1$ bE112C, Bahn 5: Fraktion 3 von  $F_0F_1$ bE112C und Bahn 6: #SM0661. c färbt nur sehr schlecht mit Coomassie.

$F_0F_1$ -Untereinheit	Masse in [kDa] aus Abb. 3.14	Masse in [kDa] nach Senior & Wise (1983)
$\alpha$	55	55,3
$\beta$	49 - 51	50,2
$\gamma$	29 - 30	31,4
$\delta$	19	19,6
$\epsilon$	15	14,9
a	22 - 23	30,3
b	17	17,3
c	< 10	8,3

**Tabelle 3.7:** Gegenüberstellung der durch Vergleich mit den Proteinmarkerbanden grob abgeschätzten Massen der einzelnen Proteine aus Abb. 3.26 mit Literaturwerten (Senior & Wise, 1983).

Ein Blick auf Tabelle 3.7 zeigt, dass im allgemeinen eine gute Übereinstimmung zwischen den aus Abb. 3.26 ermittelten Massen und den veröffentlichten Werten besteht. Nur im Falle der a-Untereinheit von  $F_0$  kommt es zu Abweichungen (22 - 23 kDa aus Abb. 3.26 und 30,3

kDa nach Senior & Wise, 1983). Vergleicht man dies mit Abbildungen von SDS-Gelelektrophoresen in anderen Publikationen, so stellt man fest, dass die a-Untereinheit dort eine geschätzte (es werden nur Gelbilder gezeigt ohne jegliche Größenangaben) Größe von etwa 26 - 27 kDa (Kuo *et al.*, 1998) bzw. etwa 22 - 23 kDa (Pänke *et al.*, 2000) aufweist, was mit unseren Werten korreliert.

Abb. 3.26 zeigt, dass die Bande der c-Untereinheit nur sehr schwach zu erkennen ist, was daran liegt, dass c nur sehr schlecht mit Coomassie färbt, wie auch schon früher festgestellt wurde (Kuo *et al.*, 1998).

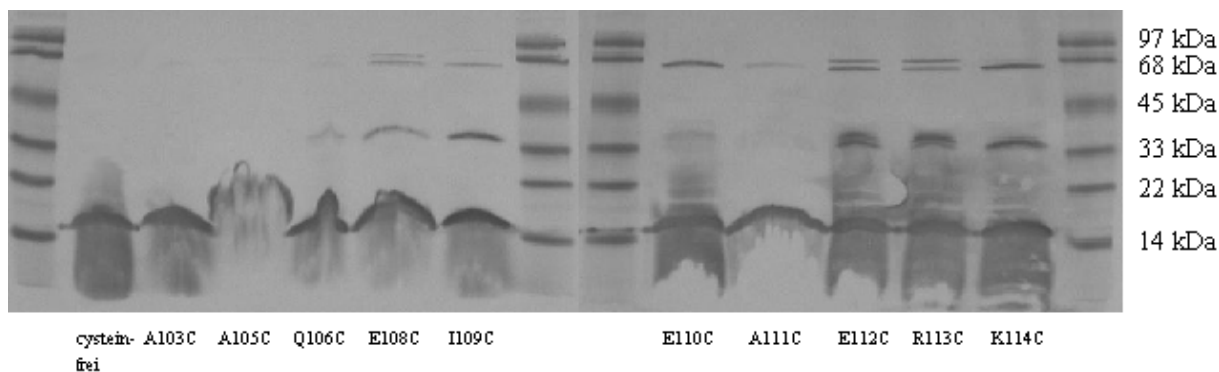
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode  $F_0F_1$  per Ni-NTA-Agarose aufzureinigen eine schnelle und bequeme Möglichkeit zur Isolation von Protein hoher Reinheit darstellt.

#### **3.2.4.2 Nachweis der $b_2$ -Untereinheiten in den unterschiedlichen ATP-Synthase-Mutanten**

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Zuordnung der Proteinbanden aus Abb. 3.26 zu den jeweiligen  $F_0F_1$ -Untereinheiten wurde nach der Isolierung jeder ATP-Synthasemutante (cysteinfreie  $F_0F_1$  bzw.  $F_0F_1b103$ , 105, 106 und 108 - 114) durchgeführt. Obwohl durch diese Vorgehensweise davon ausgegangen werden konnte jeweils das komplette Enzym isoliert zu haben, erfolgte bei allen aufgereinigten Enzymen der direkte Nachweis von b per Western-Blot. Hierzu wurden die nach Modifizierung mit IAAT und Isolierung der erhaltenen Proteine mittels 12 %-iger SDS-Gelelektrophoresen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der einzelnen  $b_2$ -Untereinheiten erfolgte nun durch anti-b-Antikörper, wobei analog Kap. 5.6.4 (S. 113) vorgegangen wurde.

Die so erhaltenen Blots sind in Abb. 3.27 dargestellt und zeigen das Vorhandensein von b bei allen untersuchten  $F_0F_1$ -Mutanten, was an den Banden zwischen 14 und 22 kDa erkennbar ist. Neben diesen von b-Monomer stammenden sind noch weitere Banden bei etwa 35 kDa ( $F_0F_1b108$ , 109 und 111 - 114) bzw. etwa 66 kDa ( $F_0F_1b108$  - 114) sichtbar, was auf b-Dimere bzw. höhere Konjugate hindeutet. Die unvollständige Reduktion und Dissoziation eventueller b-Dimere sind wahrscheinlich auf die Inkubationsbedingungen der auf die SDS-Gelelektrophoresen aufgetragenen Proben zurückzuführen.



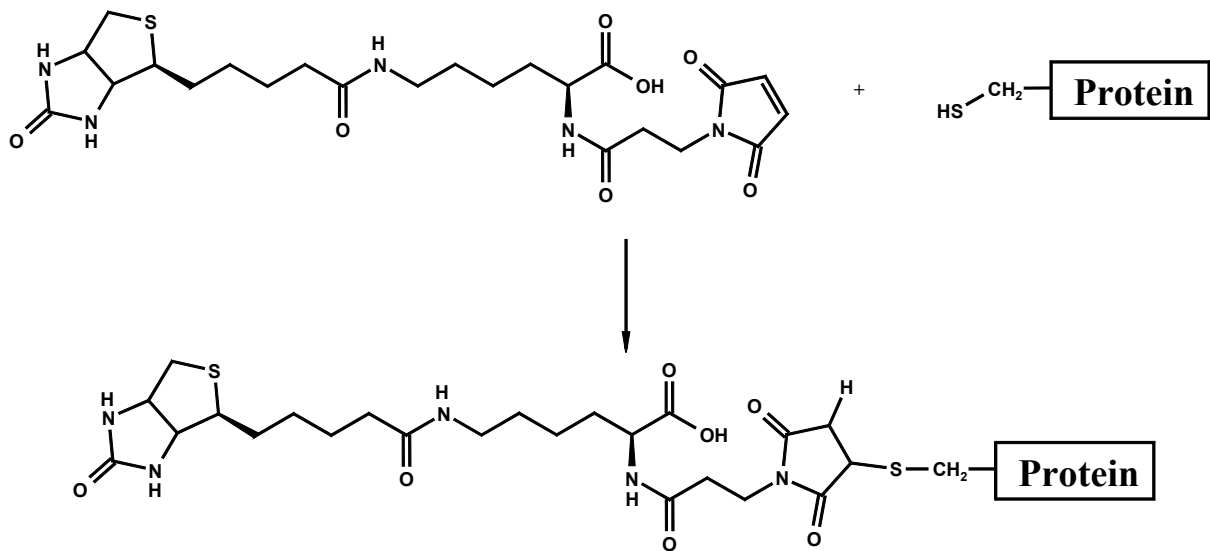


**Abbildung 3.27:** Nachweis der  $b_2$ -Untereinheiten der unterschiedlichen  $F_0F_1$ -Mutanten mittels anti- $b_2$ -Antikörpern. Die Auftrennung der Proben (jeweils 20  $\mu\text{g}$ ) erfolgte durch 12 %-ige SDS-Gele, wobei als Standard der Proteinmarker „Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“ von BIO-Rad, der Banden im Bereich von 14 - 97 kDa besitzt, verwendet wurde. Bahn 1: Standard, Bahn 2: cysteinfreie  $F_0F_1$ , Bahn 3:  $F_0F_1bA103C$ , Bahn 4:  $F_0F_1bA105C$ , Bahn 5:  $F_0F_1bQ106C$ , Bahn 6:  $F_0F_1bE108C$ , Bahn 7:  $F_0F_1bI109C$ , Bahn 8 und 9: Standard, Bahn 10:  $F_0F_1bE110C$ , Bahn 11:  $F_0F_1bA111C$ , Bahn 12:  $F_0F_1bE112C$ , Bahn 13:  $F_0F_1bR113C$ , Bahn 14:  $F_0F_1bK114C$  und Bahn 15: Standard.

Interessant in diesem Zusammenhang ist der Vergleich von Abb. 3.27 mit den Crosslink-Experimenten an den verschiedenen  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten (siehe Abb. 3.5; S. 21). So zeigt sich hier wie dort, dass es bei den Proteinen mit den Mutationen an den Aminosäurepositionen 106, 108, 112 und 113 zur Ausbildung von  $b$ -Dimeren kam, wohingegen bei 103, 105 und 111 keine (oder nur in sehr geringem Maße) festgestellt werden konnte. Abweichungen treten bei den Mutanten 103, 105, 110, 112 und 114 auf, wobei das Ausbleiben eines Crosslinks bei der  $F_0F_1$ -Mutante  $bA105C$  auch auf die durch den Frameshift bedingt veränderte Struktur von  $b_2$  zurückzuführen sein kann. Generell lässt sich sagen, dass die Unterschiede zwischen den Crosslink-Experimenten aus Kap. 3.1.4.1 (S. 19) und den in Abb. 3.27 dargelegten Ergebnissen auf unterschiedliche Quartärstrukturen von  $b_2$  im  $F_0F_1$ -Gesamtkomplex im Gegensatz zu  $b_{\text{syn}}$  deuten.

### 3.2.5 MPB-Labeling der einzelnen $F_0F_1$ -Mutanten

Die Zugänglichkeit ihrer Cysteine wurde bei den unterschiedlichen  $F_0F_1$ -Mutanten mit Hilfe einer Modifizierung mit MPB (N-(3-Maleimidopropionyl)-biocytin) und anschließender Nachweisreaktion bestimmt. Wie aus Abb. 3.28 zu erkennen ist, kommt es bei der Reaktion von MPB mit Cystein zu einer Addition der Thiolgruppe an die Doppelbindung im Maleimidoyl-Rest von MPB.



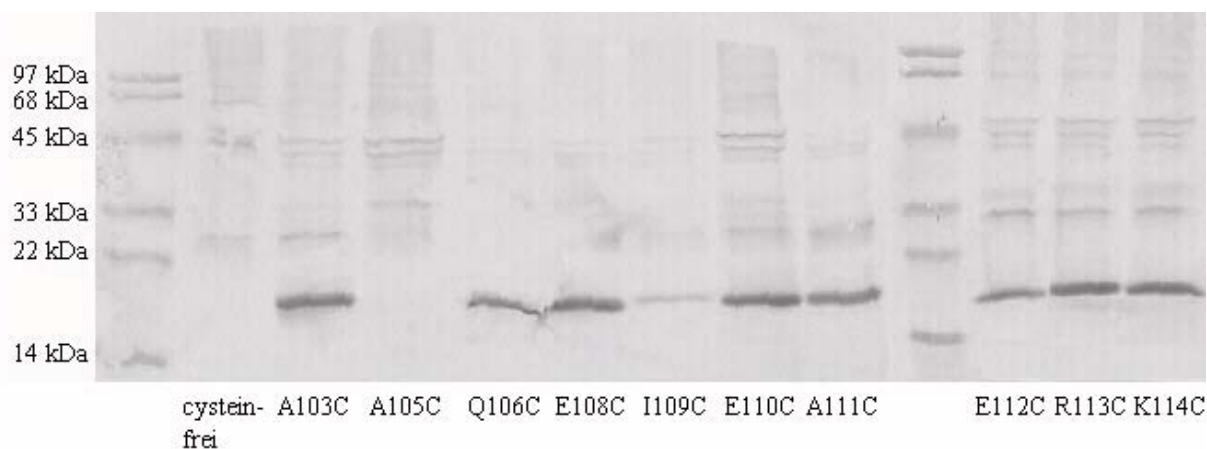
**Abbildung 3.28:** Reaktion von MPB mit der Cysteingruppe eines Proteins.

Durch Zugabe eines an Avidin gebundenen Enzyms (z.B. alkalische Phosphatase), das an die Biocytin-Gruppe bindet und eine Farbreaktion katalysiert, kann so die Cystein-MPB-Bindung und damit die Zugänglichkeit der im Protein enthaltenen Cysteine für MPB sichtbar gemacht werden. Dies wiederum lässt Rückschlüsse auf die Position der Cysteine im Protein bzw. auf die Proteinstruktur zu.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde so vorgegangen, dass direkt nach Aufschluss der Zellen und Erhalt der Inside-out-Vesikel diese mit MPB umgesetzt und danach solubilisiert wurden. Daraufhin erfolgte die Isolierung der unterschiedlichen Mutanten über Ni-NTA-Agarose und eine SDS-Gelelektrophorese. Nach Beendigung der SDS-Gel-Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem Avidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat inkubiert. Im Anschluss daran wurde analog Kap. 5.6.5 (S. 115) verfahren.

Die hierbei erhaltenen Blots sind in Abb. 3.29 dargestellt und zeigen bei den F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten 103, 106, 108 und 110 - 114 ein starkes Labeling. Bei den Mutanten 105 und 109 wurde keine oder nur eine schwache Farbentwicklung erhalten. Da in allen Fällen etwa gleiche Proteinmengen verwendet wurden (30 - 38 µg) bedeutet dies, dass die Cysteine von 105 und in geringerem Maße von 109 nicht so gut für MPB zugänglich sind wie diejenigen der restlichen Mutanten. Zurückzuführen ist dies darauf, dass die Cysteine von 105 und 109 entweder im Proteininneren platziert und so völlig abgeschirmt sind, oder es zur Ausbildung von Disulfidbindungen im Proteinkomplex gekommen war, die eine Modifizierung mit MPB

ebenfalls verhindern würde. Dieser Befund korreliert mit den Aussagen von Kap. 3.1.4.1 (s. 19), wonach die Positionen 105 und 109 in Richtung des b-b-Interfaces orientiert sind.



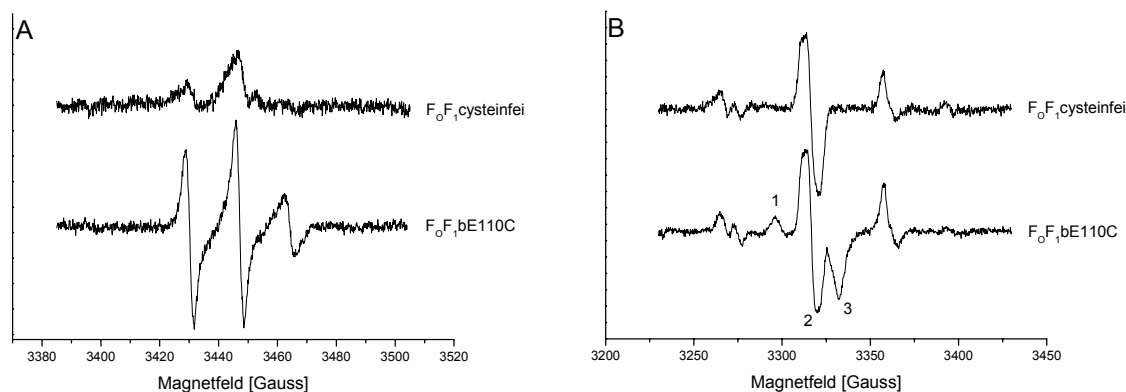
**Abbildung 3.29:** Bestimmung der Zugänglichkeit der in den  $b_2$ -Untereinheiten der unterschiedlichen  $F_0F_1$ -Mutanten enthaltenen Cysteine mittels MPB-Labeling. Die Auftrennung der Proben (30 - 38  $\mu\text{g}$ ) erfolgte durch 12 %-ige SDS-Gele, wobei als Standard der Proteinmarker „Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“ von BIO-Rad, der Banden im Bereich von 14 - 97 kDa besitzt, verwendet wurde. Bahn 1: Standard, Bahn 2: cysteinfreie  $F_0F_1$  (Negativkontrolle), Bahn 3:  $F_0F_1bA103C$ , Bahn 4:  $F_0F_1bA105C$ , Bahn 5:  $F_0F_1bQ106C$ , Bahn 6:  $F_0F_1bE108C$ , Bahn 7:  $F_0F_1bI109C$ , Bahn 8:  $F_0F_1bE110C$ , Bahn 9:  $F_0F_1bA111C$ , Bahn 10: Standard, Bahn 11:  $F_0F_1bE112C$ , Bahn 13:  $F_0F_1bR113C$  und Bahn 14:  $F_0F_1bK114C$ .

### 3.2.6 ESR-spektroskopische Untersuchung der verschiedenen $F_0F_1$ -Mutanten

Die ersten ESR-spektroskopische Untersuchungen am gesamten  $F_0F_1$ -ATP-Synthasekomplex erfolgten an der Mutante  $F_0F_1bE110C$ . Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung des Labels am Protein bzw. für eine Partition in Micellen wurde die cysteinfreie Mutanten ebenfalls untersucht. Die während der Aufarbeitung mit IAAT umgesetzten und mittels Nickel-NTA-Agarose isolierten Enzyme (siehe Kap. 5.5.2.3.2; S. 109) wurden mit Hilfe von CentriconYM30-Konzentratoren auf etwa je 100  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert. Die hierbei erhaltenen Spektren, die wie in Kap. 5.6.6.2 (S. 121) beschrieben bei 193 K und 293 K aufgenommen wurden, sind in Abb. 3.30 zusammengestellt.

Das bei 293 K aufgenommene Spektrum des Systems  $F_0F_1bE110C*IAAT$  zeigt das für proteingebundenen IAAT typische Dreilinienspektrum, wie es z.B. aus Abb. 3.7 bekannt ist. Hingegen ist das bei gleicher Temperatur aufgenommene Spektrum der cysteinfreien

Mutante für diesen Spinlabel eher ungewöhnlich (siehe Abb. 3.30A). Die Feldpositionen der dort registrierten Signale stimmen zwar mit denen eines Nitroxidradikals überein, doch sind die Formen der Signale alles andere als IAAT-charakteristisch.

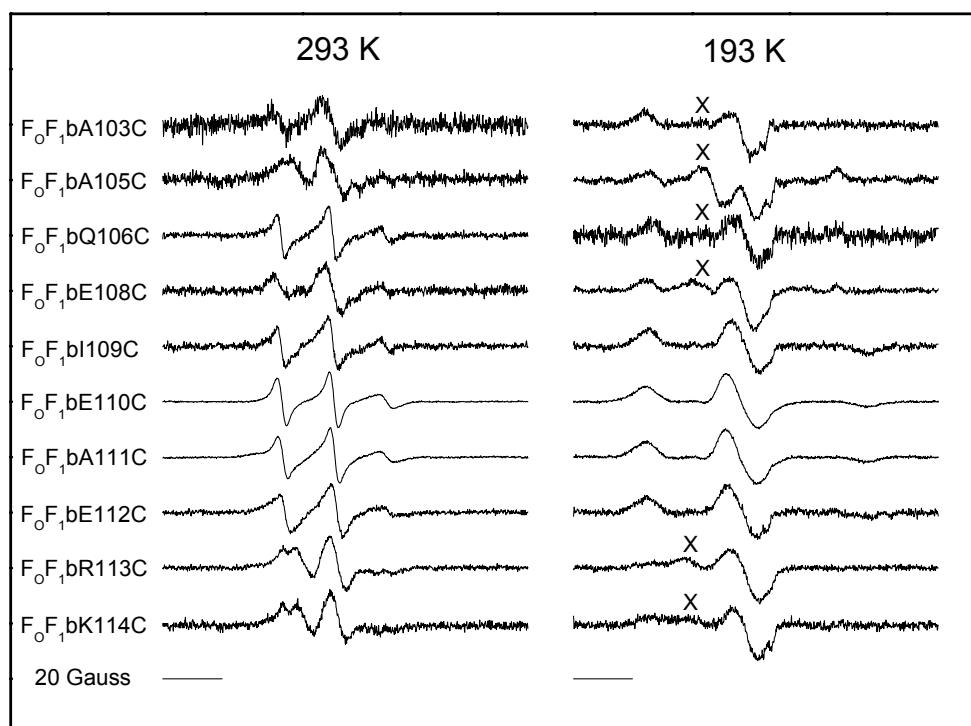


**Abbildung 3.30:** ESR-Spektren von der cysteinfreien  $F_0F_1$  bzw. von  $F_0F_1$ bE110C in His3-Puffer nach Inkubation mit IAAT (siehe Kap. 5.5.2.3.2; S. 109). Die Spektren wurden bei 293 K (A) bzw. 193 K (B) an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern registriert: Mikrowellenfrequenz 9,7 GHz (A) bzw. 9,3 GHz (B); Mikrowellenleistung 12,7 mW (A) bzw. 0,63 mW (B); Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 2G; Konversionszeit 41 ms (A) bzw. 164 ms (B); Receiver Gain  $3,99 \cdot 10^6$  (A) bzw.  $2,52 \cdot 10^6$  (B); Spektrenbreite 120 G (A) bzw. 200 G (B); Zeitkonstante 10 ms (A) bzw. 41ms (B) (siehe Kap. 5.6.6.2; S. 121).

In Abb. 3.30B sind die bei 193 K aufgenommenen Spektren zusammengestellt. Beide Spektren weisen eine recht ungewöhnlich Form auf, wobei das des Systems  $F_0F_1$ bE110C\*IAAT im Vergleich zum Spektrum der cysteinfreien  $F_0F_1$  zusätzliche Komponenten (Nr. 1 und 2 in Abb. 3.30B) aufweist. Ein Vergleich dieser mit dem Signal eines charakteristischen IAAT-Signals bei 193 K (Abb. 3.4 und Abb. 3.8) führte zu dem Schluss, dass diese Komponenten von einem Nitroxidradikal herrührten, da eine Übereinstimmung in Form und Feldpositionen festzustellen war. Auch der mit 2 gekennzeichnete negative Anteil des mittleren Peaks deutete auf einen Spinlabel hin, da er im Vergleich mit seinem Äquivalent im Spektrum der cysteinfreien Mutante vom Betrag her kleiner ausfiel. Dies war dadurch erklärbar, dass er vom positiven Anteil des Mittelfeldsignals von IAAT überlagert wurde. Zusammenfassend bedeutet dies, dass das bei 193 K von  $F_0F_1$ bE110C\*IAAT aufgenommene Spektrum aus zwei sich überlagernden Spektren aufgebaut wurde, wobei eines vergleichbar mit dem von  $F_0F_1$ cysteinfrei ist und das andere von IAAT stammte.

Da das System  $F_0F_1$ cysteinfrei keine Cysteine enthält sollte es theoretisch zu keiner Bindung von IAAT kommen. Allerdings ist es möglich, dass es zu einer unspezifischen Bindung des Labels am Protein bzw. zur Partition in Micellen gekommen ist. Desweiteren ist es möglich, dass die zusätzlichen Signale in Abb. 3.30 nicht von Spinlabel stammen, sondern von Nickelionen, die sich vom Säulenmaterial abgelöst hatten und vermutlich an den His-Tags der Proteine gebunden waren. Da die vermessenen Proben nach der Isolierung mittels Nickel-NTA-Agarose nur aufkonzentriert und sonst nicht weiter behandelt wurden, war dies recht wahrscheinlich. Bestärkt wurde dieser Verdacht durch einen Vergleich mit bei tiefen Temperaturen aufgenommenen Spektren von Nickel-dotierten NaCl-Kristallen, die dem bei 193 K aufgenommenen Spektrum der cysteinfreien  $F_0F_1$ -Mutante sehr ähnlich waren (Shengelaya *et al.*, 1993). Im Folgenden wurden alle Proben vor dem Aufkonzentrieren im Verhältnis 1:1 mit einem EDTA-haltigen Puffer (100 mM, siehe Kap. 5.6.6.2; S. 121) versetzt. Die nach dieser Behandlung der unterschiedlichen  $F_0F_1$ -Mutanten erhaltenen Spektren, die analog Kap. 5.6.6.2 (S. 121) bei 293 K bzw. 193 K aufgenommen wurden, sind in Abb. 3.31 zusammengestellt und legen den Schluss nahe, dass tatsächlich Nickelionen für die zusätzlichen Signale aus Abb. 3.30 verantwortlich waren. Denn durch die EDTA-Zugabe konnten diese Signale reduziert bzw. entfernt werden.

Die Spektren der Mutanten 109 - 112 sind sowohl bei 293 K als auch bei 193 K ähnlich zu den Spektren von  $b_{syn}$  mit und ohne  $F_1$  (siehe Abb. 3.4, 3.7 und 3.8). Bei der Mutante 106 wurden bei 293 K ebenfalls ein für den verwendeten Spinlabel typisches Signal erhalten. Allerdings zeigte das Spektrum bei 193 K genauso wie die Tieftemperaturspektren der Mutanten 103, 105, 108 und 113 - 114 ein zusätzliches Signal (Abb. 3.31, rechts; mit X gekennzeichnet), das dem aus Abb. 3.30B bekannten Mittelfeldsignal bei etwa 3310 G entsprechen dürfte und daraufhin deutete, dass in den vermessenen Proteinproben immer noch Nickel vorhanden war. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Spektren der bei 293 K vermessenen Proben von 103, 105, 108 und 113 - 114. Hier erhielt man zwar Signale, die etwa bei den IAAT-typischen Feldpositionen erschienen, aber in ihrer Form völlig uncharakteristisch für diesen Spinlabel waren (siehe Abb. 3.31, links).



**Abbildung 3.31:** ESR-Spektren der unterschiedlichen mit IAAT modifizierten  $F_0F_1$ -Mutanten (3 - 19  $\mu M$ ) aufgenommen in einem 1:1-Gemisch aus His3-Puffer und ESR-Puffer bei 293 K und 193 K (siehe Kap. 5.5.2.3.2; S. 109 und 5.6.6.2). Die Messungen erfolgten an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,7 GHz (293 K) bzw. 9,3 GHz (193 K); Mikrowellenleistung 12,7 mW (293 K) bzw. 0,63 mW (193 K); Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 2G; Konversionszeit 41 ms (293 K) bzw. 164 ms (193 K); Receiver Gain  $1,00 \cdot 10^6$  -  $3,99 \cdot 10^6$  (293K und 193 K); Spektrenbreite 120 G; Zeitkonstante 10 ms (G (193 K).293 K) bzw. 41 ms (193 K) Zentralfeld 3450 G (293 K) bzw. 3330

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die durchgeführte Methode die unterschiedlichen ATP-Synthase-Mutanten zuerst mit Spinlabel zu modifizieren und dann zu isolieren prinzipiell funktioniert, allerdings noch optimiert werden muss. Selbst bei den Spektren der Mutanten 109 - 112 kann man nicht sicher sein, ob noch etwas Nickel bei den Messungen zu gegen war, was bei einer eventuellen Simulation verfälschte Ergebnisse liefern würde.

### 3.2.7 Das Plasmid pTH24: F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Mutante bA105C

Wie bereits erwähnt, sollte mit Hilfe der Primer 105A und 105B (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) eine Cysteinmutation an der Aminosäureposition 105 in der b<sub>2</sub>-Untereinheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> eingefügt werden. Hierzu wurde pTH12 einer gezielten Mutagenese mit 105A und 105B unterzogen, was das Plasmid pTH14 lieferte, aus dem der mutierte Bereich ausgeschnitten und in pTH11 eingefügt wurde. Die Sequenzierung von dem so entstandenen Plasmid pTH24 mit den Sequenzierprimern 3 und 4 zeigte aber, dass es zu einer ungewollten Deletion eines Adenins im inklonierten Bereich kam.

Durch die Deletion kam es zu einer Verschiebung des Leserahmens, was dazu führte, dass die b-Untereinheit um 7 Aminosäuren länger war, wie sie eigentlich hätte sein sollen und eine andere Aminosäuresequenz aufwies (siehe Abb. 3.32 und Abb. 3.33).

**A**

```

5'-gaacaggaacgtactaaaatcgtggcccagtgccaggcggaaattgaagccgag-3'
3'-cttgtccttgcgatgatttttagcaccgggtcacgggtccgcctttaacttcggctc-5'
  E  Q  E  R  T  K  I  V  A  Q  C  Q  A  E  I  E  A  E
  95                               100                   105                           110

```

**B**

```

5'-gaacaggaacgtactaaaatcgtggcccagtgccaggcggaaattgaagccgagc-3'
3'-cttgtccttgcgatgatttttagcaccgggtcacgggtccgccttaaacttcggctcgc-5'
  E  Q  E  R  T  K  I  V  A  Q  C  Q  A  E  L  K  P  S
  95                               100                   105                           110

```

**Abbildung 3.32:** Ausschnitt von *uncF* bzw. von b im Bereich der Aminosäureposition 95 - 112 der Mutante F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C. Abb. A zeigt die Sequenz wie sie hätte sein sollen, wobei die Deletion fett gedruckt ist. Abb. B zeigt die tatsächliche Sequenz, die nach Deletion erhalten wurde.

Die starken Änderungen in der Sequenz von b sind wohl auch die Ursachen für das schlechtere Wachstum des entsprechenden Expressionssystems DK8pTH24 (im Vergleich zu allen anderen untersuchten Mutanten) auf succinathaltigem Minimalmedium (siehe Kap. 3.2.3; S. 53). Ebenso dürfte sich dadurch die geringe Ausbeute und nicht nachzuweisende Aktivität der hieraus isolierten F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C erklären. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass frühere Experimente zeigten, dass es möglich ist b um bis zu 14 Aminosäuren zu verlängern und immer noch aktive F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> zu isolieren (Sorgen *et al.*,

1999). Allerdings wurde hierbei so vorgegangen, dass 7, 11 bzw. 14 Aminosäuren der natürlichen Sequenz von b ab Leucin56 dupliziert und an der Position 63, 67 bzw. 70 nochmals eingefügt wurden. Es kam also nur zu einer Verdopplung der natürlichen Aminosäuresequenz in einem bestimmten Bereich und nicht zu einer kompletten Sequenzänderung, wie im vorliegenden Fall. Für die geänderten Eigenschaften von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C dürfte also nicht die Verlängerung von b, sondern die radikale Änderung der Sequenz ab der Aminosäureposition 109 verantwortlich sein.

## A

V	N	L	N	A	T	I	L	G	Q	A	I	A	F	V	L	F	V	L	F	A	M	K	Y	V	W	P	P	L	M	A	A	I	E	K		
1		5		10		15		20		25		30		35																						
R	Q	K	E	I	A	D	G	L	A	S	A	E	R	A	H	K	D	L	D	L	A	K	A	S	A	T	D	Q	L	K	K	A	K	A		
		40		45		50		55		60		65		70																						
E	A	Q	V	I	I	E	Q	A	N	K	R	R	S	Q	I	L	D	E	A	K	A	E	A	E	Q	E	R	T	K	I	V	A	Q	<b>C</b>		
		75		80		85		90		95		100		105																						
Q	A	E	I	E	A	E	R	K	R	A	R	E	E	L	R	K	Q	V	A	I	L	A	V	A	G	A	E	K	I	I	E	R	S	V		
		110		115		120		125		130		135		140																						
D	E	A	A	N	S	D	I	V	D	K	L	V	A	E	L																					
		145		150		155																														

## B

V	N	L	N	A	T	I	L	G	Q	A	I	A	F	V	L	F	V	L	F	A	M	K	Y	V	W	P	P	L	M	A	A	I	E	K			
1		5		10		15		20		25		30		35																							
R	Q	K	E	I	A	D	G	L	A	S	A	E	R	A	H	K	D	L	D	L	A	K	A	S	A	T	D	Q	L	K	K	A	K	A			
		40		45		50		55		60		65		70																							
E	A	Q	V	I	I	E	Q	A	N	K	R	R	S	Q	I	L	D	E	A	K	A	E	A	E	Q	E	R	T	K	I	V	A	Q	<b>C</b>			
		75		80		85		90		95		100		105																							
Q	A	E	L	K	P	S	V	N	V	P	V	K	<b>S</b>	<b>C</b>	V	S	K	L	L	S	W	L	L	L	A	P	R	R	S	S	N	V	P	W			
		110		115		120		125		130		135		140																							
M	K	L	L	T	A	T	S	W	I	N	L	S	L	<b>N</b>	<b>C</b>	K	E	G	G	A	D	V															
		145		150		155		160																													

**Abbildung 3.33:** Geplante (A) und tatsächliche (B) Sequenz von b der Mutante F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C. Die Abweichung von der geplanten Sequenz ist bei B kursiv dargestellt. Alle Cysteine sind fett gedruckt.

Betrachtet man nun Abb. 3.33B, so stellt man fest, dass in der neu entstandenen Aminosäuresequenz von b zwei zusätzliche Cysteine an den Aminosäurepositionen 120 und 156 entstanden ist. Geht man von einer  $\alpha$ -helikalen Struktur aus, so haben diese beiden Cysteine die gleiche Orientierung wie das von Position 105, da die Positionen 120 bzw. 156



etwa 4 bzw. 14 ganze Helixumdrehungen von 105 entfernt sind (bei 3,6 Aminosäuren pro Umdrehung).

Aus den Modifizierungsversuchen mit MPB wissen wir, dass die Cysteine in b von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C nicht gelabelt werden konnten. Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass sie nicht zugänglich waren und/oder es zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen aus zwei b-Monomeren kam. Dies würde bedeuten, dass sich nicht nur die Position 105, wie schon in 3.1.4.1 vermutet, im b-b-Interface befindet, sondern auch die Positionen 120 und 156.

Beim Western-Blotting mit anti-b-Antikörpern zeigte sich, dass bei F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C keine b-b-Dimere entstanden sind, was allerdings nicht dagegen spricht, dass sich die Positionen im b-b-Interface befinden. Die Cysteine an diesen Positionen könnten so schlecht zueinander orientiert gewesen sein, dass es einfach zu keiner Reaktion untereinander kommen konnte.

Aufgrund dessen, dass bei F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>bA105C neben den Cysteinen an der Position 105 auch welche bei 120 und 156 vorlagen, sind die Ergebnisse aus den ESR-spektroskopischen Untersuchungen (siehe Abb. 3.31; S. 63) nicht aussagekräftig, zumal es scheint, dass während der Messungen noch Nickelionen zugegen waren.

## 4 Zusammenfassung

Die Gruppe um Dunn postulierte ein Modell, wonach die Untereinheit  $b_2$  der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase im Bereich ihrer Dimerisierungsdomäne (Aminosäurepositionen 62 - 122) als rechtshändiges coiled-Coil (RHCC) vorliegt (Del Rizzo *et al.*, 2002). Ob  $b_2$  tatsächlich solch eine Struktur ausbildet oder ob ein linkshändiges coiled-Coil (LHCC) vorliegt bzw.  $b$  in Form zweier zueinander paralleler Helices dimerisiert, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht.

Die Untersuchungen wurden an einer verkürzten, wasserlöslichen Form von  $b$ , die als  $b_{syn}$  oder  $b_{24-156}$  bezeichnet wird (McLachlin & Dunn, 1997) durchgeführt.  $b_{syn}$  lag hierbei alleine bzw. im Komplex mit  $F_1$  vor. Um zu sehen, ob die hierbei gewonnenen Erkenntnisse den Gegebenheiten im gesamten  $F_0F_1$ -Komplex entsprechen, wurde dieser ausgehend von einer komplett cysteinfreien Mutante ebenfalls untersucht (Kuo *et al.*, 1998).

Neben 8 Cysteinmutanten von  $b_{syn}$ , die an den Stellen 103 - 110 mutiert waren, lag in unserem Arbeitskreis das Plasmid pDM3 vor, das als Ausgangsplasmid für die Herstellung weiterer Cysteinmutanten von  $b_{syn}$  diente. Mit Hilfe der QuickChange-Methode der Fa. Stratagene wurden so 6 Mutanten hergestellt, deren natürlich vorkommenden Aminosäuren an den Stellen 102, 102 und 111 - 114 gegen je ein Cystein ausgetauscht wurden. Insgesamt konnte so ein Bereich von 14 Aminosäuren, d.h. von knapp vier Helixumdrehungen (3,6 Aminosäuren pro Umdrehung) untersucht werden. Die Proteine wurden mit IAAT modifiziert und bei 193 K vermessen. Durch Simulation der so erhaltenen Spektren war es möglich, in Zusammenarbeit mit Eric Hustedt von der Vanderbilt University (Nashville, Tennessee) Spin-Spin-Abstände zu bestimmen. Desweiteren wurden die  $b_{syn}$ -Mutanten in Zusammenarbeit mit Stan Dunn von der University of Western Ontario (London/Ontario, Kanada) Crosslink-Experimenten unterzogen, bei denen es in Abhängigkeit der relativen Abstände und Orientierung der Cysteine zueinander zur Ausbildung von Disulfidbindungen kommt. So war es möglich, über die Stärke der Crosslinks Rückschlüsse auf die Cystein-Cystein-Abstände zu ziehen. Der starke Crosslink bei der Position 105 und der geringe für diese Position simulierte Abstand von 15,3 Å sprechen dafür, dass sich die Position 105 im  $b$ - $b$ -Interface befindet. Ebenfalls auf dieser Seite der Helix lokalisiert sind wohl die Positionen 101, 109 und 113, was aus ihren simulierten Spin-Spin-Abständen bzw. ihrer Tendenz zur Ausbildung von Crosslinks zu schließen ist. Auf der vom  $b$ - $b$ -Interface abgewandten Seite befinden sich

wahrscheinlich die Positionen 103, 104, 107, 110, 111 und 114, was durch die für 103, 104, 110 und 111 simulierten großen Abstände und die nicht ausgebildeten Disulfidbrücken an den Positionen 107, 110, 111 und 114 unterstützt wird. Es kann allerdings nicht gesagt werden, ob ein bisher bei einem Dimer noch nie beobachtetes rechtshändiges (RHCC), ein linkshändiges coiled-Coil (LHCC) oder zwei zueinander parallele Helices vorliegen. Die erhaltenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass alle drei möglichen Strukturen vorliegen können.

Es ist durchaus denkbar, dass sich die drei betrachteten Strukturen in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Man hätte so einen Wechsel von der einen Struktur in die andere. Wenn dem wirklich so sein sollte, dann wäre dies ein Hinweis darauf, dass  $b_2$  nicht nur eine verbindende Funktion zwischen den  $F_0$ - und dem  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase hat, sondern auch zur Speicherung von elastischer Energie während der ATP-Synthese dient. Dies könnte durch einen Wechsel von einem RHCC in ein LHCC (oder umgekehrt) erfolgen, wobei in einem Zwischenschritt beide Helices parallel zueinander stehen könnten.

Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen, die nach Bindung von  $b_2$  an  $F_1$  erfolgten, wurden sowohl mit IAAT als auch mit MTS durchgeführt. Die Untersuchungen mit IAAT zeigten keinerlei Einfluss von  $F_1$  auf die Struktur von  $b$ . Denn sowohl bei 193 K als auch bei 293 K konnten keine signifikanten Unterschiede in den Spektren ohne bzw. mit  $F_1$  festgestellt werden. Dass es wirklich zu einer Assemblierung der beiden Proteine gekommen war, wurde für alle  $b_{syn}$ -Mutanten durch zweidimensionale Gele belegt. Die erste Dimension bestand aus einem nichtdenaturierenden Gel, in dem  $F_1$  und  $b$  als Komplex wanderten. Die zweite Dimension stellte ein SDS-Gel dar und diente zum Auftrennen der verschiedenen Untereinheiten.

Im Gegensatz zu den Messungen mit IAAT kam es bei Verwendung von MTS nach der Addition von  $b$  an  $F_1$  bei einigen Mutanten zu einer Freisetzung des Spinlabels. Dies kann daraufhin deuten, dass es durch  $F_1$  zu einer Strukturänderung in  $b$  kommt, diese aber sehr klein ist. Und zwar so klein, dass sie sich bei Verwendung von IAAT nicht detektieren lässt, was sich auf die unterschiedliche Struktur von MTS und IAAT zurückführen lässt. IAAT ist etwas größer und besitzt mehr Rotationsfreiheitsgrade als MTS und kann sich so besser aus dem Protein herausdrehen, was in einer Abnahme der gegenseitigen Beeinflussung von Protein und Label resultiert. Andererseits kann die Freisetzung von MTS auf eine Wechselwirkung von  $b$  mit  $\alpha$  zurückzuführen sein, was bedeuten würde, dass man nicht sagen kann, ob es durch Zugabe von  $F_1$  zu einer Strukturveränderung bei  $b$  kommt.

Mittels der bei 293 K gemessenen Spektren der einzelnen  $b_{\text{syn}}$ -Proteine wurden die Labelgrade, d.h. die Verhältnisse von modifiziertem Protein zur Gesamtproteinmenge, bestimmt. Dies sollte eine Abschätzung auf die Zugänglichkeit der einzelnen Positionen liefern. Ein Vergleich der Labelgrade mit den simulierten Spin-Spin-Abständen bzw. der Ergebnissen der Crosslink-Studien zeigte mehrere Übereinstimmungen. So etwa an den Positionen 105 und 113. Das geringe Labeling passt sehr gut zu den gefundenen Crosslinks an diesen Positionen bzw. zu den kleinen Spin-Spinabständen. Die teilweise sehr hohen Labelgrade bei den Positionen 103, 104, 107, 110, 111 und 114 passen ebenfalls zu den simulierten Abständen bzw. Ergebnissen aus den Crosslink-Studien.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem  $F_0F_1$ -Gesamtkomplex. Ausgehend von einer komplett cysteinfreien Mutante (Kuo *et al.*, 1998), wurden gezielt Cysteine eingeführt, die mit IAAT modifiziert und ESR-spektroskopisch vermessen wurden. Die Isolierung der einzelnen  $F_0F_1$ -Mutanten sollte ursprünglich über einen am Protein befindlichen FLAG-Tag erfolgen. Da sich dies als zu kostspielig herausstellte, wurde dazu übergegangen den FLAG-Tag gegen einen His-Tag auszutauschen. Hierzu wurde ein Subclone vom Plasmid der cysteinfreien  $F_0F_1$  hergestellt, in den eine *HindIII*-Schnittstelle eingefügt wurde, die zum Ausschneiden der FLAG-codierende Sequenz diente. Nach Einfügen der His-codierende Sequenz und Entfernen der *HindIII*-Schnittstelle wurde der neu generierte Bereich aus dem Subclone wieder in das Ausgangsplasmid eingefügt, das nun zur Einführung der Mutationen und der Proteinexpression diente.

Die Isolation der verschiedenen  $F_0F_1$ -Mutanten erfolgte mittels Nickel-NTA-Agarose und lieferte sauberes Protein. Der Nachweis von  $b_2$  bei allen Mutanten erfolgte durch Western Blots mittels anti-b-Antikörper.

Die Zugänglichkeit der Cysteine wurde in allen Fällen durch Modifizierung mit MPB überprüft und es zeigte sich, dass die Mutanten mit den Cysteinen an den Positionen 103, 106, 108 und 110 - 114 sehr gut und das an der Stelle 109 mutierte Protein schwächer zugänglich war. Die Mutante  $F_0F_1bA105C$  zeigte keine Zugänglichkeit für MPB. Allerdings war es in diesem Fall während Herstellung zu einer Deletion eines Adenins und damit zu einer Verschiebung des Leserasters gekommen. Als Folge davon war die b-Untereinheit um 7 Aminosäuren länger und hatte eine ab der Position 109 eine völlig andere Sequenz als geplant. Die Modifizierung der einzelnen Mutanten erfolgte während der Isolierung, denn dadurch konnte gleichzeitig zur Proteinreinigung die Abtrennung des Labels erfolgen, was eine Zeitersparnis und eine Steigerung der Ausbeute zum Ziel hatte. Die Proben der cysteinfreien

$F_0F_1$  und der  $F_0F_1$ - Mutante bE110C wurden direkt nach Isolierung aufkonzentriert und vermessen. Da hierbei sehr ungewöhnliche Spektren erhalten wurde, lag der Verdacht nahe, dass Nickel, das vom Säulenmaterial stammte, in den Proben zugegen war. Deshalb wurden im Folgenden alle Proben vor dem Aufkonzentrieren 1:1 mit einer 100 mM EDTA-Lösung versetzt. Die so erhaltenen Spektren zeigten teilweise immer noch ähnliche Signale wie zuvor ohne EDTA-Behandlung. Andere allerdings, wie z.B. diejenigen Spektren der Mutanten I109C, E110C, A111C und E112C zeigten für proteingebundenen IAAT typische Signale. Prinzipiell scheint die Methode vom Säulenmaterial stammendes Nickel abzutrennen zu funktionieren. Für die Zukunft muss diese Methode allerdings noch optimiert werden, da man zur Bestimmung von Spin-Spin-Abständen (und damit zur Strukturaufklärung der  $F_0F_1$ ) komplett nickelfreie Spektren benötigt.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material

#### 5.1.1 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> ( $\Phi$ 80d $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15) <i>gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>endA1 recA1 relA1</i> $\lambda$ - <i>thi-1 deoR glnV44 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
DK8	<i>bglR thi-1 rel-1 HfrP01</i> $\Delta$ ( <i>uncB-uncC</i> ) <i>ilv::Tn10</i>	Klionsky <i>et al.</i> , 1984
JM109	F <sup>-</sup> <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lac<sup>/q</sup></i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15/ <i>e14<sup>-</sup></i> (McrA <sup>-</sup> ) $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>endA1 recA1 relA1</i> $\lambda$ - <i>thi-1 glnV44 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> )	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
SWM1	<i>unc<sup>+</sup> argH pyrE rec<sup>+</sup> Cm<sup>R</sup></i>	Rao <i>et al.</i> , 1988

**Tabelle 5.1:** Zusammenstellung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten *E. coli*-Stämme.

Die Stämme DK8, JM109 und SWM1 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei der Proteinexpression eingesetzt, wobei die DK8-Zellen zur Expression der einzelnen Mutanten des F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthasekomplexes dienten. Aus dem Stamm JM109 wurden die unterschiedlichen b<sub>syn</sub>-Mutanten und aus den SWM1-Zellen die Wildtyp-F<sub>1</sub> isoliert. Der Stamm DH5 $\alpha$  hingegen kam bei allen anderen Arbeiten zum Einsatz, wie z.B. bei der Transformation und Vermehrung von PCR-Produkten oder von neu ligierten Plasmiden.

#### 5.1.2 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Genotyp	Literatur
pAC1	<i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ) <i>rep</i> (pMB1) <i>bsyn109C</i>	Revington <i>et al.</i> , 1999
pAC2	<i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ) <i>rep</i> (pMB1) <i>bsyn110C</i>	Revington <i>et al.</i> , 1999
pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys	<i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ) <i>rep</i> (p15A) <i>uncI-uncC</i> $\beta$ FLAG $\Delta$ Cys	Kuo <i>et al.</i> , 1998

pDM3	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn	McLachlin & Dunn, 1997
pDM52	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn103C	Revington <i>et al.</i> , 1999
pDM53	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn104C	Revington <i>et al.</i> , 1999
pDM54	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn105C	Revington <i>et al.</i> , 1999
pDM55	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn106C	Revington <i>et al.</i> , 1999
pDM56	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn107C	Revington <i>et al.</i> , 1999
pDM57	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn108C	Revington <i>et al.</i> , 1999
pTH1	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn101C	diese Arbeit
pTH2	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn102C	diese Arbeit
pTH3	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn111C	diese Arbeit
pTH4	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn112C	diese Arbeit
pTH5	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn113C	diese Arbeit
pTH6	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(pMB1) bsyn114C	diese Arbeit
pTH7	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncG uncD' βFLAG ΔCys	diese Arbeit
pTH8	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncG uncD' βFLAG ΔCys	diese Arbeit
pTH9	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncG uncD' βHis ΔCys	diese Arbeit
pTH10	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncG uncD' βHis ΔCys	diese Arbeit
pTH11	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI-uncC βHis ΔCys	diese Arbeit
pTH12	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE-uncH ΔCys	diese Arbeit
pTH13	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb103C uncH βHis	diese Arbeit
pTH14	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb105C uncH	diese Arbeit
pTH15	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb106C uncH	diese Arbeit
pTH16	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb108C uncH	diese Arbeit
pTH17	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb109C	diese Arbeit

	uncH	
pTH18	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb110C	diese Arbeit
	uncH	
pTH19	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb111C	diese Arbeit
	uncH	
pTH20	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb112C	diese Arbeit
	uncH	
pTH21	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb113C	diese Arbeit
	uncH	
pTH22	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) uncE uncFb114C	diese Arbeit
	uncH	
pTH23	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb103C) βHis	diese Arbeit
pTH24	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb105C) βHis	diese Arbeit
pTH25	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb106C) βHis	diese Arbeit
pTH26	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb108C) βHis	diese Arbeit
pTH27	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb109C) βHis	diese Arbeit
pTH28	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb110C) βHis	diese Arbeit
pTH29	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb111C) βHis	diese Arbeit
pTH30	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb112C) βHis	diese Arbeit
pTH31	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb113C) βHis	diese Arbeit
pTH32	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(p15A) uncI- uncC(uncFb114C) βHis	diese Arbeit
pUC119KA1	bla(Ap <sup>R</sup> ) rep(ColE1) lacZ'	Ansorge, 1997



### 5.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Länge	Sequenz
101A	33-mer	5'-CAG GAA CGT ACG AAA TGC GTT GCG CAG GCG CAG-3'
101B	33-mer	5'-CTG CGC CTG CGC AAC GCA TTT CGT ACG TTC CTG-3'
102A	34-mer	5'-GGA ACG TAC GAA AAT CTG CGC GCA GGC GCA GGC G-3'
102B	34-mer	5'-CGC CTG CGC CTG CGC GCA GAT TTT CGT ACG TTC C-3'
103A	25-mer	5'-CTA AAA TCG TGT GCC AGG CGC AGG C-3'
103B	25-mer	5'-GCC TGC GCC TGG CAC ACG ATT TTA G-3'
105A	37-mer	5'-CTA AAA TCG TGG CCC AGT GCC AGG CGG AAA TTG AAG C-3'
105B	37-mer	5'-GCT TCA ATT TCC GCC TGG CAC TGG GCC ACG ATT TTA G-3
106A	29-mer	5'-CGT GGC CCA GGC GTG CGC GGA AAT TGA AG-3'
106B	29-mer	5'-CTT CAA TTT CCG CGC ACG CCT GGG CCA CG-3'
108A	29-mer	5'-CCA GGC GCA GGC GTG TAT TGA AGC CGA GC-3'
108B	29-mer	5'-GCT CGG CTT CAA TAC ACG CCT GCG CCT GG-3'
109A	25-mer	5'-CGC AGG CGG AAT GTG AAG CCG AGC G-3'
109B	25-mer	5'-CGC TCG GCT TCA CAT TCC GCC TGC G-3'
110A	31-mer	5'-CGC AGG CGG AAA TTT GTG CCG AGC GTA AAC G-3'
110B	31-mer	5'-CGT TTA CGC TCG GCA CAA ATT TCC GCC TGC G-3'
111A	36-mer	5'-GCA GGC GGA AAT TGA ATG TGA GCG TAA ACG TGC ACG-3'
111B	36-mer	5'-CGT GCA CGT TTA CGC TCA CAT TCA ATT TCC GCC TGC-3'

112A	35-mer	5'-GGC GGA AAT TGA AGC TTG CCG TAA ACG TGC ACG TG-3'
112B	35-mer	5'-CAC GTG CAC GTT TAC GGC AAG CTT CAA TTT CCG CC-3'
113A	37-mer	5'-GCG GAA ATT GAA GCT GAG TGT AAA CGT GCA CGT GAA G-3'
113B	37-mer	5'-CTT CAC GTG CAC GTT TAC ACT CAG CTT CAA TTT CCG C-3'
114A	38-mer	5'-GGA AAT TGA AGC TGA GCG TTG CCG TGC ACG TGA AGA GC-3'
114B	38-mer	5'-GCT CTT CAC GTG CAC GGC AAC GCT CAG CTT CAA TTT CC-3'
<i>HindIII</i> ein1	32-mer	5'-CGA CGA TGA CAA GCT TAC TGG AAA GAT TGT CC-3'
<i>HindIII</i> ein2	32-mer	5'-GGA CAA TCT TTC CAG TAA GCT TGT CAT CGT CG-3'
Insert1*)	36-mer	5'-CTA GTA GAG GAT TTA AGA TGC ACC ACC ACC ACC ACA-3'
Insert2*)	36-mer	5'-AGC TTG TGG TGG TGG TGG TGC ATC TTA AAT CCT CTA-3'
HisA	38-mer	5'-GCA CCA CCA CCA CCA CCA CGC TAC TGG AAA GAT TGT CC-3'
HisB	38-mer	5'-GGA CAA TCT TTC CAG TAG CGT GGT GGT GGT GGT GGT GC-3'
pUC-Standard- sequenzierprimer1	17-mer	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
pUC-Standard- sequenzierprimer2	17-mer	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
Sequenzierprimer1	17-mer	5'-GGC CAG CAT TAC TCA GG-3'
Sequenzierprimer2	18-mer	5'-GCA AAC ACA GAG TAA CCG-3'
Sequenzierprimer3	18-mer	5'-GCT GAC GGC CTT GCT TCC-3'
Sequenzierprimer4	18-mer	5'-CGG CGA GCG TTT CTG GCG-3'

\*) Die Oligonukleotide Insert1 und Insert2 wurden an ihren 5'-Enden von der Firma MWG-Biotech AG (München, Deutschland) phosphoryliert.

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (München, Deutschland) hergestellt und vor Gebrauch in entionisiertem bzw. doppelt destilliertem, sterilem Wasser gelöst. Die DNA-Konzentrationen wurden UV-spektrometrisch bestimmt (siehe Kap. 5.3.8; S. 90).

### 5.1.4 Enzyme

<b>Enzyme</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Bam</i> HI	10 U / $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Bss</i> III	4 U / $\mu$ l (5 U / $\mu$ l)	New England Biolabs
<i>Dpn</i> I	20 U / $\mu$ l	New England Biolabs
<i>Dra</i> III	20 U / $\mu$ l	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	10 U / $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	10 U / $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Kpn</i> I	10 U / $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Pae</i> I ( <i>Sph</i> I)	10 U / $\mu$ l (5 U / $\mu$ l)	MBI Fermentas (New England Biolabs)
<i>Ppu</i> MI	5 U / $\mu$ l (10 U / $\mu$ l)	New England Biolabs
<i>Sac</i> I	10 U / $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Spe</i> I	10 U / $\mu$ l	New England Biolabs
<i>Xba</i> I	10 U / $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	2,5 U / $\mu$ l	Stratagene
<i>T4</i> DNA Ligase	5 U / $\mu$ l (6 U / $\mu$ l)	MBI Fermentas (New England Biolabs)

Alle Reaktionen an denen eines der aufgeführten Enzyme beteiligt war, wurden in dem für das Enzym empfohlenen Puffer durchgeführt:

*Verwendete Puffer der Firma MBI Fermentas***10 x G<sup>+</sup>-Puffer**

Tris	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
NaCl	500 mM
BSA	1,0 mg / ml
pH 7,5 bei 37 °C (HCl)	

**10 x R<sup>+</sup>-Puffer**

Tris	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
KCl	1000 mM
BSA	1,0 mg / ml
pH 8,5 bei 37 °C (HCl)	

**10 x Y<sup>+</sup>/Tango<sup>TM</sup>-Puffer**

Tris-Acetat	330 mM
Mg-Acetat	100 mM
K-Acetat	660 mM
BSA	1,0 mg / ml
pH 7,9 bei 37 °C (HAc)	

**10 x T4 DNA Ligase-Puffer**

Tris	400 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5 mM
pH 7,8 bei 25 °C (HCl)	

*Verwendete Puffer der Firma Stratagene***10 x Reaction Buffer (Pfu Turbo)**

Tris	200 mM
KCl	100 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
Triton <sup>®</sup> X-100	1 %
BSA (nukleasenfrei)	100 µg / ml
pH 8,0 (HCl)	

*Verwendete Puffer der Firma New England Biolabs***10 x NEB2-Puffer**

Tris	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
NaCl	500 mM
DTT	10 mM
pH 7,9 bei 25 °C (HCl)	

**10 x NEB3-Puffer**

Tris	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
NaCl	1000 mM
DTT	10 mM
pH 7,9 bei 25 °C (HCl)	

<b>10 x NEB4-Puffer</b>		<b>10 x T4 DNA Ligase -Puffer</b>	
Tris-Acetat	200 mM	Tris	500 mM
Mg-Acetat	100 mM	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
K-Acetat	500 mM	DTT	100 mM
DTT	10 mM	ATP	10 mM
pH 7,9 bei 25 °C (HAc)		BSA	0,25 mg / ml
		pH 7,5 (HCl)	

### 5.1.5 Verwendete Chemikalien und weitere Materialien

<b>Chemikalie / Material</b>	<b>Hersteller</b>
Bacto-Agar	Becton, Dickinson & Co.
Agarose	Fisher Scientific, Genaxis Biotechnology, Sigma
Ampicillin	FisherBiotech, Roth
Anti-Mouse-IgG-Alkalische- Phosphatase-Konjugat	Sigma
ATP	ICN Biomedicals, Sigma
Avidin-Alkalische- Phosphatase-Konjugat	Molecular Probes
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson & Co.
5-bromo-4chloro-3indoyl- phosphat (BCIP)	BIO-RAD
BSA	Fisher Scientific, Roche
Chloramphenicol	Fisher Scientific
Cholsäure	Sigma
DE-52 -Anionenaustauscher	Whatman
DEAE-Sepharose CL-6B	Fluka, Pharmacia
Dialyseschlauch	Fisher Scientific, Roth
DNA-Marker $\lambda$ -DNA / <i>Hind</i> III	MBI Fermentas
DTT	ICN Biomedicals, Mallinkrodt Technology, Roth
EACA	Acros Organics, Sigma
EDTA	Fisher Scientific, Sigma

EGTA	Serva, Sigma
Glucose	Acros Organics
Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Co.
IAAT	Sigma
Imidazol	Acros Organics
Immun-Blot™ PVDF (0,2 µm)	BIO-RAD
Membran für Protein Blotting	
IPTG	Gerbu Biotechnik, Gold Bio Technology,
Natriumcholat	Sigma
N-(3-Maleimidopropionyl)- biocytin	Molecular Probes
β-Mercaptoethanol	Fluka
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Fluka
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Acros Organics, Sigma
Ni-NTA-Agarose	Quiagen
Nitroblue tetrazoliumchlorid	BIO-RAD
n-Octyl-α-D-glucopyranosid	ICN Biomedicals, Fisher Biotech
PAB	Acros Organics, Sigma
Phosphatidylcholin	Lipoid
PMSF	Sigma
Prestained SDS-PAGE Stand- ard Low Range (14 - 97 kDa)	BIO-RAD
Protein Ladder, 10 - 200 kDa (#SM0661)	MBI Fermentas
RbCl	Fisher Scientific, Fluka
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Sephadex G25	Fluka, Sigma
TES	ICN Biomedicals, Sigma
Tris	Acros Organics

Alle anderen verwendeten Chemikalien standen im Arbeitskreis zur Verfügung oder wurden von der Chemikalienausgabe der Universität Kaiserslautern bezogen.

### 5.1.6 Verwendete Geräte

	<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklaven:	Schnellkochtopf mit 10 l Fassungsvermögen	Sitram
	STERIS® V-120 Prevac Steam Sterilizer	Amsco® Century™
Elektrophorese- zubehör:	Elektrophoresekammer FB-VE10-1	FisherBiotech
	Elektrophoresekammer FB-SB-710	FisherBiotech
	Mini Protean® 3	BIO-RAD
Fraktions- sammler:	CF1 Fraction Collector	Spektrum Chromatography
	Multirac 2111	LKB Bromma
Inkubatoren:	Luftschüttler Innova 400, 4200 und 4230	New Brunswick Scientific
	Wasserbadschüttler HT BTR 112	Infors
Spannungs- geräte:	FB200 Power Supply	FisherBiotech
	FB300 Power Supply	FisherBiotech
	Power Pac 300	Bio-Rad
	Power Pac 3000	Bio-Rad
Thermocycler:	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
	PTC-0200 DNA Engine	MJ Research, Inc.
UV / VIS- Spektrometer:	DU-640-Spektrometer	Beckman
Waagen:	DU-680-Spektrometer	
	Feinwaage 1601 MP8-1	Sartorius
	Feinwaage accu-124	FisherBiotech
	Waage 1204 MP	Sartorius
Western-Blot- Zubehör	Waage accu-2202	FisherBiotech
	Mini Trans-Blot® cell	BIO-RAD
Zentrifugen:	Legend RT mit dem Rotor Heraeus # 3046	Sorvall
	J2-21 mit den Rotoren JA 10, JA 14 und JA 20	Beckman
	Tischzentrifuge 5415 C und 5415 D	
	Ultrazentrifuge L8-70 mit den Rotoren Ti	Eppendorf

	60 und Ti 70.1	Beckman
	Ultrazentrifuge Optima LE 80K mit dem	
	Rotor Ti 70	Beckman
Sonstige Geräte:	EmulsiFlex-C5	Avestin
	French Pressure Cell	SIM Aminco

## 5.2 Kultivierung und Lagerung der *E. coli*-Kulturen

### 5.2.1 Medien, Medienzusätze und Kulturbedingungen

Alle verwendeten Wachstumsmedien wurden entweder in einem 10-l-Dampfkochtopf oder einem Autoklaven bei 1,5 – 1,8 bar und 121 °C autoklaviert, wobei bei der Herstellung von Agarplatten 2,0 % Bacto-Agar zugesetzt wurde. Die Zugabe von Medienzusätze, die stets durch 0,22 µm oder 0,45 µm steril filtriert wurden, erfolgte bei einer Temperatur unterhalb von 50 °C.

#### **Ampicillin (50 mg / ml)**

Ampicillin 2,5 g

ad 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

#### **ArgEntThi**

2,3-Dihydroxybenzoesäure 0,617 g

L-Arginin-HCl 16,860 g

Thiamin-HCl 0,068 g

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; pH 7,0 (NaOH) und steril filtrieren

#### **Chloramphenicol (15 mg / ml)**

Chloramphenicol 0,75 g

ad 50 ml 90 % Ethanol

#### **Glucoselösung (29 %)**

Glucose 290 g

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren



**ILV (30 mM)**

L-Leucin	0,39 g
L-Isoleucin	0,39 g
L-Valin	0,35 g

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

**1M MgSO<sub>4</sub>**

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24,6 g
--------------------------------------	--------

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

**MgSO<sub>4</sub> (20 %)**

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20 g
--------------------------------------	------

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

**Succinatlösung (20 %)**

Bernsteinsäure	20 g
----------------	------

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

KOH	9,5 g
-----	-------

pH 6,4 (KOH) und steril filtrieren

**Thiamin (1%)**

Thiamin	1,0 g
---------	-------

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

**Trace Elements (TE)**

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14,0 mM	0,403 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,0 mM	0,021 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	3,7 mM	0,029 g
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,7 mM	0,012 g
CaCl <sub>2</sub>	2,8 mM	0,031 g
FeCl <sub>3</sub>	1,8 mM	0,029 g

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

**TB-Stammlösung**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 M	23,13 g
---------------------------------	--------	---------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72 M	125,40 g
---------------------------------	--------	----------

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und steril filtrieren

**GEAU 2,5% LB-Medium + Chloramphenicol**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,46 g
---------------------------------	---------

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,52 g
----------------------------------	--------

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,98 g
---	--------

Bacto-Trypton	0,25 g
---------------	--------

Hefeextrakt	0,125 g
-------------	---------

NaCl	0,25 g
------	--------

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; pH 7,0 (NaOH)

Uracil	0,022 g
--------	---------

Autoklavieren

29% Glucose	40 ml
-------------	-------

1M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
----------------------	------

TE	1 ml
----	------

ArgEntThi	2 ml
-----------	------

Chloramphenicol (15 mg / ml)	1 ml
------------------------------	------

**LB-Medium (+ Ampicillin)**

Bacto-Trypton	10 g
---------------	------

Hefeextrakt	5 g
-------------	-----

NaCl	10 g
------	------

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; pH 7,5 (NaOH) und autoklavieren

[Ampicillin (50 mg / ml)]	1 ml]
---------------------------	-------

**TB-Medium mit 1,1 % Glucose (+ Ampicillin)**

Bacto-Trypton	15 g
---------------	------

Hefeextrakt	24 g
-------------	------

ad 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; pH 7,5 (NaOH) und autoklavieren

TB-Stammlösung	100 ml
----------------	--------

[Ampicillin (50 mg / ml)]	1 ml]
---------------------------	-------

**Minimal-Medium**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
Zitronensäure	0,36 g
NaOH	0,2 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; pH 7,5 (NaOH) und autoklavieren	
MgSO <sub>4</sub> (20 %)	1,0 ml
Thiamin (1 %)	500 µl
ILV (30 mM)	10 ml

**Minimal-Medium + Glucose**

Minimal-Medium	1 l
Glucoselösung (29 %)	14 ml
[Ampicillin (50 mg / ml)]	1 ml]

**Minimal-Medium + Succinat**

Minimal-Medium	1 l
Succinatlösung (20 %)	10 ml

**2xYT-Medium (+ Ampicillin)**

Bacto-Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; pH 7,5 (NaOH) und autoklavieren	
[Ampicillin (50 mg / ml)]	1 ml]

Unbeimpfte Agarplatten wurde bis zu 6 Wochen und unbeimpfte Flüssigmedien bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert.

Die Inkubation der Agarplatten bzw. der Flüssigmedien erfolgte bei 37 °C im Brutschrank bzw. bei 37 °C und 220 – 300 rpm in einem Wasserbadschüttler oder einem Luftschüttler. Für die Inkubation der Flüssigmedien wurden entweder 1,5-ml-Eppendorfgefäße oder Erlenmeyerkolben benutzt, wobei diese 10 bis 25 % befüllt wurden.

## 5.2.2 Wachstumsmessungen

Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Diese Methode beruht auf der teilweisen Streuung sichtbaren Lichts beim Durchtritt durch eine Bakterienkultur. Die Stärke der Lichtschwächung ist hierbei abhängig von Zahl, Form und Größe der Bakterien und wird durch den Vergleich mit unbeimpftem Medium photometrisch bestimmt.

## 5.2.3 Lagerung der *E. coli* Kulturen

Die Lagerung der Agarplatten mit *E. coli* Kulturen erfolgte für bis zu drei Wochen bei 4 °C. Sollten Kulturen über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, so wurden Glycerinkulturen angelegt. Bei deren Herstellung wurde eine Übernachtskultur und steriles 80 %-iges Glycerin zu gleichen Teilen in einem sterilen, verschraubbaren Eppendorfgefäß gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 80 °C (Miller, 1992).

## 5.3 Allgemeine Methoden

### 5.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Rubidiumchloridmethode (Hanahan, 1983), die eine hohe Transformationseffizienz gewährleistet.

10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt.

2 – 3 ml dieser frischen Übernachtskultur dienten zum Beimpfen von 250 ml LB-Medium, das einen Zusatz von 20 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt und bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt wurde. War eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 erreicht, mußte das sofortige Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 30 Minuten erfolgen, damit die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten werden konnten.

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten mit gekühlten Lösungen und Materialien im Kühlraum.

**TBFI**

CaCl <sub>2</sub>	10 mM	0,222 g
KAcetat	30 mM	0,589 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50 mM	1,979 g
RbCl	100 mM	2,418 g
Glycerin	15 % (w/v)	
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 200 ml; pH 5,8 (HAc)		

Nach Aufteilung der Bakterienkultur auf zwei sterile Zentrifugenbecher und Zentrifugation in einem JA-14 Rotor für 5 Minuten bei 5000 rpm (3836 x g), wurde der Überstand vollkommen entfernt und die Zellpellets in je 50 ml TBFI-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für 15 Minuten in Eiswasser und der Vereinigung der Zellsuspensionen, erfolgte eine erneute Zentrifugation wie oben beschrieben und die wieder die völlige Entfernung des Überstandes.

**TBFII**

CaCl <sub>2</sub>	75 mM	0,416 g
MOPS	10 mM	0,105 g
RbCl	10 mM	0,061 g
Glycerin	15 % (w/v)	
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 50 ml; pH 6,5 (KOH)		

Nach der Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml TBFII-Puffer und erfolgter Inkubation für eine Stunde in Eiswasser, wurde die Suspension in 100 – 150 µl großen Portionen in Eppendorfgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zur Kontrolle auf etwaige Verunreinigungen oder dem Vorhandensein ungewollter Plasmide mussten die kompetenten Zellen auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert werden.

### 5.3.2 Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte aus jeweils 3 - 6 ml Übernachtskultur und wurde nach der Vorschrift des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Systems der Fa. QIAGEN unter Benutzung der mitgelieferten Lösungen und Säulen durchgeführt (siehe Kap. 7.1; S. 127). Die isolierte und gereinigte DNA wurde mit 50 µl sterilem Wasser von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 5.3.3 DNA-Restriktion

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Herstellervorgaben unter Verwendung der mitgelieferten 10-fach konzentrierten Puffer bzw. BSA-Lösungen.

Nachdem das einzusetzende Volumen DNA-Lösung, dessen Größe konzentrationsabhängig war, 2 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Puffers und eventuell 1 µl BSA-Lösung (2 mg / ml), falls nicht schon genügend BSA im Puffer enthalten war, mit sterilem Wasser auf 19 µl aufgefüllt waren, wurde 1 µl der Enzymlösung (4 – 20 U / µl) zugesetzt, kurz gevortext und bei 37 °C für 1 – 2 Stunden inkubiert. Die anschließende Enzymdeaktivierung erfolgte analog den Herstellerangaben.

Da die Aktivität einer Endonuklease grundlegend vom eingesetzten Reaktionspuffer abhängt, mussten die Reaktionsbedingungen bei einem Doppelverdau auf die beiden daran beteiligten Restriktionsenzyme abgestimmt werden. D.h. der verwendete Puffer wurde so gewählt, dass jeweils mindestens 50 % Enzymaktivität garantiert waren.

### 5.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Das einfachste Verfahren zur Auftrennung und Identifikation von DNA-Molekülen ist die Agarosegelelektrophorese. Als Trennmedium dient hierbei Agarose, ein lineares Polysaccharid aus abwechselnd  $\alpha$ -1,3- und  $\alpha$ -1,4- verknüpften D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Bausteinen, wobei die Galactose in 6-Stellung teilweise methyliert ist. Die Agarose kann durch Erhitzen geschmolzen und in spezielle Formen gegossen werden. Beim Abkühlen bildet sich ein homogenes Gel aus, in dem DNA-Moleküle beim Anlegen eines

elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückrad zur Anode wandern. Hierbei ist zu beachten, dass die Wanderungsgeschwindigkeit durch verschiedene Faktoren, wie z.B. die Molekülgröße, die DNA-Konformation, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflusst wird. In einem Agarosegel bewegen sich lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Dem Gel wird das UV-aktive Ethidiumbromid zugesetzt, das in die DNA interkaliert und diese so sichtbar macht.

Es wurden 0,9 – 1,2 %-ige Agarosegele verwendet, mit denen sich Fragmente im Bereich von 0,3 – 9,0 kb gut auftrennen lassen. Als Marker diente mit HindIII verdaute  $\lambda$ -DNA, die Banden bei 23131, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 und 125 bp liefert.

#### *Herstellung der Agarosegele und Elektrophorese*

##### **TBE-Puffer**

Tris	0,089 M	10,781 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,089 M	5,503 g
EDTA	0,002 M	0,585 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; pH 8,3 (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )		

Die benötigte Menge Agarose wurde in Abhängigkeit des Volumens der verwendeten Gelkammer in 50 bzw. 70 ml TBE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C erfolgte die Zugabe von 2,5 bzw. 3,5  $\mu$ l einer 1-%igen Ethidiumbromid-Lösung, woraufhin die Mischung in die mit einem Kamm bestückte Gelkammer gegossen wurde. Nach Gelieren und Einsetzen des Geles in die Pufferkammer, wurde der Kamm vorsichtig entfernt und es konnte in die durch die Kammzinken gebildeten Taschen die vorbereiteten DNA-Proben pipettiert werden. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für 2 – 3 Stunden. Anschließend konnte das Gel im UV-Licht betrachtet werden.

#### *Probenvorbereitung*

Bei allen durchgeführten Agarosegelen wurde der käuflich zu erwerbende Loading Dye (6x) der Fa. MBI Fermentas verwendet.

**Loading Dye (6x)**

Bromphenolblau	0,09 %
Xylencyanol FF	0,09 %
EDTA	60 mM
Glycerin	60 % in Wasser

Die Lösungen unverdauter Plasmide bzw. der DNA-Marker wurden mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und mit je 4 µl Loading Dye (6x) versetzt. Die mit DNA-Polymerase bzw. Restriktionsendonukleasen behandelte DNA verblieb im jeweiligen Puffer und wurde ebenfalls mit jeweils 4 µl Loading Dye (6x) versetzt. Nach einer Inkubation bei 65 °C für 5 Minuten, wurden die Proben bis zum Beladen des Gels auf Eis gelagert.

**5.3.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach der Vorschrift des QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit unter Benutzung der mitgelieferten Materialien (siehe Kap. 7.2; S. 129). Die Elution der isolierten DNA erfolgte hierbei mit 20 µl sterilem Wasser.

**5.3.6 Ligation**

Die Ligation von zwei oder drei DNA-Fragmenten erfolgte ausschließlich mit der *T4*-DNA-Ligase, einem Enzym, das die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe in doppelstängiger DNA katalysiert und sowohl „sticky-ends“ als auch „blunt-ends“ verknüpft.

Ein typischer Ligationsansatz bestand aus den zu ligierenden Fragmenten, die aus Agarosegelen isoliert (siehe Kap. 5.3.5; S. 89), gemischt und mit sterilem Wasser auf 17 µl aufgefüllt wurden. 2 µl des 10 x *T4*-DNA-Ligasepuffer und 1 µl der *T4*-DNA-Ligase komplettierten den jeweiligen Ansatz, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl erreicht wurde.

Die genauen Reaktionsbedingungen der durchgeführten Ligationen sind deren jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen. Nach erfolgter Ligation wurde jeweils eine Hitzeinaktivierung des verwendeten Enzyms analog den Herstellervorschriften durchgeführt.



Daran schloss sich die Transformation des kompletten Ligationsansatzes in kompetente DH5 $\alpha$  an.

### 5.3.7 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Nach Auftauen von 100 – 150  $\mu$ l kompetenter Zellen in Eiswasser und Zugabe der DNA-Lösung, wurde die Suspension vorsichtig gemischt und für 20 – 30 Minuten in Eiswasser inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 – 3 Minuten, woran sich eine erneute Inkubation in Eiswasser anschloss. Nach 2 Minuten wurden 100 – 200  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C im Luftschüttler mit 175 rpm inkubiert. Schließlich folgte die Ausplattierung von 100 – 150  $\mu$ l der Suspension auf ampicillin-haltigen Platten.

Im allgemeinen wurden jeweils 3 – 10  $\mu$ l der gewünschten DNA-Lösung zur Transformation verwendet. Sollten neu ligierte Plasmide transformiert werden, so erfolgte der Einsatz des kompletten Ligationsansatzes, also von 20  $\mu$ l. Bei der Transformation von Plasmiden, die durch PCR einer gezielten Mutagenese unterworfen worden waren, erfolgte der Einsatz von 25 – 50  $\mu$ l des PCR-Ansatzes.

### 5.3.8 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und Oligonukleotiden

Da DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum besitzt, konnten die Konzentrationen der Plasmidlösungen bzw. der verwendeten Oligonukleotid-Lösungen UV-spektrometrisch unter Einbeziehung der folgenden Gleichungen bestimmt werden (Sambrook et al., 1989):

Plasmid-DNA:  $1 \text{ OD}_{600} = 50 \mu\text{g} / \text{ml ds DNA}$

Oligonukleotide:  $1 \text{ OD}_{600} = 33 \mu\text{g} / \text{ml ss DNA}$

Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1 ml durchgeführt, wobei in einem Wellenlängenbereich von 230 – 350 nm gescannt wurde.

### 5.3.9 Gezielte Mutagenese

Bei der gezielten Mutagenese nach der Quick-Change<sup>™</sup>-Methode (Stratagene, 1997) handelt es sich um eine einfache und schnelle Methode zur Einführung von Mutationen in Plasmid-DNA mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR).

Neben der zu mutierenden Ausgangs-DNA werden bei dieser Methode nur zwei die Mutationen enthaltende Primer, die unterschiedlichen DNA-Bausteine (dNTPs) und eine DNA-Polymerase benötigt. Desweiteren hat sich die Zugabe von DMSO zum Reaktionsgemisch als vorteilhaft erwiesen, da es hierdurch zu einer Abschwächung der CG-Wechselwirkungen und somit zu einem erleichterten Aufschmelzen doppelsträngiger DNA kommt.

Beim Design der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer wurde darauf geachtet, dass diese in der Regel über 30 (mindestens jedoch 25) Basen groß waren und die Mutationen genau in ihrer Mitte trugen. Dies war notwendig, um eine möglichst gute Überlappung der Oligonukleotide mit der Ausgangs-DNA zu gewährleisten.

Im Anschluss an jede Polymerasenkettenreaktion erfolgte ein Verdau mit dem Enzym *DpnI*, was dazu diente die während der PCR als Matrize verwendete Ausgangs-DNA abzubauen und so aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. *DpnI* schneidet nur methylierte DNA, wie sie aus *E.coli* gewonnen wird. Hingegen ist DNA, die während einer PCR aufgebaut wird, nicht methyliert und wird somit nicht von *DpnI* geschnitten.

Nach Zugabe von 2 µl *DpnI* zu dem jeweiligen Reaktionsansatz wurde für 1½ - 2 Stunden bei 37 °C verdaut. Nach der anschließend durchgeführten Hitzeinaktivierung von *DpnI* (80 °C für 20 Minuten), erfolgte die Transformation des kompletten Ansatzes in kompetente DH5α.

### 5.3.10 Sequenzierung neu generierter Plasmide

Die Plasmidsequenzierungen, die im Rahmen dieser Arbeit notwendig waren, wurden von den Firmen MWG-Biotech AG (München, Deutschland) oder Davissequencing (Kalifornien, USA) durchgeführt. Nähere Informationen zu den einzelnen Sequenzierungen sind den jeweiligen Abschnitten zu entnehmen. Des Weiteren sind die Sequenzen der beiden verwendeten pUC-Standardsequenzierprimer bzw. der Sequenzierprimer1 - 4 in Kap. 5.1.3 (S. 74) nachzulesen.

## 5.4 Klonierung der Plasmide

### 5.4.1 Einführung von Cysteinen in $b_{syn}$

#### 5.4.1.1 Gezielte Mutagenese

##### *Plasmid pTH1'*

Die bei der Generierung von pTH1' verwendeten Reagenzien wurden in der Reihenfolge, wie in Tabelle beschrieben, gemischt. Die PCR verlief nach den in Tabelle 5.3 angegebenen Parametern.

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	27,2 $\mu$ l
10 x Reaction Buffer	5 $\mu$ l
pDM3 (11 ng / $\mu$ l)	7 $\mu$ l
Primer 101A (109 ng / $\mu$ l)	2,5 $\mu$ l
Primer 101B (100 ng / $\mu$ l)	2,3 $\mu$ l
dNTP-Mix (jedes 2,5 mM)	5 $\mu$ l
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	1 $\mu$ l

**Tabelle 5.2:** Pipetierschema für die PCR von pDM3 mit den Primer 101A und 101B.

	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	
Annealing	50	1	16
Kettenverlängerung	72	3½	
Kettenverlängerung	72	10	1
Reaktionsabbruch	4	20	

**Tabelle 5.3:** Zeit- und Temperaturparameter der PCR von pDM3 mit den Primer 101A und 101B.

Die in den obigen Tabellen dargelegten Versuchsparameter konnten im großen und ganzen auf die Herstellung der Plasmide pTH2' – pTH6' übertragen werden. Etwaige Abweichungen bzgl. der aufgeführten Werte sind nachfolgend aufgeführt.

*Plasmid pTH2'*

Jeweils 1,7 µl der Lösungen von 102A (144 ng / µl) bzw. 102B (145ng / µl) wurden 28,6 µl Wasser ergänzt.

Die Annealingtemperatur betrug nicht wie in Tabelle 5.3 angegeben 50 °C, sondern 55 °C.

*Plasmid pTH3'*

Bei der Synthese von pTH3' wurde Tabelle 5.3 in der Art abgewandelt, dass neben 1,4 µl von 111A (91 ng / µl) und 1,0 µl von 111B (122 ng / µl) auch 1 µl des dNTP-Mixes und 33,6 µl Wasser zum Einsatz kam. Als Annealingtemperatur wurden 67 °C eingestellt.

*Plasmid pTH4'*

Die Herstellung des Plasmids pTH4' erfolgte durch die Primer 112A bzw. 112B, die in Konzentrationen von 145 ng / µl bzw. 116 ng / µl vorlagen, wovon 1,7 µl bzw. 2,2 µl verwendet und mit 28,1 µl sterilen Wassers ergänzt wurden.

*Plasmid pTH5'*

pTH5' wurde mittels der Primer 113A bzw. 113B hergestellt, deren Lösungen lagen in Konzentrationen von 167 ng / µl bzw. 102 ng / µl vor. Hiervon fanden 1,0 µl bzw. 1,6 µl Verwendung und wurden mit 1 µl des dNTP-Mixes und 33,4 µl Wasser ergänzt. Die Annealingtemperatur bei der PCR belief sich auf 67°C.

*Plasmid pTH6'*

Neben 0,9 µl der Lösung von 114A (131 ng / µl) bzw. 0,7 µl der 114B-Lösung (136 ng / µl) kamen bei der Generierung von pTH6' auch 1 µl des dNTP-Mixes und 34,4 µl an sterilem Wasser zum Einsatz. Die Anlagerungstemperatur betrug bei dem hier durchgeführten Experiment 68 °C.

Nach Abschluss jeder durchgeführten PCR wurde wie in Kap. 5.3.9 (S. 91) beschrieben verfahren.

### 5.4.1.2 Umklonierung der mutierten Regionen in pDM3

#### *Doppelverdau mit EcoRI und HindIII*

0,7 – 1,2 µg (in je 3 – 8 µl) der Plasmide pDM3, pTH1' – 3', pTH5' und pTH6' wurden mit jeweils 2 µl 10 x Y<sup>+</sup>-Puffer, 1 µl *EcoRI* und 1 µl *HindIII* versetzt und mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach Mischen des Ansatzes erfolgte ein Verdau für 1 – 2 Stunden bei 37 °C.

#### *Doppelverdau mit EcoRI und SacI*

Zu je 5 µl (1 – 1,5 µg) der Lösungen von pDM3 und pTH4' wurden jeweils 2 µl 10 x Y<sup>+</sup>-Puffer, 1 µl *EcoRI* und 1 µl *SacI* gegeben und mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Es folgte ein Verdau für 1 – 2 Stunden bei 37 °C.

Nach der Deaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65 °C für 20 Minuten, wurden die Proben auf 0,9 %-ige Agarosegele (siehe 5.3.4) aufgetragen, woraus folgende Fragmente isoliert werden konnten:

- jeweils ein Fragment mit der Größe von 418 bp aus den Verdauen von pTH1' – 3', pTH5' und pTH6' mit *EcoRI* und *HindIII*
- ein Fragment mit der Größe von 2635 bp aus dem pDM3 / *EcoRI* / *HindIII* - Verdau
- ein 407-er Fragment aus dem Verdau von pTH4' mit *EcoRI* und *SacI*
- ein Fragment mit der Größe von 2646 bp aus dem pDM3 / *EcoRI* / *SacI*- Verdau

#### *Ligation der Fragmente*

Nach Extraktion der DNA aus den jeweiligen Agarosegelstücken (siehe Kap. 5.3.5; S. 89), erfolgte die Ligation des 2635 bp großen Fragmentes aus pDM3 (5 µl) mit den jeweils 418 bp großen Fragmenten aus pTH1' – 3', pTH5' und pTH6' (je 12 µl). Wie in Kap. 5.3.6 (S. 89) beschrieben wurden 2 µl des 10 x *T4* DNA Ligase Puffers und 1 µl der *T4* DNA Ligase zugesetzt und für 5 Stunden bei 37 °C oder 16 – 18 Stunden bei 16 °C inkubiert.

Analog dazu wurde bei der Ligation des 2646 bp großen Fragmentes aus pDM3 (5 µl) mit dem 407 bp großen Fragmentes aus pTH4' (12 µl) verfahren, wobei die Ligation für 16 Stunden bei 16 °C ablief.

Die Ligationsansätze wurden, nach thermischer Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 20 Minuten, komplett in kompetente DH5α transformiert (Kap. 5.3.7; S. 90), woraus die ligierten

Plasmide wieder isoliert und mit den pUC-Standardprimern 1 und 2 (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) von der Firma MWG-Biotech AG sequenziert werden konnte.

## 5.4.2 Umklonierung eines FLAG- in einen His-Tag

### 5.4.2.1 Plasmid pTH7

*Doppelverdau von pACWU1.2/βFlag/ΔCys bzw. von pUC119KA1 mit KpnI und SacI*

Nach Mischen von jeweils 6 µl der Lösungen von pACWU1.2/βFlag/ΔCys (1,0 µg) bzw. pUC119KA1 (1,6 µg) mit je 10 µl sterilem Wasser, 2 µl 10 x Y<sup>+</sup>-Puffer, 1 µl *KpnI* und 1 µl *SacI* erfolgte eine Inkubation für 1½ Stunden bei 37 °C. Vor dem Auftragen der Proben auf ein 0,9 %-iges Agarosegel (siehe 5.3.4), erfolgte die Deaktivierung der Restriktionsenzyme bei 80 °C für 20 min.

*Ligation der Fragmente*

Die benötigten DNA-Fragmente von pACWU1.2/βFlag/ΔCys bzw. von pUC119KA1 mit den Größen von 1438 bp bzw. 3162 bp, wurden nach durchgeführter Agarosegel-Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA, wie in Kap. 5.3.5 (S. 89) beschrieben, isoliert. Anschließend wurden 12 µl des 1438 bp großen DNA-Stranges mit 5 µl des pUC119KA1-Stückes, 2 µl 10 x *T4* DNA Ligase Puffers und 1 µl *T4* DNA Ligase versetzt und homogenisiert. Die anschließende Inkubation erfolgte dann für 1 Stunden bei 37 °C und im Anschluss für 16 Stunden bei 16 °C. Danach erfolgte die thermische Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 20 Minuten, woran sich die Transformation des kompletten Ligationsansatzes in kompetente DH5α anschloss (Kap. 5.3.7; S. 90).

### 5.4.2.2 Insertion einer HindIII-Schnittstelle in pTH7: Plasmid pTH8

Die Insertion der *HindIII*-Schnittstelle in pTH7 erfolgte mit Hilfe der Primer *HindIII*einA und B (siehe Kap. 5.1.3; S. 74), wobei nach dem in Tabelle 5.4 bzw. 5.5 aufgeführten Pipetierschema bzw. PCR-Parametern verfahren wurde.

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	39,3 µl
10 x Reaction Buffer	5 µl
pTH8 (105 ng / µl)	1 µl
Primer <i>HindIII</i> einA (87 ng / µl)	2,0 µl
Primer <i>HindIII</i> einB (75 ng / µl)	1,7 µl
dNTP-Mix (jedes 2,5 mM)	1 µl
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	1 µl

**Tabelle 5.4:** PCR-Pipetierschema zur Herstellung von pTH8.

	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklenzahl
Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	
Annealing	60	1	16
Kettenverlängerung	72	4½	
Kettenverlängerung	72	10	1
Reaktionsabbruch	4	20	

**Tabelle 5.5:** Zeit- und Temperaturparameter der durchgeführten PCR.

Nach Abschluss der PCR wurde, wie in Kap. 5.3.9 (S. 91) beschrieben, weiter verfahren.

#### 5.4.2.3 Das Plasmid pTH9: Substitution der FLAG-Tag-Sequenz aus pTH8 gegen eine His-Tag-Sequenz

##### *Doppelverdau von pTH8 mit DraIII und HindIII bzw. DraIII und SpeI*

10 µl (1 µg) von pTH8, 6 µl steriles Wasser und 1 µl *DraIII* wurden entweder mit 2 µl 10 x R<sup>+</sup>-Puffer und 1 µl *HindIII* oder mit 2 µl 10 x R<sup>+</sup>-Puffer und 1 µl *SpeI* versetzt und für 1½ Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme (65 °C für 20 Minuten) durchgeführt und die Proben auf ein 0,9 %-iges Agarosegel (siehe 5.3.4) aufgetragen, woraus folgende Fragmente isoliert werden konnten (siehe Kap. 5.3.5; S. 89): ein Fragment mit der Größe von 952 bp aus dem pTH8/*DraIII/HindIII* – Verdau, und ein 3606-er Fragment aus dem Verdau von pTH8 mit *DraIII* und *SpeI*.

*Annealing der Oligonukleotide Insert1 und Insert2***10 x Annealing-Puffer**

Tris	100 mM	1,2114 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100 mM	2,0331 g
NaCl	500 mM	2,922 g

ad H<sub>2</sub>O 100 ml; pH 7,5 (HCl)

Insert1 und Insert2 wurden so verdünnt, dass von jedem Oligonukleotid 1 nmol eingesetzt und mit 1,7 µl des 10 x Annealing-Puffers versetzt werden konnte, damit man ein Gesamtvolumen von 17,6 µl erhielt. Nach einer Inkubation der Mischung bei 70 °C für 5 Minuten, erfolgte ein langsames Abkühlen auf Raumtemperatur, was etwa eine Stunde in Anspruch nahm. Danach wurde der Hybridisierungsansatz bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

*Ligation der Fragmente*

Zur Ligation der beiden Fragmente von pTH8 mit den aneinandergelagerten Oligonukleotiden wurden jeweils 4 µl jedes Fragmentansatzes mit 9 µl des Hybridisierungsansatzes, 2 µl 10 x T4 DNA Ligase Puffers und 1 µl T4 DNA Ligase versetzt und homogenisiert. Nach einer Inkubation für 5 Stunden bei 37 °C und der Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C für 20 Minuten, erfolgte die Transformation der kompletten Ansatzes in kompetente DH5α (Kap. 5.3.7; S. 90).

**5.4.2.4 Das Plasmid pTH10: Entfernen der HindIII-Schnittstellen aus pTH9**

Die *HindIII*-Schnittstellen in dem Plasmid pTH9 wurde unter Mitwirkung der Primer HisA und HisB entfernt (siehe Kap. 5.1.3; S. 74). Die dazu benötigten Reagenzien wurden analog Tabelle 5.6 gemischt und die PCR mit den in Tabelle 5.7 dargelegten PCR-Parametern durchgeführt. Im Anschluss an die durchgeführten Polymerasenkettenreaktionen wurde weiter nach Kap. 5.3.9 (S. 91) verfahren.



H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	31,1 µl
10 x Reaction Buffer	5 µl
pTH10 (72 ng / µl)	1 µl
Primer HisA (131 ng / µl)	1,9 µl
Primer HisB (98 ng / µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (jedes 2,5 mM)	5 µl
DMSO	2,5 µl
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	1 µl

**Tabelle 5.6:** PCR-Pipetierschema zur Herstellung von pTH10.

	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	
Annealing	55	1	16
Kettenverlängerung	72	4½	
Kettenverlängerung	72	10	1
Reaktionsabbruch	4	20	

**Tabelle 5.7:** Zeit- und Temperaturparameter der durchgeführten PCR.

#### 5.4.2.5 Das Plasmid pTH11

##### *Doppelverdau von pTH10 mit SacI und SpeI*

10 µl der Lösung von pTH10 (etwa 1,0 µg) wurden mit 6 µl sterilem Wasser, 2 µl 10 x Y<sup>+</sup>-Puffer und je 1 µl *SacI* und *SpeI* gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

##### *Doppelverdau von pACWU1.2/βFlag/ΔCys mit SacI und SpeI*

Nach Addition von 2 µl 10 x Y<sup>+</sup>-Puffer und je 1 µl *SacI* und *SpeI* zu 16 µl einer pACWU1.2/βFlag/ΔCys-Lösung (1,0 µg), erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Vor dem Auftragen der Proben auf ein 0,9 %-iges Agarosegel (siehe 5.3.4), wurde eine thermische Deaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65 °C für 20 min durchgeführt.

### *Ligation der Fragmente*

Die erforderlichen DNA-Stücke von pTH10 und pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys, die eine Größe 519 bp und 8701 bp aufwiesen, wurden nach Abschluss der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA, wie in Kap. 5.3.5 (S. 89) beschrieben, isoliert.

Schließlich wurden 12  $\mu$ l des 519 bp großen DNA Stücks von pTH10 mit 5  $\mu$ l des Fragmentes von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys, 2  $\mu$ l 10 x T4 DNA Ligase Puffers und 1  $\mu$ l T4-DNA Ligase versetzt und gemischt. Die anschließende Inkubation des Ansatzes erfolgte dann für 5 Stunden bei 37 °C und im Anschluss für 16 Stunden bei 16 °C.

An die thermische Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 20 Minuten, schloss sich die Transformation des kompletten Ligationsansatzes in kompetente DH5 $\alpha$  an (Kap. 5.3.7; S. 90), woraus die neu ligierten Plasmide wieder isoliert und mit den Sequenzierprimern 1 und 2 (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) von der Firma MWG-Biotech AG (München, Deutschland) sequenziert werden konnte.

## **5.4.3 Einführung von Cysteinen in die b<sub>2</sub>-Untereinheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase**

### **5.4.3.1 Herstellung von pTH12**

*Doppelverdau* von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys bzw. von pUC119KA1 mit BamHI und SphI

Je 2  $\mu$ l der Lösungen von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys (0,8  $\mu$ g ) bzw. pUC119KA1 (1,0  $\mu$ g) wurden mit jeweils 14  $\mu$ l sterilem Wasser, 2  $\mu$ l G<sup>+</sup>-Puffer, 1  $\mu$ l BamHI und 1  $\mu$ l SphI versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20 Minuten bei 80 °C wurde die Proben auf ein 0,9 %-iges Agarosegel (siehe 5.3.4) aufgetragen.

### *Ligation der Fragmente*

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die gewünschten Fragmente von pACWU1.2/ $\beta$ Flag/ $\Delta$ Cys bzw. pUC119KA1, welche 1493 bp bzw. 3146 bp groß waren, aus der Gelmatrix ausgeschnitten und die DNA wie in Kap. 5.3.5 (S. 89) beschrieben isoliert. Anschließend wurden 12  $\mu$ l des 1493-er Fragmentes mit 5  $\mu$ l des pUC119KA1-Stückes, 2  $\mu$ l

10 x *T4* DNA Ligase Puffers und 1  $\mu\text{l}$  *T4* DNA Ligase versetzt und homogenisiert. Die Inkubation erfolgte dann für 2 Stunden bei 37 °C und im Anschluss bei 16 °C für 17 Stunden. Nach thermischer Inaktivierung der Ligase bei 67,5 °C für 20 Minuten, wurde der Ligationsansatz komplett in kompetente DH5 $\alpha$  transformiert (Kap. 5.3.7; S. 90).

### 5.4.3.2 Gezielte Mutagenese

Als Templat für die im folgenden beschriebenen Mutationen diente das Plasmid pTH12.

#### *Plasmid pTH13*

Die bei Herstellung des Plasmids pTH13 verwendeten Reagenzien wurden in der Reihenfolge, wie in Tabelle 5.8 beschrieben, gemischt. Die Durchführung der PCR erfolgte nach den in Tabelle 5.9 angegebenen Parametern.

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	32,1 $\mu\text{l}$
10 x Reaction Buffer	5 $\mu\text{l}$
pTH12 (85 ng / $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
Primer 103A (87 ng / $\mu\text{l}$ )	2,9 $\mu\text{l}$
Primer 103B (85 ng / $\mu\text{l}$ )	3,0 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (jedes 2,5 mM)	5 $\mu\text{l}$
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	1 $\mu\text{l}$

**Tabelle 5.8:** Pipetierschema für die PCR von pTH12 mit den Primer 103A und 103B.

	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	
Annealing	50	1	16
Kettenverlängerung	72	4½	
Kettenverlängerung	72	10	1
Reaktionsabbruch	4	20	

**Tabelle 5.9:** Zeit- und Temperaturparameter der durchgeführten PCR.

Bei der Herstellung der Plasmide pTH14 – pTH22 konnten die in den Tabellen 5.8 bzw. 5.9 aufgeführten Parameter weitgehend übernommen werden. Abweichungen davon sind nachfolgend aufgelistet.

#### *Plasmid pTH14*

Neben 2,3  $\mu\text{l}$  der Lösung von 105A (111 ng /  $\mu\text{l}$ ) bzw. 2,9  $\mu\text{l}$  der 105B-Lösung (87 ng /  $\mu\text{l}$ ) kamen bei der Generierung von pTH14 auch 32,8  $\mu\text{l}$  an sterilem Wasser zum Einsatz.

#### *Plasmid pTH15*

Zur Herstellung des Plasmids pTH15 wurden 1,6  $\mu\text{l}$  einer Lösung des Primers 106A (123 ng /  $\mu\text{l}$ ) bzw. 1,7  $\mu\text{l}$  einer Lösung des Primers 101B (120 ng /  $\mu\text{l}$ ) eingesetzt, die mit 1  $\mu\text{l}$  des dNTP-Mixes und 39,7  $\mu\text{l}$  an sterilem Wasser ergänzt wurden. Die Annealingtemperatur bei der PCR betrug 55 °C.

#### *Plasmid pTH16*

Die Generierung des Plasmids pTH16 erfolgte mittels der Primer 108A bzw. 108B. Deren Lösungen lagen in Konzentrationen von 156 ng /  $\mu\text{l}$  bzw. 101 ng /  $\mu\text{l}$  vor, wovon 1,0  $\mu\text{l}$  bzw. 1,5  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurden. Weiterhin erfolgte die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  des dNTP-Mixes und 39,5  $\mu\text{l}$  an sterilem Wasser. Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 65 °C durchgeführt.

#### *Plasmid pTH17*

Zur Herstellung des Plasmids pTH17 wurden 1,1  $\mu\text{l}$  einer Lösung des Primers 109A (107 ng /  $\mu\text{l}$ ) bzw. 1,0  $\mu\text{l}$  einer Lösung des Primers 109B (123 ng /  $\mu\text{l}$ ) eingesetzt, die mit 1  $\mu\text{l}$  des dNTP-Mixes und 39,9  $\mu\text{l}$  sterilen Wassers ergänzt wurden. Die Annealingtemperatur betrug 65 °C.

#### *Plasmid pTH18*

Jeweils 1,0  $\mu\text{l}$  der Lösungen von 110A (118 ng /  $\mu\text{l}$ ) bzw. 110B (124ng /  $\mu\text{l}$ ) wurden durch 1  $\mu\text{l}$  des dNTP-Mixes und 40,0  $\mu\text{l}$  an sterilem Wasser aufgefüllt. 65 °C wurden als Annealingtemperatur eingestellt.

*Plasmid pTH19*

Bei der Synthese von pTH19 kamen neben 2,7 µl von 111A (91 ng / µl) und 2,0 µl von 111B (122 ng / µl) auch 33,3 µl steriles Wasser zum Einsatz.

*Plasmid pTH20*

Die Herstellung des Plasmids pTH20 erfolgte durch die Primer 112A bzw. 112B, die in Konzentrationen von 145 ng / µl bzw. 116 ng / µl vorlagen. Hiervon wurden 1,7 µl bzw. 2,2 µl verwendet, die mit 34,1 µl sterilen Wassers ergänzt wurden

*Plasmid pTH21*

pTH21 wurde mittels der Primer 113A bzw. 113B hergestellt, deren Lösungen in lagen Konzentrationen von 167 ng / µl bzw. 102 ng / µl vorlagen, wovon 1,5 µl bzw. 2,5 µl zum Einsatz kamen. Weiterhin wurden 34,0 µl steriles Wasser zugegeben.

*Plasmid pTH22*

Neben 1,7 µl der Lösung von 114A (131 ng / µl) bzw. 1,3 µl der 114B-Lösung (136 ng / µl) kamen bei der Generierung von pTH22 auch 35,0 µl an sterilem Wasser zum Einsatz.

Nach Abschluss der durchgeführten Polymerasenkettenreaktionen wurde wie in Kap. 5.3.9 (S. 91) beschrieben verfahren.

**5.4.3.3 Umklonierung der mutierten Regionen in pTH11***Doppelverdau mit BssHII und PpuMI*

0,5 – 1,5 µg (in je 5 – 10 µl) der Plasmide pTH11 und pTH13 – 22 wurden mit jeweils 2 µl 10 x NEB4-Puffer, 1 µl BssHII und 1 µl PpuMI versetzt, mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und homogenisiert. Nach Mischen des Ansatzes erfolgte ein Verdau für 1 – 2 Stunden bei 37 °C.

Nach der Deaktivierung der Restriktionsenzyme bei 80 °C für 20 Minuten, wurden die Proben auf 0,9 %-ige Agarosegele aufgetragen, woraus folgende Fragmente isoliert werden konnten:

- je ein 478- bzw. 479-er Fragment aus dem Verdau der Plasmide pTH13 - 22
- ein Fragment mit der Größe von 8741 bp aus pTH11

*Ligation der Fragmente*

Nach der DNA-Extraktion aus den entsprechenden Agarosegelstücken (siehe Kap. 5.3.5; S. 89), erfolgte die Ligation des 8741 bp großen Fragmentes aus pTH11 (5  $\mu$ l) mit den jeweils 478 - 479 bp großen Fragmenten aus pTH13 – 22 (je 12  $\mu$ l). Wie in Kap. 5.3.6 (S. 89) beschrieben wurden 2  $\mu$ l des 10 x *T4* DNA Ligase Puffers und 1  $\mu$ l der *T4* DNA Ligase zugesetzt und für 5 Stunden bei 37 °C oder 16 – 18 Stunden bei 16 °C inkubiert.

Schließlich wurden die Ligationsansätze vollständig in kompetente DH5 $\alpha$  transformiert (Kap. 5.3.7; S. 90), woraus die neu hergestellten Plasmide wieder isoliert und mit den Sequenzierprimern 3 und 4 (siehe Kap. 5.1.3; S. 74) von der Firma Davissequencing aus Kalifornien sequenziert werden konnte.

## 5.5 Proteinspezifische Arbeiten

### 5.5.1 Isolierung der $b_{\text{syn}}$ -Mutanten

#### 5.5.1.1 Aufzucht und Ernte der Zellen

##### TMg8-Puffer

Tris	50 mM	0,606 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mM	0,203 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 100 ml; pH 8,0 (HCl)		

Die Expression der einzelnen Mutanten von  $b_{\text{syn}}$  erfolgte im Stamm JM109, welcher das für die jeweilige Mutante notwendige Plasmid trug. Zwei bis vier 2-l-Erlenmeyerkolben mit je 500 ml 2xYTamp-Medium wurden mit je 25 ml Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C mit 220 bis 300 rpm geschüttelt. Das Zellwachstum wurde halbstündlich durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 erfolgte die Zugabe von IPTG (Endmolarität: 1 mM) und es wurde weiter wachsen gelassen bis das Wachstum in die stationäre Phase überging ( $OD_{600}$  1,5 - 2,5). Nach Ernte und einmaligem Waschen der Zellen mit 3 - 6 ml TMg8-Puffer pro g Zellen (jeweils im JA 10-Rotor bei 4 °C und 8000 rpm für 10 min; 11325 x g) wurde das erhaltene Pellet bei -80 °C eingefroren und konnte so für mehrere Tage gelagert werden.

#### 5.5.1.2 Isolierung und Aufreinigung der $b_{\text{syn}}$ -Mutanten

##### TED-Puffer

Tris	50 mM	6,057 g
EDTA	1 mM	0,292 g
DTT	1 mM	0,154 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 1 l; pH 8,0 (HCl)		

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das bei -80 °C gelagerte Zellpellet wurde in TMg8-Puffer (3 - 6 ml Puffer pro Gramm Zellen; 30 - 40 ml Suspension) resuspendiert und mit 150 - 200 µl einer 0,2 M PMSF-Lösung versetzt, sodass eine finale

Molarität von 1 mM PMSF in der Zellsuspension vorlag. Der nachfolgende Zellaufschluss wurde entweder mit einer French Pressure Cell der Fa. Aminco (2 – 3 Durchgänge mit 1200) oder einer EmulsiFlex 5 der Fa. Avestin (2 – 3 Durchgänge mit 100000 – 140000 kPa) durchgeführt. Nach zwei sich anschließenden Zentrifugationsschritten, erst bei 27216 x g für 30 min (JA 20, 15000 rpm) und danach für 60 min bei 55000 rpm in einem Rotor Ti 60 (304581 x g) bzw. bei 60000 rpm im Rotor Ti 70 (370541 x g), wurde der erhaltene Überstand mit zwei Dritteln des eigenen Volumens an gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, so dass eine 40 %ige  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung entstand. Nach 1 – 2 Stunden langsamen Rührens wurde das ausgefallene Protein (JA 20, 15000 rpm für 30 min; 27216 x g) abgetrennt, in 4 – 5 ml TED-Puffer aufgenommen und über Nacht gegen 1 l TED-Puffer dialysiert.

Nach Auftragung der dialysierten Proteinlösung auf eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule (2,2 x 12 cm) und Spülen mit etwa 50 ml TED-Puffer, wurde ein Gradient aus 300 ml TED (0 – 250 mM NaCl) angelegt. Mittels Bradford-Test (Bradford, 1976) wurden die Protein-enthaltenden Fraktionen bestimmt, welche dann vereinigt, mittels einer Amiconzelle (PM10-Membran) auf 5 – 8 ml eingengt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

### 5.5.1.3 Site-specific Spin Labeling der $b_{\text{syn}}$ -Mutanten

#### TMK-Puffer

Tris	50 mM	6,057 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mM	1,232 g
KCl	300 mM	22,365 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 1 l; pH 7,5 (HCl)		

Alle Arbeiten wurden bei 20-23  $^\circ\text{C}$  durchgeführt. Zum Entfernen von DTT wurden 1,0 – 3,0 mg  $b_{\text{syn}}$  in 1,5 bis 2,0 ml TED-Puffer mittels Filtration über eine Sephadex-G25-Säule (1,4 x 16 cm oder 0,9 x 27,5 cm) in TMK-Puffer überführt. Die Protein-enthaltenden Fraktionen, deren Ermittlung mittels Bradford-Test (Bradford, 1976) erfolgte, wurden zunächst unter Verwendung von Centricon10-Konzentratoren auf 2 – 3 ml eingengt. Daran schloss sich eine Inkubation mit einem zehnfachen Überschuss an IAAT (100 mM in DMSO) bzw. mit MTS (100 mM in DMF) bezogen auf die eingesetzte Menge an  $b_{\text{syn}}$ -Dimer für 45 min an. Nach Abtrennen des nichtgebundenen, freien Labels mittels der gleichen Säule, wurde das



modifizierte  $b_{syn}$  mit einem Centricon10 maximal (etwa 40 – 60  $\mu$ l) aufkonzentriert und bei -80 °C eingefroren.

### 5.5.2 Isolierung der $F_1$ -ATPase bzw. der $F_0F_1$ -ATP-Synthase aus *E.coli*

Die Wildtyp- $F_1$ -ATPase wurde aus dem Stamm SWM1, der in dem GEAU-Medium mit 2,5 % LB und 15  $\mu$ g / ml Chloramphenicol (siehe Kap. 5.2.1; S. 81) gewachsen war, isoliert.

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase hingegen wurde in DK8-Zellen exprimiert, die in TB-Medium mit 1,1 % Glucose und 50  $\mu$ g / ml Ampicillin (siehe Kap. 5.2.1; S. 81) gewachsen waren. Die Besonderheit der DK8-Zellen liegt darin, dass das für die  $F_0F_1$ -Expression verantwortliche *unc*-Operon deletiert ist und diese Zellen somit keine ATP-Synthase herstellen können. Deshalb konnte dieser Stamm mit Plasmiden transformiert werden, die eine Gensequenz enthalten, welche für eine cysteinfreie Mutante bzw. bestimmter Cysteinmutanten der ATP-Synthase kodieren und an ihren  $\beta$ -Untereinheiten His-Tags tragen.

#### 5.5.2.1 Aufzucht und Ernte der Zellen

100 ml des jeweiligen Mediums wurden mit einer Einzelkolonie der entsprechenden Zellen beimpft und für 18 - 20 Stunden bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Diese Kultur diente zum Beimpfen von viermal 500 ml des gleichen Mediums mit obigen Zusätzen, die ihrerseits bei 37 °C mit 300 rpm inkubiert wurden.

#### STEM-Puffer

TES	100 mM	2,292 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20 mM	0,407 g
EGTA	0,25 mM	0,001 g
EACA	40 mM	0,525 g
PAB	5 mM	0,104 g
Sucrose	250 mM	8,558 g

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 100 ml; pH 7,0 (HCl)

Bevor das Wachstum, das halbstündlich durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) kontrolliert wurde, in die stationäre Phase überging ( $OD_{600}$  5 - 7), wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 4 °C und 8000 rpm für 10 Minuten im JA-10 Rotor (11325 x g) geerntet, mit etwa 5 ml STEM-Puffer pro g Zellen gewaschen und erneut wieder zuvor zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde bei – 80 °C eingefroren und konnte so für mehrere Tage gelagert werden.

### 5.5.2.2 Präparation der $F_0F_1$ -enthaltenden Membranvesikel

#### TEM-Puffer

Dieser Puffer besaß die gleiche Zusammensetzung wie der STEM-Puffer, allerdings ohne Sucrose.

#### TES50+PAB-Puffer

TES	50 mM	1,146 g
DTT	0,5 mM	0,008 g
EDTA	1 mM	0,029 g
EACA	40 mM	0,525 g
PAB	5 mM	0,104 g
Glycerin	5 % (v / v)	5 ml
ad $H_2O_{bidest}$ 100 ml; pH 7,0 (HCl)		

#### TES5+PAB-Puffer

TES	5 mM	0,115 g
DTT	0,5 mM	0,008 g
EDTA	1 mM	0,029 g
EACA	40 mM	0,525 g
PAB	5 mM	0,104 g
Glycerin	5 % (v / v)	5 ml
ad $H_2O_{bidest}$ 100 ml; pH 7,0 (HCl)		

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das bei –80 °C gelagerte Zellpellet wurde in STEM-Puffer (3 – 5 ml Puffer pro Gramm Zellen; 30 – 40 ml Suspension)

resuspendiert und mit 150 – 200  $\mu$ l einer 0,2 M PMSF-Lösung versetzt, sodass eine finale Molarität von 1 mM PMSF in der Zellsuspension vorlag. Der nachfolgende Zellaufschluss wurde mit einer EmulsiFlex 5 der Fa. Avestin (2 – 3 Durchgänge mit 110000 – 150000 kPa) durchgeführt. Unzerstörte Zellen und größere Zelltrümmer wurden durch eine anschließende Zentrifugation bei 15000 rpm für 30 Minuten im JA-20 Rotor (27216 x g) entfernt. Der trübe, gelbliche Überstand wurde mit der gleichen Menge TEM-Puffer versetzt und einer erneuten Zentrifugation für 2 Stunden bei 55000 rpm in einem Rotor Ti-60 (304581 x g) unterzogen. Das Pellet wurde dann in 24 ml TES50+PAB-Puffer resuspendiert und für 2 Stunden wie zuvor zentrifugiert. Nach einer erneuten Resuspension in 24 ml TES5+PAB-Puffer und einer Zentrifugation für 1 Stunde wie oben, konnte das abschließend erhaltene braune Pellet für mehrere Tage bei  $-80$  °C gelagert werden.

### **5.5.2.3 Isolierung der $F_1$ -ATPase bzw. der $F_0F_1$ -ATP-Synthase**

Aus den Membranvesikeln, die nach Waschen mit TES5+PAB-Puffer weitestgehend von löslichen Proteinen befreit worden waren, konnte nun sowohl die Wildtyp- $F_1$  (aus SWM1-Zellen) als auch die His-getaggte  $F_0F_1$ -ATP-Synthase (exprimiert in DK8) isoliert werden.

#### **5.5.2.3.1 Isolierung der Wildtyp- $F_1$ -ATPase aus SWM1**

##### **TES5–PAB-Puffer**

Dieser Puffer hatte die gleiche Zusammensetzung wie der TES5+PAB-Puffer, allerdings ohne PAB.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das nach der Zentrifugation mit TES5+PAB erhaltene Pellet wurde zweimal in TES5–PAB-Puffer resuspendiert und zweimal für je 30 Minuten bei 55000 rpm in einem Ti-60 Rotor zentrifugiert. Nach Verwerfen des Niederschlags wurde zu den vereinigten Überständen pro 100 ml Lösung 5 ml 1 M TES-Puffer, 0,2 ml 0,5 M DTT und 5 ml 1 M  $MgSO_4$  gegeben und 30 Minuten bei 13000 rpm in einem JA-14 Rotor (25931 x g) zentrifugiert. Nach Zugabe von 28 ml 50 % PEG6000 zum Überstand, 10-minütigem Rühren auf Eiswasser und einer erneuten Zentrifugation bei 13000 rpm in einem JA-14 Rotor für 30 Minuten wurde der dabei resultierende Überstand verworfen.

**Säulen- und Lagerungspuffer**

Tris	50 mM	6,057 g
EDTA	2 mM	0,584 g
ATPNa <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1 mM	0,605 g
DTT	1 mM	0,154 g
EACA	4 mM	0,525 g
Glycerin	10 % (v / v)	100 ml

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 1 l; pH 7,4 bei 4 °C (NaOH)

Nach gründlichem Abtropfen über Nacht wurde der Niederschlag in etwa 40 ml Säulenpuffer gelöst, 20 Minuten bei 13000 rpm in einem JA-14 Rotor zentrifugiert und auf eine Whatman DE-52-Säule (0,9 x 12 cm) aufgetragen. Nach Spülen mit etwa 100 ml Säulenpuffer und Anlegen eines Gradienten aus 400 ml Säulenpuffer mit 0 – 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, konnten die Protein-enthaltenden Fraktionen mittels Bradford-Test (Bradford, 1976) bestimmt werden. Aufeinanderfolgende F<sub>1</sub>-enthaltende Fraktionen mit gleicher spezifischer Aktivität wurden vereinigt, mit Hilfe einer Amiconzelle (PM30-Membran) auf 8 – 10 ml konzentriert und bei -80 °C eingefroren.

**5.5.2.3.2 Modifizierung bzw. Isolierung der His-getaggten F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase****His1-Puffer**

Tris	50 mM	0,606 g
KCl	100 mM	0,746 g
ATPNa <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1 mM	0,605 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 mM	0,123 g
EACA	40 mM	0,525 g
PAB	5 mM	0,104 g
Imidazol	20 mM	0,136 g
Glycerin	10 % (v / v)	10 ml

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 100 ml; pH 7,5 bei 4 °C (HCl)

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Um etwaige DTT-Reste, welche die Reaktion des Spinlabels mit den Cysteinen in der b<sub>2</sub>-Untereinheit stören bzw. verhindern

würden, zu entfernen, wurde das nach Waschen mit TES5+PAB-Puffer erhaltene Pellet in His1-Puffer resuspendiert und bei 55000 rpm in einem Rotor Ti-60 (304581 x g) zentrifugiert.

### His2-Puffer

His1-Puffer		100 ml
Phosphatidylcholin	0,05 %	0,05 g
n-octyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid	1,0 %	1,0 g
pH 7,5 bei 4 °C (HCl)		

### His3-Puffer

Der His3-Puffer entsprach in Zusammensetzung und pH-Wert dem His2-Puffer, allerdings enthielt er im Gegensatz zu diesem anstatt 20 mM Imidazol 150 mM (1,021 g pro Liter).

Nach Resuspendierung des so erhaltenen Niederschlages in 2 ml His2-Puffer pro 100 mg Pellet und Zugabe von 2  $\mu$ l einer 100 mM Spinlabel-Lösung pro 100 mg Pellet, erfolgte eine Inkubation für anderthalb Stunden bei 4 °C.

Im Anschluss an eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 16000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der braune Überstand auf eine Ni-NTA-Säule (0,9 x 3 cm, etwa 3 ml Bettvolumen), welche mit 10 ml des Puffers His2 equilibriert worden war, aufgetragen.

Nach Spülen mit 30 ml His2-Puffers, wurde die Ni-NTA-Säule mit viermal 1,5 ml His3-Puffer eluiert. Die so erhaltenen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### *Vorbereitung und Recycling der Ni-NTA-Agarose*

Die 3 ml Ni-NTA-Agarose wurden erst mit 10 ml H<sub>2</sub>O, danach mit 3 - 9 ml 0,1 M NiSO<sub>4</sub>-Lösung und wiederum mit 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Equilibriert wurde die Säule mit 10 ml des Puffers His2.

### Recyclingpuffer

Tris	25mM	0,30 g
EDTA	100 mM	2,92 g
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 100 ml; pH 8,0 (HCl)		

Nach Gebrauch wurde das Material der Reihe nach mit 10 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml Recyclingpuffer und wiederum mit 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in 20 %-igem Ethanol gelagert.

## 5.6 Analytik

### 5.6.1 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentrationsbestimmung der eingesetzten Proteine wurde nach der Methode von Bradford (1976) bzw. Lowry (Petersen 1977) durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 595 nm bzw. 650 nm, wobei Rinderserumalbumin (BSA) als Standard verwendet wurde.

### 5.6.2 Ermittlung der ATPase-Aktivität

#### ATPase-Cocktail

Tris	50 mM	0,606 g
ATPNa <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	10 mM	0,605 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4 mM	0,080 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 100 l; pH 8,5 (HCl)		

Zur Ermittlung der ATPase-Aktivität der isolierten F<sub>1</sub> oder F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> wurden 1 - 1,5 µg der jeweiligen Proteinprobe mit 500 µl ATPase-Cocktail versetzt, für 5 - 10 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 500 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung inaktiviert. Desweiteren wurde die gleiche Menge Protein zuerst mit der SDS-Lösung und danach mit dem ATPase-Cocktail versetzt und diente so als Blank.

Die Bestimmung des so freigesetzten anorganischen Phosphats erfolgte nach dem Verfahren von Taussky und Shorr (1953), wobei als Standard eine 5 mM Lösung aus getrocknetem, wasserfreiem K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> diente. Die Angabe der Aktivität geschah in Units U, wobei 1 U einer freigesetzten Posphatmenge von 1 µmol pro Minute entspricht. Die spezifische Aktivität U<sub>spez</sub> ist definiert als U / mg.

### 5.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 5.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach einer Vorschrift von Laemmli (1970) mit einigen Änderungen durchgeführt. So verlief die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 16 mA und wurde in Kammern mit den Abmessungen (8 x 8 x 0,2 cm), (8 x 10 x 0,08 cm) oder (10 x 10 x 0,08 cm) durchgeführt. Es wurde 8 – 12 %-ige Gele angefertigt, deren Anfärbung in Coomassie Brillant Blau R250 erfolgte.

##### 5xSDS-Probenpuffer

1M Tris HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50 % Glycerin	5 ml
10 % SDS	2 ml
2-Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau	1 ml
H <sub>2</sub> O	0,9 ml
DTT	160 mM 0,12468 g

Der 5xSDS-Probenpuffer wurde im Vergleich zur Proteinprobe 1:5 eingesetzt. Bevor die Proben auf die SDS-Gele aufgetragen wurden erfolgte eine Inkubation für 25 - 30 min bei 37°C. Als Standard diente im allgemeinen der Proteinmarker #SM0661 der Firma MBI-Fermentas, der Fragmente mit den Größen von 10 -200 kDa besitzt.

#### 5.6.3.2 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese wurde nach einer Vorschrift von Cox *et al.* (1978) durchgeführt.

#### 5.6.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die erste Dimension wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt und für die zweite eine SDS-Gelelektrophorese. Aus dem nativen Gel wurde die gewünschte Bahn

ausgeschnitten und mittels heißer Agarose auf das Sammelgel des SDS-Gels aufgeklebt. Danach erfolgte eine Elektrophorese analog Kap. 5.6.3.1 (112).

#### 5.6.4 Western Blot (Immunoblot)

Beim Western-Blotting handelt es sich um eine Nachweismethode für Proteine, wobei die Proteine per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12 %-ige Gele; siehe Kap. 5.6.3.1; S. 112) aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet werden. Der Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch an das Protein binden, wobei die Antikörper so modifiziert sein müssen, daß sie z.B. eine Farbreaktion katalysieren, was zu einer Kenntlichmachung des nachzuweisenden Proteins auf der Membran führt soll.

##### Transferpuffer

Tris	25 mM	3,03 g
Glycin	0,2 M	14,4 g
SDS	0,037 %	0,37g
Methanol	20%	200 ml

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 1 l

Nach Beendigung der SDS-PAGE, die mit einem *Prestained SDS-PAGE Standard Low Range*-Marker (14 - 97 kDa) erfolgte, wurde das Gel für 5 - 10 Minuten in Transferpuffer eingelegt. Als Blotting-Membran wurde eine Immun-Blot™ PVDF der Fa. BIO-RAD verwendet, die für etwa 10 Sekunden in Methanol, dann für etwa 30 Sekunden in Wasser und für mindestens 5 Minuten in Transferpuffer gewaschen wurde. Die für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran notwendigen Filterpapiere (wenig größer als das Gel) und Kissen aus Kunstfaser wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet.

Bei der Herstellung des „Transfersandwiches“ war zu beachten, daß dessen schwarze Seite nach unten zeigte und in der Reihenfolge Kunstfaserkissen, Filterpapier, SDS-Gel, PVDF-Membran, zweites Filterpapier, zweites Kunstfaserkissen und der transparenten Seite der Form aufgebaut wurde. Eingesetzt wurde das Sandwich in die Mini Trans-Blot® cell der Fa. BIO-RAD in der Art, daß die schwarze Seite des Sandwiches in Richtung der schwarzen Seite der Kammer, die mit Eis und kaltem Transferpuffer gefüllt war, zeigte.



**TBS-Puffer**

Tris	20 mM	2,42 g
NaCl	500 mM	29,22 g
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 1 l; pH 7,5 (HCl)		

Für TBS-T, werden 500 µl Tween20 pro Liter zugesetzt.

Nach einem Transfer für 1 Stunde bei 100 V dreimaligem Waschen der PVDF-Membran für jeweils 5 Minuten in TBS-T-Puffer, wurde diese für 1 Stunde in TBS-Puffer, der 5% Magermilchpulver enthielt, eingelegt. Nach einem erneuten dreimaligen Waschen der Membran in TBS-Puffer für je 5 Minuten, wurde der mit den primären anti-b-Antikörpern (von R.A. Capaldi) versetzte TBS-Puffer (50 ml) zu der Membran gegeben und für 1 Stunde inkubiert. Hieran schloss wiederum ein dreimaliges Waschen in TBS-T-Puffer an, gefolgt von einer Inkubation der Membran für eine Stunde in 50 ml TBS-Puffer, der mit 1,6 µl Anti-Mouse-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat versetzt worden war.

**Developing-Puffer**

Tris	100 mM	12,1 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,5 mM	0,1 g

**Lösung A**

NBT	6 mg
DMF	0,14 ml
H <sub>2</sub> O	0,06 ml

**Lösung B**

BCIP	3 mg
DMF	0,2 ml

Im Anschluss an ein erneutes dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer für je 5 Minuten, erfolgte eine Inkubation dieser mit 20 ml des Developing-Puffer, der je 200 µl der Lösungen A und B enthielt, bis eine gewünschte Färbung der Proteinbanden eintrat, woraufhin die Membran mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und getrocknet wurde.

### 5.6.5 MPB-Labeling

25 ml TB-Medium mit 1,1 % Glucose und 50 µg / ml Ampicillin (siehe Kap. 5.2.1; S. 81) wurden mit einer Einzelkolonie der entsprechenden DK8-Zellen beimpft und für 18 - 20 Stunden bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Diese Kultur diente zum Beimpfen von 500 ml des gleichen Mediums mit obigen Zusätzen, die ihrerseits bei 37 °C mit 300 rpm inkubiert wurden.

#### PufferA

Tris	50 mM	1,146 g
KCl	100 mM	0,746 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM	0,102 g
EDTA	0,1 mM	0,003 g
PMSF	1 mM	0,0174 g

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 100 ml; pH 8,0 (HCl)

Bevor das Wachstum, das halbstündlich durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) kontrolliert wurde, in die stationäre Phase übergang (OD<sub>600</sub> 5 - 7), wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 4 °C und 8000 rpm für 10 Minuten im JA-10 Rotor (11325 x g) geerntet, mit etwa 5 ml PufferA pro g Zellen gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert.

#### PufferB

Tris	50 mM	1,146 g
KCl	100 mM	0,746 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM	0,102 g
EDTA	0,1 mM	0,003 g
Sucrose	250 mM	8,558 g
Imidazol	30 mM	0,204 g
n-octyl-α-D-	1,5 %	1,5 g
Glucopyranosid		
Natriumcholat	0,5 %	0,5 g
Cholsäure	0,5 %	0,5 g

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 100 ml; pH 8,0 (HCl)

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle nachfolgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt. Die gewaschenen Zellen wurden in 3 – 5 ml PufferA pro Gramm Zellen resuspendiert und mit Hilfe einer EmulsiFlex 5 der Fa. Avestin (2 – 3 Durchgänge mit 110000 – 150000 kPa) aufgeschlossen. Unzerstörte Zellen und größere Zelltrümmer wurden durch eine anschließende Zentrifugation bei 15000 rpm für 30 Minuten im JA-20 Rotor (27216 x g) entfernt. Der trübe, gelbliche Überstand wurde einer erneuten Zentrifugation für eine Stunde bei 50000 rpm in einem Rotor Ti-70.1 (229600 x g) unterzogen. Nach Resuspendierung des so erhaltenen Pellets in 5 ml PufferA wurden 12,5 µl einer MPB-Lösung (50 mM in DMSO) zugesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl β-Mercaptoethanol und einer erneuten Zentrifugation im Ti70.1 Rotor wie zuvor, wurde das erhaltene Pellet in 1 ml PufferB resuspendiert und für 1 Stunde bei inkubiert. Hieran schloss sich eine Inkubation der Suspension mit 150 µl Ni-NTA-Agarose für 45 min an. Die Ni-NTA-Agarose wurde bei 16000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge vom Überstand abgetrennt, in 200 µl PufferB resuspendiert und erneut in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt bevor die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> mittels 200 µl PufferC in gleicher Weise eluiert wurde.

### **PufferC**

Der PufferC entsprach in Zusammensetzung und pH-Wert dem PufferB, allerdings enthielt er im Gegensatz zu diesem anstatt 30 mM Imidazol 150 mM (1,021 g pro Liter).

Im Anschluss an die Isolierung wurden die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Proben mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12 %-ige Gele; siehe Kap. 5.6.3.1; S. 112) aufgetrennt und analog Kap. 5.6.4 (S. 113) auf eine PVDF-Membran geblottet. Das weitere Vorgehen entsprach ebenfalls Kap. 5.6.4, allerdings wurden hier im Gegensatz zum Western-Blotting für den Proteinnachweis keine Antikörper eingesetzt, sondern ein Konjugat aus Avidin und Alkalischer Phosphatase (50 µl pro 25 ml Puffer).

## 5.6.6 ESR-Spektroskopie

### 5.6.6.1 Messungen von $b_{\text{syn}}$ mit und ohne $F_1$

Von den  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten 101 bis 114, die mit IAAT bzw. MTS gelabelten waren und in TMK-Puffer in den Konzentrationen von 10 - 300  $\mu\text{M}$  (bezogen auf b-Dimer) vorlagen, wurde für die Messungen mit und ohne  $F_1$  bei 293 K 10  $\mu\text{l}$  und bei 193 K 18 - 35  $\mu\text{l}$  verwendet.  $F_1$ , die in TMK-Puffer vorlag, wurde jeweils äquimolar zugesetzt.

Die ESR-Messungen bei 193 K wurden entweder an einem Bruker Elexsys E-500-Spektrometer oder an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit Hilfe von Quarzkapillaren in einer dielektrischen Cavity TE001-Cavity oder in Quarzröhrchen mit einem Innendurchmesser von 2 mm in einer high-sensitivity Cavity durchgeführt. Die gleichen Messproben wurden bei 293 K in Quarzkapillaren ebenfalls in der dielektrischen Cavity vermessen (MTS-gelabelte Proben wurden nur mit dem Bruker EMX EPR Spektrometer gemessen)..

In der Tabelle 5.10 sind die allgemeinen Parameter aller auf dem Bruker Elexsys E-500-Spektrometer durchgeführten Messungen zusammengestellt.

Parameter	Messung bei 193 K
Anzahl der Scans	5
Auflösung [pts]	1024
Konversionszeit [ms]	164
Mikrowellenfrequenz [GHz]	9,8
Mikrowellenleistung [mW]	0,63
Modulationsfrequenz [kHz]	100
Receiver Gain [dB]	75
Modulationsamplitude [G]	1
Spektrenbreite [G]	120
Zentralfeld [G]	3475
Zeitkonstante [ms]	41

**Tabelle 5.10:** Allgemeine Parameter der ESR-Messungen an den mit IAAT gelabelten  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten mit und ohne  $F_1$  bei und 193 K auf einem Bruker Elexsys E-500-Spektrometer.

In der Tabelle 5.11 sind die allgemeinen Meßparameter, die bei allen an einem Bruker EMX EPR Spektrometer durchgeführten Messungen identisch waren, aufgeführt. In den Tabellen 5.12 - 5.16 sind die Parameter (Receiver Gain und Anzahl der Scans) aufgeführt, die bei den ESR-spektroskopischen Untersuchungen der einzelnen Proben variiert wurden.

Parameter	Messung bei 293 K	Messung bei 193 K
Auflösung [pts]	1024	1024
Konversionszeit [ms]	41	164 *)
Mikrowellenfrequenz [GHz]	9,7	9,3
Mikrowellenleistung [mW]	12,7	0,63
Modulationsfrequenz [kHz]	100	100
Modulationsamplitude [G]	1	2
Spektrbreite [G]	120	120
Zentralfeld [G]	3450	3330
Zeitkonstante [ms]	10	41 *)

**Tabelle 5.11:** Allgemeine Parameter der ESR-Messungen an den mit IAAT bzw. MTS gelabelten  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten mit und ohne  $F_1$  bei 293 K und 193 K.

\*) Bei der Messung der Probe  $b_{\text{syn}}105*IAAT$  mit  $F_1$  bei 193 K wurde eine Konversionszeit von 41 ms und eine Zeitkonstante von 10 ms gewählt.

*$b_{\text{syn}}*IAAT$  bei 193 K*

Ort der Modifikation [Aminosäureposition]	Receiver Gain	Anzahl der Scans
$b_{\text{syn}}101$ , $b_{\text{syn}}103$ , $b_{\text{syn}}106$ bis $b_{\text{syn}}108$ und $b_{\text{syn}}110$ bis $b_{\text{syn}}112$	$5,64 \cdot 10^5$	5
$b_{\text{syn}}102$	$3,99 \cdot 10^5$	5
$b_{\text{syn}}104$	$8,93 \cdot 10^5$	10
$b_{\text{syn}}105$	$2,52 \cdot 10^6$	30
$b_{\text{syn}}109$ und $b_{\text{syn}}113$	$4,48 \cdot 10^5$	5
$b_{\text{syn}}114$	$1,59 \cdot 10^5$	5

**Tabelle 5.12:** Receiver Gain und Anzahl der Scans bei den mit IAAT gelabelten  $b_{\text{syn}}$ -Mutanten ohne  $F_1$  bei 193 K.

*b<sub>syn</sub>\*IAAT mit F<sub>1</sub> bei 193 K*

Ort der Modifikation [Aminosäureposition]	Receiver Gain	Anzahl der Scans
b <sub>syn</sub> 101	6,32·10 <sup>5</sup>	20
b <sub>syn</sub> 102, b <sub>syn</sub> 104 und b <sub>syn</sub> 111	6,32·10 <sup>5</sup>	5
b <sub>syn</sub> 103 und b <sub>syn</sub> 110	4,48·10 <sup>5</sup>	5
b <sub>syn</sub> 106, b <sub>syn</sub> 107 und b <sub>syn</sub> 109	6,32·10 <sup>5</sup>	10
b <sub>syn</sub> 108, b <sub>syn</sub> 112 und b <sub>syn</sub> 114	5,64·10 <sup>5</sup>	5
b <sub>syn</sub> 113	5,64·10 <sup>5</sup>	10

**Tabelle 5.13:** Receiver Gain und Anzahl der Scans bei den mit IAAT gelabelten b<sub>syn</sub>-Mutanten mit F<sub>1</sub> bei 193 K.*b<sub>syn</sub>\*IAAT und b<sub>syn</sub>\*MTS bei 293 K*

Ort der Modifikation [Aminosäureposition]	Receiver Gain	Anzahl der Scans
b <sub>syn</sub> 101*IAAT bis b <sub>syn</sub> 114*IAAT	6,32·10 <sup>4</sup>	4
b <sub>syn</sub> 101*MTS bis b <sub>syn</sub> 114*MTS	6,32·10 <sup>4</sup>	4

**Tabelle 5.14:** Receiver Gain und Anzahl der Scans bei den mit IAAT bzw. MTS gelabelten b<sub>syn</sub>-Mutanten ohne F<sub>1</sub> bei 293 K.*b<sub>syn</sub>\*IAAT mit F<sub>1</sub> bei 293 K*

Ort der Modifikation [Aminosäureposition]	Receiver Gain	Anzahl der Scans
b <sub>syn</sub> 101 und b <sub>syn</sub> 105	1,00·10 <sup>6</sup>	50
b <sub>syn</sub> 102, b <sub>syn</sub> 111 und b <sub>syn</sub> 114	6,32·10 <sup>4</sup>	10
b <sub>syn</sub> 103, b <sub>syn</sub> 104 und b <sub>syn</sub> 110	6,32·10 <sup>4</sup>	5
b <sub>syn</sub> 106	7,10·10 <sup>5</sup>	20
b <sub>syn</sub> 107 und b <sub>syn</sub> 108	5,64·10 <sup>5</sup>	10
b <sub>syn</sub> 109 und b <sub>syn</sub> 113	3,99·10 <sup>5</sup>	20
b <sub>syn</sub> 112	3,99·10 <sup>5</sup>	10

**Tabelle 5.15:** Receiver Gain und Anzahl der Scans bei den mit IAAT gelabelten b<sub>syn</sub>-Mutanten mit F<sub>1</sub> bei 293 K.

*b<sub>syn</sub>\*MTS mit F<sub>1</sub> bei 293 K*

Ort der Modifikation [Aminosäurereposition]	Receiver Gain	Anzahl der Scans
b <sub>syn</sub> 101 bis b <sub>syn</sub> 103	1,00·10 <sup>6</sup>	30
b <sub>syn</sub> 104	2,52·10 <sup>5</sup>	10
b <sub>syn</sub> 105 und b <sub>syn</sub> 106	6,32·10 <sup>4</sup>	4
b <sub>syn</sub> 107	2,52·10 <sup>5</sup>	20
b <sub>syn</sub> 108 und b <sub>syn</sub> 109	6,32·10 <sup>5</sup>	50
b <sub>syn</sub> 110	6,32·10 <sup>5</sup>	20
b <sub>syn</sub> 111 und b <sub>syn</sub> 114	2,52·10 <sup>5</sup>	10
b <sub>syn</sub> 112	5,64·10 <sup>4</sup>	4
b <sub>syn</sub> 113	6,32·10 <sup>5</sup>	50

**Tabelle 5.16:** Reiceiver Gain und Anzahl der Scans bei den mit MTS gelabelten b<sub>syn</sub>-Mutanten mit F<sub>1</sub> bei 293 K.**5.6.6.2 Messungen von F<sub>O</sub>F<sub>1</sub>****ESR-Puffer**

Tris                    25 mM                0,573 g

EDTA                   100 mM               2,922 g

ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 100 ml; pH 7,5 (HCl)

Die F<sub>O</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten lagen in Konzentrationen von 3 - 19 µM in His3-Puffer oder einem 1:1-Gemisch aus His3-Puffer und ESR-Puffer vor. Hiervon wurden bei den Messungen bei 293 K 10 µl und bei 193 K 70 - 100 µl verwendet. Die ESR-Messungen bei 293 K wurden an einem Bruker EMX EPR Spektrometer mit Hilfe von Quarzkapillaren in einer dielektrischen Cavity TE001 durchgeführt. Die gleichen Messproben wurden bei 193 K in Quarzröhrchen mit einem Innendurchmesser von 2 mm in einer high-sensitivity Cavity vermessen.

Parameter	Messung bei 293 K	Messung bei 193 K
Auflösung [pts]	1024	1024
Konversionszeit [ms]	41	164
Mikrowellenfrequenz [GHz]	9,7	9,3
Mikrowellenleistung [mW]	12,7	0,63
Modulationsfrequenz [kHz]	100	100
Modulationsamplitude [G]	2	2
Receiver Gain	$3,99 \cdot 10^6$ *)	$3,99 \cdot 10^6$ *)
Spektrenbreite [G]	120	120 oder 200
Zentralfeld [G]	3450	3330
Zeitkonstante [ms]	10	41

**Tabelle 5.17:** Allgemeine Parameter der ESR-Messungen mit IAAT gelabelten F<sub>O</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten bei 293 K und 193 K.

\*) Die Messungen an den F<sub>O</sub>F<sub>1</sub>-Mutanten 110 und 111 wurden sowohl bei 293 K als auch 193 K bei einem Receiver Gain von  $1,00 \cdot 10^6$  durchgeführt.

### 5.6.6.3 Bestimmung des Labelgrades der einzelnen mit Spinlabel modifizierten b<sub>syn</sub>-Mutanten

Um die Ausbeute an mit Spinlabel modifiziertem Protein in den einzelnen Messproben zu bestimmen, wurden die Raumtemperaturspektren der unterschiedlichen Mutanten unter Verwendung des Programmes *Microcal™ Origin®* der Fa. Microcal Software, Inc. einer Doppelintegration unterworfen. Der Vergleich mit einer 10 μM Standardlösung des entsprechenden Spinlabels lieferte die Spindichte in der untersuchten Proteinprobe, die bezogen auf die mittels Bradford (1976) ermittelte Proteinmenge den Labelgrad ergab. Hierbei war zu beachten, daß sowohl von den Protein-enthaltenden Proben, als auch von den Standardlösungen jeweils 10 μl unter Verwendungen der gleichen Meßparameter vermessen wurde. Desweiteren war wichtig, daß die Spinlabellösungen, die als Standard dienten, aus den gleichen Stammlösungen entnommen wurden, die auch für die Modifizierungen der jeweiligen Proteine dienten.



## 6 Literatur

- Abrahams, J.P., Leslie A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E. (1994) *Nature* **370** 621-8
- Aggeler, R., Weinreich, F., Capaldi, R.A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1230** 62-8
- Ansorge, K. (1997) *Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern*
- Aris, J.P., Simoni, R.D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258** 14599-609
- Beckers, G., Berzborn, R.J., Strotmann, H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1101** 97-104
- Bianchet, M.A., Hullihen, J., Pederson, P.L., Anzel, L.M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 11065-70
- Boyer, P.D. (1993) *Biochem. Biophys. Acta* **1140** 215-50
- Boyer, P.D., Cross R.L., Momsen, W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70** 2837-9
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72** 248-54
- Cherepanov, D.A., Mulkidjanian, A.Y., Junge, W. (1999) *FEBS Lett.* **449** 1-6
- Cox, G.B., Downie, J.A., Fayle, D.R.H., Gibson, F., Radik, J. (1978) *J. Bacteriol.* **133** 287-92
- Cross, R.L. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50** 681-714
- Cross, R.L., Nalin, C.M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257** 2874-81
- Cross, R.L., Taiz, L. *FEBS Lett.* (1990) **259** 227-9
- Cross, R.L. (2000) *Biochem. Biophys. Acta* **1458** 270-75
- Dallmann, H.G., Flynn, T.G., Dunn, S.D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** 18953-60
- Del Rizzo, P.A., Bi, Y., Dunn, S.D., Shilton, B.H. (2002) *Biochemistry* **41** 6875-84
- Dmitriev, O., Jones, P.C., Jiang, W., Fillingame, R.H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274** 15598-604
- Dunn, S.D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** 7630-6
- Dunn, S.D., Chandler J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 8646-51
- Engelbrecht, S., Giakas, E., Marx, O., Lill, H. (1998) *Eur. J. Biochem.* **252** 277-83
- Feix, J.B. & Klug, C.S. in: *Biological Magnetic Resonance, Spin Labeling, The Next Millenium* (Berliner, L. J., ed) (1998) **Vol. 14**, Plenum Press, New York, 251-79
- Fillingame, R.H., Jones, P.C., Jiang, W., Valiyaveetil, F.I., Dmitriev, O.Y. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365** 135-42
- Fillingame, R.H. (1999) *Science* **286** 1687-8
- Girvin, M.E., Rostogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L., Fillingame, R.H. (1998) *Biochemistry* **37** 8817-24
- Gresser, M.J., Myers, J.A., Boyer, P.D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257** 12030-38
- Greie, J.-C., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267** 3040-48

- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166** 557-80
- Hermolin, J., Gallant, J., Fillingame, R.H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258** 14550-5
- Hisabori, T., Kondoh, A., Yoshida, M. (1999) *FEBS Lett.* **463** 35-38
- Howitt, S.M., Rodgers, A.J.W., Jeffrey, P.D., Cox, G.B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** 7038-42
- Hustedt, E.J., Beth, A.H. (1999) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28** 129-53
- Jiang, W., Fillingame, R. H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 6607-12
- Jones, P.C., Fillingame, R.H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 29701-5
- Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22** 420-3
- Klinge, R. & Silbernel, S. in *Lehrbuch der Physiologie* (1996) Georg Thieme Verlag, 2. Auflage, 512
- Klionsky, D.J., Brusilow, W.S.A., Simoni, R.D. (1984) *J. Bacteriol.* **160** 1055-60
- Kuo, P.H., Ketchum, C.J., Nakamoto, R.K. (1998) *FEBS Letters* **426** 217-20
- Lill, H., Burkovski, A., Altendorf, K., Junge, W., Engelbrecht, S. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1144** 278-84
- Lötscher, H.R., de Jong, C., Capaldi, R.A. (1984) *Biochemistry* **23** 4134-40
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. Randall, A.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193** 265-75
- Lundblad, R. L. *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2<sup>nd</sup> edition (1991) CRC Press Inc., Boca Raton, Florida
- Lupas, A. (1996) *TIBS* **21** 375-82
- McLachlin, D.T., Dunn, S.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 21233-9
- McLachlin, D.T., Bestard, J.A., Dunn, S.D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 15162-8
- McLachlin, D.T., Coveny, A.M., Clark, S.M., Dunn, S.D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275** 17571-77
- Milgrom, Y.M. & Cross, R.L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** 23179-85
- Motz, C. (1999) *Dissertation, Universität Kaiserslautern* 56
- Murataliev, M.B., Boyer, P.D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** 15431-9
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr. (1997) *Nature* **388** 299-302
- Noji, H., Häslner, K., Junge, W., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M. Engelbrecht, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260** 597-599
- Omote, H., Sambonmatsu, N., Saito, K., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihare, A., Yanagida, T., Wada, Y., Futai, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** 7780-4
- Ogilvie, I., Aggeler, R., Capaldi, R.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 16652-6
- Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W., Engelbrecht, S. (2000) *FEBS Letters* **472** 34-38
- QIAGEN (2002) *QIAprep<sup>®</sup> Miniprep Handbook* 22-23
- QIAGEN (1999) *QIAEX II Handbook* 12-13

- Rao, R., Al-Shawi, M.K., Senior, A.E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263** 5569-73
- Revington, M., McLachlin, D.T., Shaw, G.S., Dunn, S.D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274** 31094-101
- Rodgers, A.J.W., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M.B., Howitt, S.M., Capaldi, R.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 31058-64
- Rodgers, A.J.W., Capaldi, R.A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 29406-10
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Bdd. 1-3), Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Schneider, E., Altendorf, K. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** 7279-83
- Schneider, E., Altendorf, K. (1985) *EMBO* **4** 515-8
- Senior, A.E., Wise, J.G. (1983) *J. Membrane Biol.* **73** 105-24
- Shengelaya, A., Drulis, H., Macalik, B., Suszynska, M. (1996) *Z. Phys. B* **101** 373-6
- Sorgen, P.L., Bubb, M.R., McCormick, K.A., Edison, A.S., Cain, B.C. (1998a) *Biochemistry* **37** 923-32
- Sorgen, P.L., Caviston, T.L., Perry, R.C., Cain, B.C. (1998b) *J. Biol. Chem.* **273** 27873-78
- Sorgen, P.L., Bubb, M.R., Cain, B.D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274** 36261-6
- Steinhoff, H.J., Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G., Wollmer, A. (1997) *Biophys. J.* **73** 3287-98
- Stock, D., Leslie, A.G., Walker, J.E. (1999) *Science* **286** 1700-5
- Stratgene (1997) *Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis*
- Takeyama, M., Noumi, T., Maeda, M., Futai, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263** 16106-12
- Taussky, H.H., Shorr, E. (1953) *J. Biol. Chem.* **202** 675-85
- Trommer, W. E. (1987) in: *Pyridines Nucleotide Coenzymes: Chemical, Biochemical and Medical Aspects* (Dolphin, D., Poulson, R. & Abramovic, O., eds) **2A**, 613-40, Wiley, New York
- Van Walraven, H.S., Strotmann, H., Schwarz, O., Rumberg, B. (1996) *FEBS Lett.* **379** 309-13
- Vogel, P. D., Nett, J. H., Sauer, H. E., Schmadel, K., Cross, R. L., Trommer, W. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **202**, 675-85
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H., Capaldi, R.A. (1995) *FEBS Lett.* **368** 235-8
- Weber, J., Bowman, C., Wilke-Mounts, S., Senior, A.E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** 21045-9
- Weber, J., Bowman, C., Senior, A.E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** 18711-8
- Weber, J., Senior, A.E. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1319** 19-58
- Wilkens, S., Capaldi, R.A. (1998a) *Nature.* **393** 29

- Wilkins, S., Capaldi, R.A. (1998b) *Biochim. Biophys. Acta.* **1365** 93-7
- Wilkins, S., Dunn, S.D., Chandler, J., Dahlquist, F.W., Capaldi, R.A. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4** 198-201
- Wise, J.G., Duncan, T.M., Latchney, I.R., Cox, D.N., Senior, A.E. (1983) *Biochem. J.* **215** 343-50
- Wise, J.G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265** 10403-9
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., De Cruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17** 3469-78
- Xue, Z., Zouh, J.M., Melese, T., Cross, R.L., Boyer, P.D. (1987) *Biochemistry* **26** 3749-53
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) *Gene* **33** 103-19

## 7 Anhang

### 7.1 DNA-Isolierung mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep System der Fa. QIAGEN

#### QIAprep Spin Miniprep Protocol (QIAGEN, 2002)

This Protocol is designed for purification of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1-5 ml overnight cultures of *E.coli* in LB (Luria-Bertani) medium.

**Note: All protocol steps should be carried out at room temperature**

#### Procedure

- 1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.**  
Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.
- 2. Add 250 µl Buffer P2 and gently invert the tube 4-6 times to mix.**  
Mix gently by inverting the tube. Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 minutes.
- 3. Add 350 µl N3 and invert the tube immediately but gently 4-6 times.**  
To avoid localized precipitation, mix the solution gently but thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. The solution should become cloudy.
- 4. Centrifuge for 10 min at maximum speed in a tabletop microcentrifuge.**  
A compact white pellet will form.

5. **Apply the supernatants from step 4 to the QIAprep column by decanting or pipetting.**
6. **Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through.**
7. **(Optional): Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer P1 and centrifuging for 30-60 s. Discard the flow-through.**

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using  $\text{endA}^+$  strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> do not require this additional wash step.
8. **Wash QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE and centrifuging for 30-60 s.**
9. **Discard the flow-through, and centrifuge for an additional 1 min to remove residual wash buffer.**

**IMPORTANT:** Residual wash buffer will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.
10. **Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50  $\mu\text{l}$  Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of each QIAprep column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.**

## 7.2 Extraktion von DNA-Frakmenten aus Agarosegelen mit dem QIAEX II System der Fa. QIAGEN

### QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (QIAGEN, 1999)

This protocol is designed for the extraction of 40-bp to 50-kb DNA fragments from 0.3-3% standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffers.

- Notes:**
- The yellow color of Buffer QX1 indicates a  $\text{pH} \leq 7.5$ .
  - Add ethanol (96-100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
  - A heating block or water bath at  $50^\circ\text{C}$  is required.
  - 3M sodium acetate,  $\text{pH} 5.0$ , may be necessary.
  - All centrifugation steps are at maximum speed ( $\geq 10,000 \times g$ ,  $\sim 13,000 \text{ rpm}$ ) in a conventional, table-top microcentrifuge.
  - For DNA fragments larger than 10 kb, mix by gently flicking the tube to avoid shearing the DNA. Do not vortex the tube.

**1. Excise the DNA band from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.**

Minimize the size of the gel by removing excess agarose. Use a 1.5-ml microfuge tube for processing up to 250 mg agarose.

**2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QX1 to 1 volume of gel for DNA fragments 100 bp - 4 kb; otherwise, follow the table below.**

For example, add 300  $\mu\text{l}$  of Buffer QX1 to each 100 mg of gel.

DNA fragments <100 bp	Add 6 volumes of Buffer QX1
DNA fragments >4 kb	Add 3 volumes of Buffer QX1 plus 2 volumes of $\text{H}_2\text{O}$
>2% or Methaphor agarose gels	Add 6 volumes of Buffer QX1

- 3. Resuspend QIAEX II by vortexing for 30 sec. Add QIAEX II to the sample according to the table below and mix.**

≤2 µg DNA	Add 10 µl of QIAEX II
2-10 µg DNA	Add 30 µl of QIAEX II
Each additional 10 µg DNA	Add additional 30 µl of QIAEX II

- 4. Incubate at 50°C for 10 min to solubilize the agarose and bind the DNA. Mix by vortexing\* every 2 min to keep QIAEX II in suspension. Check that the color of the mixture is yellow.**

If the color of the mixture is orange or purple, add 10 µl 3M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color should turn to yellow. The incubation should then be continued for an additional 5 min at least.

The adsorption of DNA to QIAEX II particles is only efficient at pH ≤7.5. Buffer QX1 now contains a pH indicator which is yellow at pH ≤7.5, and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

- 5. Centrifuge sample for 30 sec and carefully remove supernatant with a pipet.**

- 6. Wash the pellet with 500 µl Buffer QX1.**

Resuspend the pellet by vortexing\*. Centrifuge the sample for 30 sec and remove all traces of supernatant with a pipet. This wash step removes residual agarose contaminants.

- 7. Wash the pellet twice with 500 µl of Buffer PE.**

Resuspend the pellet by vortexing\*. Centrifuge the sample for 30 sec and carefully remove all traces of supernatant with a pipet. These washing steps remove residual salt contaminants.

- 8. Air-dry the pellet for 10-15 min or until the pellet becomes white.**

If 30 µl of QIAEX II suspension is used, air-dry the pellet for approximately 30 min. Do not vacuum dry, as this may cause overdrying. Overdrying the QIAEX II pellet may result in decreased elution efficiency.



- 9. To elute DNA, add 20 µl of 10 mM Tris·Cl, pH 8.5 or H<sub>2</sub>O and resuspend the pellet by vortexing\*. Incubate according to the table below.**

DNA fragments ≤4 kb	Incubate at room temp. for 5 min
DNA fragments 4-10 kb	Incubate at 50°C for 5 min
DNA fragments >10 kb	Incubate at 50°C for 10 min

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH is within this range, and store DNA at -20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

- 10. Centrifuge for 30 sec. Carefully pipet the supernatant into a clean tube.**

The supernatant now contains the purified DNA.

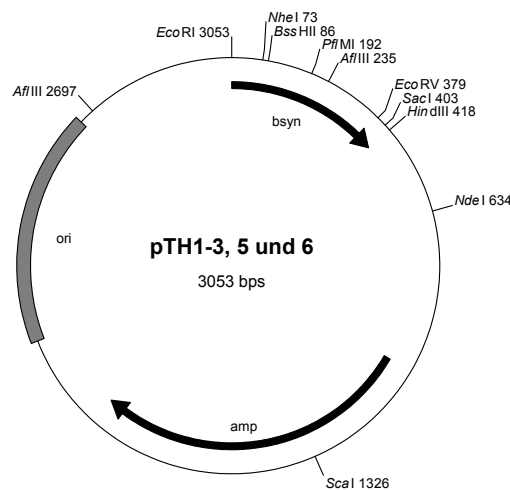
- 11. Optional: repeat steps 9 and 10 and combine the eluates.**

A second elution step will increase the yields by approximately 10-15%.

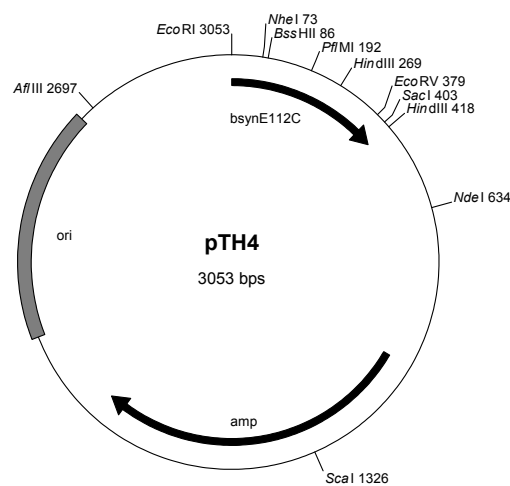
*\* For fragments larger than 10 kb, resuspend the pellet by inverting and flicking the tube. Vortexing can cause shearing of large DNA fragments.*

### 7.3 Restriktionskarten

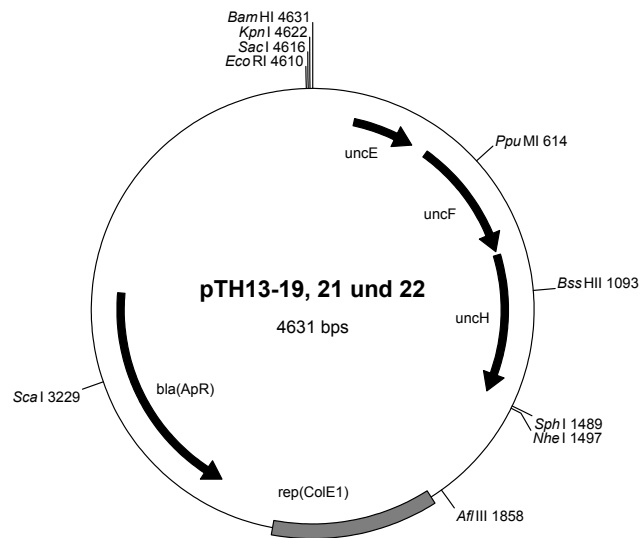
Die Restriktionskarten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Plasmide, die im Hauptteil nicht gezeigt wurden, sind nachfolgend aufgeführt.



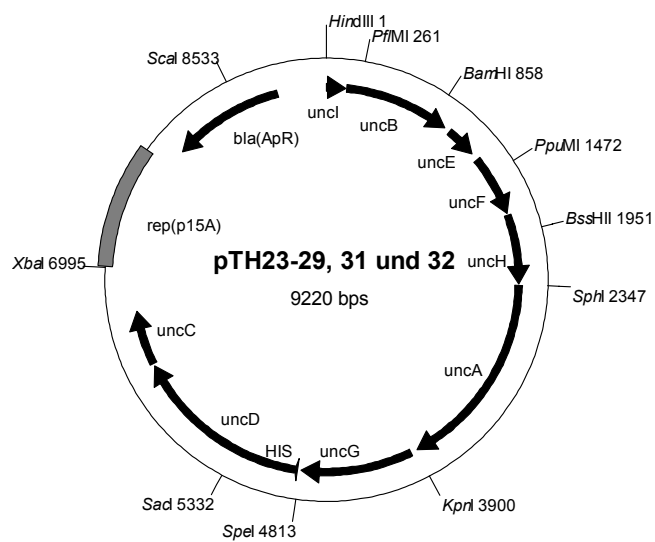
**Abbildung 7.1:** Allgemeine Restriktionskarte der Plasmide pTH1 - 3, 5 und 6, die zur Expression der  $b_{syn}$ -Mutanten I101C, V102C, A111C, R113C und K114C dienen.



**Abbildung 7.2:** Restriktionskarte des Plasmids pTH4, das zur Expression der  $b_{syn}$ -Mutante E112C diente.



**Abbildung 7.3:** Allgemeine Restriktionskarte der Plasmide pTH13 - 19, 21 und 22, die nach Einführung der Cysteinmutationen in pTH12 entstanden.



**Abbildung 7.4:** Allgemeine Restriktionskarte der Plasmide pTH23 - 29, 31 und 32, die zur Expression der  $F_0F_1$ -Mutanten A103C, A105C, Q106C, E108C, I109C, E110C, A111C, R113C und K114C dienen.