F_0F_1-ATP-Synthase aus *Escherichia coli*: Untersuchung verschiedener Proteinsysteme mit ESR-Spektroskopie

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte

Dissertation
(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Gerhard Kraft

Betreuerin: Priv.-Doz. Dr. P. D. Vogel

Kaiserslautern, 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 07. Oktober 1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. F. Preuss
1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. P. D. Vogel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Trommer

Die vorliegende Arbeit entstand von Juli 1995 bis April 1999 in der Abteilung Biochemie des Fachbereichs Chemie, Universität Kaiserslautern.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Pia D. Vogel für die Betreuung und den mir gewährten Freiraum bei der Gestaltung dieser Arbeit sowie die Hilfsbereitschaft bei arbeitsspezifischen Problemen.
Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer danke ich sowohl für die wohlwollende Unterstützung dieses Themas als auch für stetige Diskussionsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

ADP/AMP/ATP	Adenosin-5'-di-/mono-/triphosphat (allg.: ANP)
BSA	Rinderserum-Albumin
CDI	Carbonyl-1,1'-diimidazol
CW	Continuous Wave
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEAE	N,N-Diethylaminoethyl
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EACA	ε-Aminocapronsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESR	Elektronenspin-Resonanz
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
IAAT	4-(2-Iodacetamido)-TEMPO
IOPI	4-(3-Iodo-2-oxo-1-propyliden)-1-oxy-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LDH	Lactat-Dehydrogenase
NEM	N-Ethylmaleimid
PAB	4-Aminobenzamidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spin Label
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEMPO	1-Oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
TES	2-(Tris-(hydroxymethyl)-methylamino)-ethansulfonsäure
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
UV	elektromagnetische Strahlung im Ultraviolett-Bereich
VIS	elektromagnetische Strahlung im visuellen Bereich

Physikalische Konstanten

$c = 2{,}99792 \cdot 10^{8}\, m \cdot s^{-1}$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
$e = 1{,}60218 \cdot 10^{-19}\, C$	elektrische Elementarladung
$h = 6{,}62608 \cdot 10^{-34}\, J \cdot s$	Plancksches Wirkungsquantum
$\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1{,}05457 \cdot 10^{-34}\, J \cdot s$	Drehimpulsquantum
$k = 1{,}38066 \cdot 10^{-23}\, J \cdot K^{-1}$	Boltzmann-Konstante
$m_e = 9{,}10939 \cdot 10^{-28}\, g$	Ruhemasse des Elektrons
$\mu_0 = 1{,}25664 \cdot 10^{-6}\, H \cdot m^{-1}$	magnetische Feldkonstante
$\mu_B' = \frac{e \cdot \hbar}{m_e \cdot c} = 9{,}24701 \cdot 10^{-24}\, J \cdot T^{-1}$	Bohrsches Magneton (konventionell)
$\mu_B = \mu_0 \cdot \mu_B' = 1{,}16541 \cdot 10^{-29}\, V \cdot s \cdot m$	Bohrsches Magneton (alternativ)

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Eine Vielzahl chemischer Prozesse in pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Organismen benötigt, um stattfinden zu können, einerseits geeignete Katalysatoren, welche durch Enzyme repräsentiert werden, zum anderen wird Energie benötigt. Sie wird in den biologischen Systemen häufig von energiereichen chemischen Verbindungen mit zumeist hohem Gruppenübertragungspotential geliefert. Die wichtigste und daher häufigste Speicherform chemischer Energie in allen Organismen stellt das Adenosin-5'-triphosphat (ATP) dar. Bei seiner Hydrolyse zum entsprechenden Diphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) werden unter Standardbedingungen ca. 30 $kJ \cdot mol^{-1}$, unter physiologischen Bedingungen wegen pH- und Mg^{2+}-Effekten vermutlich sogar bis zu 50 $kJ \cdot mol^{-1}$ an Energie frei [Koolman & Röhm, 1994; Klinke & Silbernagl, 1996]. Diese kann durch energetische Kopplung endergone Prozesse wie z.B. Biosynthesen und Bewegungs- und Transportprozesse antreiben.

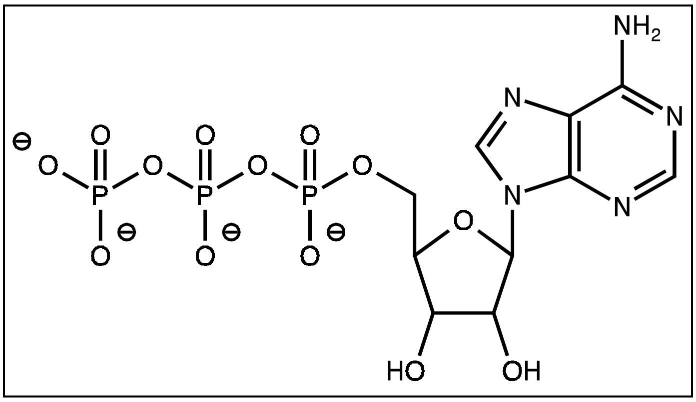


Abb. 1.1: Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

Ein Mensch verbraucht bei durchschnittlicher Leistungsbeanspruchung etwa sein eigenes Körpergewicht an ATP pro Tag. Durch den hohen Bedarf von ATP und seiner daraus resultierenden kurzen Lebensdauer im Organismus wäre dieser Energiespeicher rasch verbraucht und der Stoffwechsel würde zum Erliegen kommen. Nur durch die Umkehr der Hydrolyse, d.h. durch ATP-Synthese aus ADP und P_i, wird der ATP-Spiegel aufrechterhalten. Der Großteil des regenerierten ATP ist der Verdienst von F_0F_1-ATP-Synthasen.

Teil A: Proteine

1.2 F_0F_1-ATP-Synthase aus E. coli

1.2.1 Rolle im Organismus

Die membrangebundene, protonenpumpende F_0F_1-ATP-Synthase ist ein Enzym, das in fast allen Organismen den durch Photosynthese oder Oxidation von Nährstoffmolekülen erzeugten Protonengradienten an Thylakoid-, Mitochondrien- oder Bakterien-Membranen dazu ausnutzen kann, Energie chemisch zu speichern. Dies geschieht durch Phosphorylierung von ADP zum energiereichen ATP, weshalb man den Gesamtprozeß auch als Photophosphorylierung bzw. oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Damit erfüllt die ATP-Synthase eine wichtige Aufgabe bei der Energiekonservierung in Organismen [Stryer, 1996].

1.2.2 Aufbau und Struktur des Enzyms

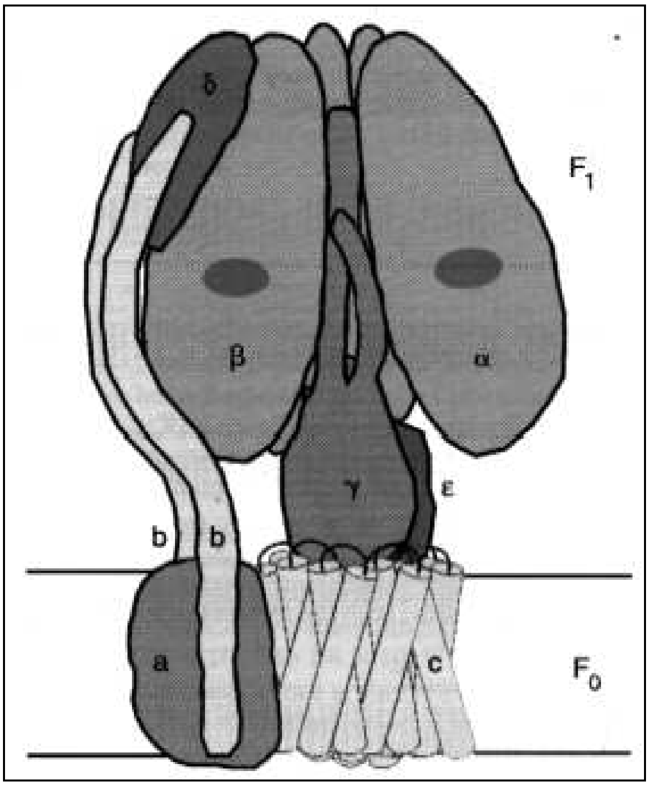


Abb. 1.2a: Schematischer Aufbau der F_0F_1-ATP-Synthase aus *E. coli* [Junge *et al.*, 1997], von der Seite aus gesehen und basierend auf den bisherigen Erkenntnissen. F_0 liegt fast vollständig in der Membran, während F_1 in die cytosolische Seite ragt. Die vorneliegende α- bzw. β-Untereinheit ist aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen worden, die in diesen Untereinheiten vorhandenen Nucleotidbindungsstellen sind als elliptische Flächen dargestellt. Etwas abgesetzt ist die Darstellung der c-Untereinheiten: Die zwei helikalen Bereiche sind als Zylinder dargestellt, welche durch eine Schleife miteinander verbunden sind.

1.2.2.1 F_1-Teil (F_1-ATPase)

Wie der Name schon besagt, besteht die F_0F_1-ATP-Synthase aus zwei Teilen. Der wasserlösliche F_1-Teil besteht aus fünf Proteinuntereinheiten (α-ε) der Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$.

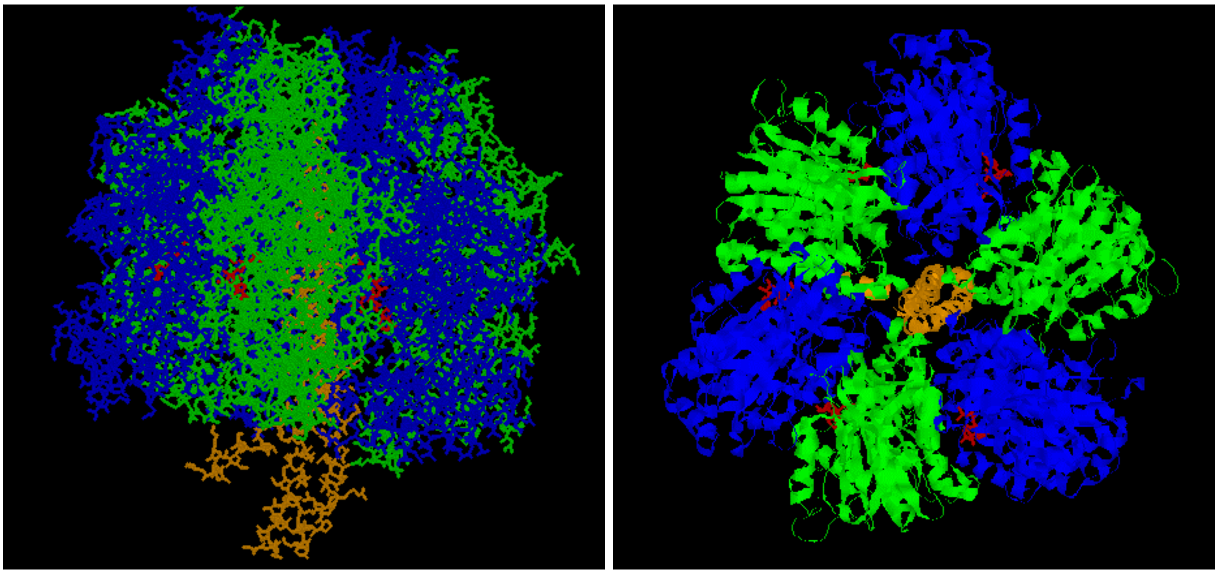


Abb. 1.2b: Von Abrahams *et al.* (1994) ermittelte Kristallstruktur der F_1-ATPase aus Rinderherz-Mitochondrien, gesehen von der Seite (linkes Bild) und von oben, d.h. dem membran-abgewendeten Ende (rechtes Bild). Die α-Untereinheiten sind blau, die β-Untereinheiten grün, die γ-Untereinheit orange und die gebundenen Nucleotide rot hervorgehoben. Die Untereinheiten δ und ε fehlen in der Struktur.

Vor einigen Jahren gelang es den Gruppen um Walker und Leslie, die Kristallstruktur von aus Rinderherzen isolierter mitochondrialer F_1-ATPase Kristalle röntgenkristallographisch aufzulösen [Abrahams *et al.*, 1994]. Amzel und Mitarbeitern gelang die Auflösung der Kristallstruktur von F_1 aus Rattenleber-Mitochondrien [Bianchet *et al.*, 1998]. Die Strukturen von δ und ε sowie eines Teils von γ der Rinderherzmitochondrien-F_1 konnten jedoch wegen zu starker Fluktuation der Positionen innerhalb des Kristalls nicht richtig aufgelöst werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der F_1-Untereinheiten aus Rinderherzmitochondrien und *E. coli* ist eine große Ähnlichkeit in deren Tertiärstrukturen zu vermuten. Die α- und β-Untereinheiten sind, ähnlich wie die Scheiben einer Orange, alternierend angeordnet. Auf ihnen ist pro Untereinheit je eine Nucleotidbindungsstelle lokalisiert. Beide Untereinheiten sind aus je drei Domänen zusammengesetzt: einem aminoterminalen, sechssträngigen β-Faß, einer zentralen Domäne mit sich abwechselnden α-Helices und β-Faltblättern, welche charakteristisch ist für eine Nucleotidbindungsstelle, und einem carboxyterminalen Bündel von sechs (bei β) bzw. sieben (bei α) α-Helices. Die katalytischen Nucleotidbindungsstellen, welche vornehmlich auf den β-Untereinheiten vorzufinden sind, liegen genau wie die nichtkatalytischen Nucleotidbindungsstellen in der Nähe des Kontaktbereichs von α- und β-Untereinheit. Bei der F_0F_1-ATP-Synthase aus Rinderherz-Mitochondrien sind die Bindungsstellen zweier benachbarter Untereinheiten durchschnittlich etwa 27 Å voneinander entfernt und zwei Bindungsstellen des gleichen Untereinheitentyps haben einen durchschnittlichen Abstand von etwa 47 Å. Ähnliche Größenverhältnisse dürften auch bei der ATP-Synthase aus *E. coli* herrschen. Von den sechs Nucleotidbindungsstellen des Proteins haben drei eine sehr hohe Affinität zu den Nucleotiden und tauschen es entsprechend langsam aus, die drei anderen tauschen das Nucleotid schnell aus.

Das ellipsoid geformte $(\alpha\beta)_3$-Fragment besitzt einen röhrenartigen Hohlraum in seiner Mitte, durch den sich die haarnadelförmige γ-Untereinheit zieht. Von dieser Untereinheit, deren Kristallstruktur noch nicht vollständig geklärt ist, ist bekannt, daß sie eine größtenteils alphahelikale Struktur besitzt. Quervernetzungs-Experimente haben ergeben, daß γ sich offensichtlich von der Membran mit dem dort eingebetteten F_0-Teil bis zur Oberseite von F_1 zieht [Watts *et al.*, 1995]. Amino- und Carboxyterminus von γ sind von der Membranseite von F_1 abgewandt.

Die δ-Untereinheit sitzt auf der Außenseite von $(\alpha\beta)_3$ und steht offenbar hauptsächlich mit dem aminoterminalen Ende der α-Untereinheit in Wechselwirkung. Desweiteren konnten Wechselwirkungen mit der b-Untereinheit des F_0-Teils nachgewiesen werden [Rodgers *et al.*, 1997; McLachlin *et al.*, 1998; Dunn & Chandler, 1998]. Die Struktur von isolierter δ-Untereinheit in Lösung ist durch NMR-Analyse weitgehend bekannt [Wilkens *et al.*, 1997]. δ ist in zwei Domänen aufgeteilt: Der aminoterminale Bereich besteht aus einem kompakten Bündel von sechs α-Helices mit Helix-turn-Helix-Motiven. Der zweite, carboxyterminale Bereich ist weniger gut charakterisiert, da ihm offensichtlich eine geordnete Struktur fehlt. Trotz ihrer räumlichen Nähe haben die beiden Domänen verschiedene Funktionen. Für die Wechselwirkung von F_1 und F_0 ist die carboxyterminale Domäne zuständig. Der Aminoterminus bindet wahrscheinlich an den restlichen F_1-Teil, ohne zu der Bindung von F_1 an F_0 beizutragen.

Die ε-Untereinheit des F_1-Teils befindet sich im Zwischenraum von $(\alpha\beta)_3$ und F_0-Teil in Kontakt mit γ sowie mit α und β selbst [Lötscher *et al.*, 1984; Dallmann *et al.*, 1992; Aggeler *et al.*, 1995]. Genau wie δ besteht auch ε aus zwei Domänen, wie NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen [Wilkens & Capaldi, 1998b]. Der direkt an F_0 angrenzende Aminoterminus ist aus einem zehnsträngigen β-Faß bzw. Sandwich zusammengesetzt und zeigt in vitro eine starke Wechselwirkung mit γ, während der Carboxyterminus als Doppelhelix-Haarnadel aufgebaut ist und wahrscheinlich in Kontakt mit α und β steht.

1.2.2.2 F_0-Teil

Der membranintegrale F_0-Teil der F_0F_1-ATP-Synthase aus *E. coli* setzt sich aus drei Untereinheiten (a-c) der Stöchiometrie ab_2c_{9-12} zusammen. Es wird postuliert, daß die a- und c-Untereinheiten am Transport der Protonen durch die Membran beteiligt sind [Junge *et al.*, 1997]. Die als Dimer vorliegende b-Untereinheit hingegen fungiert neben γ offensichtlich als zweites Bindeglied zwischen F_0- und F_1-Teil des Holoenzyms.

Von der Struktur der a-Untereinheit ist bekannt, daß das Protein sehr hydrophoben Charakter besitzt und vermutlich fünf transmembrane α-Helixsegmente besitzt [Valiyaveetil & Fillingame, 1998]. Eine Wechselwirkung mit c wurde über einen kovalent querverknüpften Komplex aus a- und c-Untereinheiten (ac_{9-12}) nachgewiesen. Der (nicht quervernetzte) Komplex aus a- und c-Untereinheiten vermag Protonen durch die Membran zu transportieren [Schneider & Altendorf, 1984 & 1985]. Es wird angenommen, daß eine α-Helix von a mit einer α-Helix von c im Kontakt steht [Jiang & Fillingame, 1998]. Desweiteren wird von a vermutet, daß die Untereinheit aktiv am Protonentransport beteiligt ist. Auch eine Wechselwirkung von a und b konnte mittels Quervernetzungsexperimenten nachgewiesen werden [Aris & Simoni, 1983; Hermolin *et al.*, 1983].

Die Struktur der b-Untereinheit wird als überwiegend alphahelikal angenommen. In der ATP-Synthase liegt b als Dimer vor [Aris & Simoni, 1983; Hermolin *et al.*, 1983; Dunn & Chandler, 1998; Sorgen *et al.*, 1998a]. Man nimmt an, daß der Aminoterminus von b als Transmembran-Helix ausgebildet ist. Diese Helix, welche wahrscheinlich mit a und c wechselwirkt, agiert wie ein Membran-Anker. Der längliche, hydrophile carboxyterminale Rest des Proteins tritt aus der Membran hervor und vermittelt die Bindung an den F_1-Teil. Diese Bindung kommt offensichtlich nicht nur durch die Wechselwirkung mit der δ-Untereinheit zustande, sondern auch mit einer nicht in Wechselwirkung mit ε stehenden β-Untereinheit von F_1, wie elektronenmikroskopische Studien belegen [Wilkens *et al.*, 1994]. Ebenso wurde eine Wechselwirkung vom b-Carboxyterminus und α diskutiert [Rodgers & Capaldi, 1998]. Mit einer genetisch verkürzten Form von b, bei der der hydrophobe Aminoterminus fehlt [Dunn, 1992], wurden in den letzten Jahren die Eigenschaften des hydrophilen Teils der b-Untereinheit untersucht. Dieses sogenannte b_{sol} ist wasserlöslich und bindet wie seine natürliche Form an F_1. Eine helikale Struktur im Bereich der Aminosäuren 124-139 in der Nähe des Carboxyterminus wird als maßgeblich für die Dimerisierung der Untereinheit angesehen [Howitt *et al.*, 1996]. Insgesamt betrachtet ist b eine recht flexible Proteinuntereinheit. Versuche mit genetisch verkürzten Versionen von b unterstützen diese Vermutung [Sorgen *et al.*, 1998b]. Jene

Flexibilität scheint eine dynamische Rolle der Untereinheit in der energetischen Kopplung von Protonentransport durch die Membran und der ATP-Synthese zu unterstreichen.

Die c-Untereinheit ist ein kleines, hydrophobes Protein. Sie hat die Form einer aus zwei transmembranen Helices gebildeten Haarnadel. Die Helices sind in einem Winkel von etwa 30° zueinander gekippt und leicht gekrümmt, ihre Enden werden anscheinend durch Wechselwirkungen von aromatischen Seitenketten zusammengehalten. Eine polare Schleife verbindet die beiden Helices. Diese Schleife, deren detaillierte Struktur bisweilen noch nicht aufgelöst wurde, zeigt in Richtung des F_1-Teils und wechselwirkt wahrscheinlich mit der aminoterminalen Domäne von ε. Im Zentrum der carboxyterminalen Helix liegt ein abgeschirmter Aspartat-Rest an einer stärker gekrümmten Stelle der Helix, der an der Translokation der Protonen beteiligt ist.

Wie schon weiter oben ersichtlich, ist weder die Stöchiometrie der c-Untereinheiten noch deren Anordnung im F_0-Teil vollständig geklärt. Neuere Untersuchungen [Fillingame *et al.*, 1998] sprechen für 12 c-Kopien pro F_0-Einheit.

1.2.3 Enzymatischer Mechanismus des ATP-Synthese- bzw. -Hydrolyseprozesses

Die Funktionsweise der F_0F_1-ATP-Synthase ist außergewöhnlich im Vergleich zu der der meisten bekannten Enzyme. Man hat mit einer Vielzahl von Experimenten herausgefunden, daß der Proteinkomplex nach dem Prinzip eines rotierenden Kolbenmotors arbeitet [Duncan *et al.*, 1995; Sabbert *et al.*, 1996 & 1997; Noji *et al.*, 1997]. Es existieren genau wie beim Motor ein Stator- und ein Rotorteil. Man fand heraus, daß der Stator offensichtlich von den Untereinheiten a, b, α, β und δ gebildet wird, entsprechend scheint der Rotor aus c, γ und ε zusammengesetzt zu sein [Junge *et al.*, 1997].

Der exakte Vorgang des Protonenflußes durch F_0 ist bisher weitestgehend Spekulation. Als sicher gilt, daß die Protonen wie erwähnt vom oben beschriebenen zentralen Aspartatrest der c-Untereinheit fixiert werden können. Ein recht neues Modell [Junge *et al.*, 1997] schlägt vor, daß Protonen auf der Membran-Außenseite über die a-Untereinheit an eine c-Kopie des Oligomerenverbunds weitergeleitet werden. Durch die Aufnahme der Protonen neutralisiert sich die Ladung im Zentrum von c. Damit ist der Kontakt mit der Lipid-Umgebung begünstigt, so daß sich die Untereinheit respektive das c-Oligomer (rotierend) bewegen kann. Wieder an der gegenüberliegenden Seite von a angelangt, gibt c das Proton an a ab, von wo dieses auf die Innenseite befördert wird. Beim Kontakt mit a liegt c somit im deprotonierten Zustand vor. Die effektive Funktion der Protonenpumpe wird hier letztlich nur von a übernommen, wobei die beiden postulierten Protonen-Lokalisierungsstellen voneinander getrennt ihre Aufgabe verrichten. Im Vergleich hierzu steht das von Dimroth *et al.* (1998) diskutierte Modell, das die Wirkungsweise des F_0-Teils der Na^+-pumpenden F_0F_1-ATP-Synthase aus *P. modestum* beschreibt.

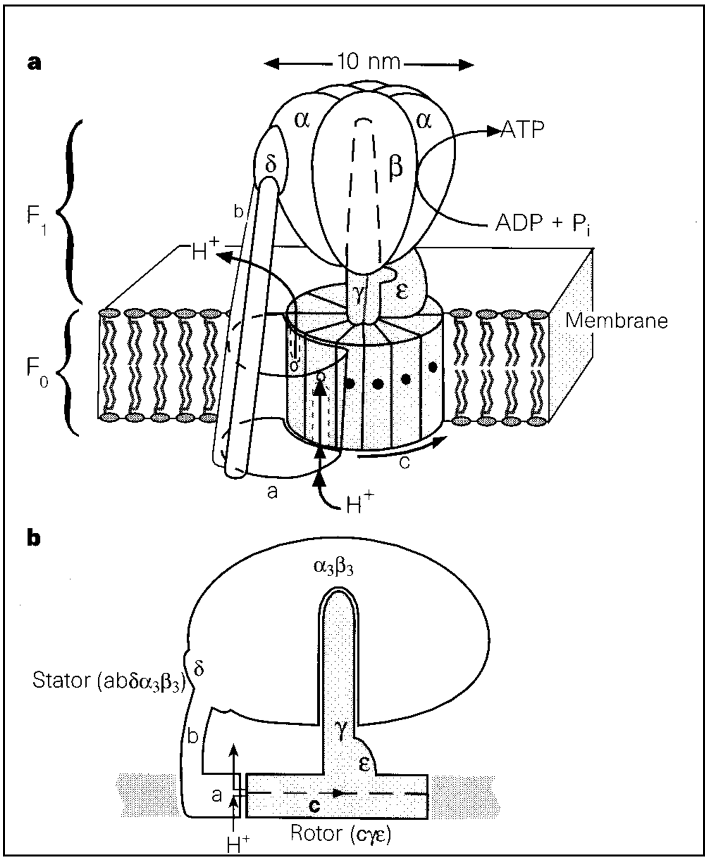


Abb. 1.3:

(a) Modell der Arbeitsweise der ATP-Synthase während des Protonenflußes durch die Membran [Junge *et al.*, 1997]. Dieser Fluß erzeugt ein Drehmoment, welches den Rotorteil der ATP-Synthase antreibt. Dieser erzeugt die unterschiedlichen Konformationen der Nucleotidbindungsstellen in einer sich wiederholenden Abfolge und ermöglicht somit die ATP-Synthese.

(b) Schematische Darstellung des Stator- und Rotorteils der F_0F_1-ATP-Synthase [Elston *et al.*, 1998].

In diesem Modell werden die Natriumionen durch einen Ionenkanal auf der statischen a-Untereinheit an Glutamat-Seitenketten in der jeweils in Kontakt zu a stehenden c-Untereinheit weitergeleitet. Durch eine somit induzierte Drehung des c-Untereinheiten-Oligomeren relativ zu a werden die Na^+-Ionen der beladenen c-Untereinheiten für das Cytoplasma zugänglich, sobald die entsprechende c-Untereinheit nicht mehr in Kontakt mit a steht. Schließlich diffundieren die Na^+-Ionen ins Cytoplasma.

Die Rotation des c-Oligomers in F_0 induziert laut der gängigen Theorie der Funktion des Proteins eine Rotation der γ-Untereinheit. Durch den Kontakt mit den α- und β-Untereinheiten verursacht die Asymmetrie von γ periodisch unterschiedliche Konformationen der Nucleotidbindungsstellen von β. Dies ist notwendig für die hier stattfindende zyklische Generierung von ATP aus den Edukten ADP und anorganischem Phosphat (P_i), welche schon einige Jahre vor der Strukturauflösung von α und β als Bindungswechsel-Mechanismus diskutiert wurde [Kayalar *et* *al.*, 1976 & 1977]. Für drei bis vier durch die Membran gepumpte Protonen wird je ein ATP-Molekül aus ADP und P_i generiert [Gräber, 1994; Pitard *et al.*, 1996].

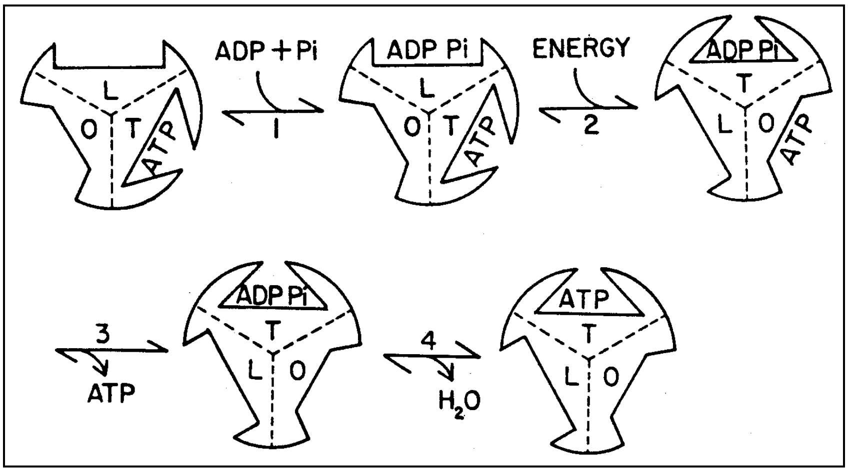


Abb. 1.4a: Bindungswechsel-Mechanismus während der ATP-Synthese bzw. -Hydrolyse (zur Entwicklung von dessen Formulierung s. Kayalar *et al.*, 1976 & 1977; Boyer, 1989; Cross, 1992 & 1994). Die Katalysezentren auf β durchlaufen drei verschiedene Konformationen während eines Rotor-Umlaufs: tight (T), open (O), loose (L)

Vom F_0-Teil abgetrennt ist der F_1-Teil der ATP-Synthase nur noch zur Hydrolyse von ATP fähig, da in diesem Fall die Energie des Protonengradienten nicht mehr für die Synthese von ATP genutzt werden kann. Für den enzymatischen Mechanismus der Mg^{2+}-abhängigen Hydrolysereaktion wurde in neuester Zeit ein Mechanismus entworfen [Weber & Senior, 1997], welcher in Abb. 1.4b dargestellt ist.

Die Hydrolyseaktivität der isolierten F_1-ATPase aus *E. coli* erhöht sich beträchtlich bei Abwesenheit der ε-Untereinheit [Laget & Smith, 1979]. Offensichtlich wirkt ε wie ein Bremselement, welches die relative Rotation von γ zum $\alpha_3\beta_3$-Fragment reguliert. Die relative Rotation von ε zu den β-Untereinheiten wurde kürzlich mit Quervernetzungsexperimenten bewiesen [Bulygin *et al.*, 1998]. Wie neuerdings aufgrund von Kinetik-Studien an der entsprechenden ATP-Synthase des thermophilen Bakteriums PS3 gemutmaßt wird [Bald et al., 1998], ist der enzymatische Mechanismus der Synthesereaktion von ATP keine einfache Umkehr von dem der ATP-Hydrolysereaktion. Damit ist einmal mehr die Komplexität der Arbeitsweise des Enzyms eindrucksvoll demonstriert.

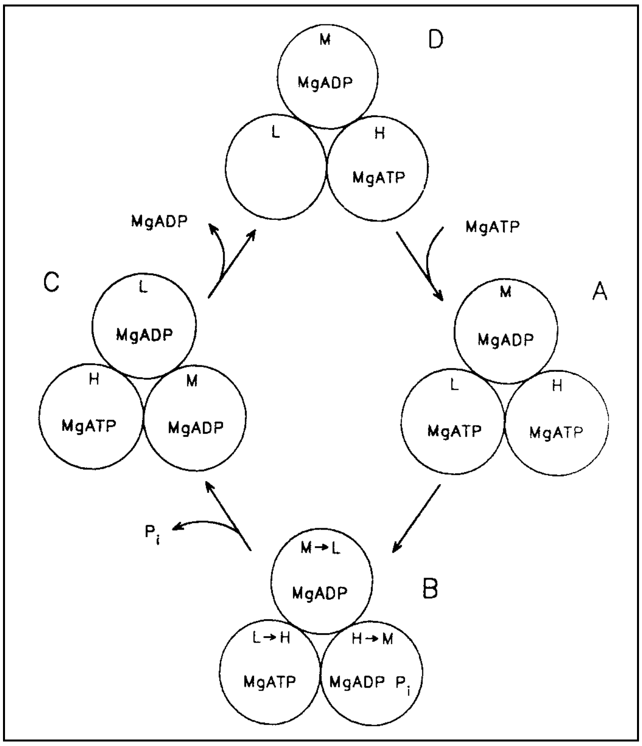


Abb. 1.4b: Modell für die Hydrolyse von ATP·Mg^{2+} durch EF_1 im stationären Zustand [Weber & Senior, 1997]. Die Konformationen der drei katalytischen Bindungsstellen (dargestellt durch Kreise) sind gekennzeichnet durch L (niedrigste Affinität), M (mittlere Affinität) und H (höchste Affinität). Während der Katalysereaktion im stationären Zustand bei v_{max} (maximaler Reaktionsgeschwindigkeit) hat die hauptsächlich vorherrschende Form des Enzyms ein Molekül ATP und zwei Moleküle ADP gebunden, wie beim Zustand C angedeutet ist.

Teil B: Spektroskopie

1.3 Theoretische Grundlagen der Elektronenspinresonanz

1.3.1 ESR-Aktivität

Voraussetzung für ESR-aktive Atome oder Moleküle ist die Existenz mindestens eines ungepaarten Elektrons in einem ihrer (Atom- oder Molekül-)Orbitale. Solche radikalischen Substanzen sind paramagnetisch. Gepaarte Elektronen (voll besetzte Orbitale) haben die Eigenschaft, daß sich ihre Spins gegenseitig aufheben (zu null addieren), so daß die betreffende Substanz diamagnetisch ist und keine ESR-Aktivität besitzt [Galla, 1988; Weil *et al.*, 1994].

1.3.2 Eigenschaften von Elektronen im homogenen Magnetfeld

Nach der klassisch-mechanistischen Betrachtungsweise besitzt jedes Elektron als Bestandteil eines Atoms außer Masse und Ladung noch einen Gesamtdrehimpuls $\underline{J}$, der sich additiv aus seinem Bahndrehimpuls $\underline{L}$ und seinem Eigendrehimpuls (Spin) $\underline{S}$ zusammensetzt [Poole, 1983].

$$\underline{J} = \underline{L} + \underline{S} \qquad (1.1)$$

Für die Beträge der Drehimpulse gilt nach der quantenmechanischen Theorie jeweils [Kuchling, 1989]

$$L = \sqrt{l(l+1)}\hbar\,; \qquad S = \sqrt{s(s+1)}\hbar \qquad (1.2a,b)$$

Die Größen l und s sind hier die jeweiligen ganz- und halbzahligen Quantenzahlen für Bahn- und Eigendrehimpuls des Elektrons.
Bezeichnet man $\underline{L}_z$ und $\underline{S}_z$ als Komponenten der jeweiligen Drehimpulse $\underline{L}$ und $\underline{S}$ bezüglich der Ausrichtung $\underline{H}_0$ eines äußeren, zeitlich konstanten Magnetfeldes, welche per Definition mit der z-Achse eines a priori festgelegten kartesischen Koordinatensystems zusammenfällt, so gilt für die Beträge dieser Komponenten

$$L_z = m_l\hbar\,; \qquad S_z = m_s\hbar \qquad (1.3a,b)$$

und Entsprechendes auch für den Gesamtdrehimpuls.

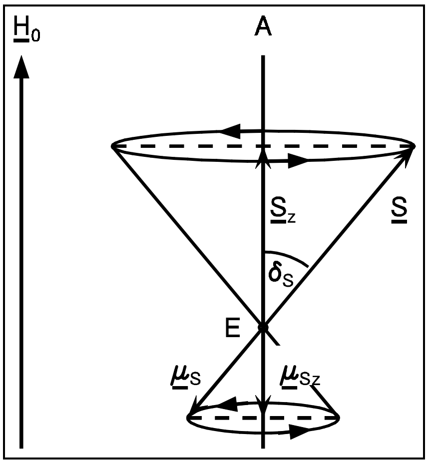


Abb. 1.5: Klassische Betrachtung eines Elektrons (E) in einem konstanten äußeren Magnetfeld der Stärke H_0 [Schneider & Plato, 1971]. Der magnetische Spinmoment-Vektor $\underline{\mu}_S$, welcher auf der Eigenrotationsachse des Elektrons (A) liegt, führt eine Präzessionsbewegung um die zum Magnetfeldvektor $\underline{H}_0$ parallele Achse A aus; er bewegt sich auf der Mantelfläche eines Präzessionskegels. Die Umlauffrequenz dieser Präzessionsbewegung wird als Larmor-Frequenz ν_L bezeichnet.

Weiterhin gilt

$$J_z = L_z + S_z = m_j \hbar; \qquad m_j = m_l + m_s \tag{1.4a,b}$$

Nach der quantenmechanischen Theorie können die jeweiligen Beträge von $\underline{L}_z$ und $\underline{S}_z$ nur diskrete, halb- oder ganzzahlige vielfache Werte von $\hbar$ annehmen, welche von den halb- oder ganzzahligen magnetischen Quantenzahlen m_l und m_s der Drehimpulse abhängen. Der Winkel δ beschreibt die Neigung des Drehimpulsvektors zu $\underline{H}_0$, es gilt hierbei im Falle des Spins [vgl. Galla, 1988; Kuchling, 1989]

$$\cos \delta_S = \frac{m_s \hbar}{S} = \frac{m_s}{\sqrt{s(s+1)}} \tag{1.5}$$

und entsprechende Beziehung auch für den Bahndrehimpuls. Bewegte Ladungen in einem Magnetfeld besitzen magnetische Dipolmomente. Ein Elektron verhält sich folglich wie ein magnetischer Punktdipol, für dessen magnetisches Gesamtmoment $\underline{\mu}_J$ gilt analog Gl. (1.1)

$$\underline{\mu}_J = \underline{\mu}_L + \underline{\mu}_S \tag{1.6}$$

Hierbei ist $\underline{\mu}_L$ das magnetische Bahnmoment und $\underline{\mu}_S$ das magnetische Spinmoment des Elektrons. Magnetisches Moment und Drehimpuls eines Elektrons sind linear voneinander abhängig, was auch aus Abb. 1.5 hervorgeht. Die Beziehung entspricht im Falle des Spins bzw. seiner Komponente in $\underline{H}_0$-Richtung [vgl. Poole, 1983]

$$\underline{\mu}_S = -\frac{g \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \underline{S}\,; \qquad \underline{\mu}_{Sz} = -\frac{g \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \underline{S}_z \qquad (1.7a,b);$$

Für den Betrag des magnetischen Moments gilt analog

$$\mu_S = \frac{g \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot S = g \cdot \sqrt{s(s+1)} \cdot \mu_B\,; \qquad \mu_{Sz} = g \cdot m_s \cdot \mu_B \qquad (1.8a,b)$$

Die Beträge der Drehimpulse werden folglich in $\hbar$-Einheiten [J·s] und die der magnetischen Momente in μ_B-Einheiten [V·s·m] angegeben.

Für die Betrachtung von Elektronenspinresonanz-Vorgängen sind von den im obigen Abschnitt erläuterten Gleichungen nur diejenigen mit einer Abhängigkeit vom Elektronenspin von Interesse. Hierbei muß jedoch vorausgesetzt sein, daß von vornherein die Wechselwirkungen zwischen magnetischem Bahnmoment und Spinmoment eines Elektrons (Spin-Bahn- oder Russell-Saunders-Kopplung) vernachlässigt werden können. Dies ist im allgemeinen in erster Näherung gut durchführbar [Schneider & Plato, 1971].

Die potentielle Energie eines magnetischen Dipols, den das Elektron im hiesigen Falle darstellt, in einem zeitlich konstanten Magnetfeld der Stärke H_0 ist gegeben durch

$$E = \underline{\mu}_S \cdot \underline{H}_0 = \left|\underline{\mu}_S\right| \cdot \left|\underline{H}_0\right| \cdot \cos\delta_S = \mu_{Sz} \cdot H_0 \qquad (1.9a)$$

[vgl. Weil *et al.*, 1994], somit gilt mit Gl. 1.8b

$$E = m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot H_0 \qquad (1.9b)$$

Der Zusammenhang zwischen magnetischer Feldstärke H und magnetischer Induktionsflußdichte B ist gegeben durch

$$B = \mu_0 \cdot H \qquad (1.10)$$

Eingesetzt in Gl. (1.9b) ergibt das

$$E = \frac{m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot B_0}{\mu_0} = m_s \cdot g \cdot \mu'_B \cdot B_0 \tag{1.11}$$

Mit $s = 1/2$ bzw. $m_s(= s,\ s-1,\ \ldots,\ -s+1,\ -s) = \pm 1/2$ sind wegen der Elektronenspin-Multiplizität $M_S = 2 \cdot s + 1 = 2$ verschiedene Spinzustände für ein Elektron erreichbar, deren Energien sind

$$E_+ = +\frac{1}{2} \cdot g \cdot \mu'_B \cdot B_0 \quad \text{und} \quad E_- = -\frac{1}{2} \cdot g \cdot \mu'_B \cdot B_0 \tag{1.12a,b}$$

Für die Energiedifferenz dieser beiden Zustände gilt:

$$\Delta E = E_+ - E_- = g \cdot \mu'_B \cdot B_0 \tag{1.13}$$

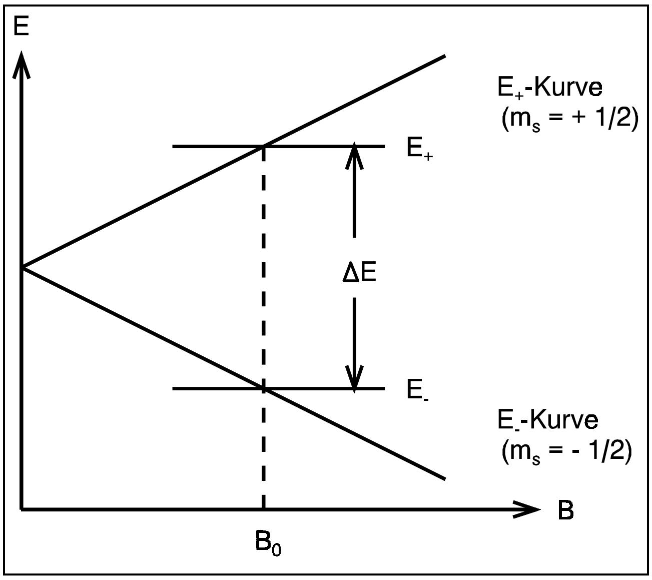


Abb. 1.6: Abhängigkeit der absoluten Energien beider möglicher Spinzustände eines ungepaarten Elektrons von der Magnetfeldstärke [Schneider & Plato, 1971]. Das Phänomen der Aufspaltung der Energieniveaus im homogenen Magnetfeld wird auch als Zeeman-Effekt bezeichnet. Für den Fall von B = 0 haben die Zustände die gleiche Energie, hier kann keine Resonanz bzw. Absorption stattfinden.

Für ein Teilchensystem kann das Besetzungsverhältnis der beiden Energieniveaus durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden [Galla, 1988; Weil *et al.*, 1994]:

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k \cdot T}\right) = \exp\left(-\frac{g \cdot \mu'_B \cdot B_0}{k \cdot T}\right) \tag{1.14}$$

Bei Raumtemperatur und magnetischen Induktionsflußdichten bis 1 T (10^4 G) ist die Besetzungszahl für die energieärmeren Spinzustände (N_-) nur unwesentlich größer als die für die energiereicheren Spinzustände (N_+), das Verhältnis liegt in der Größenordnung

$$N_+ / N_- \approx 1 - 7 \cdot 10^{-6} \qquad (1.15)$$

1.3.3 Magnetische Dipol-Wechselwirkungen zwischen Elektron und Atomkern

Ein Elektron in der Sphäre eines Atomkerns, dessen Spin von Null unterschiedlich ist, erfährt im homogenen Magnetfeld eine zusätzliche Aufspaltung seiner Energieniveaus durch den Kernspin. Bei Atomkernen mit der Spinquantenzahl I ist die Spin-Multiplizität $\mathrm{M_I} = 2 \cdot \mathrm{I} + 1$ (magnetische Kernspinquantenzahl $\mathrm{m_I} = \mathrm{I},\ \mathrm{I}-1,\ \ldots,\ -\mathrm{I}+1,\ -\mathrm{I}$) und entspricht dem Vervielfachungsfaktor der Elektronen-Energieniveaus. So gilt zum Beispiel für den ^{14}N-Kern $\mathrm{I} = 1$ bzw. $\mathrm{M_I} = 3$ ($\mathrm{m_I} = +1,\ 0,\ -1$), die beiden Energieniveaus des Elektrons in Abb. 1.6 erfahren je eine dreifache Aufspaltung.

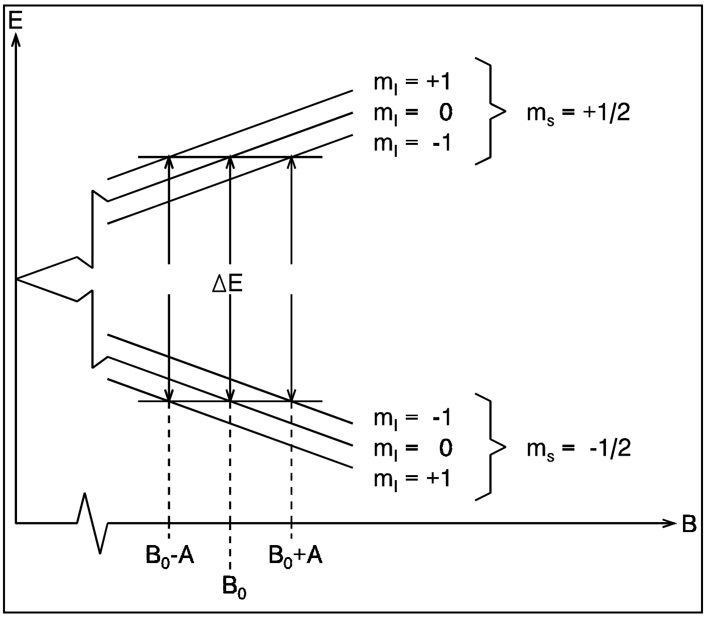


Abb. 1.7: Einfluß der magnetischen Wechselwirkung des Elektrons mit einem Atomkern, dessen Spinquantenzahl $\mathrm{I} = 1$ ist, auf die Elektronen-Energieniveaus [Weil *et al.*, 1994]. Für die Übergänge des Elektronenspins zwischen diesen Niveaus gelten die Auswahlregeln

$$\Delta \mathrm{m_I} = 0 \text{ und } \Delta \mathrm{m_s} = \pm 1$$

Damit sind, wie dargestellt, insgesamt drei Übergänge erlaubt.

Der Abstand des Elektrons vom paramagnetischen Atomkern spielt eine große Rolle für die Differenz seiner Spin-Energieniveaus. Je kleiner der Abstand, desto größer die Differenz der Energieniveaus und umgekehrt. Die Energie der magnetischen Elektron-Kern-Wechselwirkung steht im reziproken Verhältnis zur dritten Potenz des Elektron-Kern-Abstands [Weil *et al.*, 1994].

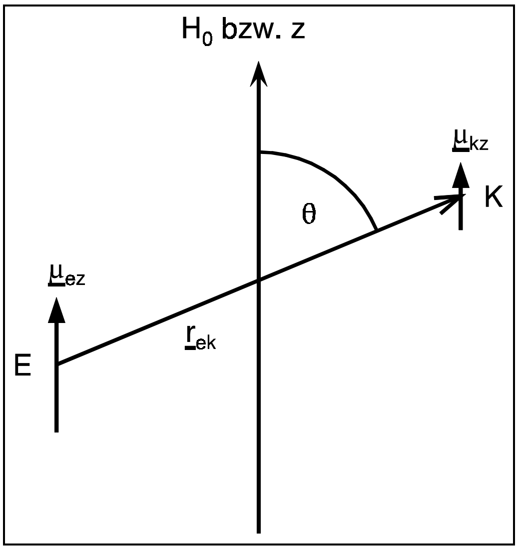


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der ausgerichteten magnetischen Momente von Elektron (E) und Atomkern (K) im homogenen Magnetfeld [Weil *et al.*, 1994]. Die Wechselwirkungsenergie ist abhängig von der Stellung der beiden Spinsysteme zueinander, d.h. vom Winkel, den Magnetfeldrichtung und Elektronen-Kern-Abstandsvektor einschließen (θ).

$$U_{ek} = -\frac{\mu_0}{4\pi} \cdot \frac{3 \cdot \cos^2\theta - 1}{r_{ek}^3} \cdot \mu_{kz} \cdot \mu_{ez} \qquad (1.16a)$$

1.3.4 Wechselwirkungen zwischen Elektronen

1.3.4.1 Magnetische Dipol-Wechselwirkungen

In der gleichen Art und Weise wie magnetische Dipol-Wechselwirkungen zwischen Elektron und Atomkern existieren auch solche Interaktionen zwischen zwei Elektronen. Für die Wechselwirkungsenergie gilt dieselbe Abhängigkeit vom Abstand der Elektronen zueinander, wobei deren Größenordnung um den Faktor 10^3 höher liegt. Dies liegt daran, daß das magnetische Spinmoment des Elektrons mindestens 2000 mal größer ist als das eines Atomkerns [Weil *et al.*, 1994].

$$U_{ee} = -\frac{\mu_0}{4\pi} \cdot \frac{3 \cdot \cos^2\theta - 1}{r_{ee}^3} \cdot \mu_{ez} \cdot \mu'_{ez} \qquad (1.16b)$$

Genau wie bei der Elektron-Kern-Wechselwirkung werden die Energieniveaus der Elektronen durch die Wechselwirkung zusätzlich aufgespalten, der Faktor wird durch die Elektronenspin-Multiplizität M_s bestimmt.

1.3.4.2 Spin-Austausch-Wechselwirkungen

Zwei benachbarte ungepaarte Elektronen können ihre jeweiligen Spinzustände voneinander übernehmen (austauschen), wenn diese unterschiedlich sind. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Austausch ist um so größer, je näher sich die Spinsysteme kommen. Bei Abständen zweier Spinsysteme unter 8 Å tritt diese Art von Interaktion verstärkt in Erscheinung [vgl. Likhtenshtein, 1976 & 1993]. Spin-Austausch-Wechselwirkungen verkürzen die Lebensdauer eines angeregten Spinzustandes (τ) und vergrößern somit nach der Heisenbergschen Unschärferelation (s. Gl. 1.20) dessen Energieunschärfe [Galla, 1988; Weil *et al.*, 1994].

1.3.5 Absorption

Absorbiert ein Spinsystem im homogenen Magnetfeld, wie es oben beschrieben wurde, im (energieärmeren) Grundzustand einen EM-Strahlungsquant der Frequenz ν, so geht es in den (energiereicheren) angeregten Zustand über. Es gilt sodann die allgemeine Formel für die Absorption von Strahlung [Kuchling, 1989]

$$\Delta E = h \cdot \nu \qquad (1.17).$$

Mit Gl. 1.13 ergibt sich hieraus die allgemeine Resonanzbedingung

$$h \cdot \nu = g \cdot \mu'_B \cdot B_0 \qquad (1.18)$$

Die Boltzmann-Gleichung (1.14) läßt sich also auch folgendermaßen ausdrücken:

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp\left(-\frac{h \cdot \nu}{k \cdot T}\right) \qquad (1.19)$$

Im Falle der Absorption wird die durch Gl. (1.15) beschriebene Boltzmann-Verteilung derart beeinflußt, daß eine Gleichverteilung der Zustände ($N_+ / N_- = 1$) angestrebt wird (entsprechend

$T \rightarrow \infty$). Eine solche Situation wird als absolute Sättigung bezeichnet. Da hier die Entropie maximal ist, sind Besetzungsverhältnisse mit $N_+ / N_- > 1$ nicht möglich [vgl. Weil *et al.*, 1994].

1.3.6 Relaxation

1.3.6.1 Spin-Gitter-Relaxation [Schneider & Plato, 1971; Weil **et al.**, *1994]*

Die durch die Absorption entstandene Verschiebung des Besetzungsverhältnisses der Spin-Energieniveaus verursacht ein thermisches Ungleichgewicht. Die atomare bzw. molekulare Umgebung der Spinsysteme, das sogenannte Gitter, ist jedoch in der Lage, die überschüssige Spin-Anregungsenergie in Form von Wärme aufzunehmen. Dieser als Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxation bezeichnete strahlungslose Übergang stellt das thermische Gleichgewicht des Gesamtsystems wieder her.

Als Maß für die Geschwindigkeit des Relaxationsvorgangs steht die sogenannte Spin-Gitter-Relaxationszeit (T_1). Sie ist per Definition die Zeit, in der im Gesamtsystem ein durch Absorption gestörtes Boltzmann-Besetzungsverhältnis bis auf 1/e (ca. 37%) der Verteilungsdifferenz wiederhergestellt wurde, d.h. daß ca. 63% der angeregten Spins innerhalb von T_1 relaxieren.

In Festkörpern ist T_1 aufgrund einer besseren Kopplung der Spinsysteme an das Gitter kleiner als in Flüssigkeiten. Zu große Spin-Gitter-Relaxationszeiten führen zu Sättigungszuständen, wie sie weiter oben im Abschnitt 1.1.5 beschrieben wurden.

1.3.6.2 Spin-Spin-Relaxation [Schneider & Plato, 1971; Weil **et al.**, *1994]*

Eine weitere Art der Dezimierung angeregter Spinzustände ist die Spin-Spin-Relaxation. Diese ist jedoch mit einer Spin-Anregung gekoppelt, so daß im Endeffekt ein Spin-Austausch resultiert (vgl. Kap. 1.1.4.2). Prozesse dieser Art sind folglich ohne Einfluß auf das Boltzmann-Besetzungsverhältnis, verkürzen jedoch die Lebensdauer des angeregten Spinzustandes. Nach der Heisenbergschen Unschärferelation [vgl. Kuchling, 1983] gilt

$$\Delta E \cdot \tau \geq \hbar \qquad (1.20)$$

wobei ΔE der Energieunschärfe eines Spinzustandes und τ seiner Lebensdauer entspricht. Das bedeutet, daß bei verkürzter Lebensdauer die Energieunschärfe der Spin-Energieniveaus zunimmt.
Die Spin-Spin-Relaxationszeit (T_2) definiert man als die mittlere Lebensdauer von angeregten Spinzuständen, welche ausschließlich durch Spin-Austausch in den Grundzustand zurückversetzt werden.

1.4 ESR-spektroskopische Meßtechnik

1.4.1 Entwicklung

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, welche sich die in Kap. 1.2 vorgestellten Eigenschaften von Elektronen in zeitlich homogenen Magnetfeldern zunutze macht, hat sich neben der Kernspinresonanz-Spektroskopie seit dem Zweiten Weltkrieg in vielen Bereichen der naturwissenschaftlichen Forschung zu einer etablierten Analysemethode entwickelt [vgl. Poole, 1983]. Speziell in der Biochemie hat sie Bedeutung bei der Aufklärung von Struktur und Funktion von Makromolekülen erlangt. In der heutigen Zeit ist die ESR-Spektroskopie mit ihrer Vielzahl verschiedener Meßtechniken als Ergänzung zu biochemischen Untersuchungen ein sehr wertvolles Instrument.

1.4.2 Meßprinzip

Das Meßprinzip der ESR-Spektroskopie wird im folgenden vereinfacht beschrieben [vgl. Weil *et al.*, 1994]. Die zu vermessende Probe wird in einem Hohlraum-Resonator (Cavity) mit Mikrowellen von konstanter Frequenz ν bestrahlt. Diese werden in einem Klystron erzeugt und über einen Hohlleiter zur Cavity geleitet. Senkrecht zur Einstrahlungsrichtung der MW-Strahlung wird ein konstantes Magnetfeld angelegt, in dem sich die Cavity befindet.

MW-Band	typische MW-Frequenz [GHz]
L	1,5
S	3,0
C	6,0
X	9,5
K	23
Q	36
V	50
W	95

Tab. 1.1: Auflistung der verschiedenen MW-Frequenzbändern, welche bei der ESR-Spektroskopie auf Basis der CW-Technik zum Einsatz kommen [Weil *et al.*, 1994]

Für Mikrowellen im X-Band-Bereich (Frequenz ca. 10 GHz) benötigt dieses Magnetfeld eine Stärke von etwa 350 mT, wenn der Landé-Faktor der Meßprobe bei etwa 2,0 liegt. Die Mikrowellen werden in einem Klystron erzeugt und durch einen Einweg-Hohlleiter sowohl zum Hohlraumresonator als auch zu einem Kristalldetektor geleitet, der Weg der Strahlung verläuft durch eine Hohlleiter-Verzweigung, dem sogenannten "magischen T". Die Intensität der MW-Strahlung wird durch eine Irisblende reguliert. Ein Kristalldetektor wandelt die in der Cavity reflektierte MW-Strahlung in eine Gleichspannung um, die gemessen und auf einem Schreiber ausgegeben werden kann. Im Falle einer magnetischen Resonanz wird aufgrund von Absorption die stehende Mikrowelle in der Cavity gestört, da eine Frequenzverschiebung stattfindet. Diese Störung kann vom Detektor registriert werden, es resultiert eine Absorptionsbande.

Im Verlauf der Entwicklung der Continuous Wave-(CW-)Meßtechnik hat sich das Field Sweep-Verfahren gegenüber dem Frequency Sweep-Verfahren durchgesetzt, da letzteres technisch anspruchsvoller ist. Beim Field Sweep wird bei konstant gehaltener MW-Frequenz die Magnetfeldstärke variiert. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bzw. der Signalausbeute wird neben dem erzeugten kontinuierlichen Magnetfeld ein magnetisches Wechselfeld angelegt und mit einer phasensensitiven Amplituden-Detektionstechnik anstelle des normalen Absorptionssignals dessen erste mathematische Ableitung, das derivative Absorptionssignal, aufgenommen (vgl. Abb. 1.9). Dieses Signal enthält mehr direkte Informationen über die Parameter der Absorptionsbande.

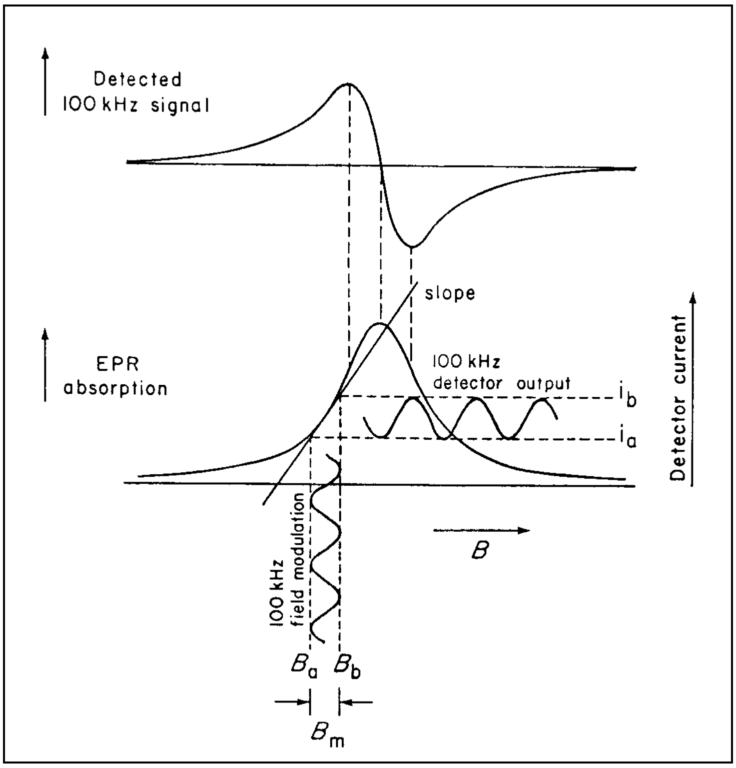


Abb. 1.9: Modulation eines normalen Absorptionssignals (unten) mit einem magnetischen Wechselfeld. Das resultierende derivative Signal (oben) entspricht der ersten mathematischen Ableitung des Normalsignals [Weil *et al.*, 1994].

In den letzten Jahren wurde die CW-Meßtechnik, ähnlich wie zuvor bei der Kernresonanzspektroskopie, zunehmend von der Puls-Technik ergänzt. Letztere beruht darauf, daß die Meßprobe bei einer konstant gehaltenen Magnetfeldstärke mit einem Breitband-Mikrowellenpuls (Rechteck-Puls) bestrahlt wird und die abklingende Quermagnetisierung gemessen wird. Mittels Fourier-Transformation wird dann schließlich das Spektrum berechnet.

1.4.3 Spektren

Das Erscheinungsbild eines ESR-Signals, d. h. seine Lage in der Magnetfeldskala und dessen Form, sind von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. So wird die Lage des Signals von der Lage der entsprechenden Spin-Energieniveaus bestimmt (s. Abb. 1.6 und 1.7), diese wiederum wird bestimmt durch

i) das äußere Magnetfeld, in dem sich die Meßprobe befindet, hier errechnet sich die Magnetfeldstärke aus Gl. 1.18:

$$B_0 = \frac{h \cdot \nu}{g \cdot \mu'_B} \qquad (1.18a)$$

ii) innere Magnetfelder, erzeugt durch

- die intra- und intermolekulare chemische Umgebung des entsprechenden Spinsystems bzw. des einfach besetzten Atom- oder Molekülorbitals, diese bestimmt dessen Landé-Faktor
- magnetische Dipol-Wechselwirkungen zwischen Elektronen oder Elektron und Atomkern (s. Abb. 1.7). Bei letzteren erweitert sich Gl. 1.18a zu

$$B_0' = B_0 - m_I \cdot A \qquad (1.21),$$

wobei A als Kernspin-Hyperfeinkopplungskonstante bezeichnet wird. Die Absorptionslinie wird hierbei in M_I Signale aufgespalten, die in der Magnetfeldskala den Abstand A voneinander aufweisen.

iii) die Orientierung des o.g. Orbitals bzw. des Spinsystem-tragenden Moleküls im äußeren Magnetfeld. Diese kann ebenso durch die räumliche Orientierung (θ, φ) des Magnetfeldvektors innerhalb eines festgelegten Molekül-Koordinatensystems (wie z.B. in Abb. 1.14, Abschnitt 1.4) beschrieben werden.

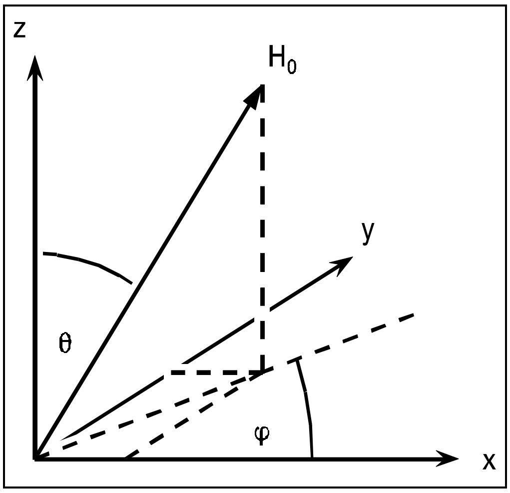


Abb. 1.10: Veranschaulichung der Orientierung des Magnetfeldvektors in einem molekularen Koordinatensystem (x,y,z). Zu ihrer Beschreibung sind die beiden dargestellten Raumwinkel (θ und φ) notwendig.

Für den Landé-Faktor in Gl. 1.18 und die Hyperfeinkopplungskonstante in Gl. 1.21 gilt

$$g(\theta,\varphi) = \sqrt{\cos^2\varphi \cdot \sin^2\theta \cdot g_{xx}^2 + \sin^2\varphi \cdot \sin^2\theta \cdot g_{yy}^2 + \cos^2\theta \cdot g_{zz}^2} \qquad (1.22a)$$

$$A(\theta,\varphi) = \sqrt{\cos^2\varphi \cdot \sin^2\theta \cdot A_{xx}^2 + \sin^2\varphi \cdot \sin^2\theta \cdot A_{yy}^2 + \cos^2\theta \cdot A_{zz}^2} \qquad (1.22b)$$

[Poole, 1983]. Die mit x, y und z doppelt indizierten Zeichen sind die sogenannten Tensorelemente, sie entsprechen den g- und A-Werten für den Fall von $H_0 \parallel x, y, z$ des

Molekül-Koordinatensystems. Sind alle möglichen Orientierungen für ein Ensemble von Spinsystemen gleichverteilt, so wird das Gesamtsystem als isotrop bezeichnet, in allen anderen Fällen ist es anisotrop. Im Falle von Isotropie gilt

$$g = \left\langle g(\theta,\varphi)\right\rangle = \tfrac{1}{3}\left(g_{xx}+g_{yy}+g_{zz}\right) \tag{1.23a}$$

$$A = \left\langle A(\theta,\varphi)\right\rangle = \tfrac{1}{3}\left(A_{xx}+A_{yy}+A_{zz}\right) \tag{1.23b}$$

[vgl. Galla, 1988]. Für die kombinierten Resonanzbedingungen aus Gl. 1.18 und 1.21

$$h\cdot\nu = g\cdot\mu'_B\cdot\left(B'_0+m_I\cdot A\right) \tag{1.24}$$

gilt ebenso

$$h\cdot\nu = g_{xx}\cdot\mu'_B\cdot\left[\left(B'_0\right)_{xx}+m_I\cdot A_{xx}\right] \tag{1.24a}$$

und Entsprechendes für die y- und z-Tensorelemente von g und A.

Die Form der Absorptionslinien bzw. Gestalt des Spektrums werden bestimmt durch

i) Relaxationsprozesse, wie sie in Kap. 1.1.6 beschrieben wurden. Diese beeinflußen die Halbwertslinienbreite $\Delta\omega$ der Signale. Es gilt

$$\frac{\Delta\omega}{2} = \frac{1}{2\cdot T_1}+\frac{1}{T_2} = \frac{1}{\tau'} \tag{1.25}$$

[Schneider & Plato, 1971]. Hierbei ist τ' die effektive Lebensdauer der Spinzustände, auch als transversale Relaxationszeit bezeichnet. In Flüssigkeiten ist die Kopplung des Spinsystems ans Gitter geringer als in Festkörpern. T_2 ist hier deutlich kleiner als T_1, und die transversale Relaxationszeit entspricht etwa der Spin-Spin-Relaxationszeit.

ii) moleküldynamische Prozesse mit Augenmerk auf die Rotationsdynamik. Als Maß für die Rotationsdynamik eines Ensembles von Spinsystemen steht die Rotationskorrelationszeit (τ_R). Sie entspricht der Zeit, in der sich der Anteil 1/e aller Spinsysteme des Ensembles um 1 rad (ca. 57°) aus seiner Ausgangsorientierung gedreht hat. Das für die Spektren maßgebliche Zeitfenster der o.g. Rotationsprozesse liegt bei etwa 10^{-7} ('slow motion'-Spektren) bis 10^{-11} s ('fast motion'-Spektren), für spezielle Meßtechniken wie der Sättigungstransfer-ESR auch über 10^{-7} s.

Im Verlauf der zunehmenden Immobilisierung bzw. zunehmenden Rotationskorrelationszeit des Spinsystem-Ensembles gehen die Parameter, welche die Position der Absorptionsbande(n) im Spektrum bestimmen, also Landé-Faktor und Kernspin-Hyperfeinkopplungskonstante, sukzessive in ihre entsprechenden Tensorelemente über. Sie verändern damit, wie in Abb. 1.11 ersichtlich, die Form des resultierenden Spektrums, da die Tensorelemente im allgemeinen unterschiedliche Werte annehmen. Abb. 1.12 zeigt die Bestimmung dieser Elemente aus einem Spektrum.

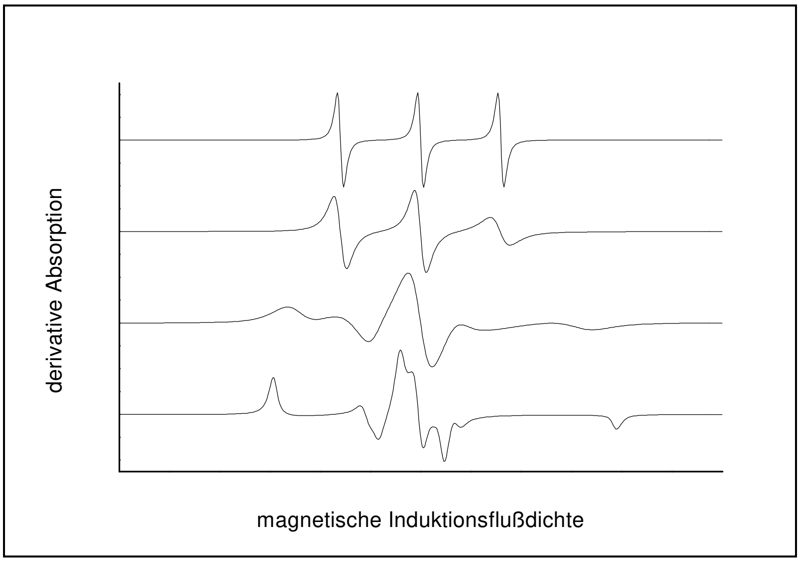


Abb. 1.11: Abhängigkeit des Erscheinungsbilds eines ESR-Spektrums für $I = 1$ von der Rotationsdynamik der Spinsysteme [Kraft, 1995]. Die Immobilisierung der Spinsonden nimmt von oben nach unten hin zu. Für die oberen zwei Spektren liegt die Rotationskorrelationszeit bei etwa 10^{-11} bzw. 10^{-9} s, beim untersten bei etwa 10^{-7} s.

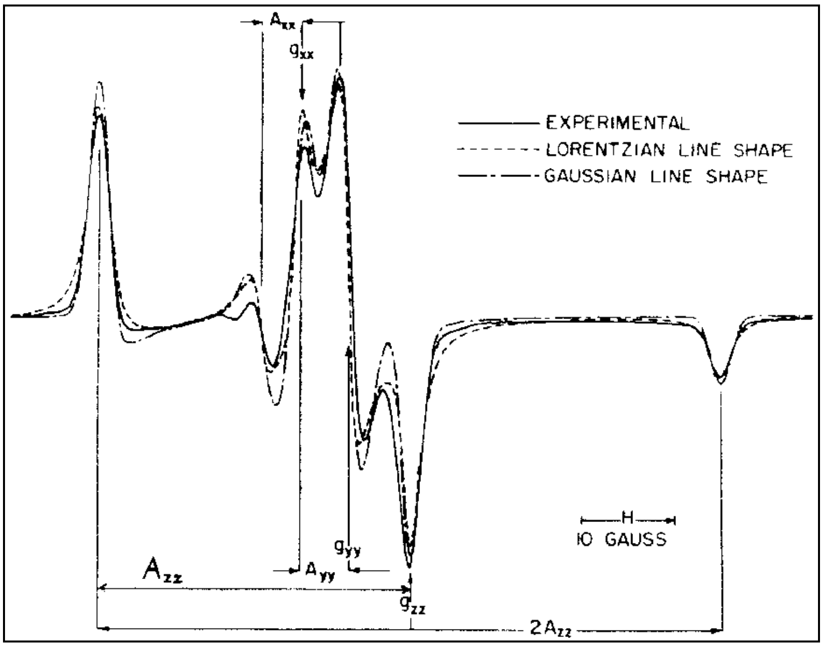


Abb. 1.12 (vorige Seite): Gemessene und simulierte "slow motion"-ESR-Spektren eines perdeuterierten Nitroxylradikals (I = 1) mit Erläuterung der g- und A-Tensorelemente [Hwang *et al.*, 1975]. Durch die geringe Linienbreite ist die Feinstruktur des Spektrums gut zu erkennen.

1.5 Organische Nitroxylradikale als ESR-Reportergruppen

Eine Sorte von Spinsonden, die in der ESR-Spektroskopie recht häufige Verwendung findet, sind die stabilen organischen Nitroxylradikale. Ihr Einsatz erfolgt hauptsächlich bei biophysikalischen Untersuchungen.

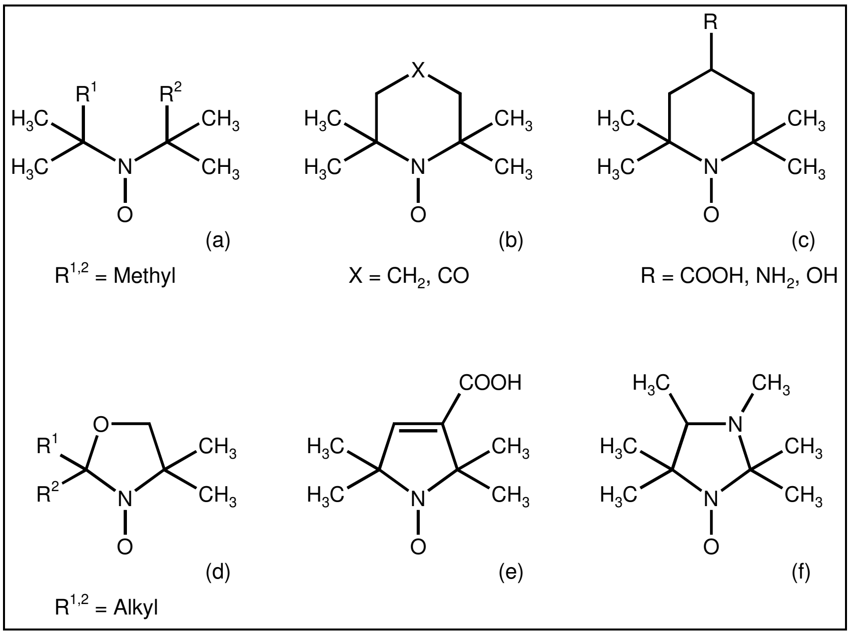


Abb. 1.13: Einige Beispiele von Nitroxylradikalen auf Piperidin- (b, c) und Pyrrolidinbasis (d-f) und eine allgemeine Form, welche auch stellvertretend für nichtzyklische organische Nitroxyl-

verbindungen steht (a). Die einfachste stabile Verbindung dieser Klasse ist Di-(1,1-dimethylethyl)amin-N-oxyl für $R^{1,2}=CH_3$.[vgl. Breuer *et al.*, 1989]

1.5.1 Besondere Eigenschaften

Die recht hohe Stabilität der Nitroxylradikale gegenüber Redox-Prozessen ist einerseits, wie in Abb. 1.14 illustriert, durch eine Mesomeriestabilisierung des ungepaarten Elektrons bedingt sowie andererseits durch die sterische Abschirmung, welche durch die vier Methylgruppen an den α-C-Atomen erzielt wird. Die primäre Funktion dieser Methylgruppen ist jedoch einfach die Substitution der Wasserstoffatome an den α-Kohlenstoffen zwecks chemischer Stabilisierung der Verbindung.

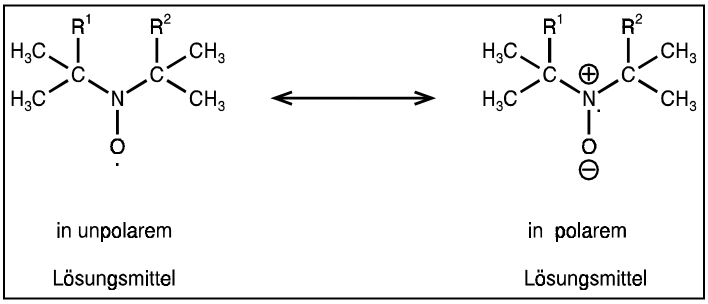


Abb. 1.14: Mesomere Grenzstrukturen eines als Reportergruppe verwendeten Nitroxylradikals [Breuer *et al.*, 1989]. Die Polarität des Lösungsmittels hat einen wesentlichen Einfluß darauf, welche Resonanzstruktur der reellen Struktur des Radikals am ähnlichsten ist.

Resultierende Elektron-Kern-Wechselwirkungen für die oben beschriebenen Nitroxylradikale wären demnach zum einen die Wechselwirkung mit dem ^{14}N-Kern ($I = 1$), welche um so stärker ist, je polarer die Umgebung der Moleküle ist, und zum anderen die Wechselwirkung mit einem α-^{13}C-Kern ($I = \frac{1}{2}$). Da die relative Häufigkeit dieses C-Isotops jedoch recht gering ist, fällt die Wechselwirkung für das Spektrum nicht stark ins Gewicht.

1.5.2 ESR-Spektren

Die ESR-Spektren der organischen Nitroxylradikale haben somit eine wie in Abb. 1.11 dargestellte Form und Gestalt. Für die Definition der im vorigen Abschnitt erläuterten Tensorelemente von Landé-Faktor und Hyperfeinkopplungskonstante liegt die in Abb. 1.12 illustrierte Darstellung zugrunde.

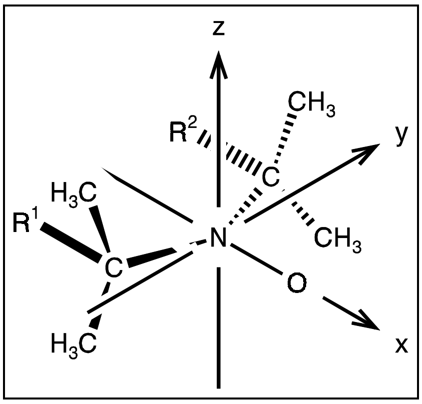


Abb. 1.15: Molekulares Koordinatensystem eines organischen Nitroxylradikals [Nordio, 1976]. Die z-Achse beschreibt hierbei die Längsachse des p-Orbitals vom Stickstoff, während die N-O-Bindung einen Teil der x-Achse darstellt.

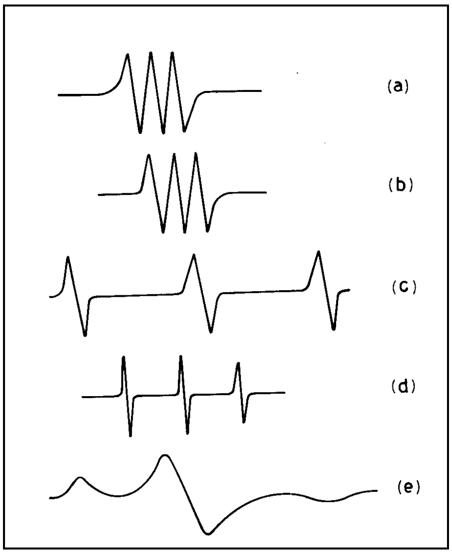


Abb. 1.16: Abhängigkeit der ESR-Spektren von der Orientierung eines mit Nitroxylradikalen dotierten Einkristalls im homogenen Magnetfeld [Nordio, 1976]. Die Spinsonden sind im Kristall einheitlich orientiert. Spektren: Magnetfeld parallel zur molekularen x-Koordinatenachse (a, vgl. Abb. 1.15), zur molekularen y-Koordinatenachse (b) und zur molekularen z-Koordinatenachse (c); gemitteltes Spektrum aus den Spektren a-c (d), entspricht dem Fast-Tumbling-Spektrum der freien Spinlabel in Lösung; Summe der Spektren über alle möglichen Orientierungen (e, vgl. Gln. 1.22), entspricht dem Rigid-Powder-Limit-Spektrum der Radikale. Aus den Spektren a-c sind die Tensorelemente von g und A bestimmbar.

Charakteristische Werte für die g- und A-Tensorelemente von Nitroxylradikalen in wäßrigen Lösungen sind

g_{xx}=2,009; g_{yy}=2,006; g_{zz}=2,003; A_{xx}=5,5 G; A_{yy}=6,0 G; A_{zz}=36,5 G.

Wie in Abb. 1.12 zu sehen ist, lassen sich die einzelnen Tensorelemente leicht aus einem Spektrum mit gut aufgelöster Feinstruktur bestimmen. Diese wird für X-Band-Spektren besonders bei perdeuterierten Spinsonden aufgrund einer geringen Hyperfeinaufspaltung der Elektronen-Energieniveaus durch den Deuteriumkern erzielt. Bei den gewöhnlichen Spinlabeln verursachen die Wasserstoff-Protonen aufgrund einer im Vergleich zu Deuterium größeren Hyperfeinaufspaltung eine schlechtere Auflösung der ESR-Linien. Zusätzlich sorgt Sauerstoff in der Lösung für eine Verbreiterung der Signale und somit für eine schlechtere Auflösung der Spektren-Feinstruktur.

2. Problemstellung

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen F_1-ATPasen verschiedenen Ursprungs und spinmarkiertem ATP mit Hilfe der ESR-Spektroskopie wurde in der Vergangenheit in unserem Arbeitskreis ein an der Ribose modifiziertes ATP mit und ohne Azid-Modifizierung am Adeninteil verwendet [Vogel *et al.*, 1992; Burgard *et al.*, 1994; Motz, 1995; Lösel *et al.*,1996 & 1997]. Die Vermessung des Enzym-Substrat-Systems lieferte zwei überlagerte ESR-Spektren, welche sich insbesondere im Hoch- und Tieffeldbereich deutlich unterschieden. Mit Hilfe von Bindungsstudien konnte das Auftreten der verschiedenen Signale durch Binden der Nucleotidanaloga an Bindungsstellen unterschiedlichen Typs erklärt werden. Es blieb letztlich jedoch die Frage nach der exakten Ursache für das Erscheinungsbild dieser verschiedenen Spektren offen. Sehr wahrscheinlich ist wohl die Annahme, daß Mobilitätseffekte, d.h. die Rotationsdynamik der Spinsonden, die Hauptrolle spielen. Desweiteren können sich aber auch Einflüsse von der Dielektrizität bzw. Polarität der Spinlabel-Umgebung im ESR-Spektrum bemerkbar machen. Außerdem ist die 2'/3'-Isomerisierung des obigen SL-ATP-Derivats ein weiterer potentieller Grund für zwei koexistierende Spektren, da die Spinsonden je nach Position im ATP unterschiedlichen Umgebungen in der gleichen Bindungsstelle ausgesetzt sein können. Fortgeführte Untersuchungen zur Aufklärung des Doppelspektrums [Motz, 1995] haben ergeben, daß diese Erscheinungsform offensichtlich nicht allein von den unterschiedlichen 2'/3'-Isomeren abhängig sein kann.

Kritisch betrachtet bleibt bei den oben genannten spinmarkiertem ATP-Derivaten ein möglicherweise ungünstiger Nebeneffekt bestehen: Durch die Art der Verknüpfung von Nucleotid-Ribose und Spin-Label besitzt letzterer eine große Rotationsfreiheit, was sich potentiell auf die Spektrenform auswirken kann. Durch den Einsatz eines (bezüglich des Spinlabels) rotationsimmobilisierten SL-ATP-Derivats wie z.B. dem 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-adenosin-5'-triphosphat [vgl. Alessi *et al.*, 1992] für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen EF_1 und ATP ist die Möglichkeit eines Vergleichs gegeben, wobei neue Aussagen über die Bewegung der Spinsonden im gebundenen Substrat ermöglicht werden könnten. Desweiteren sollte die Modellierung des Spiroketal-SL-Nucleotids in einer vergleichbaren Proteinumgebung, wie sie in der Kristallstruktur der mitochondrialen F_1-ATPase aus Rinderherzen [vgl. Abrahams *et al.*, 1994] gezeigt ist, ein nützliches Werkzeug sein, um die erhaltenen Meßergebnisse besser interpretieren zu können.

Die Erforschung von Struktur und Funktion der b-Untereinheit in EF_0 verlief bisher noch nicht so weit wie bei den röntgenkristallographisch untersuchten α-, β- und γ-Untereinheiten der ATP-Synthase [Abrahams *et al.*, 1994]. Die bisherigen Anstrengungen haben neben der Strukturvorhersage über die Aminosäurensequenz und Querverknüpfungsexperimenten mit Cysteinmutanten hauptsächlich zu Erkenntnissen über die Sekundärstruktur des Proteins geführt [Senior und Wise, 1983; Dunn, 1992; McLachlin & Dunn, 1997].

In unserem Arbeitskreis wurde bereits die Vorarbeit zur Erforschung der Struktur des hydrophilen Carboxyterminus von b mit Hilfe von 'Site-Directed Spin Labeling' der Untereinheit und ESR-Meßtechniken getan [Kersten, 1999]. Hierbei konzentrierten sich die Untersuchungen auf spezifisch spinmarkierte Cystein-Mutanten von b [vgl. Dunn, 1992; McLachlin & Dunn, 1997]. Es konnten Erkenntnisse über Mobilitätsverhältnisse der Spinsonden verschiedener Mutanten und somit über Bereiche von b, welche in Wechselwirkung mit EF_1 stehen, gewonnen werden. Mit weiteren neuen Mutanten von b sollten diese Untersuchungen fortgesetzt werden, um ein klareres Bild von Funktion und Struktur der Proteinuntereinheit zu erhalten.

Weitere Erkenntnisse bezüglich der Struktur der Verknüpfung von EF_0 und EF_1 im Bereich von b sind über die Untersuchung von möglichen dipolaren Wechselwirkungen benachbarter Spinsysteme und deren Abstand innerhalb des Protein-Dimeren von b selbst sowie dessen Komplex mit EF_1 möglich. Hierbei besteht die Möglichkeit, durch die chemische Modifizierung eines aussichtsreichen Cysteinmutanten von EF_1 mit einer ESR-Reportergruppe ausgedehntere Untersuchungen dipolarer Interaktionen durchzuführen. Eine wichtige Rolle kann hier außerdem die An- bzw. Abwesenheit der δ-Untereinheit als potentiellem Vermittler der Bindung von b an F_1 spielen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Enzym-Substrat-Wechselwirkung von EF_1 und 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP

ESR-Untersuchungen zur Interaktion verschiedener F_1-ATPasen und deren Substrat ATP wurden in unserer Arbeitsgruppe in den letzten Jahren mit Hilfe der spinmarkierten ATP-Derivate 2',3'-O-(2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonyl)-ATP (SL-ATP) und 2-Azido-2',3'-O-(2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonyl)-ATP (2-N_3-SL-ATP) durchgeführt [Burgard *et al.*, 1994; Lösel *et al.*, 1996 & 1997; Motz, 1995]. Diese an der Ribose modifizierten Nucleotide bewährten sich durch gute Bindungseigenschaften, welche selbst durch eine eingeführte Azidogruppe nicht beeinträchtigt wurden. Die resultierenden Raumtemperatur-Messungen offenbarten zwei überlagerte Spektren mit Hochfeld-Tieffeld-Signalabständen ($2A_{zz}$'-Werten) von 66 G für eine offensichtlich immobilisiertere SL-Spezies und 51 bzw. 52 G für ein dem Anschein nach beweglicheres Ensemble von Spinsonden.

Wie schon im vorigen Kapitel angeschnitten, war die Verwendung von SL-ATP als ESR-aktives Substrat unmittelbar mit dessen Eigenschaft verbunden, einem 2',3'-SL-Isomerengleichgewicht zu unterliegen [Fischer, 1920; Onur *et al.*, 1983]. Untersuchungen mit 2'-Desoxy-3'-SL- und 3'-Desoxy-2'-SL-Analoga des SL-ATP im Komplex mit EF_1 [Motz, 1995] zeigten, daß die im Rahmen der Isomerisierung potentiell mögliche Fluktuation der Spinsonde innerhalb des Substrats keinen markanten Einfluß auf die Spektrenform hatte. Die Unterschiede der $2A_{zz}$'-Werte im Vergleich von (2-N_3-)SL-ATP und den o.g. Desoxy-Derivaten von SL-ATP im Komplex mit der F_1-ATPase lagen in den spektralen Komponenten der mobileren Spinsonden. Für das 2'-Desoxy-3'-SL-Analogon betrugen diese 48-49 G und für das 3'-Desoxy-2'-SL-Analogon 45-46 G.

Mit dem 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP (SL*-ATP) sollte in dieser Arbeit ein SL-Nucleotid als potentielles Nucleotidanalogon für die F_1-ATPase untersucht werden, dem die Möglichkeit der Rotation der Spinsonde relativ zum Rest des Moleküls aufgrund einer Spiroketalverknüpfung fehlt.

3.1.1 Synthese von 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP

Ausgehend von 3 mmol der freien Säure von AMP wurden nach einer im Ablauf der Synthesen-Reihenfolge modifizierten Vorschrift [Alessi *et al.*, 1992] ca. 200 µmol des Endprodukts erhalten. Mit insgesamt rund 7% fiel die Gesamtausbeute geringer aus als die entsprechend in der Literatur angegebenen 12%.

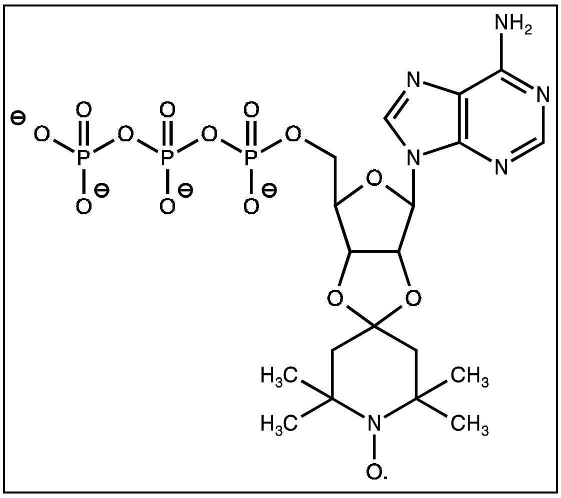


Abb. 3.1: 2',3'-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP (SL*-ATP). Dieses SL-ATP-Derivat besitzt keine Möglichkeit der freien Rotation des SL-Rests relativ zum Riboseteil, es sind in moleküldynamischer Hinsicht nur noch Pseudorotationen in Form von Torsionsschwingungen möglich.

3.1.2 Isolierung von EF_1 aus SWM1

Die Gewinnung von EF_1 aus dem *E. coli*-Bakterienstamm SWM1 [Rao *et al.*, 1988a] gelang nach einer von Wise (1990) modifizierten Vorschrift von Senior *et al.* (1979). Mit der Fermenteraufzucht wurden aus 12 l Wachstumsmedium ca. 90 g Zellen erhalten. Deren Verarbeitung zu Vesikeln und die anschließende Abtrennung und Säulenreinigung des F_1-Rohproteins ergab eine Ausbeute von 100-120 mg reinem Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 16-23 $U \cdot mg^{-1}$.

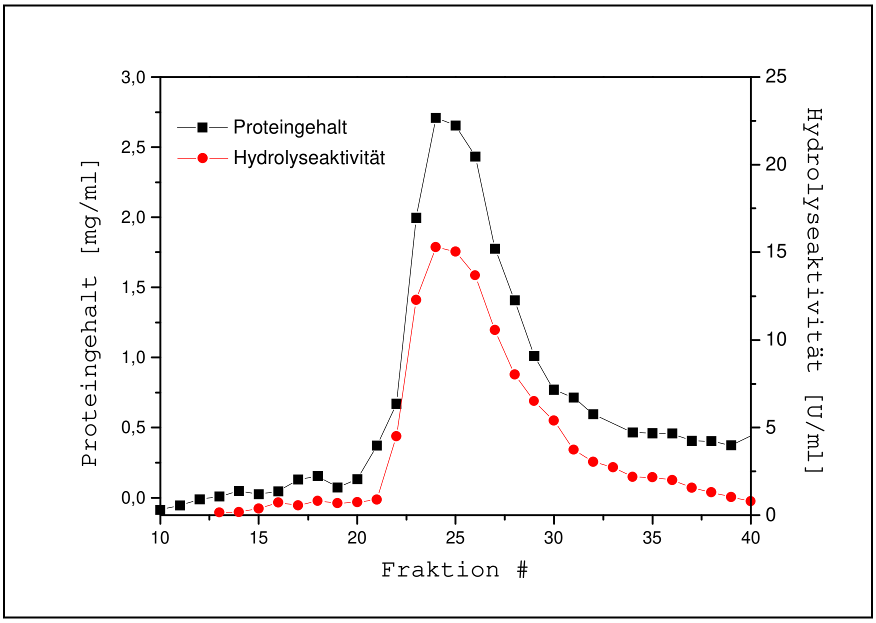


Abb. 3.2: Elutionsdiagramm des Proteins über eine DEAE-Ionenaustauscher-Säule

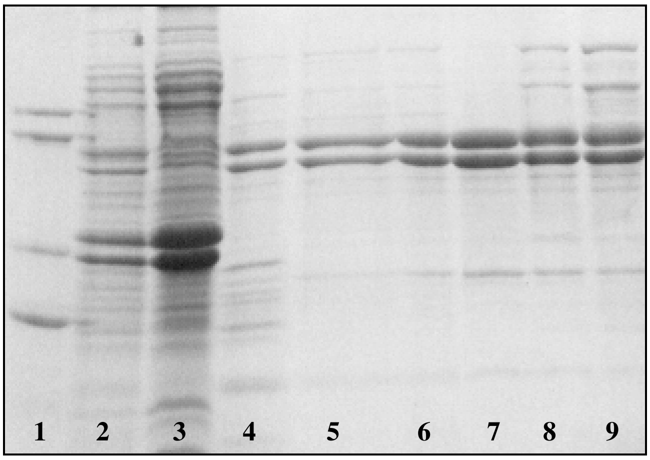


Abb. 3.3: 12%iges SDS-Gel einer typischen EF_1-Isolierung. Gel-Bahnen: #1: Marker - BSA (68 kDa), Pyruvat-Kinase (57), LDH (36), Chymotrypsinogen A (25), #2: F_0F_1-haltige *E. coli*-Membranen (Vesikel), #3: F_0-haltige *E. coli*-Membranen (Vesikel), #4: Überstand der Behandlung mit TES5-PAB, #5: Überstand der Mg^{2+}-Fällung, #6: Resuspension der PEG-Fällung vor Auftragung auf die DEAE-Ionenaustauscher-Säule, Eluat dieser Säule - #7: Fraktionen 21-26, #8: Fraktionen 27-31, #9: Fraktionen 32-35. (Die genauen Schritte der Isolierung sind in Kap. 5.2.3 näher beschrieben.)

3.1.3 Nucleotidbefreiung von $EF_{1\,SWM1}$

Die isolierte, native F_1-ATPase aus SWM1 wurde nach einer von Senior *et al.* (1992) modifizierten Vorschrift [Garrett & Penefsky, 1975] von intrinsischen Nucleotiden befreit. Bei einem Einsatz von 8 mg Protein wurden 4-5 mg nach der Gelfiltration zurückerhalten, wovon etwa 1-2 mg das für eine fast quantitative Nucleotidbefreiung charakteristische UV-

Absorptionsverhältnis A_{280}/A_{260} von mindestens 1,8 (bei MF_1: entsprechend 0,4±0,1 mol ANP pro mol Protein [Garrett & Penefsky, 1975]) erreichten. Die Bestimmung des Protein-Nucleotidgehalts mit Hilfe von HPLC (vgl. Kap. 5.5.3) ergab 0,2-0,3 mol ANP pro mol EF_1. Mit 16-20 U·mg^{-1} lag die spezifische Aktivität des nucleotidbefreiten Proteins im Bereich des Werts von nativer F_1-ATPase.

3.1.4 Untersuchungen

Die Bindung des Spiroketal-SL-Nucleotids (SL*-ATP) an native EF_1-ATPase mit verbleibenden intrinsischen Nucleotiden in den nichtkatalytischen Bindungsstellen [Weber *et al.*, 1995] und nucleotidbefreite EF_1-ATPase (EF_1[0,0]) wurde mit verschiedenen Titrationsexperimenten untersucht. Hierbei wurde die Konzentration des ungebundenem SL-Nucleotids über dessen Hochfeldsignal-Amplitude im ESR-Spektrum bestimmt und somit der Anteil von gebundenem SL*-ATP ermittelt. Als Standards dienten verschiedene Konzentrationen von 0-0,8 mM SL*-ATP.

In Anwesenheit von SL*-ATP mit 0,4 bzw. 2,5 mol Mg^{2+} pro mol Nucleotid (SL*-ATP · 0,4 Mg^{2+} bzw. SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+}) wurden bei nativer EF_1 (s. Abb. 3.4) maximal 1,8 bzw. 2,9 Bindungsstellen besetzt. Die Bestimmung der maximalen Bindungsstöchiometrien erfolgte mit einem hyperbolischem Kurvenfit. Die entsprechend ermittelten K_D-Werte der Substratbindung betrugen etwa 250 µM für SL*-ATP · 0,4 Mg^{2+} und etwa 90-100 µM für SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+}.

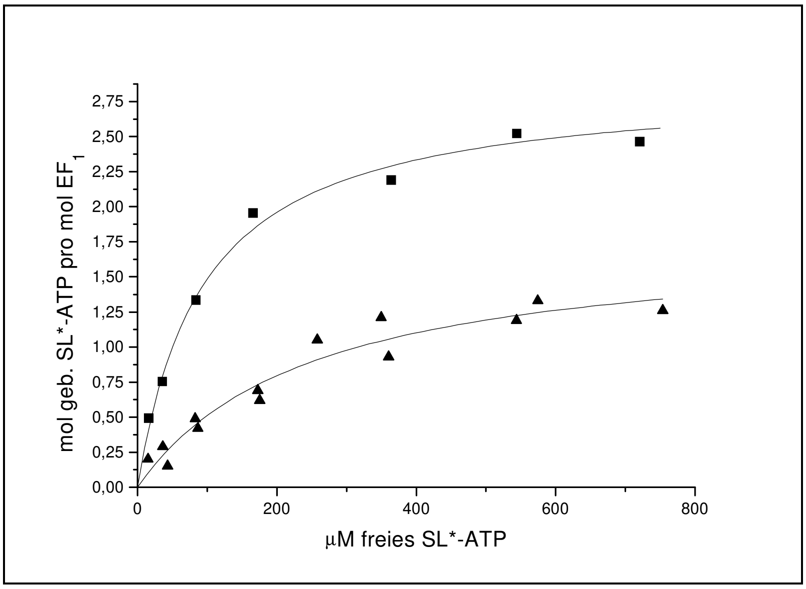


Abb. 3.4: Titration von nativer EF_1 (Ausgangskonzentration: 50 µM) mit SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+} (quadratische Meßpunkte) bzw. SL*-ATP · 0,4 Mg^{2+} (dreieckige Meßpunkte) und den jeweiligen hyperbolischen Kurvenfits.

Die Titration von EF_1[0,0] mit SL*-ATP in Gegenwart von 2,5 mol Mg^{2+} pro mol Nucleotid (s. Abb. 3.5) ergab eine per hyperbolischem Kurvenfit bestimmte maximale Bindungsstöchiometrie von 2,9 mol Nucleotiden pro mol Enzym. Der durch den Kurvenfit bestimmte K_D-Wert der Bindung von SL*-ATP an EF_1[0,0] betrug 60 µM.

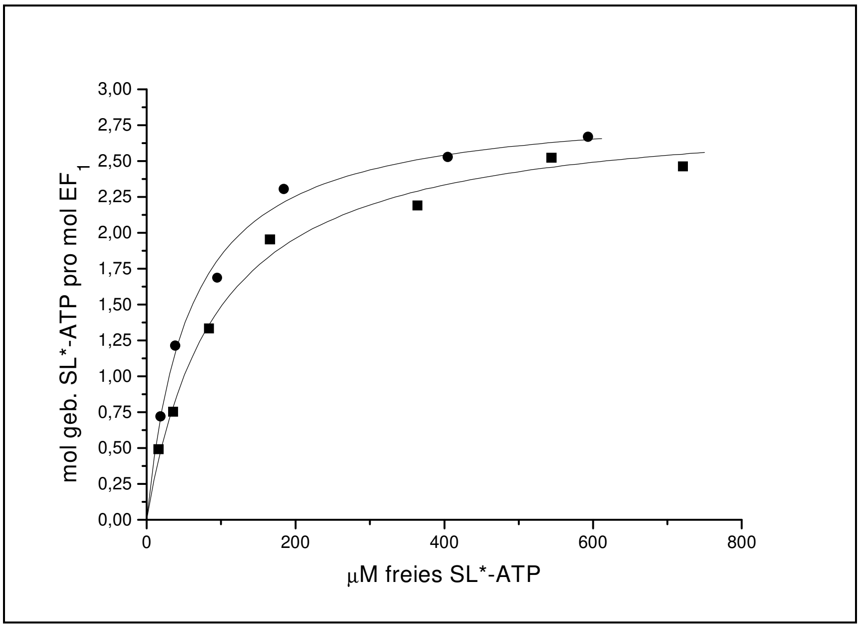


Abb. 3.5: Titration von anfangs 50 µM nativer EF_1 (quadratische Meßpunkte) bzw. anfangs 40 µM EF_1[0,0] (runde Meßpunkte) mit SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+} und den jeweiligen hyperbolischen Kurvenfits.

In Abb. 3.6 sind die Meßpunkte der Titration von nativer EF_1 mit SL*-ATP in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+} dargestellt. Der Kurvenfit erfolgte wie bei den vorangegangenen Titrationen mit einer hyperbolischen Funktion und lieferte einen Wert von 3,0 mol/mol für die maximale Bindungsstöchiometrie des Nucleotids und einen K_D-Wert von etwa 90 µM für die Substratbindung. Die Substratbindungskurve der Titration von EF_1[0,0] mit SL*-ATP in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+}, in der gleichen Abbildung dargestellt, wurde mit einem sigmoidalen Kurvenfit (Hill-Funktion) bestimmt, da ein hyperbolischer Kurvenfit nicht zufriedenstellend verlief. Der ermittelte K_D-Wert der Substratbindung an EF_1[0,0] lag bei 10-15 µM bei einem Hill-Exponenten von etwa 0,5. Für die maximale Bindungsstöchiometrie des Substratanalogons an EF_1[0,0] in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+} wurden entsprechend 3,2 mol/mol ermittelt.

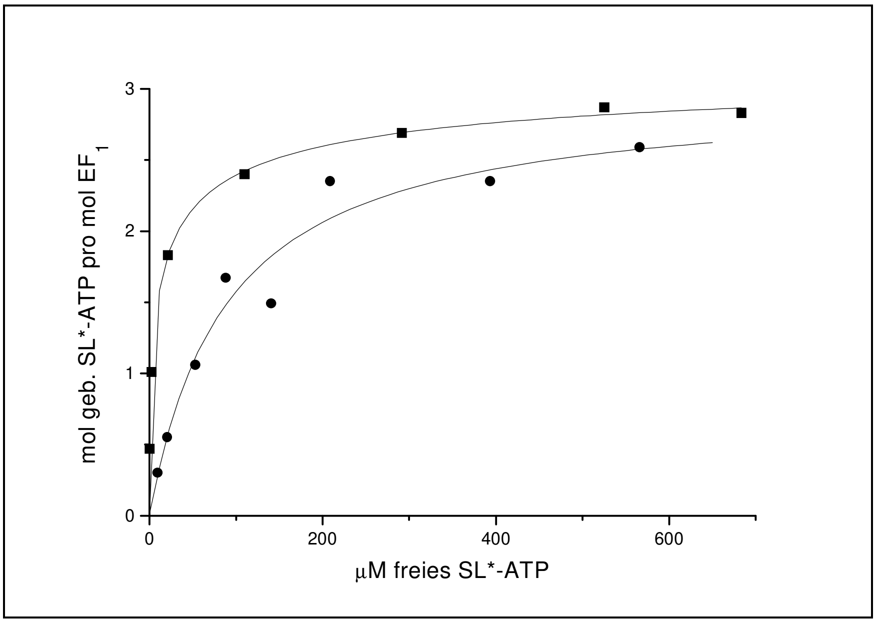


Abb. 3.6: Vergleich der Titrationen von anfangs 40 µM EF_1[0,0] (quadratische Meßpunkte) und nativer EF_1 (runde Meßpunkte) mit SL*-ATP bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 2,5 mM. Die jeweiligen Meßreihen sind mit den zugehörigen sigmoidalen (oben) und hyperbolischen Kurvenfits (unten) dargestellt

In Abb. 3.7 ist die Titration von EF_1[0,0] mit SL*-ATP bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 5,0 mM dargestellt. Die Substratbindungskurve wurde mit dem schon in der vorigen Titration angewandten sigmoidalen Kurvenfit ermittelt. Die durch den Fit erhaltenen Beträge der Parameter waren praktisch identisch zu den von der Titration von EF_1[0,0] mit SL*-ATP in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+} ermittelten Werten. Im einzelnen wurden 3,2 mol/mol für die maximale Bindungsstöchiometrie des Substrats, etwa 10 µM für den K_D-Wert der Substratbindung und etwa 0,4-0,5 für den Hill-Exponenten bestimmt.

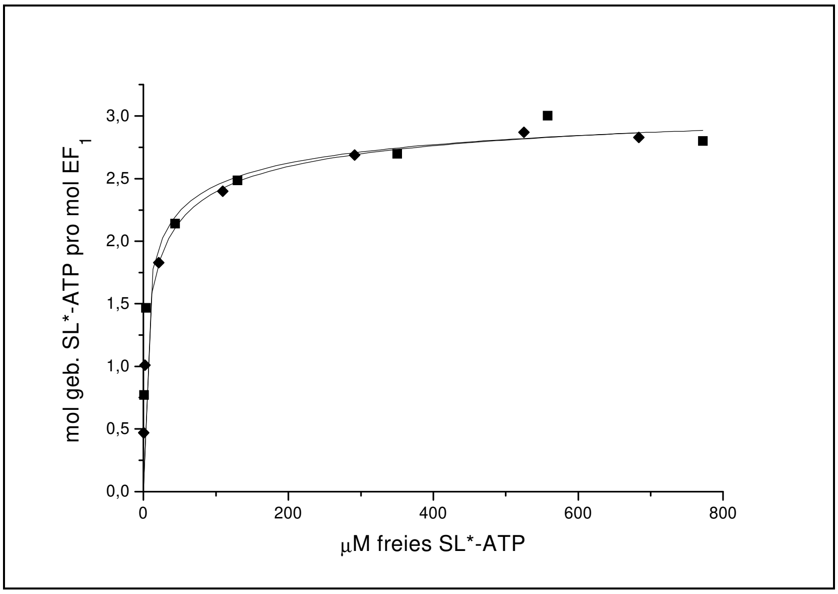


Abb. 3.7: Titration von anfangs 40 µM EF_1[0,0] mit SL*-ATP bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 2,5 (rautenförmige Meßpunkte) bzw. 5,0 mM (quadratische Meßpunkte) mit den jeweiligen sigmoidalen Kurvenfits.

Die Titrationsexperimente mit EF_1 und SL*-ATP zeigten, daß die Bindung des Nucleotids ans Enzym in starkem Maße von der Mg^{2+}-Konzentration abhängt. Die Titration von nativer EF_1 mit SL*-ATP in Gegenwart von 0,4 bzw. 2,5 mol Mg^{2+} pro mol Nucleotid (s. Abb. 3.4) ist ein eindrucksvolles Beispiel hierfür. Bei Mg^{2+}-Überschuß trat die Substratsättigung von EF_1 bei deutlich geringeren Substratkonzentrationen ein als bei substöchiometrischen Verhältnissen von Mg^{2+} und Nucleotid. Dies ist aus dem Vergleich der K_D-Werte aus den Kurvenfits der Titrationen von EF_1[0,0] mit SL*-ATP in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+} (s. Abb. 3.6) bzw. mit SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+} (s. Abb. 3.5) ersichtlich. Die Ergebnisse dieser Titrationen stützen die Vermutung, daß die Bildung des für die Bindung an EF_1 essentiellen Mg^{2+}-SL*-ATP-Komplexes nicht in dem Maße von statten geht wie vergleichsweise bei Mg^{2+} und normalem ATP. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Beim F_1-gebundenen MgANP-Komplex liegt der Adeninrest des Nucleotids in einer anti-Konformation relativ zur Ribosegruppe vor [Boos *et al.*, 1976; Sundaralingam, 1975]. Der Hydroxidrest an der 2'-Position der Ribosegruppe bildet bei dieser anti-Konformation eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoff in 3-Position des Adeninrests aus, welche die Konformation stabilisiert [Tso, 1974]. Beim SL*-ATP wird durch die Einführung der Spiroketal-SL-Gruppe die anti-Konformation des Adeninrests nicht durch Wasserstoffbrücken begünstigt und stabilisiert. Diese Konformation kann außerdem aus sterischen Gründen ungünstig sein. Ferner muß ins Auge gefaßt werden, daß die für die anti-Konformation erforderliche Ringstruktur der Ribosegruppe durch die Anwesenheit des Spiroketals gestört sein kann.

Offensichtlich spielt auch die Anwesenheit intrinsischer Nucleotide von EF_1 eine Rolle bei der Abhängigkeit der Substratsättigung des Enzyms von der Substratkonzentration. Die in Abb. 3.6 illustrierten Titrationen von nativer und nucleotidbefreiter EF_1 mit SL*-ATP, jeweils in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+}, sind im Vergleich miteinander ein Hinweis hierfür. Die Bindungskurven von EF_1[0,0] mit SL*-ATP scheinen auf eine positive Kooperativität der Nucleotidbindungsstellen bei dem nucleotidbefreiten Enzym hinzudeuten. Möglicherweise ist dieser Effekt die Folge der Glycerinbehandlung des Proteins bei der Nucleotidbefreiungsprozedur, denn die native EF_1 zeigt selbst bei Mg^{2+}-Überschuß kein solches Bindungsverhalten.

Die maximale Bindungsstöchiometrie war bei allen Titrationen nie höher als 3 mol SL*-ATP pro mol EF_1 und somit unabhängig von der Anwesenheit intrinsischer Nucleotide im Enzym. Dieses Resultat spricht für eine massive sterische Einschränkung bzw. eine geringe Substrataffinität einiger Nucleotidbindungsstellen auf EF_1 für das verwendete Substratanalogon. Im Vergleich zu SL*-ATP lag die maximale Bindungsstöchiometrie von SL-ATP · 0,4 Mg^{2+} bei etwa 2-3 mol/mol für die Bindung an native EF_1 und bei etwa 5-6 mol/mol für die Bindung an EF_1[0,0]

[Motz, 1995]. Die fast vollständige Besetzung der Nucleotidbindungsstellen von EF_1[0,0] mit SL-ATP spricht dafür, daß aufgrund der Flexibilität der Spinsonden in diesem ATP-Derivat eine Bindung in alle Nucleotidbindungsstellen des Enzyms ermöglicht wird. Aufgrund dieser Tatsache ist wohl anzunehmen, daß ein mangelndes Raumangebot bei manchen Typen von Bindungsstellen auf EF_1 eine Bindung von SL*-ATP verhindert.

Um die Ergebnisse aus den Titrationsexperimenten sichtbar zu machen, wurde SL*-ATP·Mg^{2+} in den Nucleotidbindungsstellen der von Abrahams *et al.* (1994) ermittelten Struktur von F_1-ATPase aus Rinderherz-Mitochondrien (MF_1) einmodelliert (s. Abb. 3.8a-e). Hierzu wurden die Nucleotide der Kristallstruktur durch SL*-ATP ersetzt und anschließend eine Energieminimisierung in einer Sphäre mit 5 Å Radius um das Substrat durchgeführt. Als Vergleichsmodell wurde das SL-ATP·Mg^{2+} im gleichen Proteinsystem und in der gleichen Art und Weise eingepaßt.
Die Modellierung von SL*-ATP·Mg^{2+} in die Nucleotidbindungsstellen von MF_1 führte zu dem Resultat, daß bei zwei der drei Bindungsstellen in α, nämlich α_E und α_{TP}, eine deutliche Verzerrung der Spinsonden-Piperidinringe auftrat. Besonders gut ist dies an den beiden verdreht zueinander stehenden Methylgruppenpaaren der beiden α-Kohlenstoffatome in direkter Nachbarschaft der Nitroxylgruppe zu erkennen. Das in die α_{DP}-Untereinheit modellierte SL*-ATP·Mg^{2+} zeigte keine wie oben beobachtete Verdrehung der Methylgruppen zueinander, wie in Abb. 3.8c zu sehen ist. Auch der Piperidinring der Spinsonde wurde offensichtlich nicht verzerrt und war in einer für das Ringsystem üblichen Wannenform vorzufinden.

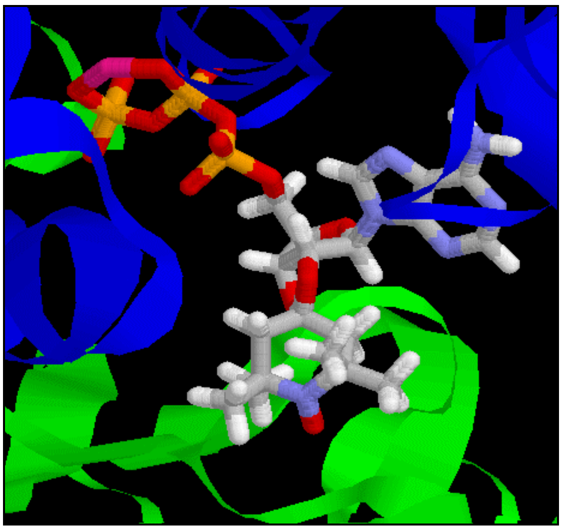


Abb. 3.8a: Modellierung von SL*-ATP·Mg^{2+} in der α_E-Untereinheit (blau) von MF_1, wie sie durch Röntgenstrukturuntersuchungen ermittelt wurde [Abrahams *et al.*, 1994]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde vom Protein nur das Peptidrückgrat als Bändermodell dargestellt.

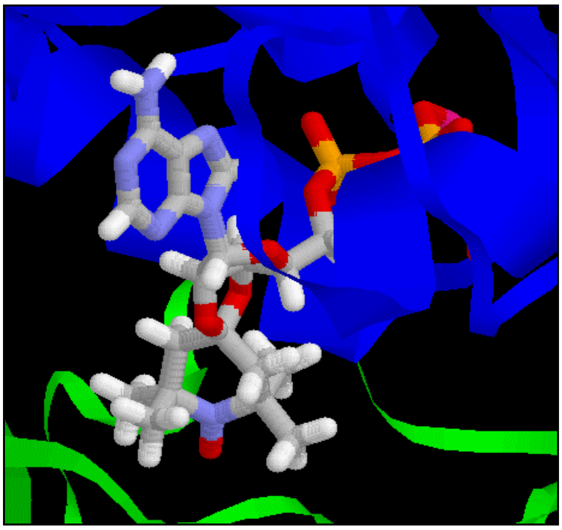


Abb. 3.8b: Modellierung von SL*-ATP·Mg^{2+} in der α_{TP}-Untereinheit (blau) von MF_1

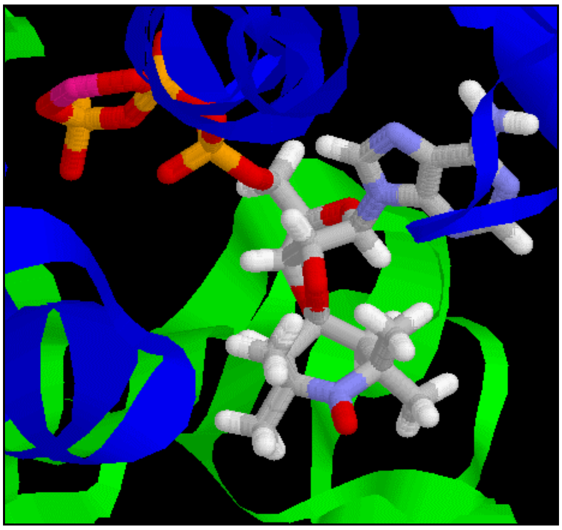


Abb. 3.8c: Modellierung von SL*-ATP·Mg^{2+} in der α_{DP}-Untereinheit (blau) von MF_1

Die Modellierung des Substratanalogons in den Nucleotidbindungsstellen der β-Untereinheiten ergab bei keiner Bindungsstelle eine erkennbare Verzerrung. Sowohl in der Bindungsstelle von β_{DP} als auch in der von β_{TP} war wie beim Nucleotid in α_{DP} (vgl. Abb. 3.8c) keine Torsion des Substrat-Piperidinrings oder Verdrehung der Methylgruppenpaare in der Nachbarschaft der Nitroxylgruppe zu erkennen. Die leere Nucleotidbindungsstelle in der von Abrahams *et al.* (1994) ermittelten Struktur (β_E) wurde nicht mit SL*-ATP·Mg^{2+} modelliert, da die hohe Bewegungsfreiheit des Nucleotids in dieser Bindungsstelle durch die Energieminimisierung des Modells zu einer relativ willkürlichen Positionierung im Strukturmodell geführt hätte.

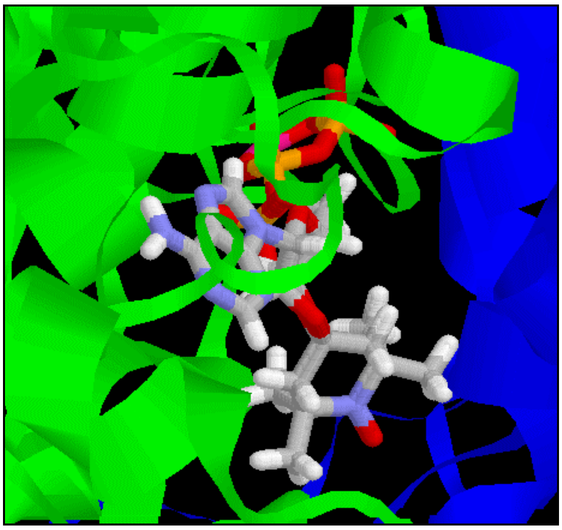


Abb. 3.8d: Modellierung von SL*-ATP·Mg^{2+} in der β_{DP}-Untereinheit (grün) von MF_1

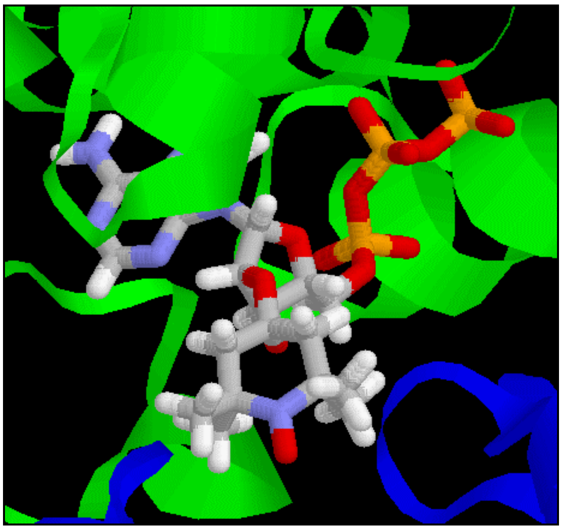
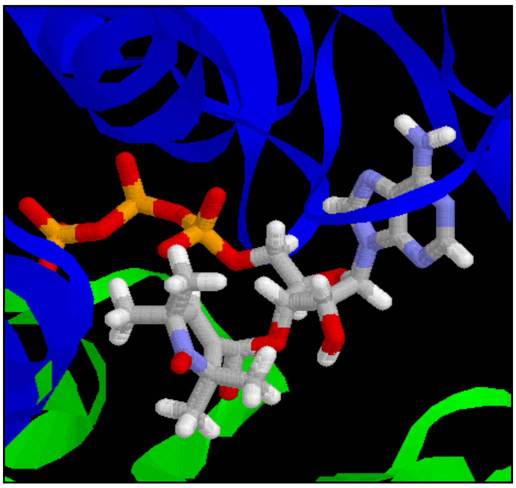


Abb. 3.8e: Modellierung von SL*-ATP·Mg^{2+} in der β_{TP}-Untereinheit (grün) von MF_1

Bei den entsprechend angefertigten Molekülmodellen von SL-ATP·Mg^{2+} in den Nucleotidbindungsstellen von MF_1 zeigte der Pyrrolinring des SL-Rests in keiner der energieminimisierten Modelle auch nur ansatzweise eine Verzerrung. Deutlich zu erkennen ist, daß sich die Spinsonden jeweils in die sterisch günstigste Konformation drehten.



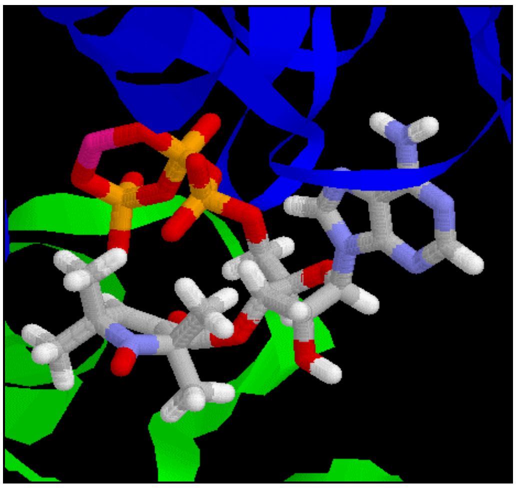


Abb. 3.9a und b: Modellierung von SL-ATP·Mg^{2+} in der α_E- und α_{TP}-Untereinheit (blau) von MF_1. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde vom Protein nur das Peptidrückgrat als Bändermodell dargestellt.

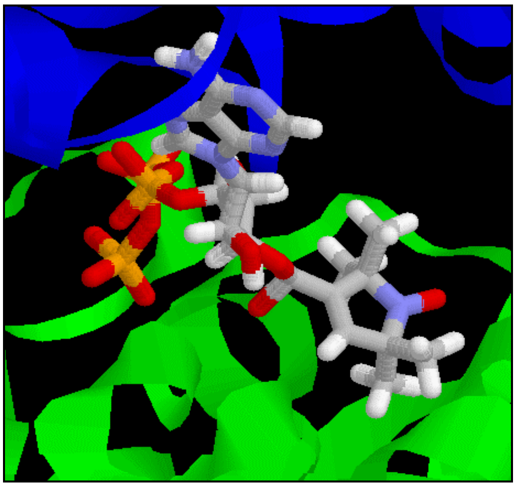


Abb. 3.9c: Modellierung von SL-ATP·Mg^{2+} in der α_{DP}-Untereinheit (blau) von MF_1

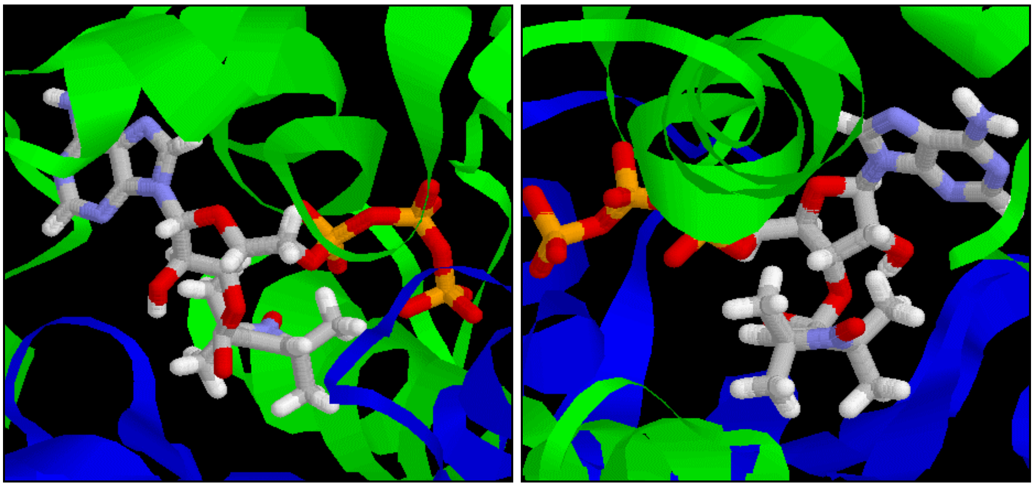


Abb. 3.9d und e: Modellierung von SL-ATP·Mg^{2+} in der β_{DP}- und β_{TP}-Untereinheit (grün) von MF_1

Die Ergebnisse der Molekülmodelle von SL*-ATP·Mg^{2+} in den Nucleotidbindungsstellen von MF_1 erklärten die Resultate der durchgeführten Titrationsexperimente mit EF_1 und SL*-ATP. Es zeigte sich, daß offensichtlich durch die Proteinumgebung erzeugte sterische Einschränkungen in manchen nichtkatalytischen Nucleotidbindungsstellen von MF_1 die Bindung von SL*-ATP nur unter starker Deformation der Nucleotide zulassen. Unter der Voraussetzung zweier sehr ähnlicher Strukturen der Nucleotidbindungsstellen von EF_1 und MF_1 würde das bedeuten, daß die Bindung von SL*-ATP in den nichtkatalytischen Bindungsstellen beider Enzyme sterisch verhindert würde.

Wie zu erwarten war, zeigten die Modellierungen von SL-ATP·Mg^{2+} in den Nucleotidbindungsstellen von MF_1, daß SL-ATP wesentlich flexibler auf die durch die Proteinumgebung verursachten sterischen Zwänge reagieren kann. Dieses Verhalten ist wohl der Möglichkeit einer freien Drehbarkeit der SL-Gruppe relativ zum Nucleotidrest zuzuschreiben. Somit erklärt sich auch die Besetzung fast aller Bindungsstellen von EF_1[0,0] mit SL-ATP [Motz, 1995].

Den Molekülmodellen nach zu urteilen, ist also das mangelnde Raumangebot der nichtkatalytischen Bindungsstellen bzw. die fehlende Flexibilität des SL-Rests von SL*-ATP für die unvollständige Substratsättigung von EF_1 mit dem Spiroketal-SL-Nucleotid verantwortlich.

Zur Untersuchung des ATP-Hydrolyseverhaltens von EF_1 mit SL*-ATP als Substrat und der Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von der Mg^{2+}-Konzentration wurden Aktivitäts-Assay-Experimente mit 1,0 mM Nucleotid in Gegenwart von 0, 0,4, 1,0, 2,5, 5,0 und 10,0 mM Mg^{2+} durchgeführt. Als Referenz-Substrat wurde 1,0 mM ATP mit 0,4 mM Mg^{2+} verwendet. Das Verhältnis der spezifischen Aktivität von EF_1 mit SL*-ATP als Substrat zur spezifischen Aktivität von EF_1 mit ATP als Substrat entspricht der relativen spezifischen Aktivität von EF_1 mit dem SL-Substrat.

Es zeigte sich, daß das Aktivitätsmaximum von EF_1 mit SL*-ATP als Substrat bei Mg^{2+}-Konzentrationen von etwa 4-5 mM lag. Mit ungefähr 0,6% der spezifischen Aktivität von EF_1 mit ATP · 0,4 Mg^{2+} als Substrat war die maximale spezifische Aktivität von EF_1 mit SL*-ATP · x Mg^{2+} etwa um den Faktor 10 kleiner als die entsprechende Hydrolyseaktivität mit SL-ATP · 0,4 Mg^{2+} als Substrat. Diese liegt bei ca. 6% der spezifischen Aktivität von EF_1 mit ATP · 0,4 Mg^{2+} als Substrat (persönliche Mitteilung von C. Motz).

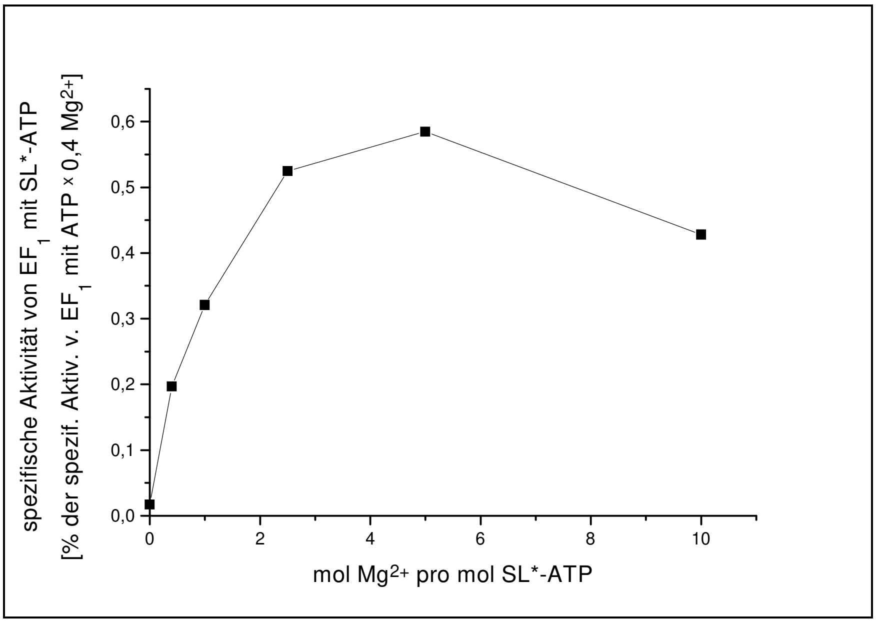


Abb. 3.10: Mg^{2+}-Abhängigkeit der relativen spezifischen Hydrolyseaktivität von EF_1 mit SL*-ATP als Substrat anstelle von ATP. Die Konzentration der Nucleotide betrug je 1,0 mM; beim ATP als Substrat betrug die Mg^{2+}-Konzentration 0,4 mM.

Die Hydrolyseaktivität von EF_1 mit SL*-ATP als Substrat liegt etwa in der Größenordnung der Bisite-Katalyseaktivität von EF_1 mit ATP als Substrat (ca. 2% der spezifischen ATPase-Aktivität; vgl. Weber & Senior, 1997). Die sehr geringe Hydrolysetätigkeit des Proteins könnte das Resultat der in den Bindungsstudien beobachteten, sehr mäßigen Bindungstendenz des Spiroketal-SL-ATP sein. Unter den Bedingungen der Aktivitätstests, d.h. bei Nucleotidkonzentrationen von 1 mM, werden trotzdem nahezu alle drei katalytische Bindungsstellen mit SL*-ATP besetzt, wie desweiteren aus den Bindungsstudien hervorgeht. In diesem Fall ist eine Bisite-Katalyse von EF_1 auszuschließen.

Der inhibierende Einfluß von Mg^{2+} in hoher Konzentration auf die ATPase-Aktivität von EF_1 kann ein weiterer Grund für die geringe spezifische Aktivität des Enzyms mit SL*-ATP als Substrat sein. Die Titrationsexperimente von EF_1 mit SL*-ATP haben jedoch ergeben, daß das Spiroketal-SL-Nucleotid andererseits diese hohen Mg^{2+}-Konzentrationen benötigt, um mit maximaler Stöchiometrie in die Katalysezentren von EF_1 zu binden. In diesem Fall ist eine maximale Bindungsstöchiometrie die Voraussetzung für eine maximale Katalyseaktivität des Enzyms [Weber & Senior, 1997]. Somit könnten sich hier die Inhibierung und die Verstärkung der ATPase-Aktivität des Enzyms durch Mg^{2+} die Waage halten.

Zusätzlich zu den Titrationsexperimenten mit EF_1 und SL*-ATP wurden ESR-Spektren bei den verschiedenen Enzym-Substrat-Verhältnissen aufgenommen. Mit diesen Spektren sollten die Mobilitäts- und Umgebungsverhältnisse der Spinsonden am proteingebundenen Nucleotid untersucht werden. Alle ESR-Spektren der Titration von nativer EF_1 mit SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+}

zeigten nur ein Teilspektrum einer Spinsonden-Population von enzymgebundenem SL*-ATP. Der $2A_{zz}$'-Wert dieses Spektrums (Signalabstand 1-1' in Abb. 3.11) liegt bei etwa 57-58 G.

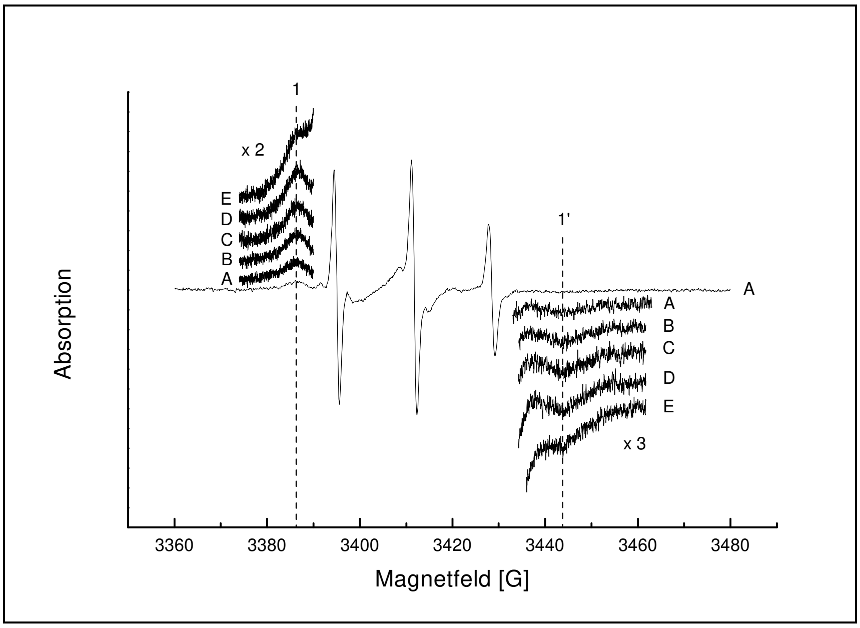


Abb. 3.11: Titration von nativer EF_1 mit SL*-ATP · 2,5 Mg^{2+}. Spektrum A: 50 µM EF_1, 24 µM Nucleotid; B: 49 µM EF_1, 48 µM Nucleotid; C: 48 µM EF_1, 106 µM Nucleotid; D: 47 µM EF_1, 196 µM Nucleotid; E: 45 µM EF_1, 408 µM Nucleotid.

Die entsprechenden Werte für SL-ATP · 0,4 Mg^{2+} liegen wie einleitend erwähnt bei 66 und 51 G, d.h. mit jeweils etwa 6-8 G Unterschied vom hier ermittelten $2A_{zz}$'-Wert. Diese deutliche Differenz legt die Vermutung nahe, daß die Spiroketal-Spinsonden von enzymgebundenem SL*-ATP mehr Bewegungsfreiheit besitzen als die potentiell flexibleren Spinsonden von enzymgebundenem SL-ATP. Letztere scheinen sich der Proteinumgebung besser anzupassen und somit eine stärkere Immobilisierung zu erfahren. Bemerkenswert sind außerdem die im Vergleich zu SL-ATP recht großen Linienbreiten der Tief- und Hochfeldsignale (1/1') in den Spektren von SL*-ATP, welche möglicherweise für eine hydrophobere Umgebung der Spinsonden und daraus resultierenden Veränderungen in den Relaxationsbedingungen der Spinsysteme sprechen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Überlagerung mehrerer unterschiedlicher Teilspektren, welche durch mehrere verschiedene Zustände der Spinsonden hervorgerufen werden.

Die ESR-Spektren von EF_1[0,0] mit SL*-ATP in Gegenwart von 5,0 mM Mg^{2+} offenbarten für die enzymgebundenen Nucleotide bei substöchiometrischen Nucleotidkonzentrationen Teilspektren zweier unterschiedlich mobiler Spinsonden-Populationen (s. Abb. 3.12). Die genaue Bestimmung der Lage von den Hoch- und Tieffeldsignalen dieser Spektren war aufgrund deren starker Überlagerung nur mit einer Gaußkurvengruppen-Analyse möglich (s. Abb. 3.13a und b). Diese lieferte $2A_{zz}$'-Werte von etwa 52 G für die mobilere Spezies der Spinsonden (Abstand der

Signale 2 und 2’ in Abb. 3.12) und etwa 59-60 G für eine stärker immobilisierte Population von SL-Gruppen (Abstand der Signale 1 und 1’ in Abb. 3.12).

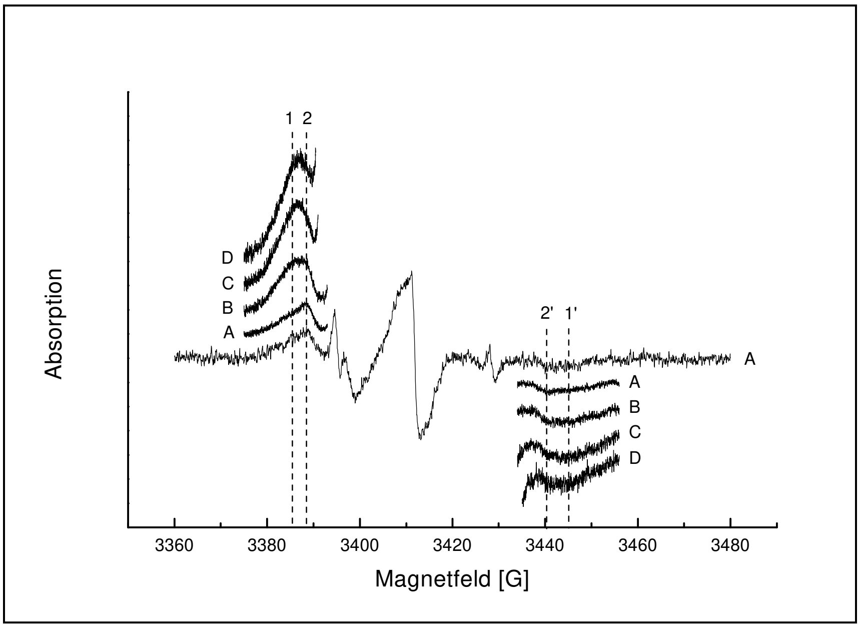


Abb. 3.12: Titration von $EF_1[0,0]$ mit SL*-ATP bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 5,0 mM. Spektrum A: 40 µM EF_1, 29 µM Nucleotid; B: 39 µM EF_1, 56 µM Nucleotid; C: 39 µM EF_1, 123 µM Nucleotid; D: 38 µM EF_1, 229 µM Nucleotid.

Wie schon bei den Spektren von nativer EF_1 mit SL*-ATP ist die große Linienbreite der Hoch- und Tieffeldsignale des Teilspektrums der immobileren Spinsonden-Komponente (Signale 1 und 1’ in Abb. 3.12) auffällig. Die Ursache für dieses Erscheinungsbild der Signale ist allem Anschein nach dieselbe wie im vorherigen Fall, d.h. Mobilitätseffekte und möglicherweise eine hydrophobere Umgebung der Spinsonden.

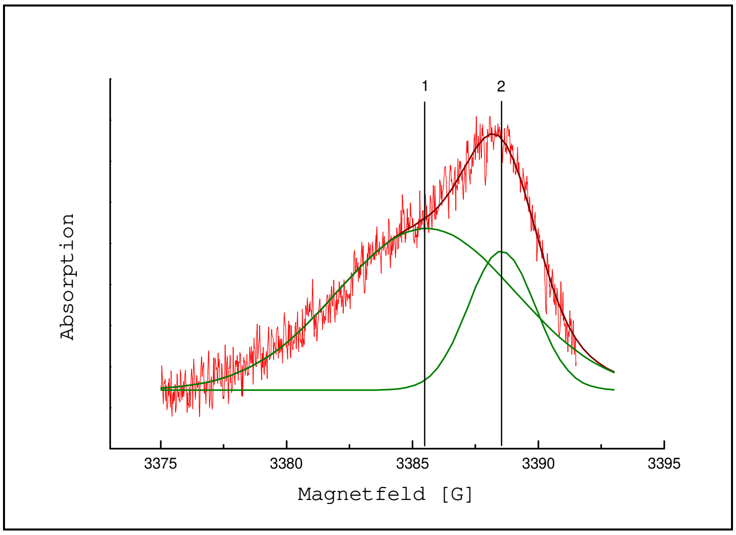


Abb. 3.13a: Analyse des Tieffeld-signals aus Spektrum A in Abb. 3.12 mit Gaußkurvengruppen-Analyse

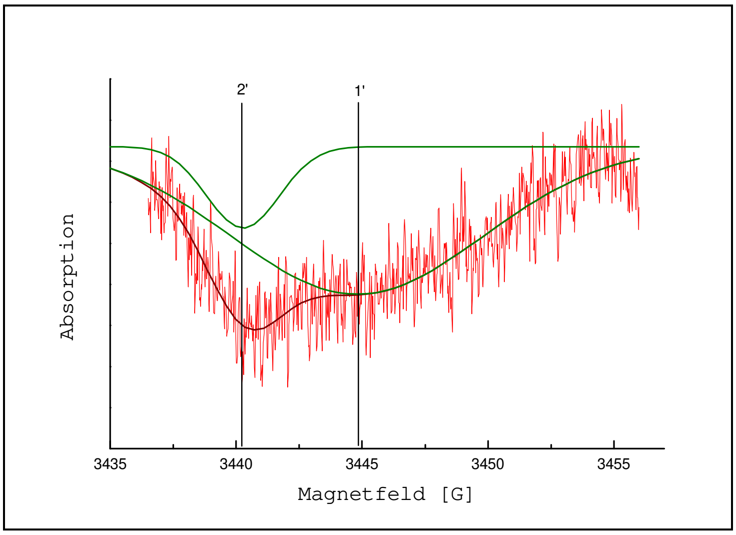


Abb. 3.13b: Analyse des Hochfeldsignals aus Spektrum A in Abb. 3.12 mit Gaußkurvengruppen-Analyse

Der $2A_{zz}$'-Wert der mobileren Spinlabel-Population von gebundenem SL*-ATP (Abstand 2-2' in Abb. 3.12) liegt mit 52 G im Bereich der Meßwerte von SL-ATP und dessen 2-Azido-Derivats [vgl. Motz, 1995]. Allem Anschein nach herrschen in diesem Fall ähnliche Mobilitätsverhältnisse für die verschiedenen SL-Reste. Der $2A_{zz}$'-Wert der mobileren Spinlabel-Population von gebundenem SL*-ATP könnte jedoch aufgrund einer hydrophoberen Umgebung der Spinsonden geringer ausfallen, so daß er über die wahren Mobilitätsverhältnisse hinwegtäuscht. Die Mobilität der Spinsonden wäre in diesem Fall geringer als angenommen. Allerdings sprechen die nicht sehr großen Linienbreiten des Tief- und Hochfeldsignals dieser Spinsonden-Population (berechnete Banden 2 und 2' in Abb. 3.13a und b) eher gegen dieses Argument. Die Beweglichkeit der Spinsonden in SL*-ATP könnte durch die von Alessi *et al.* (1992) NMR-spektroskopisch entdeckte bogenförmige Bewegung der SL-Gruppe relativ zur Ribosegruppe zustande kommen. Diese Bewegung verursacht laut den spektroskopischen Ergebnissen eine schnelle Interkonversion zweier Konformationen von SL*-ATP.

Der $2A_{zz}$'-Wert der immobileren Komponente von EF_1-gebundenem SL*-ATP ist mit 59-60 G (Abstand 1-1' in Abb. 3.12) um etwa 6-7 G geringer als der entsprechende Wert von SL-ATP oder 2-N_3-SL-ATP (66 G, vgl. Motz, 1995 und Lösel *et al.*, 1997). Dieser $2A_{zz}$'-Wert von SL*-ATP ist ungewöhnlich gering für die am stärksten immobilisierte Spinsonden-Spezies. Aufgrund der potentiell fehlenden Rotationsfähigkeit bzw. stärkeren Immobilisierung der Spiroketal-Spinlabel im Vergleich zur Spinsonde von SL-ATP wären zumindest ähnlich große $2A_{zz}$'-Werte für das Signalpaar 1/1' in Abb. 3.12 wie bei SL-ATP zu erwarten gewesen. Zusammen mit den hohen Linienbreiten der Signale 1 und 1' ist der $2A_{zz}$'-Wert von knapp 60 G für SL*-ATP unter diesen Umständen ein deutlicher Hinweis auf folgende Gegebenheiten: Zum einen, wie bereits angesprochen, eine höhere Beweglichkeit der Spinsonden von gebundenem SL*-ATP im Vergleich zu gebundenem SL-ATP; zum anderen die Abnahme der Dielektrizität bzw. Zunahme der Hydrophobie in der unmittelbaren molekularen Umgebung der Spinsonden. Letztere kann darauf zurückzuführen sein, daß die Nitroxylgruppen der Spinlabel in eine relativ hydrophobe Region des Proteins ragen.

Die durchgeführten Gaußkurvengruppen-Analysen des Tief- und Hochfeldbereichs vom Spektrum von EF_1[0,0] mit SL*-ATP (Spektrum A in Abb. 3.12) ergaben desweiteren, daß der Hauptanteil der Gesamtsignale von den jeweiligen Banden der immobilisierteren Spezies gebildet wurde. Dies ist an den einzelnen berechneten Signalen in Abb. 3.13a und b zu sehen. Im Verlauf der Titration zeigte sich, daß der Anteil der mobileren Spinsonden-Spezies von enzymgebundenem Nucleotid im Gesamtspektrum im Verhältnis zum Anteil der immobileren Spezies offensichtlich zurückging (s. Spektren A-D in Abb. 3.12).

Die gemessenen ESR-Spektren sind ein Hinweis dafür, daß die Anwesenheit intrinsischer Nucleotide in EF_1 offenbar einen Einfluß auf die Dynamik eines Teils der Spinsonden von SL*-ATP in den katalytischen Bindungsstellen hat. Erst bei Abwesenheit der intrinsischen Nucleotide tritt das Spektrum einer mobileren Spezies von enzymgebundenem SL*-ATP in Erscheinung. Es darf allerdings nicht außer acht gelassen werden, daß die Behandlung von EF_1 während der Nucleotidbefreiungsprozedur Auswirkungen auf deren Struktur hat. Dies könnte Veränderungen in den ESR-Spektren von nucleotidbefreiter EF_1 mit SL*-ATP verursachen.

Es kann zusammengefaßt werden, daß SL*-ATP als ESR-aktives Substratanalogon für ATP nur in maximal drei der sechs Nucleotidbindungsstellen von EF_1 bindet, und dies sind sowohl bei nativer als auch bei nucleotidbefreiter EF_1 offensichtlich die katalytischen Bindungsstellen auf den β-Untereinheiten des Enzyms. Molekülmodelle von SL*-ATP in den Nucleotidbindungsstellen der Kristallstruktur von MF_1 ergaben Verzerrungen der Spiroketal-SL-Gruppen in zwei der drei α-Untereinheiten, was die Ergebnisse der Bindungsexperimente bezüglich der maximalen Bindungsstöchiometrie unterstützt und teilweise erklärt. Die Substratsättigung von EF_1 wird bei Mg^{2+}-Überschuß und nucleotidbefreitem Protein schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen von SL*-ATP erreicht. Die relative spezifische ATPase-Aktivität von EF_1 mit SL*-ATP als Substrat ist ebenfalls bei Mg^{2+}-Überschuß maximal und liegt im Bereich der Hydrolyseaktivitäten, wie sie durch 'Bisite'-Katalyse erzielt werden. Die ESR-Spektren des EF_1-SL*-ATP-Komplexes zeigten bei nativem Enzym mit intrinsischen Nucleotiden nur eine Mobilität der Spinsonden von gebundenem SL*-ATP, während beim nucleotidbefreiten Enzym zwei Spinsonden-Spezies unterschiedlicher Mobilität und Umgebung in Erscheinung traten.

3.2 Strukturuntersuchungen an der b-Untereinheit von EF_0 und dem b-EF_1-Komplex

Die Tatsache, daß es sich bei der F_0F_1-ATP-Synthase um ein Protein handelt, dessen Funktion auf einer Rotationsbewegung basiert, wurde durch eine Vielzahl von Experimenten mit dem isolierten F_1-Teil des Enzyms aufgeklärt [Duncan *et al.*, 1995; Sabbert *et al.*, 1996 & 1997; Noji *et al.*, 1997]. Durch diese Untersuchungen konnte zum Teil auch geklärt werden, welche Untereinheiten von F_1 die Aufgabe des Stator- und Rotor-Elements innehaben. Bezüglich des F_0-Teils der ATP-Synthase stellen solcherlei Experimente immer noch eine Herausforderung an die Forschung dar. So existieren zur Zeit aufgrund fehlender Details über Struktur, Funktion und Zusammensetzung der Proteinuntereinheiten von F_0 nur Hypothesen über dessen Stator-Rotor-Zusammensetzung [Junge *et al.*, 1997; Dimroth *et al.*, 1998], die sich in den letzten Jahren konkretisiert haben. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung geht man davon aus, daß der Stator-Teil aus den Untereinheiten a und b von F_0 und α, β und δ von F_1 gebildet wird, während der Rotor-Teil des Enzyms aus den Untereinheiten c von F_0 und γ und ε von F_1 zusammengesetzt ist [Engelbrecht & Junge, 1997; Junge *et al.*, 1997].

Über die b-Untereinheit ist bisher in Erfahrung gebracht worden, daß sie neben γ eine zweite Verbindung von F_0 und F_1 darstellt, welche die designierten Statorelemente dieser funktionalen Proteinkomplexe verbindet [Wilkens & Capaldi, 1998a, Rodgers & Capaldi, 1998]. Von der konkreten Tertiärstruktur dieser länglichen, größtenteils alphahelikalen Untereinheit [Dunn, 1992], welche in der ATP-Synthase als Dimer vorliegt [Sorgen *et al.*, 1998a], ist bislang wenig bekannt, genauso wenig weiß man über ihre genaue Funktionsweise als Bindeglied in der F_0F_1-ATP-Synthase.

Der per Mutagenese vom membranintegralen Aminoterminus abgetrennte Teil der b-Untereinheit von EF_0, bezeichnet als b_{sol}, sowie einige Cystein-Mutanten von b_{sol} (b_{syn}, vgl. McLachlin & Dunn, 1997) wurden bereits in unserem Arbeitskreis untersucht, um einen ersten Einblick von der Struktur und der Funktion des Proteins zu erhalten [Kersten, 1999]. Als Meßtechnik wurde hierbei die ESR-Spektroskopie angewendet. Die b-Untereinheiten wurden jeweils als ortsspezifisch (an der Cystein-Seitenkette) spinmarkiertes Protein (b_{syn}·IAAT) alleine und im Komplex mit EF_1 vermessen. Die durchgeführten Experimente zeigten, daß beim Komplex von b-Dimeren mit EF_1 im Bereich der Aminosäurenpositionen 125, 130 und 155 von b_{syn} eine verstärkte Immobilisierung der Spinsonden auftritt, was durch eine Wechselwirkung von b mit EF_1 zu erklären ist [Kersten, 1999]. Andere Untersuchungen haben ergeben, daß die gegen Cystein ausgetauschten Aminosäuren 124, 128, 132 und 139 von b_{sol} unter Einfluß eines

geeigneten Oxidationsmittels (Cu^{2+}) eine spontane Tendenz zur Disulfid-Verknüpfung zeigen [McLachlin & Dunn, 1997]. Die Untersuchungen deuten darauf hin, daß diese Aminosäuren im b-Dimer-Komplex sehr nahe beieinander stehen und der Bereich der Aminosäuren 124-139 zur Dimerisierung von b beitragen kann. Allerdings schmälern die teilweise sehr geringen Ausbeuten an den querverknüpften b-Untereinheiten die Aussagekraft dieses Experiments. Die Abstände der Aminosäuren 124, 128, 132 und 139 in der Sequenz (4 bzw. 7 Aminosäuren) stützen die Annahme, daß die Struktur der b-Untereinheit in diesem Bereich einen alphahelikalen Charakter hat (3,6 Aminosäuren pro Helixumlauf).
Um dies näher zu erforschen und ein deutlicheres Bild von der Struktur der b-Untereinheit zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Mutanten von b_{sol}, die einzelne Cysteine im carboxyterminalen Bereich enthalten, mit Spin-Labeling und verschiedenen ESR-spektroskopischen Meßtechniken genauer untersucht. Die Cysteine in b_{sol} waren im einzelnen in den Positionen 84, 109, 124, 125, 128, 130, 132, 138, 139, 146, 150, 151, 155 und 158 vorzufinden.

3.2.1 Transformation der b_{syn}-Plasmide in JM109

Fünf Plasmide mit eingebautem Ampicillin-Resistenzgen, im einzelnen pAC1, pDM31, pDM22, pDM38 und pDM13, welche für die b_{syn}-Mutanten b_{109C}, b_{124C}, b_{128C}, b_{132C} und b_{139C} kodierende Gene tragen (persönliche Mitteilung von Prof. S. D. Dunn), wurden nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) transformiert. Die transformationskompetenten Zellen des *E. coli*-Stamms JM109 wurden freundlicherweise von K. Fromknecht im Arbeitskreis zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Isolierung von b_{syn} aus JM109

Die Isolierung der wasserlöslichen Cysteinmutanten von b aus JM109 wurde nach der Vorschrift von McLachlin & Dunn (1997), welche auf einer früheren Vorschrift [Dunn, 1992] basiert, durchgeführt. Aus 2 l Wachstumsmedium wurden mit Schüttler-Aufzucht 8-10 g Zellen erhalten, deren Weiterverarbeitung erbrachte 10-15 mg Protein.

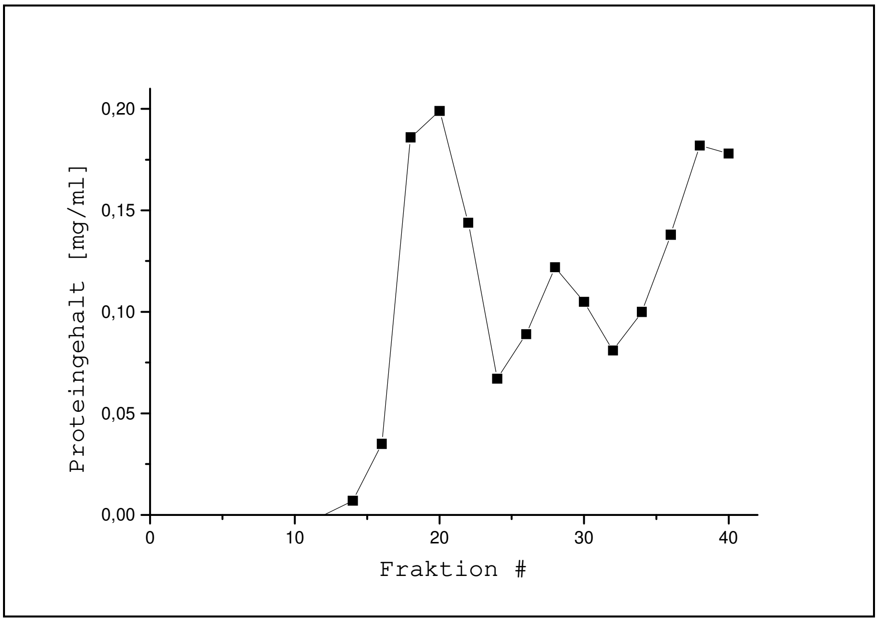


Abb. 3.14: Typisches Elutionsdiagramm von b_{syn}-Mutanten auf einer DEAE-Ionenaustauscher-Säule. Die b-Proteinuntereinheiten eluierten etwa bei knapp der Hälfte des 0-250 mM NaCl-Gradienten, dies entspricht dem ersten Peak im Diagramm (hier etwa bei Fraktion 20)

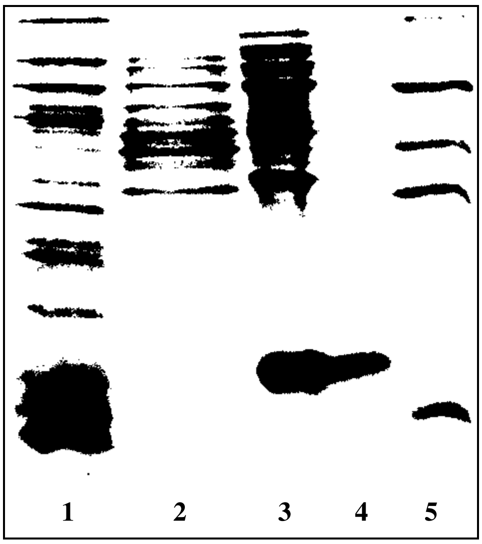


Abb. 3.15: 15%iges SDS-Gel der b_{syn}-Isolierung. Gel-Bahnen: #1: Pellet der Ultrazentrifugation (Membranfragmente), #2: Überstand der Ammoniumsulfat-Fällung, #3: Resuspension der Ammoniumsulfat-Fällung, #4: b_{syn}-Fraktionen nach Aufreinigung mit Ionenaustauscher-Chromatographie, #5: Marker - BSA (68 kDa), Ovalbumin (45), LDH (36), Cytochrom c (12,5). (Die genauen Schritte der Isolierung sind in Kap. 5.2.5 näher beschrieben.)

3.2.3 Chemische Modifizierung von b_{syn}

Von den isolierten b-Cysteinmutanten wurden 2-3 mg für die chemische Modifizierung mit 4-(2-Iodo-acetamido)-1-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (IAAT-SL-Reagens) eingesetzt. Nach der Umpufferung in HMK-Puffer (s. Kap. 5.3.2) und vor der Reaktion wurde die Anzahl der freien Thiolgruppen des Proteins zu 0,95±0,05 ermittelt. Nach der Reaktion, der Abtrennung des Reagens und der Aufkonzentrierung des Proteins wurden 1-1,5 mg modifiziertes Protein erhalten, dessen Anzahl freier Thiolgruppen auf 0,08±0,03 mol pro mol Protein bestimmt wurde.

3.2.4 Untersuchungen

Mit der ESR-spektroskopischen Untersuchung der an den Aminosäurenpositionen 109, 124, 128, 132 und 139 spinmarkierten Cysteinmutanten von b_{sol} bei Raumtemperatur stellte sich heraus, daß b_{109C} als einzige der fünf vermessenen Mutanten sowohl alleine als auch im Komplex mit EF_1 eine stark immobilisierte Spinsonden-Population besitzt (s. Abb. 3.16 und 3.17). Der $2A_{zz}$'-Wert des betreffenden Spektrums liegt bei etwa 62 G. Das ist deutlich mehr als der höchste Wert anderer bisher untersuchten spinmarkierten Cysteinmutanten von b_{sol}, welcher bei etwa 57 G liegt [Kersten, 1999]. Im EF_1-b-Komplex nimmt der Anteil dieses 62 G- Spektrums im Gesamtspektrum ab, was für eine zunehmende Mobilisierung der Spinlabel spricht. Nur eine weitere der fünf Mutanten, nämlich b_{139C}, weist ein klar erkennbares immobilisiertes Spektrum auf. Allerdings tritt dieses nur beim b-F_1-Komplex in Erscheinung, was auf die Immobilisierung eines Teils der Spinsonden von b_{139C}·IAAT bei der Bindung an EF_1 schließen läßt. Der $2A_{zz}$'-Wert liegt hier bei ca. 50 G. Dieses Ergebnis spricht für eine verstärkte Wechselwirkung von b und EF_1 in diesem Bereich. Für die Spektren der mobileren Spinsonden-Spezies wurden die $2A_{zz}$'- (bzw. 2A-) Werte einheitlich zu 34 G ermittelt.

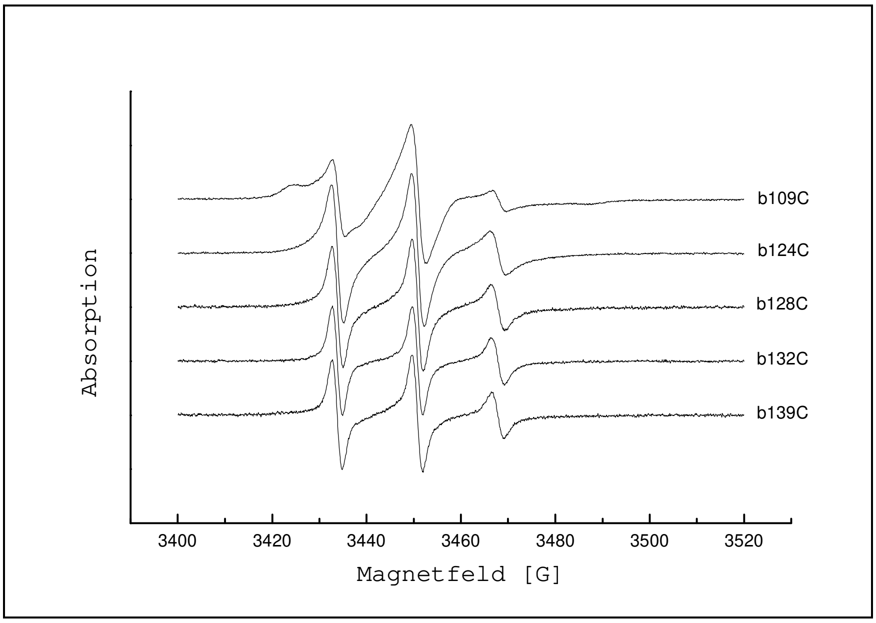


Abb. 3.16: ESR-Spektren von je 40 µM $(b_{syn} \cdot IAAT)_2$ bei Raumtemperatur

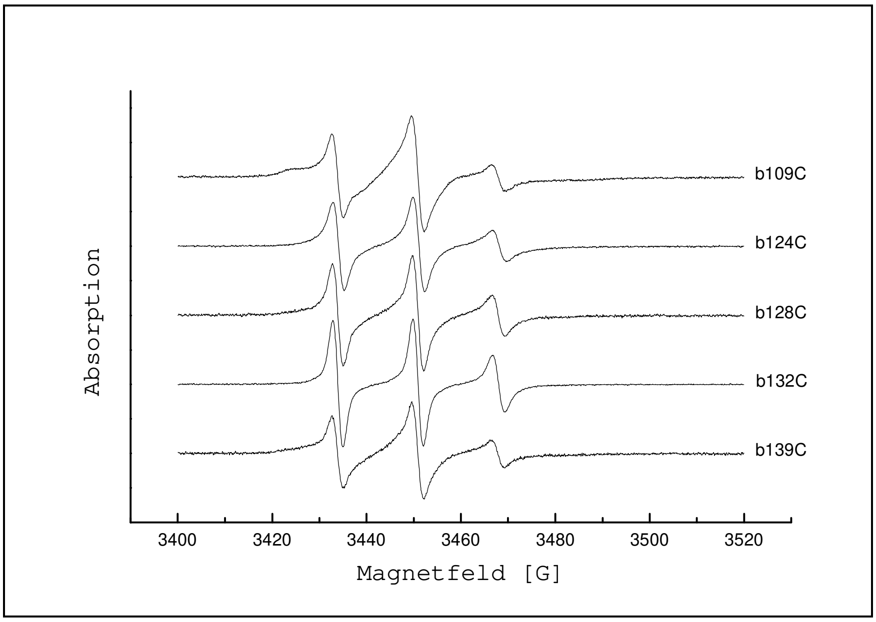


Abb. 3.17: ESR-Spektren von je 35 µM EF_1 in Gegenwart von je 35 µM $(b_{syn} \cdot IAAT)_2$ bei Raumtemperatur.

Die mit der empirischen Formel aus Gleichung 3.1 [Xü *et al.*, 1983] bestimmten Rotationskorrelationszeiten (τ_R) der mobileren Spinsonden liegen allesamt in der Größenordnung von Nanosekunden (s. Tab. 3.1). Beim Vergleich dieser Werte mit den Werten der mobileren Spinsonden anderer spinmarkierter Cysteinmutanten von b_{sol} [Kersten, 1999] sind die für die hier untersuchten $b_{syn} \cdot IAAT$ mit 0,8-1,5 ns leicht erhöht, aber trotzdem in der gleichen Größenordnung. Insgesamt nicht sehr unterschiedlich sind die Verhältnisse bei $b_{syn} \cdot IAAT$ im Komplex mit EF_1. Dort sind die Rotationskorrelationszeiten der mobileren Spinlabel, mit 0,6-1,2 ns wieder in der gleichen Größenordnung, eher im unteren Bereich des Wertespektrums angesiedelt (s. Tab. 3.2).

$$\tau_R = 6{,}5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 \cdot \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right) \qquad (3.1)$$

ΔB_0 Linienbreite des ESR-Signals

h_0 Amplitude des Zentralfeld-ESR-Signals

h_{-1} Amplitude des Hochfeld-ESR-Signals

b_{syn}·IAAT	$2A_{(zz)}$ [G]	τ_R [ns]
b_{109C}·IAAT	34,0 / 62,0	1,01
b_{124C}·IAAT	34,0	1,53
b_{128C}·IAAT	34,0	1,11
b_{132C}·IAAT	34,0	0,82
b_{139C}·IAAT	34,0	0,96

Tab. 3.1: Auflistung der $2A_{(zz)}$-Werte von den Spinsonden der modifizierten Cysteinmutanten von b_{sol} und ihrer mit Gleichung (3.1) berechneten Rotationskorrelationszeiten

EF_1 + b_{syn}·IAAT	$2A_{(zz)}$ [G]	τ_R [ns]
EF_1 + b_{109C}·IAAT	34,0 / 62,0	0,96
EF_1 + b_{124C}·IAAT	34,0	1,18
EF_1 + b_{128C}·IAAT	34,0	1,12
EF_1 + b_{132C}·IAAT	34,0	0,75
EF_1 + b_{139C}·IAAT	34,0 / 50,0	0,66

Tab. 3.2: Auflistung der $2A_{(zz)}$-Werte von den Spinsonden der modifizierten Cysteinmutanten von b_{sol} im Komplex mit EF_1 und ihrer mit Gleichung (3.1) berechneten Rotationskorrelationszeiten

Die größten Differenzen der Rotationskorrelationszeiten von b_{syn}·IAAT im Vergleich zu denen des b_{syn}·IAAT-EF_1-Komplexes sind bei b_{124C} und b_{139C} zu beobachten (s. Abb. 3.18). Die Erniedrigung der Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden von b_{syn}·IAAT bei der Bindung an EF_1 sprechen hier für eine leichte Mobilisierung der Spinlabel-Gruppen. Ein Nachteil bei der Bestimmung dieser Zeiten besteht jedoch darin, daß die dafür benutzte Gleichung (3.1) eine hydrophobe Umgebung der Nitroxylradikale voraussetzt und die Meßlösungen wässrig sind.

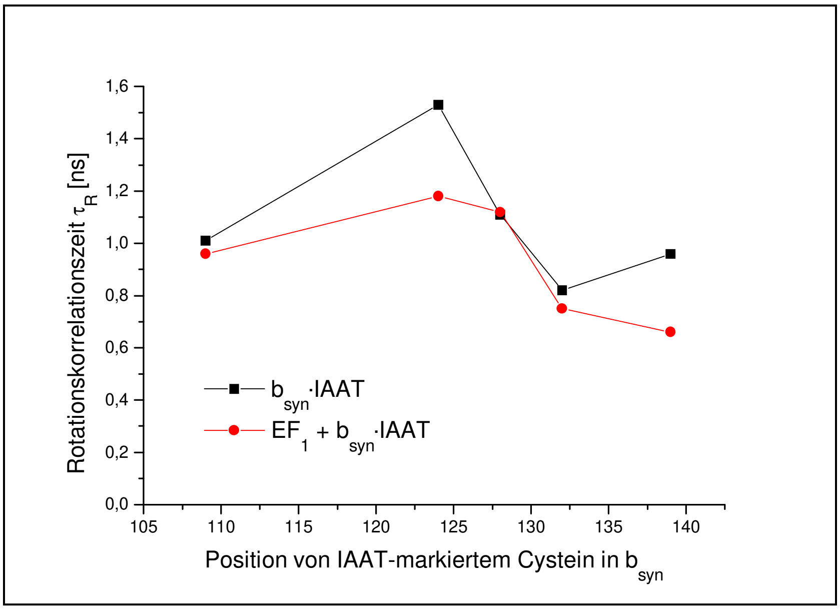


Abb. 3.18: Die Meßgrößen aus Tab. 3.1 und 3.2 im Diagramm dargestellt

Alles in allem sind die oben erwähnten größten Differenzen in den Rotationskorrelationszeiten mit etwa 0,3 ns recht gering, wenn sie mit den von Kersten (1999) ermittelten Werten verglichen werden. Diese liegen entsprechend bei ca. 1-2 ns.

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie wurden auch potentielle dipolare Wechselwirkungen zweier SL-Gruppen im spinmarkierten Protein-Dimer von b_{syn} untersucht, um Informationen über die Proteinstruktur von b zu erhalten. Die Spinsonden der gelabelten Proteine haben in Lösung aufgrund der freien Drehbarkeit von IAAT um einige seiner Atombindungen eine hohe Bewegungsfreiheit und sind somit nicht stark in der Proteinstruktur von b orientiert. Da somit dipolare Wechselwirkungen in den Spektren bei Raumtemperatur schwer auszumachen sind, ergibt sich die Notwendigkeit, die Untersuchung dieser Wechselwirkungen im gefrorenen Zustand bei tiefer Temperatur durchzuführen. Kokorin und Mitarbeiter haben 1972 beobachtet, daß sich bei Tieftemperatur-ESR-Spektren das Verhältnis von aufsummierten Tief- und Hochfeldsignal-Amplituden zur Amplitude des Zentralfeldsignals (d_1/d-Verhältnis in Abb. 3.19, bezeichnet als 'Kokorin-Zamaraev-Parameter') bei Spinsystem-Abständen zwischen 8 und 25 Å charakteristisch ändert [Kokorin *et al.*, 1972; s. auch Likhtenshtein, 1976 & 1993]. Dies äußert sich in einem Anstieg des d_1/d-Verhältnisses bei abnehmenden Abständen der Spinsysteme bzw. umgekehrt mit einer Senkung bei zunehmenden Spinsystem-Abständen. Dieser empirische Wert kann als ein tendenzielles Maß für den Abstand zweier Spins verwendet werden.

Mit der Untersuchung potentieller dipolarer Wechselwirkungen zwischen SL-markierten Aminosäuren der b-Untereinheiten mittels Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie (s. Abb. 3.20-

3.22) ergaben sich weitere Informationen über die Proteinstruktur von b im Bereich des Carboxyterminus. So ist bei den Spektren von spinmarkiertem b_{syn}-Dimer zwischen den Aminosäuren 124 und 158 in der Sequenz (s. Abb. 3.20) eine Schwankung der Beträge der Kokorin-Zamaraev-Parameter in ihrer Abfolge zu erkennen (s. Abb. 3.23). Im Bereich der Aminosäuren 124-139 machte sich eine Regelmäßigkeit bemerkbar, die ein Hinweis auf eine α-Helix in diesem Abschnitt der Sequenz ist. Die spinmarkierten Aminosäuren 124, 128, 132 und 139 besitzen die größten d_1/d-Verhältnisse aller untersuchten spinmarkierten b_{syn} und sind in der Sequenz 4 bzw. 7 Positionen voneinander entfernt. Für die dazwischen liegenden Aminosäuren 125, 130 und 138 wurden deutlich kleinere d_1/d-Verhältnisse bestimmt. In Richtung des Carboxyterminus, d.h. bei den Aminosäurenpositionen ab etwa 140, tendieren die Werte dieser Parameter etwas zur Abnahme. Dies spricht für eine Zunahme der Distanz der jeweiligen Spinsysteme und möglicherweise für die Zunahme der Distanz der beiden Proteinuntereinheiten des b-Dimers.

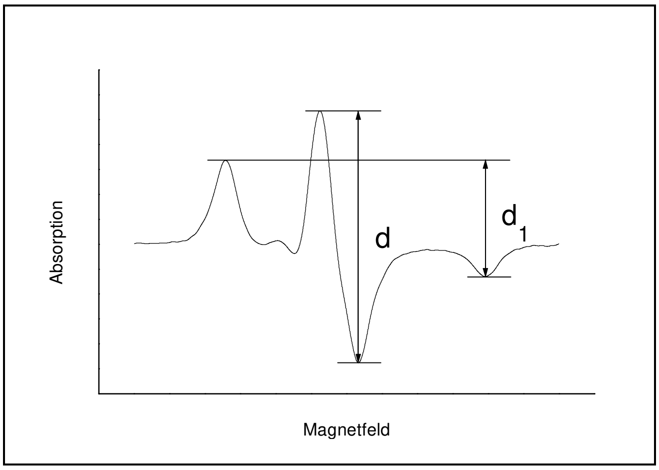


Abb. 3.19: Darstellung der Komponenten des Kokorin-Zamaraev-Parameters eines Tieftemperatur-ESR-Spektrums [Kokorin *et al.*, 1972; Likhtenshtein, 1976 & 1993]. Der Parameter ist definiert als das Verhältnis d_1/d und stellt ein Maß für dipolare Wechselwirkungen zwischen Spinsystemen mit einem Abstand von 8-25 Å dar. Mit abnehmendem Spinsystem-Abstand vergrößert sich hierbei der Betrag des Kokorin-Zamaraev-Parameters.

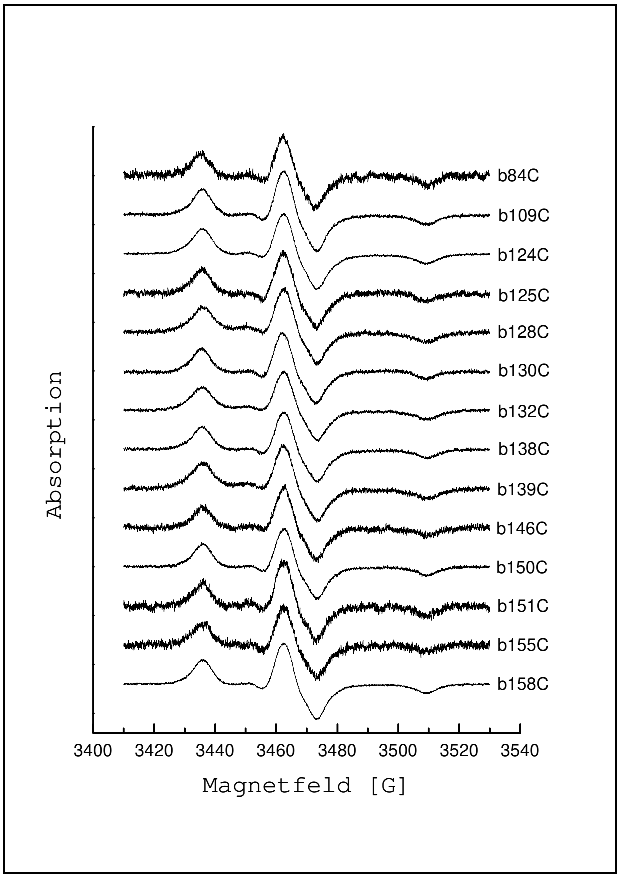


Abb. 3.20: ESR-Spektren von je 40 µM $(b_{syn} \cdot IAAT)_2$ bei 193 K

Die Ergebnisse der Untersuchung der dipolaren Wechselwirkungen bei $(b_{syn} \cdot IAAT)_2$ korrelieren mit den aus der Cystein-Quervernetzungsstudie von McLachlin und Dunn (1997) gewonnenen Erkenntnissen, daß sich die Seitenketten der Aminosäuren 124, 128, 132 und 139 in der Sequenz beim b-Dimer jeweils sehr nahe kommen. Somit wird deutlich, daß die chemische Modifizierung des Proteins mit den ESR-Reportergruppen bei diesen Cysteinmutanten keine einschneidenden Auswirkungen auf die Struktur des Protein-Dimeren oder auf dessen Dimerisierungstendenzen hat.

Die Kokorin-Zamaraev-Parameter der in Abb. 3.21 gezeigten Tieftemperatur-ESR-Spektren der spinmarkierten b_{syn} im Komplex mit EF_1 änderten sich gegenüber den Parametern der spinmarkierten b_{syn} für jede der Mutanten und teilweise deutlich (s. Abb. 3.23). Diese Veränderungen sind ein klarer Hinweis für die Bindung von b an F_1. Desweiteren ist für den Bereich der Aminosäuren 124-158 in der Sequenz auffällig, daß die kleineren Beträge der Kokorin-Zamaraev-Parameter vieler spinmarkierter b_{syn}-Mutanten bei der Bindung an EF_1 anstiegen, wohingegen sich die größeren Beträge vieler entsprechender Mutanten im Komplex mit EF_1 verringerten. Die Abfolge der Kokorin-Zamaraev-Parameter von spinmarkiertem b_{syn} im

Komplex mit EF_1 ist vor allem im Bereich der Aminosäurenpositionen 124 bis 139 in der gleichen Art alternierend wie die der entsprechenden Parameter von b_{syn} alleine. Die Unterschiede der Parameter-Werte von benachbarten Aminosäuren sind hier bei b_{syn} im Komplex mit EF_1 teilweise nicht so groß wie bei b_{syn}. Die Resultate der ESR-Messungen weisen auf folgende Situation hin: Im Bereich der Aminosäurenpositionen 124 bis 139 verdrehen sich beide b-Untereinheiten-Helices, vermutlich zusammen mit dem restlichen carboxyterminalen Ende, gegeneinander um ihre Längsachsen, sobald das b_{syn}-Dimer an EF_1 bindet. Die Struktur der Helices scheint sich hierbei nicht auffällig zu verändern. In dieser neuen Konformation haben sich Aminosäuren in der gleichen Position der b-Sequenz, die im b_{syn}-Dimer ohne EF_1 weit voneinander entfernt waren, stärker angenähert. Dagegen entfernen sich entsprechende, im b_{syn}-Dimer recht nahe zueinander stehende Aminosäuren bei der Bindung vom b_{syn}-Dimer an EF_1 stärker voneinander. Die Untersuchungen zeigen, daß das carboxyterminale Ende der b-Untereinheit offenbar sehr flexibel ist.

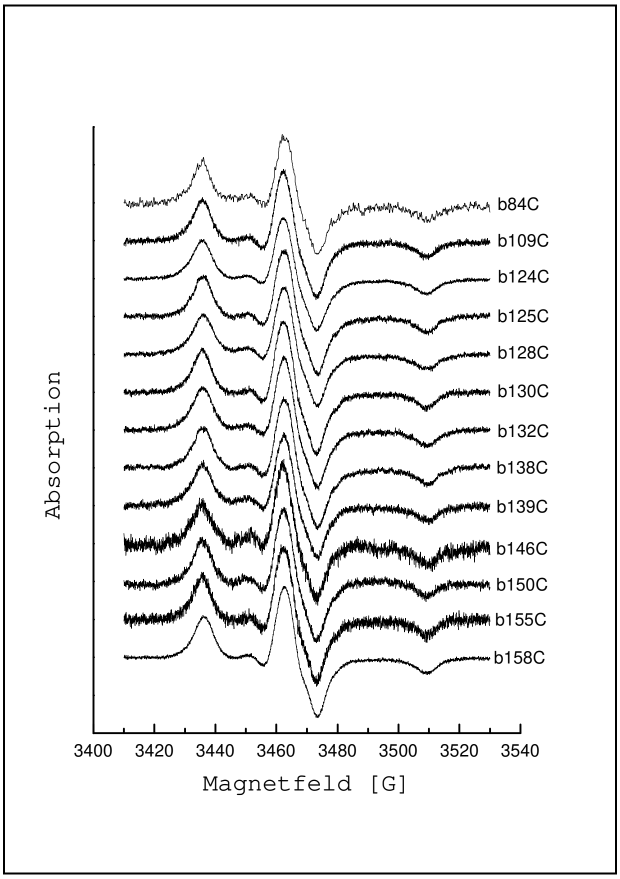


Abb. 3.21: ESR-Spektren von je 35 µM EF_1 mit je 35 µM $(b_{syn}\cdot IAAT)_2$ bei 193 K

Frühere Arbeiten zeigten, daß der δ-Untereinheit von F_1 eine wesentliche Rolle bei der Bindung des F_0-Teils an den F_1-Teil der ATP-Synthase beizumessen ist [Engelbrecht & Junge, 1990].

Zusammen mit den b-Untereinheiten von F_0 bildet sie ein Verbindungselement für F_0 und F_1 [Dunn & Chandler, 1998]. Es wurden ferner Wechselwirkungen zwischen b und α bzw. β von F_1 diskutiert, welche ebenso für die Bindung von F_0 und F_1 verantwortlich sind [Rodgers & Capaldi, 1998; Wilkens *et al.*, 1994]. Die vorher erhaltenen Ergebnisse bezüglich dipolarer Wechselwirkungen bei spinmarkiertem b_{syn} und deren Veränderung bei der Bindung von b an EF_1 sind ein gutes Werkzeug für den Nachweis der Bindung von b an δ-freie EF_1. Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen sollte die Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie als Meßtechnik verwendet werden. Die von δ befreite EF_1 wurde von C. Motz im Arbeitskreis zur Verfügung gestellt.

Die Tieftemperatur-ESR-Untersuchungen von spinmarkiertem b_{syn} im Proteinkomplex mit EF_1, welche keine δ-Untereinheit besaß, wurden für die an den Aminosäurepositionen 124, 128, 130, 132, 139, 146 und 158 SL-markierten Cysteinmutanten von b durchgeführt (s. Abb. 3.22). Die aus den Spektren ermittelten Beträge der Kokorin-Zamaraev-Parameter waren fast ausschließlich geringer als die der entsprechenden spinmarkierten b_{syn}-EF_1-Komplexe mit vorhandener δ-Untereinheit (s. Abb. 3.23). Es war ebenso zu erkennen, daß sich die d_1/d-Verhältnisse der b_{syn}-Dimere in Gegenwart von δ-freier EF_1 bei jeder b_{syn}-Mutante von den entsprechenden Werten für b_{syn} ohne EF_1 unterschieden. Damit war einerseits bestätigt, daß b_{syn} an δ-freie EF_1 bindet und diese Bindung andererseits zu einer Struktur von b_{syn} führt, welche sich sowohl von der b_{syn}-Struktur alleine als auch von der im Komplex mit EF_1 deutlich unterscheidet. Ähnliche, die Bindung von b an EF_1-δ betreffende Ergebnisse wurden von Motz (1999) erzielt. Der Unterschied in den Beträgen der Kokorin-Zamaraev-Parameter von den δ-freien b_{syn}-EF_1-Komplexen und den entsprechenden δ-haltigen Komplexen gab Anlaß zu der Annahme, daß der Abstand der beiden b-Untereinheiten-Helices bei Abwesenheit von δ im Bereich der letzten 20-30 Aminosäuren des Carboxyterminus etwas ansteigt.

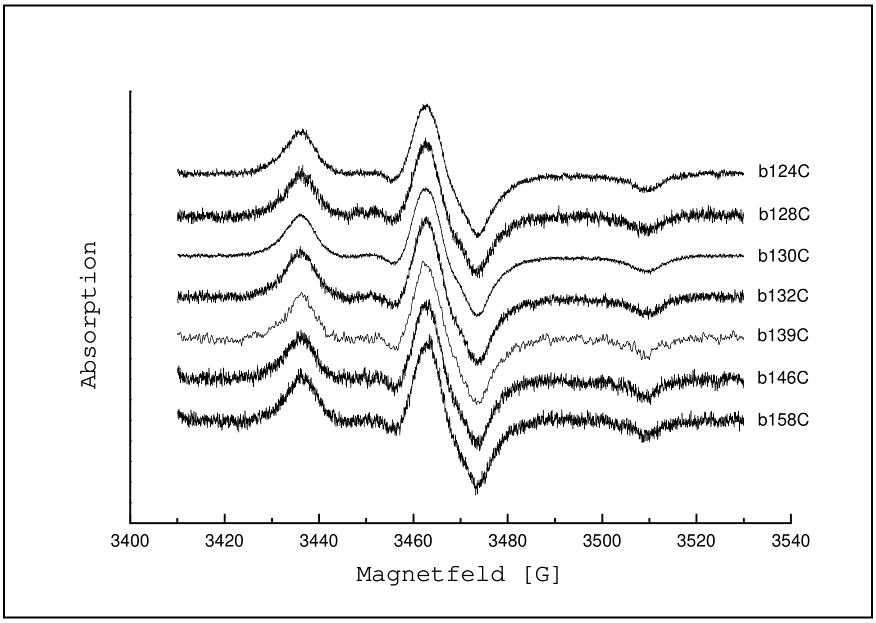


Abb. 3.22: ESR-Spektren von je 40 µM EF_1-δ mit je 40 µM $(b_{syn}·IAAT)_2$ bei 193 K

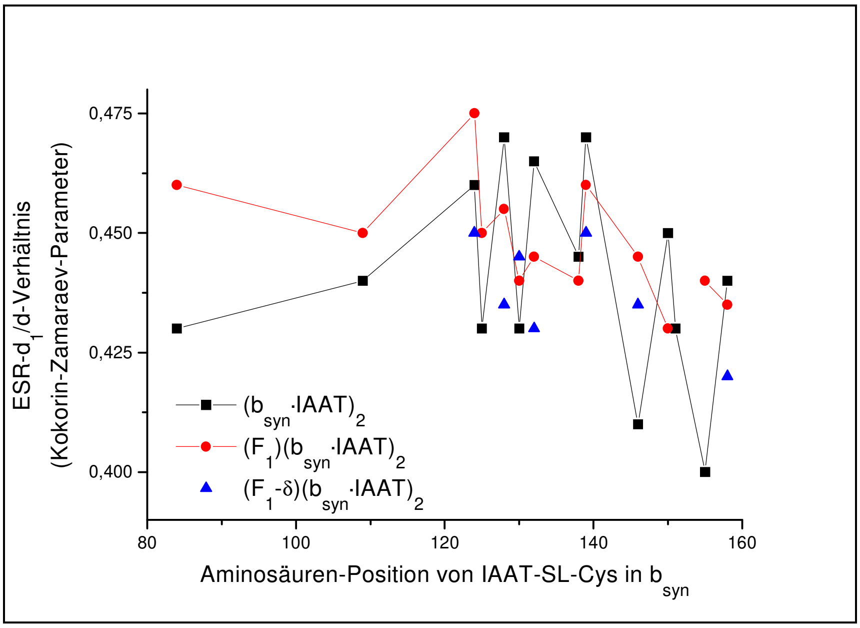


Abb. 3.23: Übersicht aller Kokorin-Zamaraev-Parameter der verschiedenen Systeme

Um ein visuelles Modell von der carboxyterminalen Region von b zu erhalten, wurde ein Molekülmodell mit dem Programm 'Quanta 97' angefertigt. Von b_{syn} wurde ein Untereinheiten-Fragment, bestehend aus den Aminosäuren 120-145 der Sequenz des Proteins, unter der Annahme einer alphahelikalen Struktur dieses Fragments angefertigt. Die Cysteinmutationen betrafen die Positionen 124, 125, 128, 130, 132, 138 und 139. Zur Ermittlung der Ausrichtung der beiden Helices zueinander wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse von McLachlin & Dunn (1997) beide Helixfragmente jeweils mit den zweifachen Cysteinmutationen an den Positionen 128 und 139 so zueinander bewegt, daß sich der Abstand der Schwefelatome der beiden positionsgleichen Cysteinpaare bei etwa dem doppelten Abstand der Schwefelatome einer

Disulfidbindung bewegte (ca. 4 Å). Abschließend wurde eine Energieminimierung der Aminosäuren-Seitenketten bei fixiertem Protein-Rückgrat durchgeführt. Es ergab sich nach der Ausrichtung der Helices eine zueinander verdrehte Stellung, d.h. die Helixachsen kippten um einen Winkel von etwa 20° zueinander (s. Abb. 3.26). Die erhaltene Struktur des b-Dimeren-Fragments diente als Basis für alle weiteren Modellierungsexperimente.

Zur Kontrolle aller Abstände der sequenzkonformen Cystein-Schwefelatome wurden die ursprünglichen Aminosäuren in den oben erwähnten sieben Positionen der Aminosäurensequenz durch Cystein substituiert und das Gesamtsystem erneut einer Energieminimierung unterzogen. Die Untersuchung ergab, daß bei den von McLachlin und Dunn untersuchten Cysteinmutanten in den Positionen 124, 128, 132 und 139 die Schwefelabstände am geringsten waren (vgl. Tab. 3.3), während sich die Abstände für die restlichen Cysteinmutanten in den Positionen 125, 130 und 138 deutlich davon abhoben.

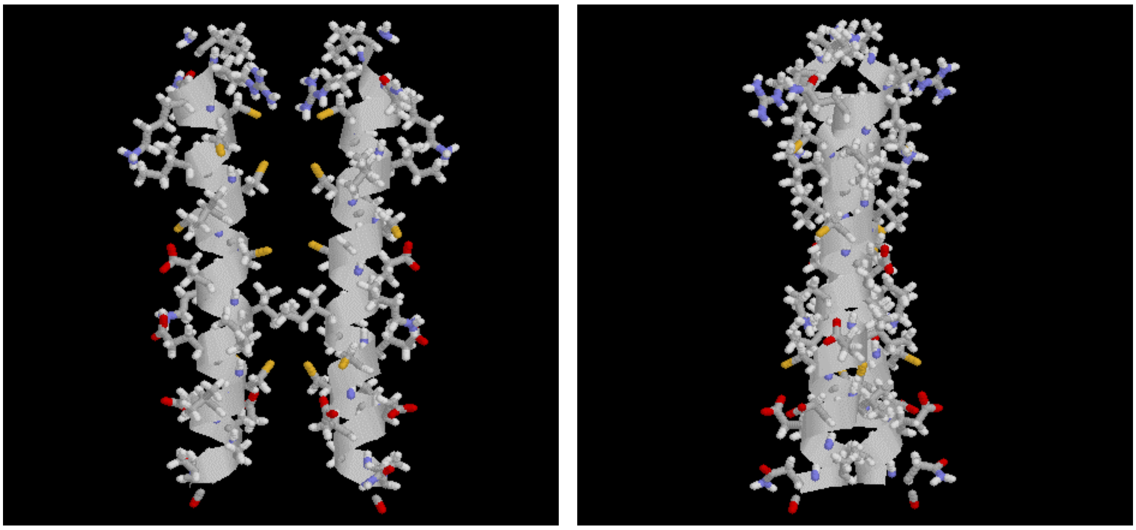


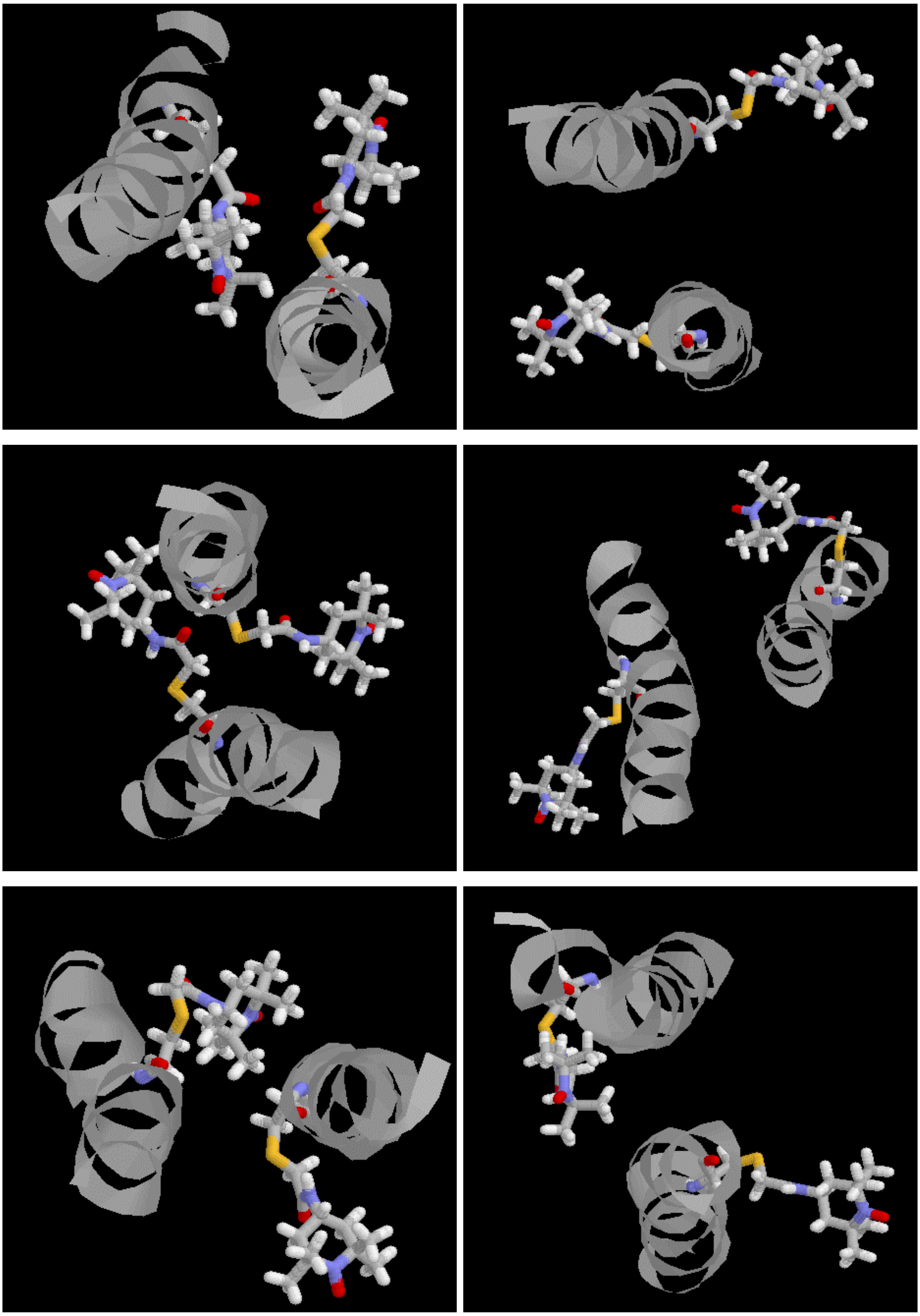
Abb. 3.24: Ansicht des b-Dimerenfragments mit allen verwendeten Cysteinmutationen von vorne (a) und von der Seite (b). Der Aminoterminus der Sequenz ist im Bild jeweils unten und der Carboxyterminus oben abgebildet. Im rechten Bild ist eine deutliche Verdrehung der beiden Helixachsen zueinander zu erkennen. Von den Thiolgruppen der Cysteine sind nur die Schwefelatome (gelb) dargestellt.

Cys-Position	S-S-Abstand [Å]
124	5,7
125	15,3
128	4,6
130	20,8
132	5,5
138	15,4
139	4,0

Tab. 3.3: Schwefelabstände der positionsgleichen Cysteine im b-Dimerenfragment in Abhängigkeit von der Cystein-Position (vgl. Abb. 3.20)

Die Modellierung der entsprechenden spinmarkierten b_{syn}-Systeme ergab eine recht gute Korrelation der erhaltenen Spinsystem-Abstände und der ermittelten d_1/d-Werte (s. Abb. 3.26). Die längliche Form und die hohe Bewegungsfreiheit der Spinsonden-Verknüpfungen von IAAT-SL-markiertem b_{syn} ermöglichen diesen einen relativ hohen Bewegungsradius. Für die Abstände zweier Spinsysteme in einem b_{syn}·IAAT-Dimer bedeutet das, daß starke Schwankungen möglich sind. Eine genauere Quantifizierung der Spinsystem-Distanzen auf der Basis der Kokorin-Zamaraev-Parameter wird somit ungemein erschwert, zumal durch die Art der Modellierungen nur jeweils eine Konformation, d.h. ein bestimmter Abstand errechnet wird. Es muß auch in Betracht gezogen werden, daß der Abstand der beiden Helices des Proteinrückgrats von b aufgrund fehlender Strukturdaten nur undeutlich festgelegt werden konnte und hiermit ein nicht zu unterschätzender Fehlerfaktor eingeht.

Im Vergleich mit den aus den Spektren von Rabenstein & Shin (1995) erhaltenen Werten (s. Abb. 3.26) lagen die d_1/d-Verhältnisse der IAAT-Spinlabel vor allem bei größeren Spinsystem-Abständen sehr hoch. Rabenstein und Shin benutzten einen Methanthiosulfonat-Spinlabel als ESR-Reportergruppe, welcher im Vergleich zum IAAT-Spinlabel eine geringere Länge besitzt. An ein Protein gebunden zeichnet sich der Methanthiosulfonat-Spinlabel folglich durch einen geringeren Bewegungsradius aus, welcher eine genauere Quantifizierung von Spinsystem-Abständen zulassen sollte als der IAAT-Spinlabel. Die Reaktivität des Methanthiosulfonat-Spinlabels bezüglich der Thiolgruppen ist jedoch vergleichsweise gering, so daß in dieser Arbeit der IAAT-Spinlabel als ESR-Reportergruppe bevorzugt wurde. Die größeren d_1/d-Verhältnisse der IAAT-Spinlabel bei gleichen berechneten Spinsystem-Abständen sind wohl auf die Flexibilität von IAAT zurückzuführen. Im b_{syn}·IAAT-Dimer können sich auch bei weiter voneinander entfernten spinmarkierten Cysteinen die Spinsonden aufgrund ihres vergleichsweise hohen Bewegungsradius teilweise sehr nahekommen. Dadurch kann das d_1/d-Verhältnis stärker erhöht werden als entsprechend bei der Verwendung von Methanthiosulfonat-Spinlabel.



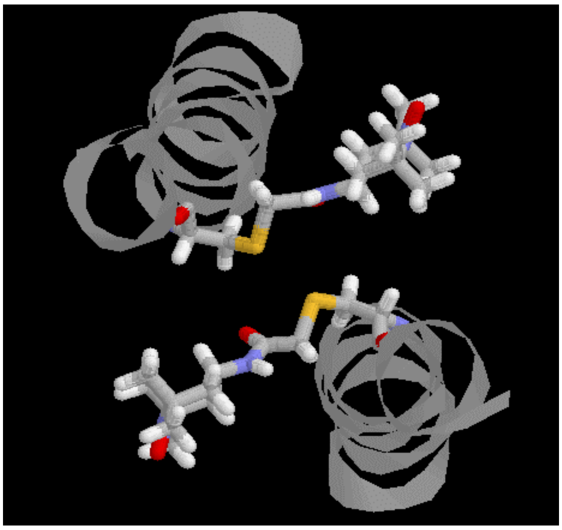


Abb. 3.25 (s. auch vorige Seite): Modellierung einiger b_{syn}·IAAT-Dimeren-Helixfragmente. Von oben nach unten: b_{124C}, b_{125C}, b_{128C}, b_{130C}, b_{132C}, b_{138C}, b_{139C}.

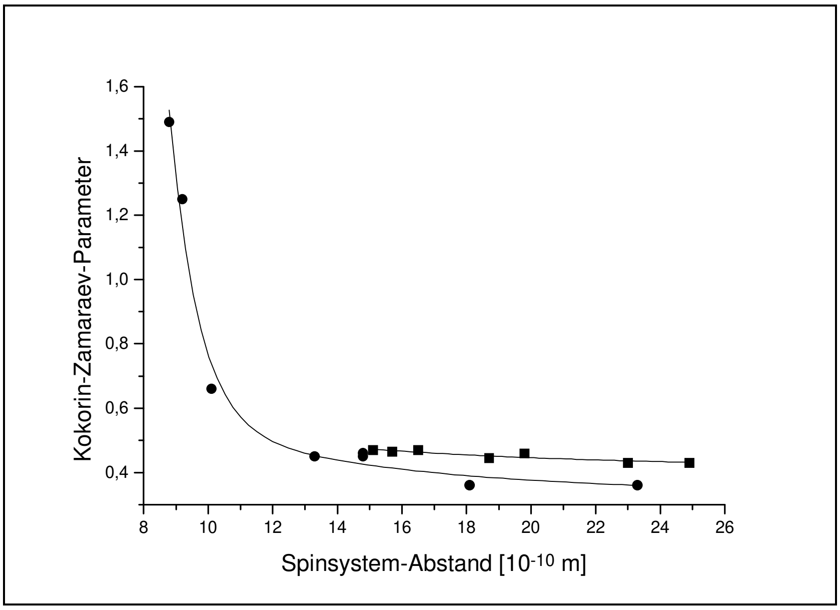


Abb. 3.26: Mit Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie ermittelte d_1/d-Verhältnisse von b_{syn}·IAAT, aufgetragen gegen deren mit Molekül-Modellierung ermittelten Abstände der Spinsysteme (quadratische Meßpunkte) und ein Ausschnitt der aus den ESR-Spektren von Rabenstein & Shin (1995) ermittelten d_1/d-Verhältnisse, aufgetragen gegen deren mit Molekül-Modellierung ermittelten Abstände der Spinsysteme (runde Meßpunkte)

Wie in Abb. 3.26 zu sehen ist, gestaltet sich die Abschätzung größerer Spinsystem-Abstände (ca. 15-25 Å) bei spinmarkierten Molekülen ohne bevorzugter Spinsonden-Orientierung mit Hilfe der Kokorin-Zamaraev-Methode als schwierig. In diesem Bereich verursachen schon kleine Schwankungen der d_1/d-Verhältnisse große Ungenauigkeiten bei den Spinsystem-Abständen.

3.3 Untersuchung der Nucleotidbindungsstellen von F_1 und F_1-b_{syn}-Komplex

In den letzten zwei Jahren wurden in unserem Arbeitskreis ESR-Untersuchungen an der Cystein-Mutante β_{Y331C} von EF_1 [Wise, 1990], welche spezifisch mit IOPI gelabelt war (hier als EF_{1C}·IOPI bezeichnet), alleine und als Komplex mit b_{sol} durchgeführt [Kersten, 1999]. Das Ziel dieser Untersuchungen war, Informationen über den Einfluß der b-Untereinheit auf die Konformationen der Nucleotidbindungsstellen auf den β-Untereinheiten zu erhalten. Die Aminosäurenposition 331 in der β-Untereinheit von EF_1 befindet sich in direktem Kontakt zu der Nucleotidbase in der Bindungsstelle auf derselben Untereinheit. Sie ist daher ein geeigneter Ansatzpunkt für spezifisches Spin-Labeling, da eine kovalent verknüpfte Spinsonde an diesem Ort wertvolle Informationen z.B. über die Hydrophilie der molekularen Umgebung oder dynamische Parameter der Bindungsstelle liefern kann. Die Untersuchungen von Kersten (1999) haben gezeigt, daß die Konformation der Nucleotidbindungsstellen sich bei der Bindung von b_{sol} an EF_1 merklich ändert, da die Bewegungsfreiheit der immobilsten Komponente der Spinsonden offensichtlich erhöht wurde. Es konnte jedoch mit den Messungen bei Raumtemperatur nicht festgestellt werden, wie nahe sich die Nucleotidbindungsstellen auf β und das Proteinrückgrat von b_{sol} im F_1-b-Komplex kommen. Somit blieb eine weitere Information über die Struktur dieses Komplexes ungeklärt, welche in dieser Arbeit erhalten werden sollte.

Um ein Bild vom Abstand zwischen b und F_1 zu erhalten, bot sich an, wie mit den vorangegangenen Messungen die dipolaren Wechselwirkungen zweier im Proteinkomplex benachbarter Spinsonden mit Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie zu untersuchen. Als Proteinsysteme für die Messungen wurden spinmarkierte EF_1-b-Komplexe mit Spinlabeln sowohl in Position β_{331} als auch an verschiedenen Stellen an b_{syn} eingesetzt.

3.3.1 Isolierung von $EF_{1\ \beta Y331C}$ (EF_{1C}) aus K12 JP17

Die Gewinnung von EF_{1C} aus dem *E. coli*-Bakterienstamm K12 JP17, welcher das Plasmid pJW1 mit vollständigem *unc*-Operon aus *E. coli* enthält [Wise, 1990], gelang im wesentlichen nach dem Verfahren von Wise (1990) [vgl. Kersten, 1999]. Es wurden mit Fermenteraufzucht 90-100 g Zellen aus 10 l Wachstumsmedium erhalten. Deren weitere Verarbeitung erbrachte 30-35 mg F_1-ATPase mit einer spezifischen Aktivität von 7-10 U·mg^{-1}.

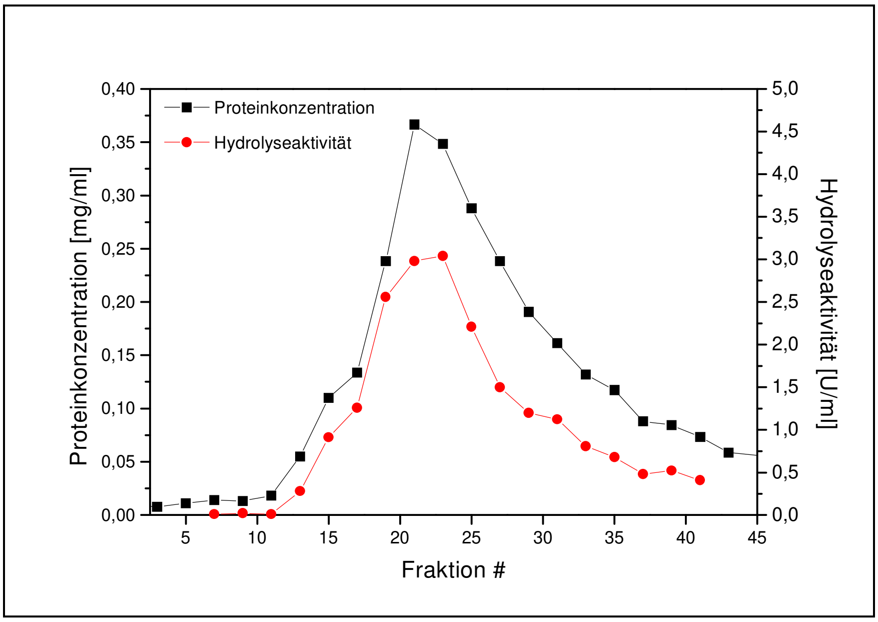


Abb. 3.27: Elutionsdiagramm von EF_{1C} nach der DEAE-Ionenaustauscher-Säule

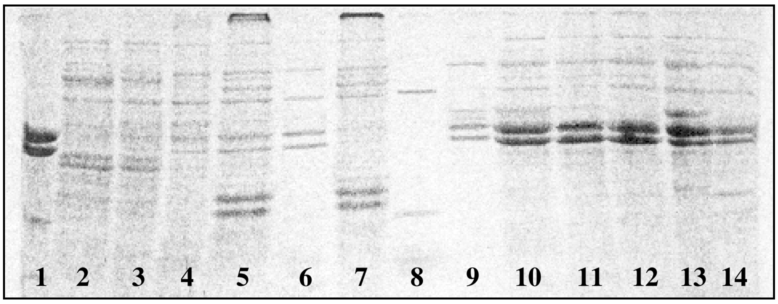


Abb. 3.28: 12%iges SDS-Gel der Isolierung von EF_{1C}. Gel-Bahnen: #1: Marker - F_1-ATPase, #2: Überstand der Behandlung mit TEM, #3: Überstand der Behandlung mit TES50+PAB, #4: Überstand der Behandlung mit TES5+PAB, #5: F_0F_1-Membranen (Vesikel), #6: Überstand der Behandlung mitTES5-PAB, #7: F_0-Membranen (Vesikel), #8: Pellet der Mg^{2+}-Fällung, #9: Überstand der Mg^{2+}-Fällung, #10: Überstand der Resuspension der PEG-Fällung, #11: Pellet der Resuspension der PEG-Fällung, #12: Ionenaustauscher-Säule: Fraktionen 18-32, #13: Ionenaustauscher-Säule: Fraktionen 13-17 und 33-43, #14: Marker - F_1-ATPase. (Die genauen Schritte der Isolierung sind in Kap. 5.2.3 näher beschrieben.)

3.3.2 Chemische Modifizierung von EF_{1C} an Position β_{331} mit IOPI-SL

Die spezifische chemische Modifizierung von EF_{1C} an der gentechnisch eingeführten Cysteinseitenkette der Aminosäure β_{331} mit 4-(3-Iodo-2-oxo-1-propyliden)-1-oxy-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin (IOPI-SL) wurde nach einer Vorschrift von Kersten (1999) durchgeführt. Aus etwa 12 mg eingesetztem Protein mit einer spezifischen Aktivität von etwa 9 $U \cdot mg^{-1}$ wurden nach der NEM-Maskierung in Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen und der Nucleotidbefreiung etwa 5-6 mg zurückerhalten, die spezifische Aktivität betrug 10-11 $U \cdot mg^{-1}$

und die Anzahl freier Thiolgruppen wurde mit 3,1±0,2 mol pro mol Enzym ermittelt. Nach der chemischen Modifizierung der Position β_{331} mit IOPI-SL wurden 4-5 mg Protein mit 8-10 U·mg^{-1} spezifischer Aktivität erhalten, als Anzahl freier Thiolgruppen pro Enzym wurde 0,2±0,1 ermittelt.

3.3.3 Untersuchungen

Zunächst wurde von EF_{1C}·IOPI ohne $b_{sol/syn}$ ein ESR-Spektrum bei 193 K gemessen. Um den Einfluß der Bindung von b_{sol} an EF_{1C}·IOPI auf die Tieftemperaturspektren zu untersuchen, wurde als Kontrolle EF_{1C}·IOPI zusammen mit b_{sol} bei der gleichen Temperatur vermessen (s. Abb. 3.29). Dieses Spektrum diente ebenso als Referenz für die Tieftemperatur-ESR-Spektren von EF_{1C}·IOPI im Komplex mit b_{syn}·IAAT.

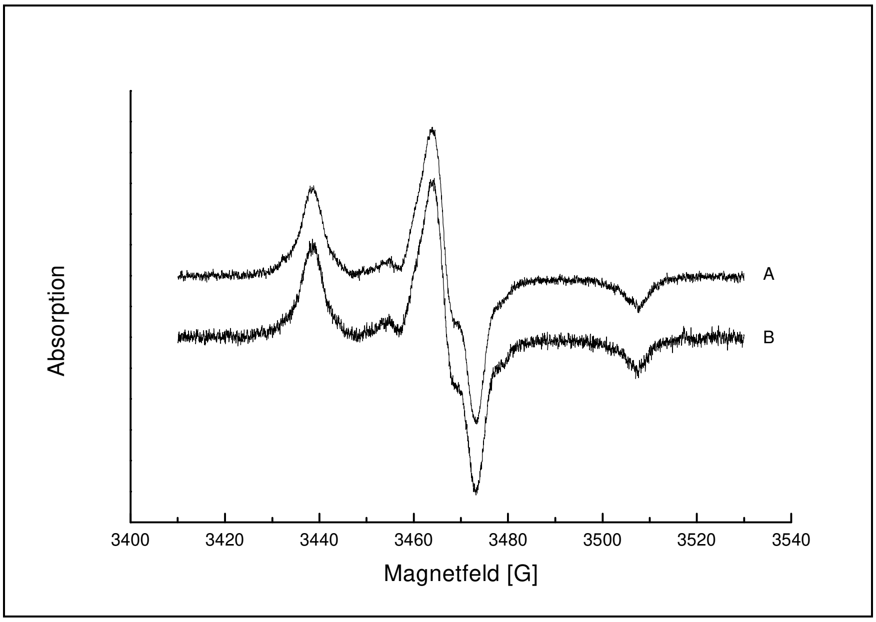


Abb. 3.29: ESR-Spektren von 40 µM nucleotidbefreiter EF_{1C}·IOPI (A) und 40 µM nucleotidbefreiter EF_{1C}·IOPI mit 60 µM $(b_{sol})_2$ (B) bei jeweils 193 K

Beim Tieftemperatur-ESR-Spektrum des nucleotidbefreiten EF_{1C}·IOPI-Systems lag der $2A_{zz}$'-Wert unabhängig von der Bildung eines EF_1-b_{sol}-Komplexes bei 69 G (s. Abb. 3.29). Verglichen mit den $2A_{zz}$'-Werten der Tieftemperatur-ESR-Spektren der b_{syn}·IAAT-Systeme, welche bei etwa 73 G lagen (vgl. Abb. 3.20-22), fiel dieser Wert recht gering aus. Der offensichtliche Grund dafür ist, daß die IAAT-Spinsonden der b_{syn}-Mutanten mehr oder weniger frei in die wäßrige Umgebung ragen. Die IOPI-Spinlabel in den Nucleotidbindungsstellen von EF_{1C} hingegen befinden sich aufgrund einer ausgedehnten Proteinumgebung in einem weniger hydrophilen

Milieu. Der Betrag des Kokorin-Zamaraev-Parameters wurde durch die Bindung von b_{sol} an EF_{1C}·IOPI nicht verändert und lag in beiden Fällen bei 0,38.

Die genauere Analyse der Hoch- und Tieffeldbereiche des Spektrums von EF_{1C}·IOPI mittels Gaußkurvengruppen-Analyse ergab, daß die jeweiligen Signale aus je zwei Komponenten zusammengesetzt waren (s. Abb. 3.30). Die Analyse wurde mit dem Programm 'Origin' von Fa. Microcal durchgeführt. Neben dem Spektrum mit 69 G Hochfeld-Tieffeld-Signalabstand existiert offensichtlich noch ein weiteres Spektrum mit einem $2A_{zz}$'-Wert von 67 G. Dieses fällt besonders durch seine hohe Linienbreite auf, welche wohl durch die hydrophobere Umgebung eines Teils der IOPI-Spinsonden zustande kommt [vgl. Hwang *et al.*, 1975]. Die Ursache dafür kann unter anderem auch in der unterschiedlichen Beladung der Bindungsstellen mit Wassermolekülen liegen. Folglich bedeutet das, daß die Katalysezentren auch ohne Nucleotidbeladung in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Durch die Bindung von b_{sol} an EF_{1C}·IOPI schien sich das Profil des Tieftemperatur-ESR-Spektrums nicht signifikant zu ändern.

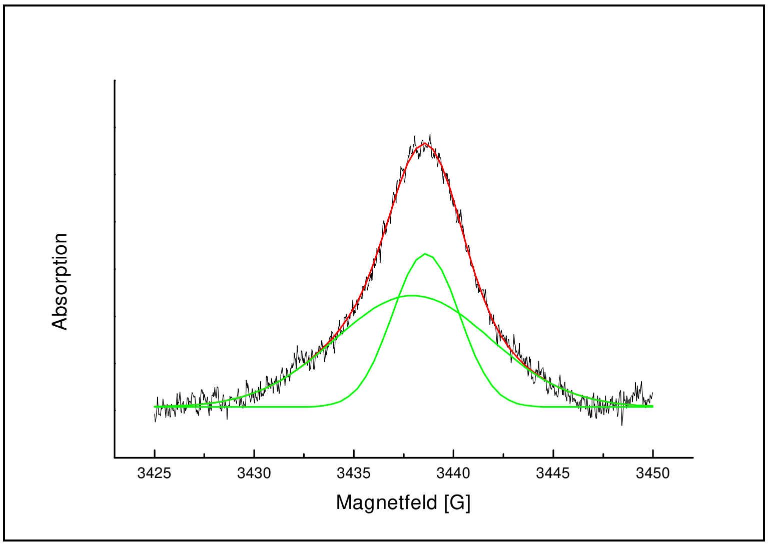


Abb. 3.30a: Gaußkurvengruppen-Analyse des Tieffeldbereichs vom EF_{1C}·IOPI-Tieftemperatur-spektrum (Spektrum A in Abb. 3.29)

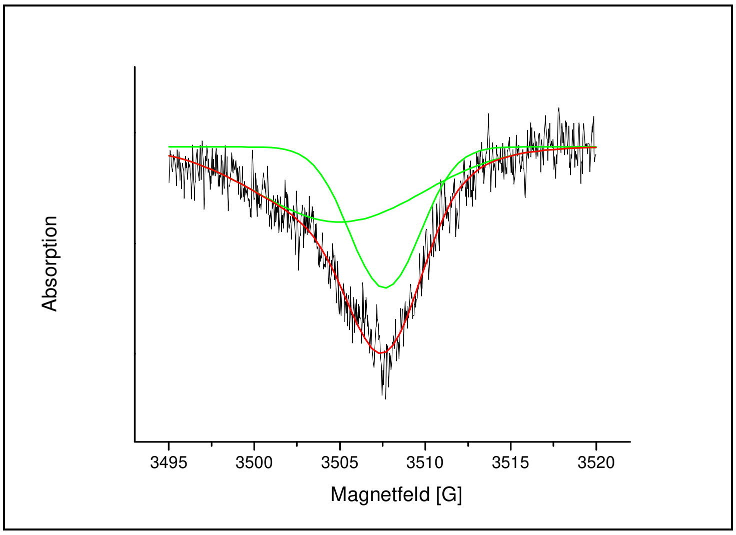


Abb. 3.30b: Gaußkurvengruppen-Analyse des Hochfeldbereichs vom EF_{1C}·IOPI-Tieftemperatur-spektrum (Spektrum A in Abb. 3.29)

Für die Vermessung der EF_{1C}·IOPI-b_{syn}·IAAT-Proteinkomplexe wurden im einzelnen die b_{syn}-Mutanten b_{109C}, b_{124C}, b_{125C}, b_{128C}, b_{130C}, b_{132C}, b_{138C} und b_{139C} ausgewählt (s. Abb. 3.31), da in diesem Abschnitt der Aminosäurensequenz von b die größten Effekte der Bindung an EF_1 auf die ESR-Spektren entdeckt wurden [Kersten, 1999].

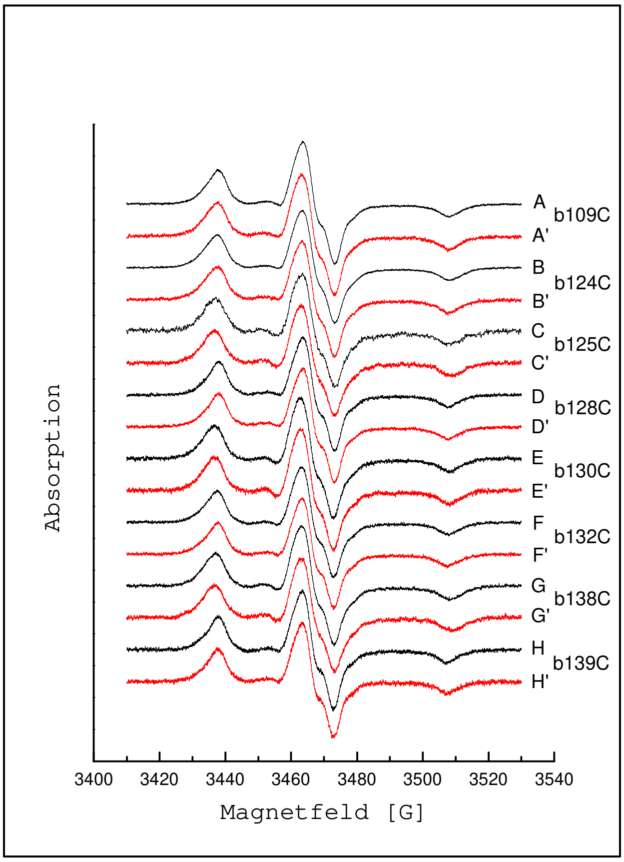


Abb. 3.31: ESR-Spektren von 35 µM EF_{1C}·IOPI im Komplex mit 35 µM $(b_{syn}$·IAAT$)_2$ (A-H) sowie die Aufsummierung der Einzelspektren von 35 µM EF_{1C}·IOPI mit b_{sol} zum einen und andererseits 35 µM $(b_{syn}$·IAAT$)_2$ (A'-H') bei 193 K

Die ESR-Tieftemperaturspektren der EF_{1C}·IOPI-b_{syn}·IAAT-Proteinkomplexe wurden mit den aufsummierten Tieftemperaturspektren einerseits von EF_{1C}·IOPI mit b_{sol} und andererseits von b_{syn}·IAAT verglichen (s. Abb. 3.31). Es stellte sich heraus, daß die Spektren sich nicht signifikant unterschieden. Dies galt sowohl für die Spektrenform als auch für die Beträge der Kokorin-Zamaraev-Parameter. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß der Abstand der Nucleotidbindungsstellen auf β zur an F_1 gebundenen b_{syn}-Untereinheit im Bereich der Aminosäuren 109 bis 139 von b_{syn} bei allen untersuchten spinmarkierten b_{syn}-Mutanten größer als 25 Å sein mußte.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die wasserlösliche, verkürzte Form der b-Untereinheit ($b_{sol/syn}$) von EF_0 im Bereich der Aminosäuren 124-139 in der Sequenz offenbar alphahelikalen Charakter hat und in Lösung als paralleles Dimer vorliegt. Die Strukturen des Protein-Dimers alleine in Lösung, an EF_1 und an δ-freie EF_1 gebunden, unterscheiden sich jeweils merklich voneinander. Die Bindung an EF_1 verursacht im Bereich des carboxyterminalen Endes von b offensichtlich eine gegenseitige Verdrehung der Monomere um ihre Längsachsen. Der carboxyterminale Bereich von b scheint ein hohes Maß an Flexibilität zu besitzen. Das an EF_1 gebundene b_{syn} ist von den Nucleotidbindungsstellen auf den β-Untereinheiten von EF_1 offensichtlich weiter als 25 Å entfernt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde die Bindung des an der Ribose modifizierten, rotationsimmobilisierten SL-ATP-Derivats 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP (SL*-ATP) an normale F_1-ATPase aus dem *E. coli*-Stamm SWM1 untersucht. Sowohl die Isolierung des Proteins aus den Bakterien als auch seine Befreiung von intrinsischen Nucleotiden erbrachte ausreichende Mengen an Enzym mit guter Aktivität und Reinheit. Das SL-Derivat des Nucleotids konnte ebenso in ausreichenden Mengen synthetisiert werden.

Die Charakterisierung der Bindung des Spiroketal-SL-ATP an native EF_1, die etwa drei verbleibende, intrinsisch gebundene Nucleotide enthält, ergab, daß pro Enzym-Molekül nur annähernd drei SL-Nucleotide gebunden wurden. Zu dem gleichen Resultat führten entsprechende Untersuchungen mit nucleotidbefreiter EF_1. Das SL*-ATP wird offensichtlich nur in den drei katalytischen Nucleotidbindungsstellen auf den β–Untereinheiten des Enzyms und nicht in den drei nichtkatalytischen Bindungsstellen gebunden. Unterstützt und teilweise erklärt wurden diese Ergebnisse durch die Resultate der Computer-Modellierungen von SL*-ATP in den Nucleotidbindungsstellen des Röntgenstrukturmodells von MF_1 [Abrahams et al, 1994]. Die Modellierungen ergaben, daß die Spiroketal-SL-Gruppen von SL*-ATP in zwei der drei α–Untereinheiten von MF_1 deutlich verzerrt wurden. Dies geschieht offenbar aufgrund eines durch die Proteinumgebung eingeschränkten Raumangebots.

Die Bindungsstudien zeigten desweiteren, daß die maximale Bindung von SL*-ANP an EF_1 schon bei geringeren Konzentrationen von SL*-ATP erreicht wird, wenn ein Überschuß an Mg^{2+} vorhanden war und die EF_1 von Nucleotiden befreit vorlag. Im Fall der nucleotidbefreiten EF_1 schien sich abzuzeichnen, daß die Nucleotidbindungsstellen eine positive Kooperativität für die Substratbindung besitzen. Es scheint möglich, daß die Mg^{2+}-Affinität des modifizierten ATP durch die Verzerrung der Ribosestruktur, bedingt durch den Spiroketal-Spinlabel, herabgesetzt wurde. Dies würde die Notwendigkeit höherer Mg^{2+}-Konzentrationen für die quantitative Bildung eines Komplexes mit SL*-ATP erklären.

Die durchgeführten Aktivitätstests mit SL*-ATP als Substrat von EF_1 zeigten, daß die spezifische Aktivität des Enzyms stark von der Mg^{2+}-Konzentration abhängig ist. Eine maximale spezifische Aktivität wurde bei 4-5 mol Mg^{2+} pro mol Nucleotid erreicht. Diese lag im Bereich der Bisite-Katalyseaktivität des Enzyms mit ATP · 0,4 Mg^{2+} als Substrat. Aufgrund der ermittelten Bindungsstöchiometrie von SL*-ATP an EF_1 war eine Bisite-Katalyse jedoch wenig wahrscheinlich. Die geringe spezifische Aktivität des Enzyms ist wohl darauf zurückzuführen, daß sich die hohen Mg^{2+}–Konzentrationen, welche für eine maximale Bindung des Substrats erforderlich sind, inhibitorisch auf die Katalysetätigkeit der ATPase auswirken.

Die Analyse der ESR-Spektren von EF_1 im Komplex mit SL*-ATP ergab maximale $2A_{zz}$-Werte von 57-58 G für natives Enzym und 59-60 G für nucleotidbefreites Enzym. Die $2A_{zz}$-Werte sind um etwa 6-8 G geringer als die entsprechenden Werte von SL-ATP. In den Nucleotidbindungsstellen von EF_1 scheinen die am stärksten immobilisierten Spiroketal-SL-Gruppen von SL*-ATP eine höhere Beweglichkeit zu besitzen als die immobilsten Spinsonden von SL-ATP. Letztere sind offenbar aufgrund höherer Flexibilität in der Lage, sich der Proteinumgebung besser anzupassen und werden so stärker immobilisiert. Die größeren Linienbreiten der Signale von gebundenem SL*-ATP sind außerdem ein Hinweis dafür, daß sich die Spiroketal-Spinlabel in einer hydrophoberen Umgebung befinden als die Spinlabel von SL-ATP.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Struktur einer verkürzten und am Carboxyterminus modifizierten, wasserlöslichen Form der b-Untereinheit vom F_0-Teil der ATP-Synthase (b_{sol}) als isoliertes Protein und im Komplex mit dem F_1-Teil der ATP-Synthase erforscht. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf das carboxyterminale Ende des Proteins gerichtet, welches die Bindung von b an F_1 vermittelt. Der untersuchte Bereich von b_{sol} erstreckte sich über die Aminosäurenpositionen 84 bis 158 in der Sequenz. Die Cysteinmutanten von b_{sol} und EF_1 konnten in ausreichenden Mengen aus *E. coli* isoliert und spezifisch kovalent mit den SL-Reagenzien IAAT (für b) und IOPI (für EF_1) markiert werden.

Die ESR-spektroskopische Untersuchung der an den Aminosäuren-Positionen 109, 124, 128, 132 und 139 spinmarkierten Cystein-Mutanten von b_{sol} bei Raumtemperatur ergab, daß die errechneten relativen Rotationskorrelationszeiten des b-Dimeren alleine und im Komplex mit EF_1 etwa in derselben Größenordnung lagen. Die größte Differenz der Rotationskorrelationszeiten von b_{syn}·IAAT mit und ohne EF_1 betrug nur etwa 0,5 ns. Im Vergleich dazu sind die maximalen Unterschiede der Rotationskorrelationszeiten bei anderen spinmarkierten Cysteinmutanten von b_{sol} [Kersten, 1999] ohne und mit EF_1 deutlich größer und somit ein Anzeichen auf Protein-Wechselwirkungen zwischen b_{sol} und EF_1.

Die Tieftemperatur-ESR-Messungen an den spinmarkierten b_{syn}-Systemen bestätigten die allgemeinen Voraussagen über die Sekundärstruktur des Proteins. In der Abfolge der Spinsonden-Positionen am carboxyterminalen Ende der Cysteinmutanten schwankten die Verhältnisse von den Hoch- und Tieffeldsignal-Amplituden zu den Zentralfeldsignal-Amplituden (Kokorin-Zamaraev-Parameter bzw. d_1/d-Verhältnisse) deutlich. Zwischen den Aminosäurenpositionen 124 und 139 waren periodisch im Abstand von drei bis vier Aminosäuren variierende d_1/d-Verhältnisse ein deutlicher Hinweis für zwei parallele alphahelikale Stränge von unterschiedlichen b_{sol}-Untereinheiten. Durch die Bindung von b_{sol} an EF_1 wurde das Profil der d_1/d-Verhältnisse in der Aminosäurensequenz des b-Carboxyterminus nachhaltig verändert. Die Resultate sprechen für eine gegenseitige Verdrehung der b-Untereinheiten des Dimers um ihre Längsachsen im carboxyterminalen Bereich. Im Bereich der Aminosäuren 124-139 scheint die Struktur der α–Helices von b hierbei offenbar strukturell nicht merklich verändert zu werden. Die EF_1-b_{sol}-Komplexe ohne δ-Untereinheit zeigten d_1/d-Verhältnisse, welche sich deutlich von den Werten für b_{sol} unterschieden und außerdem fast alle geringer waren als die entsprechenden Werte für die b_{sol}-Komplexe mit der vollständigen ATPase. Das läßt darauf schließen, daß sich die Strukturen von b_{sol}-Dimer alleine, an EF_1 und EF_1-δ gebunden, deutlich unterscheiden und die b-Untereinheit folglich sehr flexibel ist.

Aus der Analyse der ESR-Tieftemperaturspektren von EF_{1C}·IOPI ohne Nucleotid in den Katalysezentren gehen zwei existierende Konformationen der Nucleotidbindungsstellen hervor. Der Unterschied in den $2A_{zz}$-Werten wies darauf hin, daß die beiden Konformationen unterschiedliche hydrophile Umgebungen an den Spinsonden erzeugen. Die Bindung von b_{sol} an F_1 zeigte keine signifikanten Änderungen des Tieftemperaturspektrums von EF_{1C}·IOPI, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß sich in diesem Zustand die Konformationen der Bindungsstellen nicht deutlich geändert haben. Der Abstand der Nucleotidbindungsstellen in den β-Untereinheiten der ATPase vom Proteinrückgrat der b-Untereinheit im Bereich ihrer Aminosäuren-Positionen 109-139 wurde entsprechend den vorherigen Tieftemperatur-ESR-Messungen mit Komplexen von den jeweils spinmarkierten EF_1- und b_{syn}-Systemen untersucht. Da im Vergleich zu den Einzelspektren von EF_{1C}·IOPI mit b_{sol} und von b_{syn}·IAAT keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren, konnte davon ausgegangen werden, daß der Abstand der Nucleotidbindungsstellen vom Proteinrückgrat von b in diesem Bereich stets mehr als 20-25 Å beträgt.

Die erstellten Molekülmodelle des b-Dimerenfragments im Bereich der Aminosäuren 120-145 in der Sequenz unter Berücksichtigung der Ergebnisse von McLachlin & Dunn (1997) unterstützten die Ergebnisse aus den Tieftemperatur-ESR-Messungen. Die Abstände der Spinsonden-Nitroxylgruppen in den Molekülmodellen der b-Dimerenfragmente korrelierten recht gut mit den Werten der mit ESR erhaltenen d_1/d-Verhältnissen. Die vergleichsweise hohen Beträge der d_1/d-Werte sind wohl auf die Eigenschaften der Spinlabel-Reste von IAAT-spinmarkiertem b_{syn} zurückzuführen. Selbst bei zwei relativ weit voneinander entfernten spinmarkierten Cysteinen können sich die Spinsonden aufgrund ihrer Länge und Flexibilität sehr nahe kommen und somit das d_1/d-Verhältnis erhöhen. Wie aus der Abhängigkeit des d_1/d-Verhältnisses vom Abstand zweier Spinsysteme hervorgeht, ist die Abschätzung von Spinsystem-Abständen über 15 Å ohnehin sehr ungenau. Verhältnismäßig kleine Veränderungen der d_1/d-Werte führen in diesem Bereich zu großen Schwankungen der Interspin-Distanzen.

Die Site-Directed Spinlabeling-Methode hat sich in Kombination mit Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie als ein geeignetes Werkzeug für Strukturuntersuchungen an b_{syn} erwiesen. Um mehr Informationen über die Struktur von b zu erhalten, ist die Vermessung weiterer spinmarkierter b_{syn}-Varianten notwendig. Erst wenn die noch ausstehenden Aminosäuren-positionen auf dipolare Wechselwirkungen untersucht sind, ergibt sich ein präziseres Gesamtbild von der Struktur der Untereinheit.

Die Tieftemperatur-ESR-Methode kann ebenso wertvoll für Untersuchungen an der hydrophoben a-Untereinheit vom F_0-Teil sein, da deren Struktur ebenfalls noch nicht vollständig bekannt ist. Diese Methode ist generell als eine Ergänzung zur Strukturaufklärung von Proteinen mit NMR-Spektroskopietechniken und Röntgenstrukturanalyse anwendbar. Monomere Proteinuntereinheiten können als spinmarkierte Cystein-Doppelmutanten auf dipolare Interaktionen untersucht werden, um Strukturinformationen zu erhalten bzw. zu ergänzen.

5. Experimentelle Methoden

5.1 Allgemeines

5.1.1 Chemikalien

Die außer den unten aufgelisteten Chemikalien verwendeten Substanzen waren entweder im Arbeitskreis oder in der Chemikalienausgabe der Universität Kaiserslautern vorhanden. Die Aufbereitung bzw. Trocknung der Lösungsmittel wurde nach den gängigen Vorschriften durchgeführt.

Firma	Chemikalie
Acros	Acetonitril, Triethylamin
Boehringer	ADP, ATP, BSA, SDS
Fluka	PAB, Pyridin
Merck	Agar-Agar, CDI, Toluolsulfonsäure, Trioctylamin
Roth	Acrylamidlösung für PAGE (Rotiphorese Gel 30)
Serva	Coomassie Brilliant Blue G-250, EDTA, EGTA, DTT, Glycin, Mercaptoethanol, PEG 6000, TES, Tris
Sigma	AMP (freie Säure), Ampicillin, PMSF, Uracil

5.1.2 Materialien

Firma	Material
Dow Chemical	Dowex 50W-X 8
Macherey-Nagel	Polygram SIL G/UV$_{254}$ DC-Fertigfolien (80 × 40 × 0,25 mm)
Merck	RP-18 F$_{254}$s DC-Fertigplatten (200 × 50 × 0,25 mm)
Pharmacia Biotech	DEAE-Sepharose CL-6B, (DEAE-)Sephadex-Gele
Sigma	DNAse I

Die Säulenmaterialien wurden nach Herstellervorschrift vorbehandelt und konditioniert.

5.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Protein	*E. coli*-Stamm	Plasmid
EF_1	SWM1	(pAN45)
$EF_{1\ \beta 331C}$	K12 JP17	pJW1
b_{sol}	JM103	pDM3
b_{84C}	JM103	pDM29
b_{125C}		pDM32
b_{130C}		pDM36
b_{138C}		pDM12
b_{150C}		pDM40
b_{151C}		pDM41
b_{155C}		pDM42
b_{158C}		pSD120
b_{109C}	JM109	pAC1
b_{124C}		pDM31
b_{128C}		pDM22
b_{132C}		pDM38
b_{139C}		pDM13
b_{146C}		pDM14

5.1.4 Geräte

Autoklaven

Zur Sterilisierung der Materialien und Geräte wurde ein Schnellkochtopf mit ca. 10 l Fassungsvermögen von Fa. Sitram sowie ein Dampfsterilisator der Marke Varioklav 500 mit ca. 130 l Fassungsvermögen von Fa. H+P Labortechnik verwendet.

Computer

Als Plattform für das Molekülmodellierungs-Programm Quanta 97 diente eine Workstation des Typs IRIS Indy von Fa. Silicon Graphics mit dem Betriebssystem IRIX 5.3 von gleichnamiger Firma.

Druckzelle

Für den Aufschluß der Bakterien wurde eine French Pressure Cell mit einem Fassungsvermögen von ca. 50 ml von Fa. Aminco verwendet. Diese wurde mit einer hydraulischen Presse angetrieben.

Elektrophorese

Die für die SDS-PAGE benutzten und von den Metallwerkstätten der Universität Kaiserslautern hergestellten Kammern aus Kunststoff hatten die Ausmaße $140 \times 80 \times 2$ und $80 \times 80 \times 2$ mm, die Elektrophorese wurde ca. 3-3,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 16 mA durchgeführt.

Elementaranalysen

Elementaranalysen wurden an einem Analysator des Typs EA 240 von Fa. Perkin-Elmer durchgeführt.

ESR-Spektrophotometer und Zubehör

Für die ESR-Messungen wurde ein X-Band-Spektrophotometer des Typs ESP 300E der Fa. Bruker verwendet. Die Frequenz der erzeugten Mikrowellen betrug 9,6-9,7 GHz. Als Cavity diente sowohl das Modell 4102 ST/8410 als auch das Modell ER 4118 SPT-NI der Fa. Bruker. Die Vermessung der Proben erfolgte in 40 µl-Flachzellküvetten der Fa. MGW bzw. Quarzkapillaren ($100 \times 0{,}9$ mm) der Fa. Spintec.

Fermenter

Der zur Bakterienaufzucht im großen Maßstab verwendete Fermenter war vom Typ Microferm der Fa. New Brunswick Scientific mit einem Fassungsvermögen von 13 l.

Filtrationssystem für Elutionsmittel

Die für die HPLC verwendeten mobilen Phasen wurden mit einem Filter des Typs HV (0,45 µm) als Teil eines Filtersystems der Fa. Millipore von Mikropartikeln befreit. Bei Anwesenheit organischer Lösungsmittel wurden die Filter mit wenigen ml der entsprechenden Lösungsmittel vorgewaschen.

Fraktionssammler

Eluate von säulenchromatographischen Prozeduren wurden in einem Sammler vom Typ 2111 Multirac der Fa. LKB Bromma fraktioniert.

HPLC-Anlage und -Säulen

Zur quantitativen Bestimmung von Nucleotiden bzw. der Bestimmung ihrer Retentionszeiten wurde eine computerunterstützte HPLC-Anlage des Typs ‘System Gold’ der Fa. Beckman mit einem Pumpenmodul vom Typ 125 und einem Detektormodul vom Typ 168 verwendet.
Für die Analytik wurden eine Anionentauscher-Säule des Typs Partisil 10 SAX (25 cm × 4,6 mm) von Fa. Whatman und eine Reversed Phase-Säule des Typs Spherisorb C8, 5 µm (25 cm × 6 mm) von Fa. Bischoff verwendet.

Inkubationsschüttler

Die Aufzucht der Übernacht-Zellkulturen erfolgte einerseits mit einem Luftschüttler vom Typ Innova 4000 der Fa. New Brunswick Scientific und andererseits mit einem Wasserbadschüttler des Typs HT von Fa. Infors.

Konzentratoren für Proteinlösungen

Zum Aufkonzentrieren kleiner Mengen von Proteinlösungen (bis 10 ml) wurden Mikrokonzentratoren des Typs Centricon 10 bzw. Centricon 30 von Fa. Amicon mit ca. 2 ml Fassungsvermögen verwendet. Diese wurden bei max. 6000 rpm in einem JA 20-Rotor zentrifugiert. Für die Aufkonzentrierung größerer Mengen von Proteinlösungen (ab 10 ml) wurde eine Druckzelle des Typs 8050 mit Membranen des Typs PM-10 bzw. PM-30, jeweils von Fa. Amicon, mit einem Fassungsvermögen von 50 ml verwendet. Die Zelle wurde mit 3-5 bar Stickstoffgas betrieben.

Lyophilisator

Für die Gefriertrocknung wässriger Lösungen wurde ein Lyophilisator des Typs Lyovac GT 2 von Fa. Leybold-Heraeus verwendet.

NMR-Spektrophotometer

Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden an einem 60 MHz-CW-Spektrophotometer des Typs EM-360L von Fa. Varian aufgenommen. Als interner Standard diente der Chloroform-Anteil von Chloroform-d.

Reinstwasser-Generator

Die Vollentsalzung von destilliertem Wasser wurde mit einer Reinstwasser-Anlage des Typs Clear-Plus von Fa. SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation durchgeführt. Das Wasser hatte nach der Behandlung einen durchschnittlichen Leitwert von 54 nS/cm.

UV-Bestrahlungslampe

Die Detektion der Nucleotidbanden auf den Dünnschichtchromatographie-Platten wurde mit einer UV-Lampe der Fa. Camag bei einer Wellenlänge von 254 nm vorgenommen.

UV-Detektor und Schreiber

Für die qualitative Erfassung des Stoffgehalts der Protein- und Nucleotideluate von säulenchromatographischen Prozeduren wurden UV-Durchflußdetektoren der Marken 2138 Uvicord S und 2238 Uvicord S II von Fa. LKB Bromma verwendet. Zwei Lampen generierten UV-Strahlung mit herausgefilterten Wellenlängen von 254 und 277 nm. Das Detektionsprofil wurde mit einem Ein-Kanal-Schreiber des Typs Servogor 120 oder SE 120 von Fa. BBC Goerz Metrawatt aufgezeichnet.

UV/VIS-Spektrophotometer

Für die Messungen im UV- und VIS-Bereich (Wellenlängen-Bereich: 200-700 nm) wurde ein Spektrometer des Typs DU-640 der Fa. Beckman verwendet.

Ultraschall-Generator mit Zubehör

Die Zertrümmerung der Bakterienzellen wurde u.a. mit einem Ultraschall-Generator des Typs B-12 von Fa. Branson und einem zylindrischen Ultraschall-Überträger durchgeführt. Die Optimierung der Beschallungsleistung wurde mit einem halb mit Wasser gefüllten 50 ml-Becherglas als Probenersatz vorgenommen. Das Ende des Ultraschall-Überträgers wurde etwa 1 cm über dem Boden des Gefäßes positioniert. Beim Start jeder Beschallung wurde die Leistung innerhalb von 2 s von Stufe 0 auf Stufe 8 erhöht.

Zentrifugen

Firma	Zentrifuge	Rotoren
Hettich	Universal (Tischzentrifuge)	
Eppendorf	5415C (Tischzentrifuge)	
Beckman	J2-21	JA 10, JA 14, JA 20

Beckman	Optima LE-80K (Ultrazentrifuge)	SW 60Ti, 70Ti

5.2 Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten

5.2.1 Plasmid-Isolierung und Transformation in *E. coli*

Die Isolierung des für die b_{syn}-Cystein-Mutante b_{109C} codierenden Plasmids pAC1 (persönliche Mitteilung von Prof. S. D. Dunn) aus *E. coli*-Zellen des Stamms DH5α erfolgte weitestgehend nach der Alkalischen Lyse-Methode [Sambrook *et al.*, 1989].

<u>TEG-Puffer mit Lysozym</u>
25 mM (3,03 g/l) Tris
10 mM (3,72 g/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
50 mM (9,01 g/l) Glucose
pH 8,0 mit HCl, steril autoklaviert
Ca. 4 mg/ml Lysozym, frisch zugesetzt

<u>Lyse-Reagens</u>
0,2 M (8,0 g/l) NaOH, steril autoklaviert
10%(v/v) 34,7 mM (10,0 g/l) SDS, steril autoklaviert
frisch angesetzt

<u>Kaliumacetat-Lösung (pH 5,8)</u>
60%(v/v) 5 M (490 g/l) Kaliumacetat-Lösung
11,5%(v/v) Essigsäure
28,5%(v/v) H_2O
steril autoklaviert

<u>TE-Puffer</u>
10 mM (1,21 g/l) Tris
1 mM (372 mg/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
pH 8,0 mit HCl
steril autoklaviert

<u>TE-Puffer mit RNAse</u>

98%(v/v) TE-Puffer

2%(v/v) 1 mg/ml RNAse (pankreatisch, DNAse-frei) in TE-Puffer

Nachfolgende Arbeitsschritte wurden durchgehend unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Drei auf 0-4°C gekühlte Proben von je 1,5 ml einer Anzucht-Übernachtkultur (LB mit Amp) wurden in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 20 s evtl. bei 0-4°C zentrifugiert (14000 rpm). Die Überstande wurden gründlich abgesaugt und die Zentrifugation und Entfernung des Überstands ein weiteres mal wiederholt. Sodann wurden je 100 µl eiskalter TEG-Puffer mit Lysozym zugegeben und die Zellen durch kurzes Schütteln resuspendiert und 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 200 µl Lyse-Reagens, dreifaches kräftiges Schütteln per Hand und 5 min Inkubation auf Eiswasser. Nach der Zugabe von je 150 µl einer eiskalten Kaliumacetat-Lösung (pH 5,8) wurden die Eppendorf-Gefäße in umgedrehter Position 10 s lang sanft geschüttelt und 5 min bei 14000 rpm und 0-4°C zentrifugiert, um den Niederschlag aus Zelltrümmern, Kaliumdodecylsulfat, Proteinen und chromosomaler DNA abzutrennen. Die Überstände mit Plasmid-DNA und -RNA wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt, jeweils mit dem gleichen Volumen einer gekühlten Phenol-Chloroform-Lösung für DNA-Isolierungen versetzt und kurz geschüttelt. Nach 2 min Zentrifugation bei 14000 rpm und 0-4°C wurden die oberen, wässrigen Phasen in frische 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Zur Fällung der Doppelstrang-DNA wurden die Lösungen jeweils mit dem doppeltem Volumen an Ethanol versetzt, geschüttelt und für 30-60 min in Eiswasser oder bei
-80°C gelagert. Nach 15-20 min Zentrifugation bei 14000 rpm und 0-4°C wurden die Überstände gründlich entfernt und mit je 1 ml 70%(v/v) Ethanol durch gründliches Mischen gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation unter den o.g. Bedingungen wurden die Überstände entfernt und die Pellets vorsichtig 30 min im Exsikkator oder 15 min im Lyophilisator getrocknet. Schließlich wurden die Rückstände in je 20 µl RNAse-haltigem TE-Puffer aufgenommen und kurz geschüttelt, bis sich die Niederschläge aufgelöst hatten. Nach 30-60 s war die RNA hydrolysiert und die Eppendorf-Gefäße wurden bei -20°C eingefroren gelagert.

Die Transformation der von Prof. S. D. Dunn, University of Western Ontario, London (Ontario), Kanada erhaltenen Plasmide für b_{109C} (pAC1), b_{124C} (pDM31), b_{128C} (pDM22), b_{132C} (pDM38), b_{139C} (pDM13) und b_{146C} (pDM14) [vgl. McLachlin & Dunn, 1997] in kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms JM109 erfolgte weitestgehend nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989). Die kompetenten Zellen standen im Arbeitskreis zur Verfügung.

Nachfolgende Arbeitsschritte wurden unter halbsterilen Bedingungen durchgeführt. Die bei -80°C gefroren gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eiswasser aufgetaut (30-40 min) und bei 0-4°C in Portionen von 100-200 µl in Eppendorf-Gefäße aufgeteilt (ein Aliquot für jedes Plasmid und ein Aliquot für die Kontrolle). Sodann wurden je 5-10 µl gekühlter RNAse-haltiger TE-Puffer mit den Plasmiden zugegeben und die Lösungen kurz gemischt, das Aliquot für die Kontrolle blieb ohne Plasmidzusatz. Nach 1 h Inkubation auf Eiswasser wurden die Lösungen 2 min bei 42°C inkubiert und sofort für einige Minuten auf Eiswasser gestellt. Anschließend wurden die Lösungen zu Reagenzgläsern mit je 1 ml sterilem LB-Medium gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Von diesen Kulturen wurden je 100 µl auf Agarplatten mit LB-Amp-Medium ausgestrichen. Die restlichen Flüssigkulturen wurden durch Umfüllen in Eppendorf-Gefäße, 5 min Zentrifugation bei 0-4°C und 14000 rpm, Entfernen der Überstände bis auf ca. 100 µl und kurzes Mischen aufkonzentriert und ebenfalls auf Agarplatten mit LB-Amp-Medium ausgestrichen. Nach 12-15 h Inkubation bei 37°C bildeten sich Zellkolonien, mit denen eine Aufzucht gestartet und Glycerinkulturen angelegt werden konnten.

5.2.2 Aufzucht und Ernte der *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme SWM1, K12 JP17 und JM109 mit den zugehörigen Plasmiden für die Expression der entsprechenden Proteine wurden als Glycerinkultur bei -80°C gelagert. Als Wachstumsmedium zur Aufzucht der Stämme SWM1 und JP17 wurde ein Minimalmedium (GEAU) und für JM109 ein LB-Medium verwendet, als Antibiotika wurden Chloramphenicol für SWM1 und Ampicillin für JP17 und JM109 benutzt.

<u>Minimalmedium mit Uracil (MinUra)</u>

60 mM (10,46 g/l) K_2HPO_4

40 mM (5,52 g/l) NaH_2PO_4

150 mM (1,98 g/l) $(NH_4)_2SO_4$

pH 7,0 mit NaOH

200 µM (22 mg/l) Uracil

steril autoklaviert

<u>27%(w/v) Glucose</u>

1,5 M (270 g/l) Glucose, steril autoklaviert

<u>1 M $MgSO_4$</u>

1 M (246 g/l) $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, steril autoklaviert

<u>ArgEntThi</u>

40 mM (6,17 g/l) 2,3-Dihydroxybenzoesäure

800 mM (168,6 g/l) L-Arginin-Hydrochlorid

2 mM (675 mg/l) Thiamin-Hydrochlorid

pH 7,0 mit NaOH; steril filtriert

<u>Trace Elements (TE)</u>

14 mM (4,03 g/l) $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$

1 mM (170 mg/l) $MnSO_4 \cdot H_2O$

3 mM (190 mg/l) H_3BO_3

700 µM (120 mg/l) $CaSO_4 \cdot 2\ H_2O$

2,9 mM (370 mg/l) $CaCl_2 \cdot H_2O$

1,8 mM (290 mg/l) $FeCl_3$

steril autoklaviert

<u>Ampicillin (Amp)</u>

50 mg/ml Ampicillin, steril filtriert

<u>Chloramphenicol (Cm)</u>

15 mg/ml Chloramphenicol, steril filtriert

<u>GEAU-Medium</u>

pro ml sterilem MinUra:

20 µl 27% Glucose

1 µl 1 M $MgSO_4$

1 µl ArgEntThi

1 µl TE

<u>Luria-Bertani-(LB-)Medium</u>

10 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

pH 7,5 mit NaOH; steril autoklaviert

GEAU- bzw. LB-Medium mit Antibiotikum

pro ml GEAU- bzw. LB-Medium:

1 µl Cm bzw. Amp

Agarplatten mit GEAU- bzw. LB-Medium und Antibiotikum

pro Platte ca.:

25 ml GEAU-Medium (ohne ArgEntThi) bzw. LB-Medium

500 mg Agar

im Medium suspendiertes Agar steril autoklavieren und abkühlen lassen, unter Rühren bei 40-50°C pro ml Lösung

1 µl Cm bzw. Amp

bei GEAU (ohne ArgEntThi) Zugabe von

1 µl ArgEntThi

Die Platten wurden gegossen und nach der Verfestigung des Gels über Nacht bei Raumtemperatur oder 37°C belassen.

Beimpfte Agar-Platten

Die Platten wurden mit einer gefrorenen Glycerinkultur des gewünschten Bakterienstamms beimpft. Der Aufstrich wurde 2-3 mal auf derselben Platte verdünnt. Nach 1-2 Tagen Inkubation bei 37°C sind die ersten Bakterienkolonien sichtbar gewachsen.

Anzucht-Übernachtkulturen

20 ml GEAU- bzw. LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum werden mit isolierten, kreisrunden Bakterienkolonien von den beimpften Agarplatten inkubiert und für 15-18 h bei 37°C geschüttelt.

Glycerinkulturen

0,5 ml der fertigen Anzucht-Übernachtkulturen wurden zu 0,5 ml sterilem Glycerin in einem Eppendorf-Röhrchen gegeben, verschlossen und gut gemischt. Das Röhrchen wurde nach ca. 30-

60 min Inkubation bei Raumtemperatur in flüssigem Stickstoff 2-3 min schockgefroren und bei -80°C gelagert.

IPTG-Lösung

1 M (242 mg/ml) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Weiterzucht-Übernachtkulturen bzw. Großkulturen

1 ml (bei SWM1 und JP17) bzw. 20 ml (bei JM109) der fertigen Anzucht-Übernachtkulturen wurden zu 500 ml GEAU- bzw. LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben.
Die Weiterzucht-Übernachtkulturen (SWM1 bzw. JP17 in GEAU-Medium mit Chloramphenicol bzw. Ampicillin) wurden für 15-18 h bei 37°C geschüttelt.
Die Großkulturen (JM109 in LB-Medium mit Ampicillin) wurden bei 37°C geschüttelt. Alle 30 min wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen. Bei einer OD_{600} größer als 0,5 (nach 2-3 h) wurde pro ml Kulturmedium 1 µl IPTG-Lösung zugegeben und bis zu einem kaum mehr zunehmenden OD_{600}-Wert weitergeschüttelt (3-4 h). Sodann wurden die Kulturen auf 0-4°C abgekühlt.

Fermentermedium (5 × MinUra mit optionalen Zusätzen)

300 mM (52,3 g/l) K_2HPO_4
200 mM (27,6 g/l) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
75 mM (9,9 g/l) $(NH_4)_2SO_4$
evtl. 1,25 g/l Bacto-Trypton (für SWM1)
evtl. 630 mg/l Hefeextrakt (für SWM1)
pH 7,0 mit NaOH
2 mM (220 mg/l) Uracil
steril autoklavieren

Fermenter-Zusatzmedium

1,5 M (270 g/l) Glucose
2,5%(v/v) 1 M $MgSO_4$
2,5%(v/v) TE
steril autoklavieren
5%(v/v) ArgEntThi
2,5%(v/v) Cm bzw. Amp

Fermenter-Aufzucht

In einem auf 37°C erwärmten 14 l-Fermenter mit 2 l Fermentermedium, 8 l sterilem Wasser und 400 ml Fermenter-Zusatzmedium wurden 2 l der Weiterzucht-Übernachtkulturen gegeben. Alle 30 min wurde die OD_{600} gemessen. Kurz vor Erreichen des stationären Zustands der Zellvermehrung, d.h. bevor die Stagnation von OD_{600} erreicht war (nach etwa 4-6 h), wurde das Kulturmedium aus dem Fermenter entfernt und auf 0-4°C abgekühlt.

STEM-Puffer

100 mM (22,9 g/l) TES
20 mM (4,07 g/l) $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
250 µM (95 mg/l) EGTA
40 mM (5,0 g/l) EACA
6 mM (1,0 g/l) PAB-Hydrochlorid
500 µM (77 mg/l) DTT (für JP17)
250 mM (85,5 g/l) Sucrose
pH 7,0 mit NaOH

TM-Puffer

50 mM (6,06 g/l) Tris
10 mM (2,03 g/l) $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$
pH 8,0 mit HCl

Ernte und Reinigung der Zellen

Alle weiteren Schritte bis zu den isolierten und aufgereinigten Proteinen wurden unter Kühlung (0-4°C) durchgeführt. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 10000×g (Beckman JA 10, 8000 rpm) vom Medium getrennt und deren Naßgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden pro Gramm Zellen in 1 ml STEM-(bei SWM1 und JP17) bzw. 5-10 ml TM-Puffer (bei JM109) resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert, vom Überstand getrennt und resuspendiert. Die Suspensionen wurden bei -80°C eingefroren und max. 10 Tage gelagert.

5.2.3 Isolierung und Aufreinigung der F_1-ATPase aus *E. coli*

Die Isolierung und Aufreinigung der F_1-ATPase aus den Zellen von SWM1 und JP17 erfolgte im wesentlichen nach einem Verfahren von Wise (1990), welches an wenigen Stellen modifiziert wurde.

<u>TEM-Puffer</u>
100 mM (22,9 g/l) TES
20 mM (4,0 g/l) $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$
250 µM (100 mg/l) EGTA
40 mM (5,0 g/l) EACA
6 mM (1,0 g/l) PAB-Hydrochlorid
500 µM (77 mg/l) DTT (für JP17)
pH 7,0 mit NaOH

<u>TES50-Puffer mit PAB</u>
50 mM (11.46 g/l) TES
5%(v/v) Glycerin
1 mM (372 mg/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
40 mM (5,0 g/l) EACA
6 mM (1,0 g/l) PAB-Hydrochlorid
500 µM (77 mg/l) DTT
pH 7,0 mit NaOH

<u>TES5-Puffer mit PAB</u>
5 mM (1,15 g/l) TES
5%(v/v) Glycerin
1 mM (372 mg/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
40 mM (5,0 g/l) EACA
6 mM (1,0 g/l) PAB-Hydrochlorid
500 µM (77 mg/l) DTT
pH 7,0 mit NaOH

<u>TES5-Puffer ohne PAB</u>

s. Angaben zu ‘TES5-Puffer mit PAB’, ohne PAB-Anteil

<u>PMSF-Lösung</u>

200 mM (31,6 mg/ml) Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol

<u>10 × Salze</u>

500 mM (60,6 g/l) Tris

20 mM (7,45 g/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat

10 mM (6,05 g/l) ATP-Dinatriumsalz-Trihydrat

10 mM (1,54 g/l) DTT

40 mM (5,0 g/l) EACA

pH 7,4 (für EF_1) bzw. 7,0 (für EF_{1C}) mit HCl

<u>Säulenpuffer A</u>

10%(v/v) 10 × Salze

10%(v/v) Glycerin

pH 7,4 (für EF_1) bzw. 7,0 (für EF_{1C}) überprüfen

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter Kühlung (0-4°C) durchgefürt. Die aufgetauten Suspensionen der *E. coli*-Zellen wurden mit einer Spatelspitze (2-4 mg) DNAse I sowie 5-10 µl PMSF-Lösung pro Gramm Zellen versetzt und zweimal mit zwischenzeitiger Kühlung (2-3 min) bei einem Druck von 250-300 kp/cm² (French Pressure Cell) aufgeschlossen. Nach 20 min Zentrifugation bei 40000×g (JA 20, 15000 rpm) wurde der Überstand mit den dabei entstandenen Inside-Out-Vesikeln vorsichtig abdekantiert, je nach Volumen mit 30-40%(v/v) TEM-Puffer aufgefüllt und einer Ultrazentrifugation bei 130000×g (70Ti, 62000 rpm, 3h) unterzogen. Das Pellet wurde in PAB-haltigem TES50-Puffer aufgenommen, vorsichtig mit einem Pinsel resuspendiert, mit PAB-haltigem TES50-Puffer aufgefüllt und wie oben ultrazentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet zunächst in PAB-haltigem TES5-Puffer resuspendiert, mit gleichem Puffer aufgefüllt und wie oben ultrazentrifugiert (2 h). Das nach diesem Schritt erhaltene Sediment enthält die weitgehend von löslichen Proteinen gereinigten Membranvesikel mit der F_0F_1-ATPase, die als Suspension in PAB-haltigem TES5-Puffer für mehrere Monate bei -80°C haltbar ist. Sodann wurde der obige Arbeitsschritt mit PAB-freiem TES5-Puffer zweimal wiederholt (2 und 1,5 h Ultrazentrifugation), um den F_1-Teil der ATP-Synthase vom F_0-Teil zu trennen. Die Überstände dieser Schritte wurden unter Rühren pro ml Volumen nacheinander mit

50 µl 1M (229 g/l) TES (pH 7,0),
2 µl 1M (154 g/l) DTT und
50 µl 1M (203,3 g/l) $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$

versetzt, der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert (JA 14, 13000 rpm, 20 min) und die Lösung unter Rühren pro ml mit

280 µl 50%(w/v) Polyethylenglykol (PEG) 6000-Lösung

versetzt, um die F_1-ATPase auszufällen. Nach 10 min Rühren und 30 min Zentrifugation (JA 14, 13000 rpm) wurde das Pellet von der PEG-Lösung getrennt und in den JA 14-Zentrifugenbechern kopfüber über Nacht gelagert, um die restliche Lösung gründlich abzutrennen. Das Pellet wurde schließlich in 15-20 ml Säulenpuffer A resuspendiert und nochmals zentrifugiert (JA 20, 15000 rpm, 30 min). Der Überstand wurde direkt auf eine mit Säulenpuffer A equilibrierte DEAE 52-Ionentauscher-Säule (16 × 1,5 cm) aufgetragen, mit etwa 200 ml Säulenpuffer A gewaschen und mit insgesamt 400 ml eines linearen, 0-500 mM (0-71 g/l) Na_2SO_4-Gradienten in Säulenpuffer A eluiert. Die Elution wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 nm verfolgt und es werden Fraktionen zu je 3-4 ml gesammelt. Das gewünschte Protein eluierte bei 100-200 mM Na_2SO_4. Zur zuverlässigen Bestimmung der Proteinfraktionen wurden diese auf Proteingehalt und ATPase-Aktivität hin untersucht. Die Hauptfraktion der Proteinbande enthält die am besten gereinigte F_1-ATPase (s. Abb. 3.2 und 3.27). Die verschiedenen ATPase-haltigen Fraktionen wurden bis zu einem Volumen von ca. 1-2 ml aufkonzentriert (Amicon 8050-Konzentrator mit PM-30-Membran) und konnten bei -80°C eingefroren gelagert werden.

5.2.4 Nucleotidbefreiung der F_1-ATPase von SWM1

Die Befreiung des Proteins von intrinsischen Nucleotiden wurde nach einer von Senior *et al.* (1992) modifizierten Vorschrift nach Garrett & Penefsky (1975) vorgenommen.

<u>TE-Puffer</u>

100 mM (12,1 g/l) Tris
4 mM (1,49 g/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
pH 8,0 mit HCl

TEG-Puffer
100 mM (12,1 g/l) Tris
4 mM (1,49 g/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
50%(v/v) Glycerin
pH 8,0 mit HCl, entgast

Ca. 5-10 mg der ATPase in 1-3 ml Lagerungspuffer (Säulenpuffer A mit Na_2SO_4) wurden bei 0-4°C mit dem doppelten Volumen an kalter, gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt und gemischt. Der Niederschlag wurde für 1-2 h gekühlt und dann abzentrifugiert (15 ml-Corex-Zentrifugenglas in JA 20, 15000 rpm, 30 min, 0-4°C). Sodann erfolgte die Aufnahme in 500 µl TE-Puffer und eine erneute, wie oben beschriebene Fällung und Zentrifugation. Schließlich wurde der Niederschlag, nachdem er sorgfältig vom Überstand getrennt wurde, bei Raumtemperatur in 50-80 µl TEG-Puffer aufgenommen und nach Abtrennung des restlichen Niederschlags durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5-10 min bei 15000 rpm) auf eine mit TEG-Puffer equilibrierte Gelfiltrationssäule (Sephadex G-50 fine, 100 × 1,0 cm) aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte bei einer Flußrate von 0,5-1,0 ml/h und wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 nm verfolgt. Es wurden Fraktionen zu je ca. 400 µl gesammelt und deren UV-Absorptionsverhältnis 280/260 nm bestimmt, zur Nullpunkteinstellung diente eine nicht proteinhaltige Fraktion. Die proteinhaltigen Fraktionen mit Absorptionsverhältnissen von über 1,8 enthielten Protein mit einem Nucleotidgehalt unter 0,3 mol/mol und wurden gesammelt, bei 0-4°C auf 50-80 µl (Proteingehalt: 20-25 mg/ml) aufkonzentriert und bei -80°C eingefroren gelagert.

5.2.5 Isolierung und Aufreinigung von b_{syn} aus *E. coli*

Die Isolierung und Aufreinigung der wasserlöslichen Cysteinmutanten von b (b_{syn}) aus den Zellen von JM109 erfolgte im wesentlichen nach einer Vorschrift von McLachlin & Dunn (1997), welche stellenweise leicht modifiziert wurde.

PMSF-Lösung

(s. oben)

TED-Puffer
50 mM (6,06 g/l) Tris
1 mM (372 mg/l) EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
1 mM (154 mg/l) DTT
pH 8,0 mit HCl

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter Kühlung (0-4°C) durchgefürt. Die aufgetauten Zellen wurden mit 5-10 µl PMSF-Lösung pro g Zellen versetzt und zweimal für je 20-30 s mit Ultraschall behandelt. Zwischen den Beschallungen wurde die Lösung einige min lang abkühlen lassen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch 30 min Zentrifugation (JA 20, 15000 rpm, Bremsstufe 3) entfernt. Anschließend wurden feinere Niederschläge mit 1 h Zentrifugation bei 60000 rpm (70Ti-Rotor) entfernt. Unter Rühren wurden langsam zwei Drittel des Überstandsvolumens an gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Nach 2-3 h Rühren wurde das ausgefällte Protein mittels 30 min Zentrifugation bei (JA 20, 15000 rpm) abgetrennt und in 5-10 ml TED-Puffer aufgenommen. Diese Lösung wurde mindestens 12 h gegen 1 l TED-Puffer dialysiert.
Die dialysierte Proteinlösung wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Sepharose CL-6B, 20 × 1,5 cm, equilibriert mit TED-Puffer) aufgetragen und nach Waschen mit 2-3 Säulenvolumen TED-Puffer mit einem linearen Gradienten von insgesamt 300 ml 0-250 mM (0-14,6 g/l) NaCl in TED-Puffer eluiert. Die Elution des Proteins wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 nm verfolgt. Das gewünschte Protein eluierte bei etwa 120 mM NaCl. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt geprüft. Entsprechende Fraktionen des gewünschten Proteins waren ausreichend von Fremdproteinen befreit. Diese wurden gesammelt, auf einen Proteingehalt von mindestens 3-5 mg/ml aufkonzentriert (Amicon 8050-Konzentrator mit PM-10-Membranen) und konnten bei -80°C eingefroren gelagert werden.

5.3 Chemische Modifizierung der Proteine mit Spinlabeln

5.3.1 Chemische Modifizierung von β_{331C} der F_1-ATPase aus JP17 mit IOPI-SL

Die spezifische chemische Modifizierung des Cysteinrests in Position 331 der β-Untereinheit von F_1 wurde nach der Vorschrift von Kersten (1999) durchgeführt. Als Reagens für diese

Prozedur wurde die im Arbeitskreis synthetisierte Spinlabel-Verbindung 4-(3-Iodo-2-oxo-1-propyliden)-1-oxy-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin (IOPI-SL) verwendet [Kersten, 1999].

Nucleotid-Puffer
50 mM (8,71 g/l) K_2HPO_4
6 mM (3,63 g/l) ATP-Dinatriumsalz-Trihydrat
6 mM (1,48 g/l) $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
10%(v/v) Methanol
pH 7,0 mit HCl

N-Ethylmaleinimid-(NEM-)Lösung
300 mM (37,5 mg/ml) NEM in DMSO

TEG-Puffer mit DTT
s. unter 'TEG-Puffer', zusätzlich mit
500 mM (77 g/l) DTT,
pH 7,0 mit HCl

ESR-Puffer
50 mM (6,06 g/l) Tris
1 mM (247 mg/l) $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
pH 7,0 mit HCl, entgast

ESR-Puffer mit Glycerin
s. 'ESR-Puffer', zusätzlich mit
10%(v/v) Glycerin

IOPI-SL-Reagenslösung
20 mM (6,74 mg/ml) IOPI-SL in DMF

Zur NEM-Maskierung wurden 10-15 mg des ATPase-Cysteinmutanten (EF_{1C}) im Lagerungspuffer (Säulenpuffer A) aufgetaut und bei Bedarf bei 0-4°C auf 0,5-1 ml eingeengt, mit kaltem Nucleotid-Puffer auf 3 ml aufgefüllt und 10 min auf Eiswasser inkubiert. Sodann wurde die Lösung 15 min bei 50000 rpm (155000×g) zentrifugiert (SW 60Ti, 4°C), der Überstand bei

0-4°C auf ca. 100 µl eingeengt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Der Proteingehalt der Probe wurde bestimmt und ein 144-facher molarer Überschuß an NEM hinzugesetzt. Nach kurzem Mischen wird die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei alle frei zugänglichen Cysteinreste außer denen in den katalytischen Nucleotidbindungsstellen von β mit dem NEM reagierten. Das entstandene Pellet wurde im Eppendorf-Gefäß 5 min bei 14000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine mit DTT-haltigem TEG-Puffer equilibrierte Gelfiltrationssäule (Sephadex G-50 fine, 65 × 1,0 cm) aufgetragen und mit demselben Puffer bei einer Flußrate von 500-800 µl/h eluiert, um den Überschuß an NEM, ATP und intrinsischen Nukleotiden zu entfernen. Die Elution wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 nm verfolgt und es wurden Fraktionen zu je 400 µl gesammelt. Von den proteinhaltigen Fraktionen wurde das Absorptionsverhältnis 280/260 nm bestimmt. Fraktionen mit einem Quotienten größer als 1.3 haben einen Nucleotidgehalt von weniger als 1,3 mol pro mol Protein, welches in den β-Untereinheiten praktisch nucleotidfrei ist [Kersten, 1999]. Sie wurden vereinigt und bei 0-4°C auf 300-500 µl aufkonzentriert. Nach der Bestimmung des Proteingehalts und einer quantitativen Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurde die Proteinlösung bei -80°C eingefroren über Nacht gelagert.

Vor der chemischen Modifizierung des Proteins mit dem Spinlabel-Reagens wurde das in DTT-haltigem TEG-Puffer aufbewahrte, NEM-maskierte Protein auf eine mit ESR-Puffer equilibrierte Gelfiltrationssäule (Sephadex G-50 fine, 40 × 1,0 cm) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer equilibriert. Die Elution der ATPase wurde erneut mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 nm verfolgt. Die erste Bande im Elutionsdiagramm entsprach dem DTT-befreiten Protein-Eluat. Dieses wurde unter Argon gesammelt, mit 10%(v/v) Glycerin versetzt und sofort auf 0-4°C gekühlt. Nach der Bestimmung des Proteingehalts wurden etwa 300 µg Protein für einen Thiolgruppen-Test nach Ellman entnommen. In diesem Stadium hatte das Enzym drei frei zugängliche Cysteinreste. Der Rest der Lösung wurde mit einem auf die Proteinmenge vor der letzten Gelfiltrationssäule bezogenen 30-fachen molaren Überschuß an IOPI-SL bei Raumtemperatur versetzt, gut gemischt und 10-15 min auf Eiswasser inkubiert. Nach einer Aufkonzentrierung des Gemischs auf 100-300 µl bei 0-4°C wurden dreimal 2 ml glycerinhaltiger ESR-Puffer zugesetzt und die Lösung jeweils wie zuvor auf weniger als 100 µl aufkonzentriert, um überschüssiges SL-Reagens möglichst quantitativ zu entfernen. Schließlich wurden erneut Proteingehalt und -Aktivität sowie mit etwa 300 µg Protein die Anzahl der freien Thiolgruppen ermittelt. Die Lösung wurde in Aliquote von 230-250 µg F_1 aufgeteilt und konnte bei -80°C eingefroren gelagert werden.

5.3.2 Chemische Modifizierung von b_{syn} aus JM109 mit IAAT-SL

Die spezifische chemische Modifizierung der Cysteinmutanten der wasserlöslichen b-Untereinheiten von F_1 (b_{syn}) an ihren freien Thiolgruppen wurde nach der Vorschrift von Kersten (1999) durchgeführt. Als Reagens für diese Prozedur wurde die im Arbeitskreis synthetisierte Spinlabel-Verbindung 4-(2-Iodacetamido)-1-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (IAAT-SL) verwendet [Kersten, 1999].

<u>HMK-Puffer</u>
10 mM (2,38 g/l) HEPES
5 mM (1,23 g/l) $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
300 mM (22,4 g/l) KCl
pH 7,0 mit NaOH, entgast

<u>IAAT-SL-Reagenslösung</u>
200 mM (65,6 mg/ml) Iodacetamid-TEMPO-Spinlabel in Acetonitril

Nachfolgende Arbeitsschritte wurden durchgehend unter Kühlung (0-4°C) durchgeführt. 2-3 mg b_{syn} in maximal 1-2 ml TED-Puffer wurden mit HMK-Puffer über eine Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25f, 15 × 1,5 cm, mit HMK-Puffer equilibriert) umgepuffert. Die Elution wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 nm beobachtet. Die erste auftretende Bande im Elutionsdiagramm war das Absorptionssignal des Proteins. Die entsprechende Proteinfraktion wurde unter Argon gesammelt und deren Proteingehalt wurde bestimmt. Nach der Entnahme von etwa 100 µg Protein für die Bestimmung der Anzahl der freien Thiolgruppen wurde sofort die 20-fache molare Menge an IAAT-SL-Reagens, berechnet aus der anfangs verwendeten Proteinmenge, zugesetzt. Nach ca. 1 h Schütteln wurde das nicht umgesetzte IAAT-SL-Reagens durch einen erneuten Säulengang mit o.g. Gelfiltrationssäule und HMK-Puffer abgetrennt und das Protein bis zu 5-10 mg/ml (100-300 µl Lösung) aufkonzentriert. Der Proteingehalt wurde ermittelt und für die Bestimmung der Anzahl der verbliebenen freien Thiolgruppen wurden etwa 100 µg Protein entnommen. Der Rest der Proteinlösung wurde bei -80°C gefroren gelagert.

5.4 Vorbereitung der Protein-Meßproben für die ESR-Spektroskopie

5.4.1 Umpufferung der F_1-ATPase

Vor der Vermessung mit ESR-Spektroskopie wurde das in Säulenpuffer A gelöste Protein auf zwei verschiedenen Wegen in einen Puffer frei von DTT und Nucleotid überführt.

<u>TG-Puffer</u>
50 mM (6,06 g/l) Tris
10%(v/v) Glycerin
pH 8,0 mit HCl

<u>TMG-Puffer</u>
50 mM (6,06 g/l) Tris
x mM (203·x mg/l) $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$
10%(v/v) Glycerin
pH 8,0 mit HCl

5.4.1.1 Umpufferung mit kleinen Gelfiltrationssäulen

Etwa 2 mg der in Säulenpuffer A gelagerten F_1-ATPase wurden zunächst auf 60-80 µl aufkonzentriert (Proteingehalt ca. 25 mg/ml) und ein- bis zweimal über Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-50 fine, 5 cm × 5 mm, equilibriert mit TG- oder TMG-Puffer), welche vorher entwässert wurden (Hettich-Tischzentrifuge, max. Beschleunigung, 3000 rpm, 60 s), umgepuffert (Hettich-Tischzentrifuge, max. Beschleunigung, 3000 rpm, 60-65 s) [vgl. Penefsky, 1977]. Der Proteingehalt der Lösung wurde zuletzt bestimmt.

5.4.1.2 Umpufferung mit Mikrokonzentratoren

Etwa 2 mg der in Säulenpuffer A gelagerten F_1-ATPase wurden bei 0-4°C auf etwa 100 µl aufkonzentriert und mit 2 ml TM- oder TMG-Puffer aufgefüllt. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Prozedur wurde die Lösung auf 40-50 µl aufkonzentriert und schließlich deren Proteingehalt bestimmt.

Das Protein war nach einer der beiden oberen Prozeduren für den Zusatz von SL-Substrat und die ESR-Vermessung vorbereitet.

5.4.2 Herstellung der Meßproben von (spinmarkierter) F_1-ATPase mit spinmarkiertem b_{syn}

<u>HMKG-Puffer</u>
s. unter 'HMK-Puffer', zusätzlich mit
10%(v/v) Glycerin

<u>KCl-Puffer mit Glycerin</u>
50 mM (6,06 g/l) Tris
3 M (224 g/l) KCl
10%(v/v) Glycerin
pH 7,0 mit HCl

Ein 230 µg-Aliquot von der F_1-ATPase in *x* µl TG-, TMG- oder glycerinhaltigem ESR-Puffer wurde mit 18,4 µg spinmarkiertem b_{syn} in *y* µl HMK-Puffer, 0,11·*x* µl glycerinhaltigem KCl-Puffer und (15-1,11·*x*-*y*) µl HMKG-Puffer versetzt und gemischt. Die Probe war nach dieser Prozedur fertig für die ESR-Vermessung vorbereitet.

5.5 Analytik

5.5.1 Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung

Die Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Proteine erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976).

<u>Bradford-Reagens</u>
400 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250
10%(v/v) Ethanol
34%(w/v) H_3PO_4
vor Gebrauch mit H_2O auf ein Fünftel des Volumens verdünnen und filtrieren

BSA-Standardlösung
50 mM (6,06 g/l) Tris
1 mg/ml BSA
pH 7,0 mit HCl

Ca. 5-10 µg Protein in *x* µl einer Lösung, deren Konzentration bestimmt werden sollte, wurden mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und unter Mischen mit 1 ml Bradford-Reagens versetzt. Zur Quantifizierung der Proteinmenge lieferten je 0, 3, 5, 10 und 15 µg BSA in gleich vielen µl Lösung, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Reagens versetzt, die Eichwerte. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

5.5.2 ATPase-Aktivitätstest

5.5.2.1 Aktivitätstest mit ATP als Substrat

Die Aktivität des Enzyms wurde durch Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats (P_i) bestimmt und basierte auf einem von Taussky und Shorr (1953) entwickelten Verfahren.

ATPase-Cocktail I
50 mM (6,06 g/l) Tris
10 mM (6,05 g/l) ATP-Dinatriumsalz-Trihydrat
4 mM (812 mg/l) $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$
pH 8,5 mit HCl

Phosphat-Standardlösung
5 mM (600 mg/l) NaH_2PO_4 (wasserfrei)

Stock-Lösung
30%(w/w) H_2SO_4
10%(w/w) $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$
in bidestilliertem H_2O

Phosphat-Reagens
10%(v/v) Stock-Lösung

5%(w/v) $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
in bidestilliertem H_2O, frisch angesetzt

Eingesetzt wurden 1-2 µg F_1, die bei 30°C mit 500 µl ATPase-Cocktail I inkubiert wurden (kurzes Mischen) und deren Hydrolysereaktion nach einer genauen Zeitspanne zwischen 5 und 10 min mit Zugabe von 500 µl 10% (w/v) SDS unter kurzem Schütteln beendet wurde. Als Referenzprobe diente jeweils die gleiche Menge F_1, die bei derselben Temperatur zuerst mit 500 µl SDS-Lösung und dann mit 500 µl ATPase-Cocktail I versetzt wurde. Zur Quantifizierung der Phosphatmenge lieferten je 1 ml 0, 25, 50, 125 und 250 µM Phosphat-Standardlösung die Eichwerte.
Zu allen o.g. Lösungen wurden je 500 µl Phosphat-Reagenz hinzugegeben (kurzes Mischen) und für eine genaue Zeitspanne zwischen 10 und 12 min belassen. Schließlich wurde die Absorption aller Proben bei einer Wellenlänge von 700 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität (Einheit: Units, [U]) ist definiert als µmol produziertes P_i pro min. Die spezifische Aktivität wird in Units pro mg Enzym [$U \cdot mg^{-1}$] angegeben.

5.5.2.2 Aktivitätstest mit SL-ATP als Substrat*

Die Aktivität des Enzyms wurde durch Bestimmung der SL-Nucleosiddi- und triphosphatmengen mit Hilfe von HPLC ermittelt, da die Menge des umgesetzten Substrats bzw. des produzierten Phosphats zu gering für eine Erfassung mit der Taussky-Shorr-Methode war.

<u>ATPase-Cocktail II</u>
50 mM (6,06 g/l) Tris
1 mM (747 mg/l) SL*-ATP-Tetranatriumsalz
x mM (203·*x* mg/l) $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$
pH 8,5 mit HCl

Eingesetzt wurden Proteinlösungen mit ca. 5 µg F_1, welche mit ATPase-Cocktail II auf 250 µl aufgefüllt bei 30°C inkubiert wurden (kurzes Mischen) und deren Hydrolysereaktion nach exakt 2 h durch Hitze-Denaturierung (2 min, 100°C) gestoppt wurde. Als Referenz diente das Volumen der jeweiligen Proteinlösungen an TM-Puffer, welcher mit ATPase-Cocktail II auf 250 µl aufgefüllt und in der gleichen Art und Weise wie oben behandelt wurde. Nach der Denaturierung wurde das Pellet zweimal durch 15 min Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 15000 rpm) abgetrennt. Die Stoffmenge der Nucleotide im Überstand wurde mit analytischer HPLC (System I, s. Kap. 5.5.8) über definierte Volumina und Integration der Peakflächen ermittelt, wobei zuvor eine Standardkurve mit verschiedenen definierten Stoffmengen an SL-Nucleotid (5, 10, 25 und 50 nmol SL*-ATP) aufgestellt wurde. Die Retentionszeiten (t_R) für SL*-ADP und SL*-ATP betrugen 9,0 und 11,2 min.

5.5.3 Bestimmung intrinsisch gebundener Nucleotide der ATPasen

Nach der Nukleotidbefreiung der ATPasen und deren Überführung in ESR-bzw. T(M)G-Puffer wurden nach der Bestimmung des Proteingehalts ca. 200 µg F_1 hitzedenaturiert (2 min, 100°C) und das Pellet zweimal mit 15 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15000 rpm) abgetrennt. Die Konzentration der Nucleotide im Überstand wurde mit analytischer HPLC (System I, s. Kap. 5.5.8) über definierte Volumina und Integration der Peakflächen ermittelt, wobei zuvor eine Kalibrierung mit verschiedenen definierten Nucleotid-Stoffmengen (5, 10, 25 und 50 nmol ADP bzw. ATP) durchgeführt wurde. Die Retentionszeiten für ADP und ATP betrugen 4,4 und 6,9 min.

5.5.4 Bestimmung der Anzahl frei zugänglicher Thiolgruppen in den Proteinen

Die Anzahl der freien Thiolgruppen der verschiedenen Proteine wurde nach dem Verfahren von Ellman (1959) bestimmt.

<u>Phosphat-Puffer</u>
50 mM (8,71 g/l) K_2HPO_4
pH 7,5 mit HCl

<u>Ellman's Reagens</u>
12 mM (4,76 g/l) DTNB in Phosphat-Puffer

Jeweils 100-150 µg F_1 bzw. 100 µg b_{syn} in DTT-freiem Puffer wurden mit Phosphat-Puffer auf 400 µl aufgefüllt und mit 100 µl Ellman's Reagens versetzt. Als Referenz dient eine Lösung aus 400 µl Phosphat-Puffer mit 100 µl Ellman's Reagens, die Einstellung des Absorptions-Nullwerts wurde mit Phosphat-Puffer vorgenommen. Probe und Referenz wurden unter gleichen Bedingungen vermischt, in Quarzküvetten eingefüllt und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen. Das Stoffmengenverhältnis von Thiolgruppen und Protein errechnet sich zu

$$\frac{n_{SH}}{n_P} = \frac{\Delta E}{\varepsilon_{TNB} \cdot c_P \cdot d} \qquad (5.1),$$

ΔE Absorptionsdifferenz von Probe und Referenz

ε_{TNB} molarer Extinktionskoeffizient von 2-Nitrobenzoesäure-5-thiophenolat bei $\lambda = 412$ nm, pH 7,5 und unter Standardbedingungen (= 13600 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

d Schichtdicke [cm]

c_P Konzentration des Proteins [M]

5.5.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Überprüfung der Reinheit des Proteins wird mit einer SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970) mit Modifikationen von Smith (1984) durchgeführt.

5.5.6 UV-Spektroskopie

5.5.6.1 Nucleotid-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Adenosin-Nucleotide und deren Derivate in wässriger Lösung wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 259 nm bestimmt. Die Proben wurden jeweils mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) verdünnt und vermessen. Der Absorptions-Nullwert wurde mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) eingestellt. Für den molaren Extinktionskoeffizienten von Adenin bei $\lambda = 259$ nm gilt $\varepsilon_{Ade} = 15300\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$ unter Standardbedingungen.

5.5.6.2 Bestimmung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums

Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums (λ_{max}) der Nucleotide wurde durch einen Wellenlängen-Scan von 200-400 nm ermittelt. Die Nucleotidproben wurden wie oben mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) verdünnt und vermessen. Die Einstellung des Absorptions-Nullwerts erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

5.5.7 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die Analytik von Nucleotiden mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie wurde mit zwei Systemen durchgeführt.

System I

Stationäre Phase: Polygram SIL G/UV_{254} (80 × 40 × 0,25 mm)

mobile Phase: n-Propanol / 25%(v/v) NH_4OH / H_2O, 20:12:3 (v/v/v)

Detektion: λ = 254 nm

System II

Stationäre Phase: RP-18 F_{254}s (100 × 50 × 0,25 mm)

mobile Phase: 100 mM LiCl in 10%(v/v) Isopropanol

Detektion: λ = 254 nm

5.5.8 HPLC

Die Analytik von Nucleotiden mit Hilfe der HPLC wurde mit drei Systemen durchgeführt.

System I

Säule: Partisil 10 SAX (25 cm × 4,6 mm)

mobile Phase: 0,8 M NaH_2PO_4 (pH ≈ 4,0)

Detektion: λ = 259 nm

Flußrate: 1,0 ml/min

System IIa

Säule: Spherisorb C8, 5 µm (25 cm × 6 mm)

mobile Phase: 10 mM Natriumacetat in 45%(v/v) Methanol; pH 6,5

Detektion: λ = 259 nm

Flußrate: 1,5 ml/min

System IIb

Säule: Spherisorb C8, 5 µm (25 cm × 6 mm) mobile Phase: 50 mM KH_2PO_4 in 12%(v/v) Acetonitril; pH 5,5

Detektion: $\lambda = 259$ nm

Flußrate: 1,5 ml/min

5.6 Synthesen

5.6.1 1-Oxy-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

Die Oxidation des Amins wurde weitestgehend nach einer Vorschrift von Brière *et al.* (1965) durchgeführt.

Ansatz:
34,5 g (223 mmol) 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
1,25 g Phosphorwolframsäure
13,5 g (400 mmol) H_2O_2

34,5 g (223 mmol) 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin wurden in 170 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 1,25 g Phosphorwolframsäure, gelöst in 10 ml bidestilliertem Wasser, versetzt. Sodann wurden 41 ml einer 30%(w/v) H_2O_2-Lösung langsam zugetropft und die Mischung nach 15 min Rühren unter Wasserbad-Kühlung weitere 3 bis 4 Stunden gerührt. Die Lösung wurde nach Sättigung mit NaCl dreimal mit je 150 ml Ether extrahiert und die etherische Phase wurde danach zweimal mit je 100 ml 0,5 M H_2SO_4 extrahiert. Die wässrige Phase wurde wiederum dreimal mit je 50 ml Ether ausgeschüttelt, anschließend verworfen und die etherische Phase zweimal mit je 125 ml gesättigter K_2CO_3-Lösung extrahiert, über $MgSO_4$ getrocknet und abfiltriert ($MgSO_4$-Rückstand mit wenigen ml Ether waschen). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 22,5 g (132 mmol) des Produkts in Form roter Kristalle wie nach Literatur erhalten. Ausbeute: 61% (Lit.: 75%), Smp. 35-36°C (Lit.: 36°C)

Alle nachfolgenden Synthesen bis zum 1-Acetoxy-4-methoxy-2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin wurden nach der Vorschrift von Alessi *et al.* (1991) durchgeführt.

5.6.2 1-Acetoxy-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

Ansatz:

14,2 g (83,5 mmol) 1-Oxy-4-oxo-2,2,6,6–tetramethylpiperidin

26,7 g (135 mmol) Natriumascorbat

45,4 ml (482 mmol) Essigsäureanhydrid

14,2 g (83,5 mmol) 1-Oxy-4-oxo-2,2,6,6–tetramethylpiperidin wurden durch sachtes Erwärmen geschmolzen und mit einer Lösung von 26,7 g (135 mmol) Natriumascorbat in 230 ml H_2O versetzt. Die Lösung wurde 5 min heftig gerührt (Farbe wechselt von dunkelrot bis blaßgelb), anschließend mit 570 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung verdünnt und auf Eis gekühlt. Innerhalb von 2 min wurden 45,4 ml (482 mmol) Essigsäureanhydrid zu der gerührten Mischung (pH 8) gegeben. Danach wurde portionsweise festes $NaHCO_3$ vorsichtig zugegeben, um den pH-Wert zu halten, bis dieser sich nicht mehr ändert (ca. 1 h). Die Mischung wurde dreimal mit je 150 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten etherischen Extrakte wurden zweimal mit je 200 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und im Vakuum getrocknet, um das Ketoacetat-Produkt als blaßen Feststoff zu erhalten. Das Produkt wurde aus Hexan umkristallisiert. Es wurden 10,8 g (51 mmol) des Produkts als Feststoff erhalten. Ausbeute: 61% (Lit.: 94%), Smp. 95°C (Lit.: 95-95,5°C)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ[ppm] = 1,15 (s, 12 H, $C\underline{H}_3$), 2,06 (s, 3 H, $C\underline{H}_3CO$), 2,75 und 2,15 (AX-q, 4 H, $C\underline{H}_2$), Standard: δ = 7,23 ($C\underline{H}Cl_3$)

[Lit. (90 MHz, $CDCl_3$): δ[ppm] = 1,21 (s, 12 H, $C\underline{H}_3$), 2,14 (s, 3 H, $C\underline{H}_3CO$), 2,78 und 2,25 (AX-q, 4 H, J_{gem} = 12,7 Hz, $C\underline{H}_2$)]

5.6.3 1-Acetoxy-4,4-dimethoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

Ansatz:

10,8 g (51 mmol) 1-Acetoxy-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

0,97 g (5,1 mmol) Toluolsulfonsäure-Monohydrat

115 ml (1,05 mol) Trimethylorthoformiat

10,8 g (51 mmol) Ketoacetat-Rohprodukt des letzten Syntheseschritts und 0,97 g (5,1 mmol) Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 115 ml Methanol wurden mit 115 ml (1,05 mol)

Trimethylorthoformiat versetzt und die Lösung unter Rückfluß 2 h erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurden 345 ml 3%(w/v) $NaHCO_3$-Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung wurde mit NaCl gesättigt. Nach dreimaligem Extrahieren der Lösung mit je 100 ml Ether wurden die vereinigten etherischen Extrakte mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde der ölige Rückstand im Vakuum destilliert. Vom Ketal-Produkt wurden 10,5 g (41 mmol) als blaße Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 80% (Lit.: 91%), Sdp. 60-61°C bei 0,1 mmHg (Lit.: 84°C bei 0,5 mmHg)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ[ppm] = 1,1 (s, 6 H, $C\underline{H}_3$), 1,3 (s, 6 H, $C\underline{H}_3$), 1,95 (AB-q, 4 H, $C\underline{H}_2$), 2,15 (s, 3 H, $C\underline{H}_3CO$), 3,2 (s, 6 H, $OC\underline{H}_3$), Standard: δ = 7,3 ($C\underline{H}Cl_3$)
[Lit. (90 MHz, $CDCl_3$): δ[ppm] = 1,08 (s, 6 H, $C\underline{H}_3$), 1,28 (s, 6 H, $C\underline{H}_3$), 1,89 (AB-q, 4 H, J_{gem} = 12,6 Hz, $C\underline{H}_2$), 2,08 (s, 3 H, $C\underline{H}_3CO$), 3,16 (s, 6 H, $OC\underline{H}_3$)]

5.6.4 1-Acetoxy-4-methoxy-2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin

Ansatz:
684 mg (3,6 mmol) Toluolsulfonsäure-Monohydrat
10,5 g (41 mmol) 1-Acetoxy-4,4-dimethoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

In einen Kolben mit Rührer und Wasserabscheider mit Rückflußkühler wurde eine Lösung von 684 mg (3,6 mmol) Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 400 ml Toluol unter Rückfluß erhitzt, bis kein Wasser mehr abgetrennt wurde (ca. 30 min). Das Wasser wurde abgelassen und 10,5 g (41 mmol) Ketal-Produkt des letzten Syntheseschritts in 25 ml Toluol wurden zu der oberen Lösung gegeben. Die Mischung wurde 30 min unter Rückflüß erhitzt und die Inhalte der Falle wurden währenddessen zweimal abgelassen, um vorhandenes Methanol zu entfernen. Nach der Abkühlung wurde die Mischung zweimal mit 200 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die etherische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das erhaltene Öl durch Vakuum-Destillation gereinigt (Sdp. 73°C bei 0,07 mmHg). Es wurden 8,1 g (35,6 mmol) des Enolether-Produkts als blaßes Öl erhalten, welches sich bei 4°C zu einem wachsartigen Stoff verfestigte. Ausbeute: 87% (Lit.: 91%), Smp. 37-38°C (Lit.: 37-40°C)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ[ppm] = 1,13 (s, 9 H, $C\underline{H}_3$), 1,22 (s, 3 H, $C\underline{H}_3$), 1,73 und 2,07 (d, 1 H, 1× 5-$\underline{H}$), 2,05 (s, 3 H, $C\underline{H}_3CO$), 2,35 und 2,62 (dd, 1 H, 1× 5-$\underline{H}$), 3,45 (s, 3 H, $OC\underline{H}_3$), 4,33 (d, 1 H, 3-$\underline{H}$), Standard: δ = 7,23 ($C\underline{H}Cl_3$)
[Lit. (90 MHz, $CDCl_3$): δ[ppm] = 1,16 (s, 3 H, $C\underline{H}_3$), 1,19 (s, 3 H, $C\underline{H}_3$), 1,21 (s, 3 H, $C\underline{H}_3$), 1,28 (s, 3 H, $C\underline{H}_3$), 1,93 (d, 1 H, J = 16,5 Hz, 1× 5-$\underline{H}$), 2,11 (s, 3 H, $C\underline{H}_3CO$), 2,53 (dd, 1 H, J = 16,5 und 1 Hz, 1× 5-$\underline{H}$), 3,49 (s, 3 H, $OC\underline{H}_3$), 4,40 (d, 1 H, J = 1 Hz, 3-$\underline{H}$)]

Elementaranalyse: Bruttoformel $C_{12}H_{21}NO_3$, M_r = 227,3;
Gewichtsanteile, ber. (gef.) C 63,4% (62,9%), H 9,3% (9,0%), N 6,2% (6,5%)

5.6.5 2’,3’-O-(1-Acetoxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-AMP

Die Synthese des Acetoxy-Spiroketal-AMP wurde weitestgehend nach der Vorschrift von Alessi *et al.* (1992) mit einigen kleineren Modifikationen durchgeführt.

Ansatz:
1,1 g (3 mmol) Adenosin-5´-monophosphorsäure-Monohydrat
2,86 g (15 mmol) Toluolsulfonsäure-Monohydrat
10 g (44 mmol) 1-Acetoxy-4-methoxy-2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin

1,1 g (3 mmol) Adenosin-5´-monophosphorsäure-Monohydrat wurden in 25 ml wasserfreiem DMF suspendiert und bei 35°C im Hochvakuum getrocknet. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt, um das Nukleotid vom Wasser zu befreien. Gleichzeitig wurden 2,86 g (15 mmol) Toluolsulfonsäure-Monohydrat analog zur oberen Prozedur viermal mit je 25 ml wasserfreiem Acetonitril versetzt und getrocknet, und zusammen mit 10 g (44 mmol) des Enolether-Produkts des letzten Syntheseschritts in 220 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst. Diese Lösung wurde schnell der getrockneten AMP-Säure zugegeben. Die Mischung blieb in einem verschlossenen Glaskolben unter Rühren und Schutzgas bei Raumtemperatur für 7 Tage stehen. Das ungelöste AMP wurde abfiltiert, der Rückstand mit wenigen ml Acetonitril gewaschen und das Filtrat mit 1,5 l 10 mM TEAB (pH 7,4) versetzt. Danach wurde die Reaktionsmischung dreimal mit je 250 ml Petrolether extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit Triethylamin auf pH 7,4 eingestellt und über eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Sephadex A-25, 50 × 2,5 cm, Bicarbonat-Form, mit 10 mM TEAB bei pH 7,4 equilibiert) gegeben (Flußrate: ca. 80 ml/h). Danach wurde die Säule mit 10 mM TEAB (pH 7,4) gewaschen, bis die Absorption bei λ = 254 nm auf Null zurückgegangen war. Die Mischung wurde mit einem linearen Gradienten aus 1,5 l 10-250 mM TEAB (pH 7,4) eluiert (Flußrate: jeweils ca. 80 ml/h). Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm verfolgt, Produkt und AMP eluierten bei etwa 130 bzw. 160-170 mM TEAB. Die gesammelten Fraktionen wurden mit Dünnschichtchromatographie (System I) auf ihre relativen Fließgeschwindigkeiten (R_f-Werte) untersucht. Fraktionen, die das Acetoxy-Spiroketal-AMP enthielten, wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Der restliche TEAB-Puffer in der Trockensubstanz wurde durch wiederholte Aufnahme in einigen ml Methanol mit anschließendem Trocknen im Vakuum entfernt. Es wurden ca. 370 mg (ca. 500 µmol) des Acetoxy-Spiroketal-AMP als Triethylammoniumsalz erhalten und bei -80°C gelagert. Ausbeute: 17% (Lit.: 20%)

UV:	λ_{max} = 259,5 nm	
DC:	System I	R_f = 0,62 (Produkt), 0,25 (AMP)
	System II	R_f = 0,53 (Produkt), 0,75 (AMP)
HPLC:	System I	t_R = 6,6 min (Produkt), 3,7 min (AMP)
	System IIa	t_R = 3,4 min (Produkt), 1,5 min (AMP) [Lit.: 3,3 bzw. 1,5 min]
	System IIb	t_R = 17,0 min (Produkt), 1,7 min (AMP)

5.6.6 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-AMP (SL*-AMP)

Die Entfernung der Acetylgruppe des Piperidyliden-Rests im AMP-Derivat wurde nach der Vorschrift von Alessi *et al.* (1992) mit geringfügigen Änderungen durchgeführt.

Ansatz:
150 mg (200 µmol) 2',3'-O-(1-Acetoxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-AMP
660 mg (11,8 mmol) KOH

Ca. 150 mg (200 µmol) des Acetoxy-Spiroketal-AMP als Triethylammoniumsalz wurden in 30 ml 50%(v/v) Methanol gelöst und zu einer Lösung von 10 ml 6%(w/v) KOH in Methanol gegeben. Ein auftretender Niederschlag wurde durch portionsweise Zugabe von einigen ml 50% Methanol in Lösung gebracht. Nach 60 h Reaktion bei Raumtemperatur im offenen Gefäß und unter gelegentlichem Umrühren wurde die Reaktionsmischung mit ca. 10 ml 1 M HCl neutralisiert und mit 300 ml 10 mM TEAB (pH 7,4) verdünnt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Sephadex A-25, 30 × 2 cm, Bicarbonat-Form, mit 10 mM TEAB bei pH 7,4 equilibriert) gegeben (Flußrate: 75 ml/h). Die Säule wurde nach Waschen mit 300 ml 10 mM TEAB (pH 7,4) mit einem linearen Gradienten von 1 l 10-300 mM TEAB (pH 7,4) eluiert. Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm verfolgt. Das Produkt eluierte bei 140-160 mM TEAB. Die Fraktionen wurden mit DC (System I) und ESR-Spektroskopie untersucht und diejenigen mit dem verseiften Spiroketal-AMP wurden gesammelt und gefriergetrocknet. Pufferreste im Rückstand wurden durch wiederholte Aufnahme in einigen ml Methanol mit anschließendem Trocknen im Vakuum entfernt. Es wurden ca. 120 mg (ca. 170 µmol) SL*-AMP als Triethylammonium-Salz erhalten. Ausbeute: 85% (Lit.: 90%)

UV: λ_{max} = 259,5 nm
DC: System I R_f = 0,60 (Produkt), 0,26 (AMP)
System II R_f = 0,56 (Produkt), 0,75 (AMP)
HPLC: System I t_R = 8,1 min (Produkt), 3,7 min (AMP)
System IIb t_R = 10,3 min (Produkt), 1,7 min (AMP)
ESR: A = 16,6 G
Signalamplituden-Verhältnis Hochfeldsignal/Mittelfeldsignal = 0,64

5.6.7 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP (SL*-ATP)

Die Darstellung des Bis-(trioctylammonium)-bis-pyridinium-pyrophosphats für die Phosphorylierung von 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-AMP wurde basierend auf einer Arbeitskreis-Vorschrift [Zirkel, 1986] durchgeführt. Es wurden hierbei einige zusätzliche Veränderungen vorgenommen.
Ansatz:
850 mg (4,75 mmol) Pyrophosphorsäure
4,2 ml (9,5 mmol) Trioctylamin
15 ml (190 mmol) Pyridin

Unter Schutzgas wurden 850 mg (4,75 mmol) Pyrophosphorsäure, 4,2 ml (9,5 mmol) Trioctylamin und 15 ml wasserfreies Pyridin in 15 ml wasserfreiem Methanol aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum abgezogen. Sodann wurde der Rückstand zweimal in je 15 ml wasserfreiem Pyridin und anschließend zweimal in je 15 ml wasserfreiem DMF aufgenommen und jeweils wie oben getrocknet. Zuletzt wurde der Rückstand in 10 ml wasserfreiem DMF gelöst.

Die Darstellung von 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-ATP wurde nach der Vorschrift von Alessi *et al.* (1992) mit geringen Änderungen durchgeführt.

Ansatz:
120 mg (170 µmol) 2',3'-O-(1-Oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyliden)-AMP (TEA-Salz)
7 ml (90 mmol) Pyridin
75 µl (170 µmol) Trioctylamin
56 mg (340 µmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol
35 µl (1 mmol) Methanol
4,95 g (4,75 mmol) Bis-(trioctylammonium)-bis-pyridinium-pyrophosphat

Ca. 120 mg (170 µmol) des SL*-AMP-Triethylammoniumsalzes in 7 ml wasserfreiem Pyridin wurden unter Schutzgas mit 75 µl (170 µmol) Trioctylamin versetzt und bei 35°C im Hochvakuum zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde dreimal in je 7 ml wasserfreiem DMF gelöst, wie oben getrocknet und danach schließlich in 3 ml wasserfreiem DMF gelöst. Diese Lösung wurde mit 56 mg (340 µmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) versetzt und für mindestens 5 h unter Schutzgas gerührt. Sodann wurden 35 µl (1 mmol) wasserfreies Methanol zugegeben und das gesamte Lösungsmittel 45 min später im Hochvakuum entfernt.
Zu der trockenen Masse mit dem aktivierten AMP-Derivat wurden die 4,95 g (4,75 mmol) Bis-(trioctylammonium)-bis-pyridinium-pyrophosphat in 10 ml wasserfreiem DMF schnell zugesetzt. Nach 48 h heftigem Rühren unter Schutzgas wurde die Reaktionsmischung zu 300 ml 10 mM TEAB-Lösung (pH 7,4) gegeben, zweimal mit 50 ml Ether extrahiert und der pH-Wert der wässrigen Phase mit Triethylamin auf 7,4 eingestellt. Danach wurde die Lösung über eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Sephadex A-25, 25 × 2 cm, Bicarbonat-Form, wie oben equilibriert) gegeben (Flußrate: s.o.) und nach Waschung mit 250 ml 10 mM TEAB mit 800 ml eines linearen Gradienten von 10-400 mM TEAB (pH 7,4) eluiert (Flußrate: s.o.). Die Elution wurde wie gewohnt verfolgt. Das Produkt eluierte nach dem Edukt bei 330-350 mM TEAB. Nucleotidhaltige Fraktionen wurden mit DC (System I) in der üblichen Weise untersucht. Fraktionen mit dem Produkt (SL*-ATP) wurden aufkonzentriert und wie oben mehrfach mit Methanol im Hochvakuum vom überschüssigen TEAB-Puffer befreit. Es wurden ca. 85 mg (80 µmol) des Produkts als Triethylammoniumsalz erhalten. Ausbeute: 47% (Lit.: 68%).

Vom Produkt wurden etwa 10 µmol in 100 µl Wasser gelöst und über eine Kationenaustauscher-Säule (Dowex 50W-X 8, 5 cm × 5 mm, Na^+-Form, Flußrate: ca. 100 µl/min) ins entsprechende Natriumsalz überführt.

UV: λ_{max} = 259,5 nm
DC: System I R_f = 0,12 (Produkt), 0,05 (ATP)
System II R_f = 0,79 (Produkt), 0,91 (ATP)
HPLC: System I t_R = 11,0 min (Produkt), 6,9 min (ATP)
System IIb t_R = 3,1 min (Produkt), 1,4 min (ATP) [Lit.: 3,0 min (Produkt)]
ESR: A = 16,7 G
Signalamplituden-Verhältnis Hochfeldsignal/Mittelfeldsignal = 0,57

5.7 ESR-Spektroskopie

5.7.1 Raumtemperatur-Spektren

5.7.1.1 Cavity-Typ 4102 ST/8410

Geräte-Standardeinstellungen:

Temperatur	295 K
Receiver Gain	$5{,}0 \cdot 10^5$
Modulationsfrequenz	100 kHz
Modulationsamplitude	1.0 G
Konversionszeit	164 ms
Zeitkonstante	41 ms
Zentralfeld	3420 G
Spektrenbreite	120 G
Auflösung	2048 pts
Mikrowellenfrequenz	9,59 GHz
Mikrowellenleistung	6,32 mW

5.7.1.2 Cavity-Typ ER 4118 SPT-NI

Geräte-Standardeinstellungen: s. unter ‘Cavity-Typ 4102 ST/8410’, mit den Änderungen

Zentralfeld	3460 G
Mikrowellenfrequenz	9,70 GHz

5.7.2 Tieftemperatur-Spektren mit dem Cavity-Typ ER 4118 SPT-NI

Geräte-Standardeinstellungen: s. unter ‘Cavity-Typ 4102 ST/8410’, mit den Änderungen

Temperatur	193 K
Modulationsamplitude	2.0 G
Zeitkonstante	164 ms
Zentralfeld	3470 G
Auflösung	4096 pts
Mikrowellenfrequenz	9,74 GHz
Mikrowellenleistung	100 µW

5.8 Molecular Modelling

Die Molekülmodelle für die Systeme EF_1/SL-ATP und b_{syn}·IAAT-Fragmente wurden mit dem Programm Quanta 97 von Fa. Molecular Simulations erstellt.

6. Literatur

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., Walker, J. E., *Nature* **370** (1994) 621-8

Aggeler, R., Weinreich, F., Capaldi, R. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1230** (1995) 62-8

Alessi, D. R., Corrie, J. E. T., Feeney, J., Trayer, I. P., Trentham, D. R., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** (1991) 2243-7

Alessi, D. R., Corrie, J. E. T., Fajer, P. G., Ferenczi, M. A., Thomas, D. D., Trayer, I. P., Trentham, D. R., *Biochemistry* **31** (1992) 8043-54

Aris, J. P., Simoni, R. D., *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 14599-609

Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J.-L., Kruip, J., Hisabori, T., Yoshida, M., Shibata, M., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 865-70

Bianchet, M. A., Hullihen, J., Pederson, P. L., Amzel, L. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 11065-70

Boos, K.-S., Lüstorff, J., Schlimme, E., Hesse, H., Strotmann, H., *FEBS Lett.* **71** (1976) 124-9

Boyer, P. D., *FASEB J.* **3** (1989) 2164-78

Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-54

Breuer, E., Aurich, H. G., Nielsen, A., „Nitrones, Nitronates and Nitroxides“, Wiley-Verlag (1989)

Brière, R., Lemaire, H., Rassat, A., *Bull. Soc. Chim. France* **11** (1965) 3273-83

Bulygin, V. V., Duncan, T. M., Cross, R. L., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 31765-9

Burgard, S., Nett, J. H., Sauer, H. E., Kagawa, Y., Schäfer, H.-J., Wise, J. G., Vogel, P. D., Trommer, W. E., *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 17815-9

Cross, R. L., Nalin, C. M., *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 2874-81

Cross, R. L., in: Ernster, L. (Hrsg.), „Molecular Mechanisms in Bioenergetics“, Elsevier Science Publishers (1992), S. 317-30

Cross, R. L., *Nature* **370** (1994) 594-5

Dallmann, H. G., Flynn, T. G., Dunn, S. D., *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 18953-60

Dimroth, P., Kaim, G., Matthey, U., *Biochim. Biophys. Acta* **1365** (1998) 87-92

Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L., Cross, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) 10964-8

Dunn, S. D., *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 7630-6

Dunn, S. D., Chandler, J., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 8646-51

Ellman, G. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **82** (1959) 70

Elston, T., Wang, H., Oster, G., *Nature* **391** (1998) 510-3

Engelbrecht, S., Junge, W., *Biochim. Biophys. Acta* **1015** (1990) 379-90

Engelbrecht, S., Junge, W., *FEBS Lett.* **414** (1997) 485-91

Fillingame, R. H., Jones, P. C., Jiang, W., Valijaveetil, F. I., Dmitriev, O. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **1365** (1998) 135-42

Fischer, E., *Ber.* **53** (1920) 1621

Fromknecht, K., Dissertation, Universität Kaiserslautern (1999)

Galla, H.-J., „Spektroskopische Methoden in der Biochemie“, Thieme-Verlag (1988)

Garrett, N. E., Penefsky, H. S., *J. Biol. Chem.* **250** (1975) 6640-7

Gräber, P., *Biochim. Biophys. Acta* **1187** (1994) 171-6

Harris, D. A., *Biochim. Biophys. Acta* **463** (1978) 245-73

Hermolin, J., Gallant, J., Fillingame, R. H., *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 14550-5

Howitt, S. M., Rodgers, A. J. W., Jeffrey, P. D., Cox, G. B., *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 7038-42

Hwang, J. S., Mason, R. P., Hwang, L.-P., Freed, J. H., *J. Phys. Chem.* **79** (1975) 489-511

Issartel, J. P., Lunardi, J., Vignais, P. V., *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 895-901

Jiang, W., Fillingame, R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 6607-12

Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S., *Trends Biochem. Sci.* **22** (1997) 420-3

Kayalar, C., Rosing, J., Boyer, P. D., *Fed. Proc.* **35** (1976) 1601

Kayalar, C., Rosing, J., Boyer, P. D., *J. Biol. Chem.* **252** (1977) 2486-91

Kersten, M., Dissertation, Universität Kaiserslautern (1999)

Klinke, R., Silbernagl, S., „Lehrbuch der Physiologie“, 2. Aufl., Thieme-Verlag (1996)

Kokorin, A. I., Zamaraev, K. I., Grigorian, G. L., Ivanov, V. P., Rozantsev, E. G., *Biofizika* **17** (1972) 34-41

Koolmann, J., Röhm, K.-H., „Taschenatlas der Biochemie“, Thieme-Verlag (1994)

Kraft, G., Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1995)

Kuchling, H., „Taschenbuch der Physik“, 12. Aufl., Deutsch-Verlag (1989)

Laemmli, U. K., *Nature* **227** (1970) 680-5

Laget, P. P., Smith, J. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **197** (1979) 83-9

Likhtenshtein, G. I., „Spin Labeling Methods in Molecular Biology“, Wiley-Verlag (1976)

Likhtenshtein, G. I., „Biophysical Labeling Methods in Molecular Biology“, Cambridge University Press (1993)

Lösel, R. M., Erbse, A. H., Nett, J. H., Wise, J. G., Berger, G., Girauld, G., Vogel, P. D., *Spectrochim. Acta A* **52** (1996) 73-83

Lösel, R. M., Wise, J. G., Vogel, P. D., *Biochemistry* **36** (1997) 1188-93

Lötscher, H. R., de Jong, C., Capaldi, R. A., *Biochemistry* **23** (1984) 4134-40

McLachlin, D. T., Dunn, S. D., *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 21233-9

McLachlin, D. T., Bestard, J. A., Dunn, S. D., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 15162-8

Motz, C., Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1995)

Motz, C., Dissertation, Universität Kaiserslautern (1999)

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr., *Nature* **386** (1997) 299-302

Nordio, P. L., in: Berliner, L. J. (Hrsg.), „Spin Labeling - Theory and Applications“, Academic Press (1976), S. 5-52

Onur, G., Schäfer, G., Strotmann, H., *Z. Naturforsch.* **38c** (1983) 49-59

Penefsky, H. S., *J. Biol. Chem.* **252** (1977) 2891-9

Pitard, B., Richard, P., Dunach, M., Rigaud, J., *Eur. J. Biochem.* **235** (1996) 779-88

Poole, C. P. Jr., „Electron Spin Resonance - A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques“, 2. Aufl., Wiley-Verlag (1983)

Rabenstein, M. D., Shin, Y.-K., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** (1995) 8239-43

Rao, R., Al-Shawi, M. K., Senior, A. E., *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 5569-73

Rao, R., Pagan, J., Senior, A. E., *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 15957-63

Rodgers, A. J. W., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M. B., Howitt, S. M., Capaldi, R. A., *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 31058-64

Rodgers, A. J. W., Capaldi, R. A., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 29406-10

Sabbert, D., Engelbrecht, S., Junge, W., *Nature* **381** (1996) 623-5

Sabbert, D., Engelbrecht, S., Junge, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 4401-5

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Bdd.1-3), Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)

Schneider, E., Altendorf, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (1984) 7279-83

Schneider, E., Altendorf, K., *EMBO J.* **4** (1985) 515-8

Schneider, F., Plato, M., „Elektronenspin-Resonanz, Experimentelle Technik“, Thiemig-Verlag (1971)

Senior, A. E., Downie, J. A., Cox, G. B., Gibson, F., Langman, L., Fayle, D. R. H., *Biochem. J.* **180** (1979) 103-9

Senior, A. E., Wise, J. G., *J. Membrane Biol.* **73** (1983) 105-24

Senior, A. E., Al-Shawi, M. K., *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 21471-8

Senior, A. E., Lee, R. S.-F., Al-Shawi, M. K., Weber, J., *Arch. Biochem. Biophys.* **297** (1992) 340-4

Smith, B. J., in: Walker, J. M. (Hrsg.), „Methods in Molecular Biology“ (Bd. 1), Humana Press (1984), S. 41-56

Sorgen, P. L., Bubb, M. R., McCormick, K. A., Edison, A. S., Cain, B. D., *Biochemistry* **37** (1998) 923-32

Sorgen, P. L., Caviston, T. L., Perry, R. C., Cain, B. D., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 27873-8

Stryer, L., „Biochemie“, 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag (1996)

Sundaralingam, M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **255** (1975) 3-43

Taussky, H. H., Shorr, E., *J. Biol. Chem.* **202** (1953) 675-85

Tso, P. O. P. (Hrsg.), in: „Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry“ (Bd. 1), Academic Press (1974), S. 453-517

Valiyaveetil, F. I., Fillingame, R. H., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 16241-7

Vogel, P. D., Nett, J. H., Sauer, H. E., Schmadel, K., Cross, R. L., Trommer, W. E., *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 11982-6

Watts, S. D., Zhang, Y., Fillingame, R. H., Capaldi, R. A., *FEBS Lett.* **368** (1995) 235-8

Weber, J., Bowman, C., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E., *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 21045-9

Weber, J., Senior, A. E., *Biochim. Biophys. Acta* **1319** (1997) 19-58

Weil, J. A., Bolton, J. R., Wertz, J. E., „Electron Paramagnetic Resonance - Elementary Theory and Practical Applications“, Wiley-Verlag (1994)

Wilkens, S., Dunn, S. D., Capaldi, R. A., *FEBS Lett.* **354** (1994) 37-40

Wilkens, S., Dunn, S. D., Chandler, J., Dahlquist, F. W., Capaldi, R. A., *Nature Struct. Biol.* **4** (1997) 198-201

Wilkens, S., Capaldi, R. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1365** (1998) 93-7

Wilkens, S., Capaldi, R. A., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 26645-51

Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, L. R., Cox, D. N., Senior, A. E., *Biochem. J.* **215** (1983) 343-50

Wise, J. G., *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 10403-9

Xü, Y. H., Gietzen, K., Galla, H.-J., *Int. J. Biol. Macromol.* **5** (1983) 154-8

Zirkel, J., Forschungsarbeit Biochemie, Universität Kaiserslautern (1986)

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Folgenden Personen möchte ich im Einzelnen herzlichst danken:

Den Herren Prof. Stanley D. Dunn und Dr. Derek T. McLachlin von der University of Western Ontario, London/Ontario (Kanada), für die Bereitstellung der Plasmide für die b_{syn}-Mutanten,

Herrn Dipl.-Chem. Christian Motz für die δ-freie EF_1-ATPase, die Mitarbeit bei so manchen EF_1- und b_{syn}-Arbeitsprozeduren und viele gute Ratschläge in den vergangenen Jahren,

Herrn Dr. Michael „Mike" Kersten für die Hilfe rund um die Isolierung und Handhabung der Cystein-Mutanten von EF_1 und b_{sol},

Herrn Dipl.-Chem. Thomas Schanding für die guten Tips bezüglich der Nucleotidsynthesen,

den Herren Dr. Klaus Schmadel und Dr. Reinhard Philipp für die Quanta 97-Molekülmodelle und sonstige Unterstützung bei computerrelevanten Angelegenheiten,

den Kollegen Dr. Dirk Chelius und Dr. Matthias Schneider für die formidable Fitness und Freude am Joggen,

den Dipl.-Chem.-Kollegen Markus Jehl, Ralf Milosavljevic und Christopher Winicker für die 'leichte Unterhaltung' in der Mittagspause,

den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für vier schöne Jahre in einer tollen und kollegialen Atmosphäre.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Gerhard Kraft
Anschrift:	Kurt-Schumacher-Str. 22 67663 Kaiserslautern
Telefon:	(06 31) 3 11 17 54
Geburtsdatum und -ort:	21.05.1970 in Neustadt a. d. Weinstraße
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Bildungsgang

1976-80	Grundschule Ruppertsberg/Deidesheim
1980-86	Staatl. Realschule Neustadt a. d. Weinstraße
06/1986	Abschluß Mittlere Reife
1986-89	Staatl. Käthe-Kollwitz-Gymnasium Neustadt a. d. Weinstraße
05/1989	Abitur
10/1989-05/1995	Chemie-Diplomstudium an der Universität Kaiserslautern
08/1994-05/1995	Diplomarbeit in der Fachrichtung Biochemie, Thema: „Untersuchung verschiedener bakterieller F_1-ATPasen mittels ESR-Spektroskopie und ESR-Spektrensimulation per Computer“
07/1995-04/1999	Dissertation, Thema: „F_0F_1-ATP-Synthase aus *Escherichia coli*: Untersuchung verschiedener Proteinsysteme mit ESR-Spektroskopie“
07.10.1999	Tag der wissenschaftlichen Aussprache