

**Die außergewöhnliche Diversität der Proteolipide
in *Archaea*: Multimere und monomere Rotoren mit
sechs bis dreizehn Ionenbindestellen in A_1A_0 -ATPasen**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
vorgelegt von
Claudia Weidner
aus Langenhagen
im August 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 2003

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. und Müller, V. (1998) The A_1A_0 ATPase from *Methanosarcina mazei*: cloning of the 5' end of the *aha* operon encoding the membrane domain and expression of the proteolipid in a membrane-bound form in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **180**: 3448-3452.

Müller, V., Ruppert, C. und Lemker, T. (1999) Structure and function of the A_1A_0 -ATPases from methanogenic Archaea. J. Bioenerg. Biomembr. **31**: 15-28.

Ruppert, C., Kavermann, H., Wimmers, S., Schmid, R., Kellermann, J., Lottspeich, F., Huber, H., Stetter, K. O. und Müller, V. (1999) The proteolipid of the A_1A_0 ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. J. Biol. Chem. **274**: 25281-25284

Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S. und Müller, V. (2001) Overproduction of a functional A_1 ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. **268**: 3744-3750.

Ruppert, C., Schmid, R., Hedderich, R. und Müller, V. (2001) Selective extraction of subunit D of the Na^+ -translocating methyltransferase and subunit *c* of the A_1A_0 ATPase from the cytoplasmic membrane of methanogenic archaea by chloroform/methanol and characterization of subunit *c* of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* as a 16-kDa proteolipid. FEMS Microbiol. Lett. **195**: 47-51.

Weidner, C. und Müller, V. (2003) A sodium ion-binding site in methanoarchaeal A_1A_0 ATPases deduced from gene sequences. eingereicht

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Verbreitung der ATPasen	2
1.2 Struktur und Funktion der ATPasen	6
1.2.1 Struktur und Funktion der F_1F_0 -ATPasen	6
1.2.2 Struktur und Funktion der V_1V_0 -ATPasen	13
1.2.3 Struktur und Funktion der A_1A_0 -ATPasen	16
1.2.4 Fragestellung der Arbeit	18
2. Methoden	19
2.1 Organismen und Plasmide	19
2.2 Nährmedien	21
2.2.1 Medien für Methanogene	21
2.2.1.1 Medium für <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	21
2.2.1.2 <i>Methanosarcina</i> -Komplexmedium	22
2.2.1.3 Medium für <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	23
2.2.1.4 Medium für <i>Methanothermobacter marburgensis</i>	24
2.3 Medium für <i>Escherichia coli</i>	25
2.3.1 Medienzusätze	25
2.4 Großanzucht von <i>M. mazei</i> Gö1	26
2.5 Bestimmung von Wachstumsparametern	27
2.5.1 Bestimmung der Gesamtgasmenge	27
2.5.2 Bestimmung der optischen Dichte	27
2.6 Membranpräparationen	27
2.7 Molekularbiologische Methoden	28
2.7.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	28
2.7.2 Standardmethoden	28
2.7.3 Isolierung von chromosomaler DNS	29
2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.8 Biochemische Methoden	30

2.8.1	Proteinbestimmung	30
2.8.2	Extraktion des Proteolipids und MtrD durch Chloroform/Methanol	30
2.8.3	Bestimmung der ATPase-Aktivität	31
2.8.4	Messen einer ATP-Neusynthese mit Hilfe von inkorporiertem $^{32}\text{P}_i$	31
2.8.5	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.8.6	Expression von <i>malE</i> -Fusionsgenen und Aufreinigung der Fusionsproteine	33
2.8.7	Herstellung von Antiseren	33
2.8.8	Western-Blot-Analyse	33
2.9	Radioaktive Markierung von Proteinen	34
2.10	Heterologe Genexpression in dem Minizell-Produzenten <i>E. coli</i> DK6	35
2.10.1	Markierung der heterolog in <i>E. coli</i> gebildeten Proteine mit ^{35}S -Methionin	35
2.11	Isolierung der Ether-Lipide aus <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> und <i>M. jannaschii</i>	36
2.11.1	Herstellung des Lipid-Rohextraktes	36
2.11.2	Fraktionierung der Lipide	36
2.12	Herstellung von Liposomen	37
2.13	Rekonstitution der $\text{A}_1\text{A}_\text{O}$ -ATPase aus <i>M. jannaschii</i> in Liposomen von <i>S. acidocaldarius</i> und <i>M. jannaschii</i>	37
2.14	MALDI-TOF-Analyse	38
2.15	Elektronenmikroskopie	39
2.16	Chemikalien, Enzyme und Gase	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	Das Proteolipid aus <i>M. jannaschii</i>	41
3.1.1	<i>In Vivo</i> -Markierung des Proteolipids mit ^{35}S -Methionin	41
3.1.2	Minizell-Analyse des heterolog exprimierten atpK	43
3.1.3	Chloroform/Methanol Extraktion des Proteolipids aus <i>M. jannaschii</i>	44
3.2	Koisolierung des Proteolipids und MtrD aus verschiedenen Methanoarchäen	50
3.2.1	Extraktion von AtpK und MtrD aus <i>M. mazei</i> Gö1	50
3.2.2	Extraktion von AtpK und MtrD aus <i>M. thermautotrophicus</i> und <i>M. marburgensis</i>	51
3.3	Rekonstitution der $\text{A}_1\text{A}_\text{O}$ -ATPase in Liposomen	54
3.3.1	Herstellung von Liposomen aus Lipiden von <i>S. acidocaldarius</i> und <i>M. jannaschii</i>	55
3.3.2	Rekonstitution der $\text{A}_1\text{A}_\text{O}$ -ATPase aus <i>M. jannaschii</i>	56

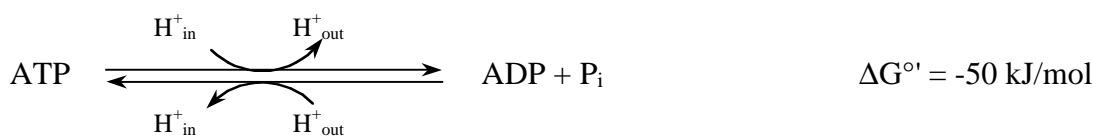
3.4	Heterologe Expression der A_1A_O -ATPase aus <i>M. mazei</i> in <i>E. coli</i>	61
3.4.1	Überproduktion einzelner A_1 -ATPase-Untereinheiten als MalE-Fusionen und Gewinnung von Antiseren	61
3.4.2	Klonierung von pRT1	63
3.4.3	Produktion der A_1A_O -ATPase aus <i>M. mazei</i> in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	65
4.	Diskussion	75
4.1	Die Biochemie der Methanogenese	75
4.2	Archäelle ATPasen	79
4.2.1	Molekulargenetische Organisation der bekannten archäellen ATPasen	79
4.2.2	Heterologe Überexpression der A_1A_O -ATPasen	83
4.2.3	Vergleich der A_1A_O ATPasen mit den V_1V_O - und den F_1F_O -ATPase	88
4.3	Archäelle Proteolipide	91
4.3.1	Die Struktur archäeller Proteolipide	91
4.3.2	Das Na^+ -Bindemotiv in archäellen Proteolipiden	94
4.4	Evolution der ATPasen	99
5.	Zusammenfassung	103
6.	Literatur	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Angström
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl
OD _x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
P _i	anorganisches Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminomethansulfonsäure
U	Unit
x g	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid

1. EINLEITUNG

Energie, die durch metabolische Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen gewonnen wird, muß für diverse Zellfunktionen konserviert werden. In lebenden Organismen wird diese chemische Energie entweder in Form von ATP oder als elektrochemischer Gradient gespeichert. Im zweiten Fall durchlaufen H^+ - oder Na^+ -Ionen membranständige ATP-Synthasen, in denen durch Konformationsänderungen des Enzyms aus ADP und anorganischem Phosphat ATP gebildet wird. ATPasen katalysieren die *in vitro* vollkommen reversible Reaktion:



Auch *in vivo* können die bisher bekannten A_1A_0 -ATPasen und die F_1F_0 -ATPasen ATP synthetisieren und hydrolysieren (CAPALDI *et al.*, 1996; FILLINGAME, 1999; MÜLLER *et al.*, 1999; WEBER und SENIOR, 1997; WEBER und SENIOR, 2000; MÜLLER und GRÜBER, 2003), wobei die Reaktionsrichtung thermodynamisch bestimmt wird. Die ATP-Synthase wandelt das elektrochemische Potential in ein chemisches Potential um. Beide Potentiale stehen über die transportierten Ionen miteinander in Verbindung:

$$\Delta G_p = n \cdot F \cdot \Delta \tilde{\mu}_{H^+}$$

n = translozierte Protonen

F = Faraday-Konstante

Das Phosphorylierungspotential (ΔG_p , $\text{ATP} \cdot (\text{ADP} + \text{P}_i)^{-1}$) ist dabei dem an der Membran anliegenden elektrochemischen Potential proportional. Bei einem physiologischen elektrochemischen Protonenpotential ($\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$) von -180 mV und einem ΔG_p von 50 – 70 kJ/mol müßten drei bis vier Protonen transloziert werden, um die Synthese eines Moleküls ATP zu ermöglichen. Umgekehrt werden bei der Hydrolyse eines Moleküls ATP maximal drei bis vier Protonen über die Cytoplasmamembran entgegen dem elektrochemischen Membranpotential transportiert. Demzufolge ist die Reaktionsrichtung abhängig von der Größe des elektrochemischen Potentials, dem Phosphorylierungspotential der Zelle und der Anzahl der transportierten Protonen. In gärenden Bakterien, die nicht über die Möglichkeit

einer elektronentransportgetriebenen H^+ -Translokation über die Cytoplasmamembran verfügen und ATP durch Substratkettenphosphorylierung synthetisieren, läuft die Reaktion überwiegend in Richtung der H^+ -Extrusion ab. In diesem Fall bewirkt die F_1F_0 -ATPase als primäre Protonenpumpe den Aufbau eines elektrochemischen Potentials, das als Triebkraft des sekundären Stofftransportes und der Flagellenrotation dient. Ist jedoch eine Elektronentransportkette vorhanden, liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der ATP-Synthese, und die F_1F_0 -ATPase fungiert als sekundärer Energiekonverter. Neben dem „Protonendruck“ verschiebt auch ein hoher ADP-Gehalt (kleines ΔG_P) das Gleichgewicht in Richtung der ATP-Synthese. Neben den unmittelbaren Faktoren können aber auch andere auftreten, die das Gleichgewicht beeinflussen. So verhindert die „Thiol-Modifikation“ der ATPase aus Pflanzen oder Cyanobakterien bei Dunkelheit die Hydrolyse des ATP, also unter Bedingungen, unter denen keine Photophosphorylierung stattfindet.

1.1 Verbreitung der ATPasen

Drei Klassen von ATPasen werden unterschieden (Abb. 1): die F_1F_0 -ATPasen, die vakuolären V_1V_0 -ATPasen und die archäellen A_1A_0 -ATPasen, die alle auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückzuführen sind (NELSON und NELSON, 1989; GOGARTEN *et al.*, 1989; GOGARTEN *et al.*, 1992b; KIBAK *et al.*, 1992; NELSON, 1992a). Betrachtet man archäelle, vakuoläre oder bakterielle ATPasen unter dem Elektronenmikroskop, weisen sie alle eine ähnliche, zweigeteilte Form auf: sie bestehen aus einem Köpfchen, das durch 2 - 3 Stiele mit einem Membrananker verbunden ist. Weitere Analysen zeigten, daß diese Enzyme aus mindestens acht nicht identischen Untereinheiten zusammengesetzt sind. F_1F_0 -ATPasen findet man in den Membranen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien. Die V_1V_0 -ATPasen wurden zuerst in Clathrin-ummantelten Vesikeln und später in anderen eukaryontischen Organellen gefunden (SKULACHEV, 1992). Erst in letzter Zeit konnte eine dritte Klasse von ATPasen identifiziert werden, nämlich die der archäellen A_1A_0 -ATPasen. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu den V_1V_0 -ATPasen wurden sie zunächst dieser Klasse zugeordnet, die funktionellen Eigenschaften und phylogenetische Analysen erforderten jedoch eine neue Einordnung.

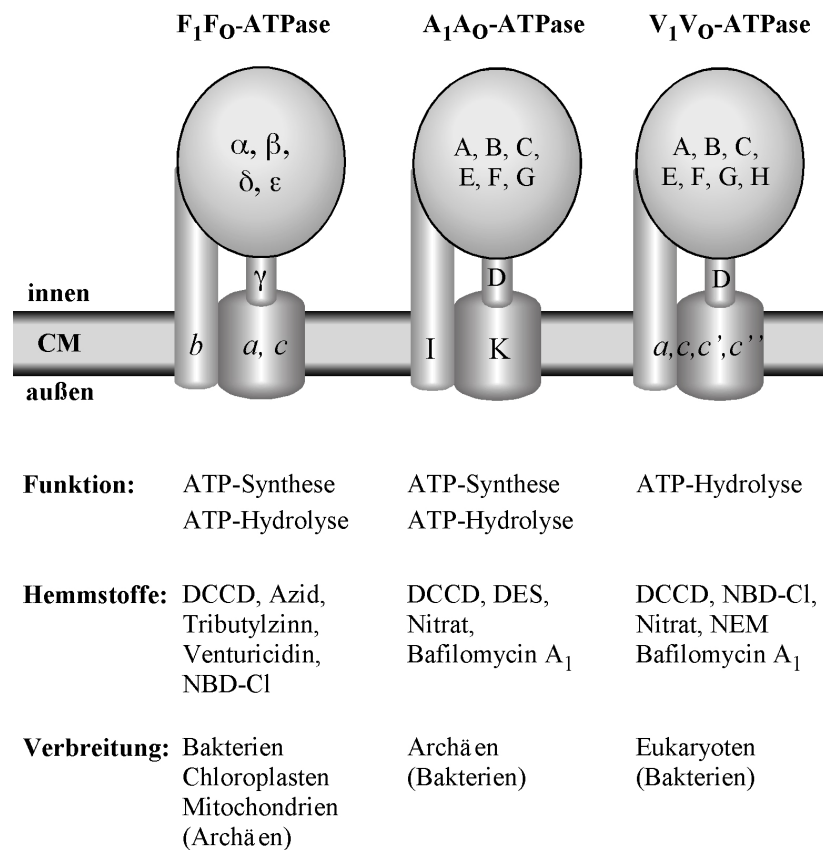


Abb. 1: Vergleich der F₁F₀-, A₁A₀- und V₁V₀-ATPasen. Es sind die Zusammensetzungen der F₁F₀-ATPase aus *E. coli*, der A₁A₀-ATPase aus *M. mazei* und der V₁V₀-ATPase aus *S. cerevisiae* gezeigt. Abkürzungen: CM, Cytoplasmamembran

Das Vorkommen der ATPasen läßt sich nicht exakt den jeweiligen Domänen zuordnen. Vielmehr finden sich auch in Bakterien ATPasen des vakuolären beziehungsweise archäellen Typs. So besitzt *Enterococcus hirae* eine als vakuolär bezeichnete ATPase, die überdies nicht H⁺, sondern Na⁺-Ionen über die Membran pumpt (HEEFNER und HAROLD, 1982; KAKINUMA und IGARASHI, 1994; KAKINUMA *et al.*, 1991; KAKINUMA *et al.*, 1993). Das stets als V-Typ-ATPase bezeichnete Enzym gruppiert interessanterweise jedoch in phylogenetischen Analysen der A-Untereinheit mit den Untereinheiten der A-ATPasen (HILARIO und GOGARTEN, 1998). *E. hirae* ist ein anaerobes, strikt fermentatives Bakterium, das nur durch Substratkettenphosphorylierung ATP bilden kann. Die V/A-ATPase wird allerdings nicht konstitutiv, sondern in Abhängigkeit des pH-Wertes produziert (KAKINUMA, 1987; KAKINUMA und IGARASHI, 1989; KAKINUMA und IGARASHI, 1990; WASER *et al.*, 1992). Unter alkalischen Bedingungen wird die Na⁺-abhängige ATPase synthetisiert, um auch in dieser bioenergetisch schwierigen Situation die Membran energetisieren zu können.

Weitere als V-Typ-ATPasen bezeichnete Enzyme wurden auch in *Caloramator* (früher *Clostridium*) *fervidus* und in verschiedenen Vertretern der Gattung *Thermus* gefunden, wobei die ATPase aus *T. thermophilus* HB27 in phylogenetischen Analysen der A-Untereinheiten mit den A_1A_0 -ATPasen gruppiert (HILARIO und GOGARTEN, 1998). Zudem wurde berichtet, daß die V-ATPase aus *T. thermophilus* HB8 zur ATP-Synthese befähigt ist (Yokoyama, 1998). Dieses Ergebnis weist auch auf archäellen Ursprung dieser ATPase hin, da die ATPasen vakuolären Typs unter physiologischen Bedingungen nicht zur ATP-Synthese befähigt sind. Von *C. fervidus* liegen noch keine Sequenzdaten vor, um genauere Analysen vornehmen zu können. Die V_1V_0 -ATPase aus *C. fervidus*, einem anaeroben, thermophilen Bakterium, ist ebenfalls Na^+ -abhängig (HÖNER ZU BENTRUP *et al.*, 1997). Die ATPase baut einen primären Na^+ -Gradienten auf, der dann den Transport von Aminosäuren und Peptiden, den Substraten des Bakteriums, ermöglicht (UBBINK-KOK *et al.*, 2000). Die Na^+ -abhängige V_1V_0 -ATPase wurde durch Hemmstoffanalysen, N-terminale Sequenzierung und immunologische Untersuchungen identifiziert (HÖNER ZU BENTRUP *et al.*, 1997). Aus *T. thermophilus* HB8 und HB27, *T. aquaticus* YT-1 und *Meiothermus* (früher *Thermus*) *chliarophilus* ALT-8 wurden ATPasen gereinigt, die durch immunologische und N-terminale Untersuchungen als V_1V_0 -ATPasen identifiziert wurden (YOKOYAMA *et al.*, 1994; RADAX *et al.*, 1998). Allerdings ist diese Einteilung bis zur Sequenzanalyse als vorläufig zu betrachten.

Die F-Typ-ATPasen treten ebenfalls nicht nur im Reich der *Bacteria* und in den Zellorganellen der *Eukarya*, sondern auch bei den *Archaea* auf. So wurde postuliert, daß die ATP-Synthese bei *Halorubrum saccharovororum* über eine F_1F_0 -ATPase verläuft (HOCHSTEIN, 1992; SCHOBERT, 1991). Hemmstoffanalysen an Membranvesikeln von *H. saccharovororum* bestätigten das Vorhandensein einer F_1F_0 -ATPase, während bei *Halobacterium salinarum* nur eine ATPase detektiert wurde, die wie eine ATPase vakuolären Typs reagierte (HOCHSTEIN und LAWSON, 1993). Da bisher aus Archäen jedoch noch keine F_1F_0 -ATPase gereinigt werden konnte, sind die Ergebnisse mit Vorbehalt zu betrachten.

Nicht nur bei den halophilen *Archaea* wurden F_1F_0 -ATPasen vermutet, sondern auch bei den Methanogenen. *Methanosarcina barkeri* MS und *Methanosarcina mazei* Gö1 bauen beide im Laufe der Methanogenese aus $H_2 + CO_2$ sowohl einen Protonen- als auch einen Natriumgradienten auf (MÜLLER *et al.*, 1988a; MÜLLER *et al.*, 1993; MÜLLER *et al.*, 1990; MÜLLER *et al.*, 1988b). Durch Zugabe von Ionophoren zu invertierten Membranvesikeln von *M. mazei* Gö1 konnte gezeigt werden, daß die Synthese von ATP an

beide Gradienten gekoppelt ist. Zudem waren die Synthesereaktionen entweder durch F_1F_0 -typische oder A_1A_0 -typische Inhibitoren hemmbar, was auf die gleichzeitige Existenz einer A-Typ- und einer F-Typ-ATPase schließen ließ (BECHER und MÜLLER, 1994). Die F_1F_0 -ATPase sollte dabei den Natrium-Gradienten nutzen, die A_1A_0 -ATPase den Protonen-Gradienten. Auch in *Methanothermobacter thermautotrophicus* (früher *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH ; SMIGAN *et al.*, 1988; SMIGAN *et al.*, 1994) und *Methanococcus voltae* (CRIDER *et al.*, 1985) wurden Na^+ -translozierende ATPasen vermutet. In *M. thermautotrophicus* sollte die Produktion des jeweiligen ATPase-Typs vom pH-Wert des Mediums abhängig sein (SMIGAN *et al.*, 1994; SMIGAN *et al.*, 1995). Bisher konnten allerdings keine F_1F_0 -ATPase aus den genannten Organismen oder anderen Methanogenen gereinigt werden. Weiterhin wurden in den Genomen von *M. mazei* Gö1 (DEPPENMEIER, 2002a) und *M. thermautotrophicus* (SMITH *et al.*, 1997) keine Gene identifiziert, die für F-Typ-ATPasen kodieren, womit die Existenz solcher Enzyme in diesen Organismen ausgeschlossen werden muß. In weiteren Genomen von Archäen wie *Methanocaldococcus jannaschii* (früher *Methanococcus jannaschii*), *Methanopyrus kandleri* AV19, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus abyssi* GE5, *P. furiosus*, *P. horikoshii* OT3, *Pyrobaculum aerophilum*, *Aeropyrum pernix*, *Halobacterium* Spezies NRC-1 und *Sulfolobus solfataricus* P2 konnten ebenfalls neben den archäellen ATPasen keine weiteren ATPasen detektiert werden (BULT *et al.*, 1996; SLESAREV *et al.*, 2002; KLENK *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/chrom?gi=143&db=G; ROBB *et al.*, 2001; FITZ-GIBBON *et al.*, 2002; KAWARABAYASI *et al.*, 1999; KAWARABAYASI *et al.*, 1998; NG *et al.*, 2000; SHE *et al.*, 2001). Der Arbeitsgruppe um Yoshida gelang es jedoch das für eine F_1F_0 -ATPase kodierende Operon aus *M. barkeri* MS zu sequenzieren (SUMI *et al.*, 1992; SUMI *et al.*, 1997). Allerdings konnten weder Expression noch F_1F_0 -ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (LEMKER, 1997), es handelt sich offenbar um ein kryptisches Operon. Im Genom von *Methanosarcina acetivorans* liegen neben Genen für eine A_1A_0 -ATPase auch Gene für eine F_1F_0 -ATPase vor (GALAGAN *et al.*, 2002), deren Expression noch nicht überprüft wurde.

Welche Bedeutung dem bei der Methanogenese aufgebauten Natrium-Gradienten zukommt, bleibt insbesondere vor dem Hintergrund der mehrfach beobachteten Na^+ -abhängigen ATPase-Aktivitäten noch zu klären.

1.2 Struktur und Funktion der ATPasen

1.2.1 Struktur und Funktion der F₁F₀-ATPase

Wie bereits erwähnt, setzen sich die ATPasen aus zwei Domänen zusammen, einer hydrophilen, an der ATP synthetisiert oder hydrolysiert wird (F₁, V₁, A₁) und einer hydrophoben, mit der die ATPase in der Membran verankert ist und durch die Ionen über die Membran transportiert werden (F₀, V₀, A₀). Die hydrophile und die hydrophobe Domäne sind mindestens über zwei Stiele miteinander verbunden. Am besten ist die F-Typ-ATPase aus *Escherichia coli* untersucht worden, in der diese beiden Domänen aus acht verschiedenen Untereinheiten in unterschiedlicher Kopienzahl aufgebaut sind. Die cytoplasmatische Domäne besteht aus den Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:3:1:1:1. Die Peptide a , b_2 und c_{10} bilden den membranständigen Teil (FOSTER und FILLINGAME, 1982; FILLINGAME *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 2001). Erst kürzlich zeigten Analysen weiterer F₀-Domänen aus anderen Spezies, daß die Anzahl der c -Untereinheiten zwischen 10 und 14 variiert (STOCK *et al.*, 1999; STAHLBERG *et al.*, 2001; SEELERT *et al.*, 2000).

Wie die Röntgenstrukturanalyse eines Kristalls der F₁-Domäne aus Rinderherz-Mitochondrien ergab, liegen die ATP-bindenden Untereinheiten α und β alternierend ringförmig als Hexamer vor (ABRAHAMS *et al.*, 1994). An den Zwischenflächen der zu 20% identischen Untereinheiten liegen sechs Nukleotid-Bindestellen (WALKER *et al.*, 1982), wobei β die eigentliche katalytische Untereinheit ist (ABRAHAMS *et al.*, 1994). Die 3 $\alpha\beta$ -Paare befinden sich stets in einem von drei Konformationszuständen („open“, „loose“ und „tight“), in dem die beiden Nukleotid-Bindestellen bei ausreichender ATP-Konzentration jeweils mit ATP oder ADP und P_i besetzt oder unbesetzt sind. Diese bereits von CROSS 1981 postulierten Konformationen (CROSS, 1981) wurden durch die Röntgenstruktur bestätigt. Durch die Bindung eines ATP an das nächste katalytische Zentrum wird die Freisetzung des Produktes aus dem ersten katalytischen Zentrum erheblich gefördert (CROSS *et al.*, 1982). Die Reaktion verläuft also kooperativ.

Mit zwei parallelen α -Helices inserieren der Amino- und der Carboxyterminus der γ -Untereinheit inserieren in das Zentrum des $\alpha\beta$ -Hexamers. Der Großteil der γ -Untereinheit lag in früheren Untersuchungen jedoch ungeordnet vor, so daß zunächst keine Aussagen über die

Struktur von γ unterhalb des Hexamers gemacht werden konnte. Neuere Analysen mit der F_1 -Domäne aus Hefe und Rinderherzmitochondrien zeigten, daß die γ -Untereinheit einen Stiel bildet, an dessen Ende sich die δ - (entspricht dem bakteriellen ϵ) und ϵ -Untereinheit (keine entsprechende Untereinheit in der bakteriellen F_1 -ATPase) befinden (STOCK *et al.*, 1999; GIBBONS *et al.*, 2000).

Die Struktur der ϵ -Untereinheit wurde bereits vor einigen Jahren bestimmt (WILKENS *et al.*, 1995; UHLIN *et al.*, 1997). Es handelt sich hierbei um ein Protein mit zwei Domänen. Der N-Terminus ist ein 10-strängiges β -Faltblatt, der C-Terminus bildet zwei über eine Schleife verbundene α -Helices aus. Überraschenderweise lieferten die beiden verfügbaren Kristallstrukturen jedoch unterschiedliche Ausrichtungen der Untereinheit im Enzym: Die Struktur der DCCD inhibierten F_1 -ATPase aus Mitochondrien zeigt eine δ -Untereinheit (entspricht ϵ in den bakteriellen ATPasen), deren beide C-terminalen α -Helices weg vom F_1 -Teil in Richtung F_0 -Domäne weisen. Das stimmt überein mit einer Struktur niedriger Auflösung, die aus der F_1 -Domäne mit dem c_{10} -Ring aus Hefe erhalten wurde (STOCK *et al.*, 1999; GIBBONS *et al.*, 2000). Ein gänzlich anderer Aufbau wurde in einem 1:1 Komplex von γ und ϵ aus dem *E. coli*-Enzym erhalten (RODGERS *et al.*, 2000). Die Struktur zeigt die beiden α -Helices des C-Terminus getrennt und sich zur γ -Untereinheit ausstreckend, wo diese Untereinheit mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer interagiert. Durch Vernetzungsstudien gelang es den Arbeitsgruppen um CAPALDI und YOSHIDA, diese unterschiedlichen Konformationen zu erklären (TSUNODA *et al.*, 2001a). Sie erstellten ein Enzym mit einer Vernetzung von $\epsilon A117$ mit einer c -Untereinheit des Proteolipid-Rings und ein Enzym mit einer Vernetzung von $\epsilon S118$ mit der γ -Untereinheit. Beide Enzymvarianten waren in der Lage, ATP mit voller Aktivität zu synthetisieren, allerdings war die ATP-Hydrolyse des Enzyms mit der Vernetzung ϵ/γ um den Faktor 5 inhibiert. Die Autoren schlossen aus diesem Befund, daß die ϵ -Untereinheit als Kippschalter funktioniert und so die Richtung der Reaktion bestimmt.

Die Kristalle einer Chloroplasten- F_1 -ATPase (GROTH und POHL, 2001), eines $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers aus *Bacillus PS3* (SHIRAKIHARA *et al.*, 1997), der ϵ -Untereinheit aus *E. coli* (UHLIN *et al.*, 1997) und der Kristall eines $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ -Subkomplexes aus *E. coli* (HAUSRATH *et al.*, 1999; SVERGUN *et al.*, 1998) zeigten, daß diese bakteriellen F-Typ-ATPasen den mitochondriellen sehr ähnlich sind.

Eine außerordentliche Rolle kommt der γ -Untereinheit zu. Schon die Strukturanalyse durch ABRAHAMS *et al.* (1994) ließ erahnen (ABRAHAMS *et al.*, 1994), daß durch Rotation der γ -Untereinheit im $\alpha_3\beta_3$ -Komplex die verschiedenen Konformationen hervorgerufen werden. Erste Beweise für solch eine Rotation der γ -Untereinheit, die 1982 von BOYER und KOHLBRENNER vorausgesagt worden war, kamen aus der Arbeitsgruppe um CROSS, die spaltbare Quervernetzungen zwischen γ und β benutzten (ZHOU *et al.*, 1996; DUNCAN *et al.*, 1995). Daß γ wirklich in Abhängigkeit von ATP in diesem Komplex rotiert, konnten NOJI *et al.* (1997) erstmals in einem bemerkenswerten Film zeigen. Ein fluoreszierendes Actin-Filament auf der γ -Untereinheit bewegte sich entsprechend der $\alpha\beta$ -Dimere in drei 120° Schritten unidirektional mit sehr plötzlichen Transitionen von einer Position zur nächsten (SABBERT *et al.*, 1997a; SABBERT *et al.*, 1997b; YASUDA *et al.*, 1998). Da das Actin-Filament sehr lang war, sollte eine mögliche Behinderung der Rotation durch die Verwendung eines einzelnen Fluorophores ausgeschlossen werden. Auch bei der geringeren Beladung konnte eine Rotation der γ -Untereinheit in Schritten von 120° beobachtet werden (ADACHI *et al.*, 2000). Die ε -Untereinheit rotiert auf die gleiche Weise wie γ . Zunächst gab es auch hierfür biochemische Hinweise (AGGELER *et al.*, 1997), visualisiert werden konnte die Rotation wie im Fall der γ -Untereinheit durch ein Actin-Filament an der ε -Untereinheit (KATO-YAMADA *et al.*, 1998).

Die γ - und die ε -Untereinheit sind eng verbunden mit dem Proteolipid-Ring der F_0 -Domäne (STOCK *et al.*, 1999; WATTS *et al.*, 1995; HERMOLIN *et al.*, 1999), zu der weitaus weniger Informationen vorliegen als zur hydrophilen Domäne. Wie bereits erwähnt, besteht F_0 aus den drei teilweise oder gänzlich hydrophoben Untereinheiten *a*, *b* und *c*. Die *c*-Untereinheit wird aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität auch als Proteolipid bezeichnet. Strukturinformationen über die Untereinheiten der F_0 -Domäne wurden bisher nur über Elektronenmikroskopie, NMR-Analysen oder indirekte Methoden wie Quervernetzungsexperimente, Mutationsanalysen oder immunologische Untersuchungen erhalten.

Die *a*-Untereinheit besteht aus 5 bis 6 transmembranen α -Helices (HATCH *et al.*, 1995; VALIYAVEETIL und FILLINGAME, 1997; LONG *et al.*, 1998; JÄGER *et al.*, 1998; YAMADA *et al.*, 1996) und spielt eine Schlüsselrolle in der Ionentranslokation (SENIOR, 1988; DECKERS-HEBESTREIT und ALTENDORF, 1996; NAKAMOTO, 1996; HOWITT *et al.*, 1996). In den beiden letzten Helices liegen die hoch konservierten Aminosäuren Arg210, Glu219 und His245, denen eine wichtige Funktion bei der Ionentranslokation

zugewiesen worden war (VIK *et al.*, 1988; CAIN, 2000). Nach vielen unterschiedlichen Mutationsanalysen besagter Aminosäuren konnte aber nur Arg210 als essentiell für die Funktion der F₀-Domäne angenommen werden, weil an der Stelle alle Austausche gegen andere Aminosäuren zu Funktionsverlust führten. Interessanterweise wurde durch die Mutation Arg210Ala zwar die an ATP-Hydrolyse gekoppelte Ionentranslokation völlig aufgehoben, die passive Ionentranslokation jedoch blieb unbeeinträchtigt (VALIYAVEETIL und FILLINGAME, 1997). Es wird angenommen, daß Arg210 mit Asp61 aus der *c*-Untereinheit interagiert und so zur Verringerung des pK_a-Wertes für den Carboxylat-Rest und damit auch zu einer gekoppelten Ionentranslokation führt. Ersetzt man nun das Arginin durch ein Alanin, verbleibt der Carboxylat-Rest mit einem hohen pK_a-Wert, was zu einer passiven Ionentranslokation führt (VALIYAVEETIL und FILLINGAME, 1997).

Die *b*-Untereinheit besteht aus einer transmembranen Helix und einer cytoplasmatischen Domäne und bildet im ATPase-Molekül ein Dimer (DUNN, 1992; McLACHLIN und DUNN, 1997), das gemeinsam mit der δ -Untereinheit F₁ mit F₀ verbindet (SORGEN *et al.*, 1998).

Strukturuntersuchungen von F₀ durch Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie zeigten, daß die *a*- und die *b*-Untereinheiten außerhalb eines Ringes aus *c*-Untereinheiten liegen (BIRKENHÄGER *et al.*, 1995; TAKEYASU *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 1996; SEELERT *et al.*, 2000).

Bereits 1984 postulierte SEBALD, daß sich das Proteolipid der ATPasen, auch *c*-Untereinheit genannt, in Form einer Haarnadel in der Membran faltet, da es aus zwei hydrophoben α -Helices besteht, die durch eine hydrophile, vermutlich cytoplasmatische Schleife miteinander verbunden sind. Der für die Ionentranslokation essentielle Carboxylat-Rest liegt in der Membran (RASTOGI und GIRVIN, 1999). Die ¹H-NMR-Analysen des Proteolipids von *E. coli* in einem Gemisch aus Chloroform:Methanol:Wasser durch GIRVIN und FILLINGAME bestätigten diese Vermutung (GIRVIN und FILLINGAME, 1993; GIRVIN und FILLINGAME, 1994; FILLINGAME *et al.*, 1995; GIRVIN und FILLINGAME, 1998). Seit kurzem liegt die erste Röntgenkristallstruktur eines Komplexes aus F₁ und dem Proteolipidoligomer aus Hefe vor (STOCK *et al.*, 1999). Dieser Kristall bestätigt die Haarnadelstruktur aus der NMR-Analyse. Die Proteolipidmonomere sind in einem Ring arrangiert, in dem die C-terminale α -Helix mit dem für die Ionentranslokation essentiellen Carboxylat-Rest nach außen weist. In etwa auf der Höhe dieses Carboxylat-

Restes knickt die Helix im Winkel von 23° ab. Phospholipide füllen den Zylinder aus *c*-Monomeren aus (MEIER *et al.*, 2001).

Die genaue Anzahl der Proteolipidmonomere im ATPase-Molekül war lange Zeit nicht klar. Erste Untersuchungen mit ^{35}S - und ^{14}C -Markierungen ergaben 10 ± 1 *c*-Untereinheiten pro F_1F_0 -ATPase aus *E. coli* (FOSTER und FILLINGAME, 1982). Nach Quervernetzungsstudien und Untersuchungen mit genetisch fusionierten Proteolipidmonomeren wurde abgeleitet, daß 12 Kopien der *c*-Untereinheit in einem Ring organisiert sind (JONES und FILLINGAME, 1998; JONES *et al.*, 1998). Neuere Arbeiten ergaben jedoch wiederum 10 Monomere pro *E. coli*-ATPase-Molekül (JIANG *et al.*, 2001) und stimmen diesbezüglich mit den Untersuchungen von STOCK *et al.* (1999) für die *F*-ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* überein. Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, daß die Anzahl der *c*-Untereinheiten in *E. coli* von den Wachstumsbedingungen abhängig sein kann (SCHEMIDT *et al.*, 1995; SCHEMIDT *et al.*, 1998). Eine ganz andere Zahl als 10 ermittelte die Arbeitsgruppe um MÜLLER (2000) für die SDS-gereinigte *c*-Oligomer-Präparation aus Chloroplasten, die sich nach Rekonstitution in Lipiden in Ringen von 14 rearrangierten (SEELERT *et al.*, 2000). Die Analyse von 2D-Kristallen des *c*-Rings der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *Propionigenium modestum* durch Rasterkraftmikroskopie ergab elf Proteolipidmonomere pro Ring (STAHLBERG *et al.*, 2000). In allen Fällen wurde allerdings die biologische Funktion nicht überprüft, weshalb nicht klar ist, ob die verschiedenen Stöchiometrien ein Ergebnis der Reinigung sind oder wirklich den nativen Strukturen entsprechen. Die genaue Struktur des Rings ist unbekannt, aber es wird angenommen, daß die *c*-Monomere sich Rücken an Vorderseite aneinander lagern, was dazu führt, daß zwei konzentrische Ringe ausgebildet werden. Es wird immer noch diskutiert, welche der beiden Helices innen und welche außen liegt (JONES und FILLINGAME, 1998; FILLINGAME *et al.*, 2000; GROTH und WALKER, 1997; SCHNICK *et al.*, 2000). Die Position des aktiven Carboxylat-Restes war ebenfalls längere Zeit unklar. Die Arbeitsgruppen um FILLINGAME und JUNGE favorisierten eine Lokalisation in der Cytoplasma-Membran (FILLINGAME *et al.*, 2000; JUNGE *et al.*, 1997), die Arbeitsgruppe um DIMROTH hingegen eine im Cytoplasma (MATTHEY *et al.*, 2002). Kürzlich wurde dieses Modell jedoch widerrufen (VON BALLMOOS *et al.*, 2002).

Durch die kovalente Bindung von DCCD an die *c*-Untereinheit und die damit einhergehende Inhibition der Protonentranslokation und der ATP-Synthese war schon früh die Beteiligung dieser Untereinheit an der Protonentranslokation vermutet worden

(FILLINGAME, 1975; ALTENDORF und ZITZMANN, 1975). Insbesondere *c*Asp61 des Enzyms aus *E. coli* konnte durch eine Reihe von verschiedensten Experimenten als essentiell für den Transfer von Protonen identifiziert werden. An der Grenzfläche zwischen *a* und den Proteolipidmonomeren werden die Ionen transloziert (JIANG und FILLINGAME, 1998; DIMROTH *et al.*, 1999; VIK *et al.*, 1998; TAKEYASU *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 1996). Der genaue Weg und Mechanismus dieser Ionentranslokation ist jedoch noch nicht geklärt.

Nachdem die Drehung der γ -Untereinheit im α_3/β_3 -Köpfchen so anschaulich nachgewiesen worden war, lag auf der Hand, daß sich diese Bewegung im F_0 -Teil fortsetzen mußte, um den Protonentransport in Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse zu vervollständigen. Dabei wäre ein Mechanismus, in dem sich der *c*-Ring gegen die *a*-Untereinheit dreht und dabei Protonen transportiert die naheliegendste Lösung. Obwohl endgültige Beweise für diese Hypothese fehlen, gibt es einige Hinweise für eben solch einen Mechanismus: Ein Enzym, in dem die Untereinheiten γ , ϵ und *c* miteinander vernetzt sind (TSUNODA *et al.*, 2001b), kann immer noch ATP hydrolysieren, was die These der Rotation von *c* und die Übertragung der Bewegung auf die ϵ und γ -Untereinheit bei der Ionentranslokation unterstützt. An das *c*-Oligomer wurde zudem in Analogie zum Nachweis der Rotation der γ -Untereinheit ein fluoreszierendes Actin-Filament angehängt. Tatsächlich konnte die ATP-getriebene Rotation des *c*-Oligomers beobachtet werden (SAMBONGI *et al.*, 1999; PÄNKE *et al.*, 2000). Am überzeugendsten waren jedoch Versuche mit einem vollständig gekoppelten Enzym aus *P. modestum*, in dem Rotation während Hydrolyse und Synthese nachgewiesen werden konnten. In diesem System ließ sich sogar die Rotation durch DCCD erheblich inhibieren (KAIM *et al.*, 2002). Ein Rotor benötigt jedoch auch immer einen Stator. Gebildet wird dieser durch die *a*-, *b*- δ -, α - und β -Untereinheit, wie aus Vernetzungsstudien geschlossen werden konnte (RODGERS *et al.*, 1997; RODGERS und CAPALDI, 1998; OGILVIE *et al.*, 1997).

Die Arbeitsgruppe um DIMROTH stellte ein Konzept vor, wie im Falle der ATP-Hydrolyse ein Ion, das durch den F_0 -Teil transportiert wird, die Rotation des membranständigen *c*-Oligomers gegen die *a*-Untereinheit vorantreibt (DIMROTH *et al.*, 1998; KAIM *et al.*, 1998a). Abbildung 2 faßt dieses Modell zusammen. Die Bindestellen der Ionen im *c*-Ring sind bis auf diejenige, die an der Grenzfläche zum Stator liegt, nur von der Seite des Cytoplasmas her frei zugänglich. Die Ionen werden durch einen Kanal in der *a*-Untereinheit ins Periplasma abgegeben. Für die komplette Passage eines Ions durch die Membran wird die Rotation des *c*-Rings gegen den Stator (*a*-Untereinheit) benötigt. Im Falle der ATP-Synthese werden die Ionen durch das Periplasma an eine Bindestelle gegeben. Die

treibende Kraft hierfür ist das elektrochemische Potential. Fehlt dieses Potential, tritt ein Austausch von $^{22}\text{Na}^+$ innen und $^{22}\text{Na}^+$ außen auf, was bedeutet, daß der Rotor ungerichtet am Stator hin und her gleitet (KAIM und DIMROTH, 1998b; KAIM und DIMROTH, 1998a). Ein unbesetzter Carboxylat-Rest auf dem Rotor ist negativ geladen und wird von dem hoch konservierten Arginin-Rest des Stators angezogen. Anschließend wird die negative Ladung des Rotors durch die Beladung mit einem Ion ausgeglichen, wodurch diese Bindestelle des Rotors in die hydrophobe Umgebung drehen kann und der angrenzende, negativ geladene Carboxylat-Rest wiederum mit dem Arginin in Wechselwirkung treten kann. Es sollte jedoch auch erwähnt werden, daß ein alternatives Modell diskutiert wird, in dem zwei Kanäle vom Cytoplasma und vom Periplasma aus Zugang zum Rotor haben (JUNGE *et al.*, 1997)

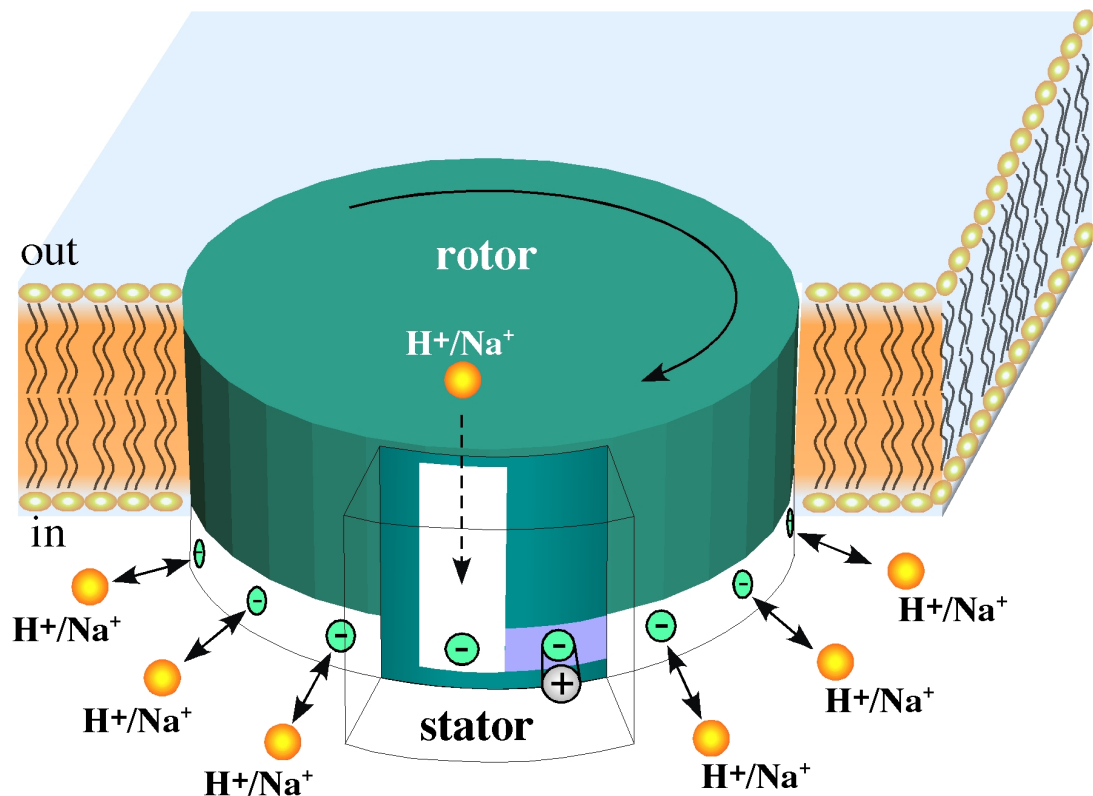


Abb. 2: Der Motor der F_1F_0 -ATPasen. Der Rotor wird durch das c -Oligomer gebildet, die Statorfunktion wird durch Untereinheit a erfüllt. Auf dem Rotor werden die negativen Ladungen vom Carboxylat und im Falle von Na^+ -translozierenden Enzymen von weiteren komplexierenden Aminosäure-Resten bereit gestellt. Der konservierte Arginin-Rest der a -Untereinheit oder Na^+/H^+ gleichen die Ladungen aus. Nach DIMROTH *et al.*, 2000.

1.2.2 Struktur und Funktion der V_1V_O -ATPase

Die vakuolären V_1V_O -ATPasen sind ATP-abhängige Protonenpumpen, die intrazelluläre Kompartimente ansäuern oder Protonen über die Plasmamembran translozieren (NISHI und FORGAC, 2002a). Die Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente ist beispielsweise für die Rezeptor-vermittelte Endozytose, die intrazelluläre Zielsteuerung, die Prozessierung, den Abbau von Proteinen und deren gekoppelten Transport essentiell. Der H^+ -Transport über Plasmamembranen ist notwendig für Knochenresorption, cytoplasmatische pH-Homöostase und K^+ -Sekretion.

Die für die ATP-Hydrolyse verantwortliche hydrophile Domäne dieser ATPase-Familie setzt sich aus acht verschiedenen Untereinheiten zusammen (Untereinheiten A, B, C, D, E, F, G und H). Die katalytischen Nukleotidbindestellen liegen auf der A-Untereinheit (homolog zur β -Untereinheit der F-ATPasen), während B (homolog zu α) die nicht-katalytischen Bindestellen trägt. Die membran-integrale V_O -Domäne, die wie die F_O -Domäne Ionen transloziert, besteht in *S. cerevisiae* aus den fünf Untereinheiten *a*, *d*, *c*, *c'* und *c''*. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, daß die periphere und die integrale Domäne durch zwei Stiele miteinander verbunden sind (BOEKEMA *et al.*, 1997; WILKENS *et al.*, 1999; BOEKEMA *et al.*, 1999; UBBINK-KOK *et al.*, 2000). Durch neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen einer pflanzlichen V-Typ-ATPase konnten sogar ein dritter und ein vierter Stiel identifiziert werden (DOMGALL *et al.*, 2002). Durch diese Aufnahmen und frühere Vernetzungsstudien schloß die Arbeitsgruppe um BÖTTCHER, daß die Untereinheiten C, D, E, F, G und H und der hydrophile Teil der *a*-Untereinheit diese Stiele bilden.

Wie bereits erwähnt, liegen die Nukleotidbindestellen auf der 70 kDa A- und der 60 kDa B-Untereinheit, die je in drei Kopien in einem ATPase-Molekül vorkommen. Auch diese Untereinheiten liegen alternierend in einem Hexamer vor. Das Arrangement und die Funktion anderer Untereinheiten in der V_1 -Domäne wurden durch Mutagenese, Vernetzungsstudien und Elektronenmikroskopie untersucht. Mutationen in der D-Untereinheit, die zum Entkoppeln von H^+ -Translokation und ATP-Hydrolyse führten, ließen den Schluß zu, daß Untereinheit D wie die γ -Untereinheit der F-ATPasen ein zentraler Rotor der V-Typ-ATPasen ist (XU und FORGAC, 2000). Zunächst wurde vermutet, daß die E-Untereinheit mit der D-Untereinheit im Zentralstab interagiert (NELSON *et al.*, 1995; BOWMAN *et al.*, 1995; TOMASHEK *et al.*, 1996). Durch neuere Vernetzungsstudien wurde jedoch klar, daß

Untereinheit E zusammen mit der G-Untereinheit einen zusätzlichen, weiter außerhalb gelegenen Stab bilden (ARATA *et al.*, 2002a). Der Zentralstab wird vielmehr ergänzt durch die F-Untereinheit (XU *et al.*, 1999). Die Untereinheiten C, H und der hydrophile Teil der α -Untereinheit sind ebenfalls Teile eines Stabes. Interessanterweise vermutet die Arbeitsgruppe um FORGAC, daß sie gemeinsam mit den Untereinheiten E und G den zweiten peripheren Stab bilden, während DOMGAL *et al.* vorschlagen, daß Untereinheit H und C in Interaktion mit dem hydrophilen Teil von α einen weiteren Stab formen.

In der V_O -Domäne ist nur die c -Untereinheit vollständig hydrophob. Sie sind untereinander und den Proteolipiden der F_1F_O -ATPasen und der A_1A_O -ATPasen homolog (NISHI und FORGAC, 2002; Forgac, 1999) und essentiell für die Funktion der V-Typ-ATPase (HIRATA *et al.*, 1997). Die vakuolären Proteolipide sind vermutlich durch Duplikation und anschließende Fusion der für die F-Typ-Proteolipide kodierenden Gene entstanden (MANDEL *et al.*, 1988) Untereinheit c und c' aus *S. cerevisiae* haben beide eine molekulare Masse von 16 kDa, bestehen also aus vier transmembranen Helices, tragen aber nur in Helix vier den für die Ionentranslokation essentiellen Carboxylat-Rest. Das Gen für c'' , Vma16, kodiert für ein 21 kDa-Peptid mit fünf transmembranen Helices (HIRATA *et al.*, 1997). Kürzlich wurde jedoch nachgewiesen, daß c'' im V_1V_O -ATPase-Molekül nur vier transmembrane Helices besitzt. Die Untereinheit c'' wird offensichtlich prozessiert (NISHI *et al.*, 2002). Der konservierte Carboxylat-Rest liegt interessanterweise in Helix 2. Scheinbar wird der Proteolipid-Ring aus $c_{4.5}c'_1c''_1$ gebildet (ARAI *et al.*, 1988; POWELL *et al.*, 2000). Die c -Untereinheit enthält auch die Bindestelle für die für V-Typ-ATPasen hochspezifischen Inhibitoren Bafilomycin und Concanamycin (BOWMAN und BOWMAN, 2002; HUSS *et al.*, 2002). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von V_O zeigen einen Ring aus Proteolipid-Monomeren mit der α -Untereinheit an einer Seite und Verzahnungen zwischen der α -Untereinheit und dem c -Ring (WILKENS und FORGAC, 2001). In diesen Aufnahmen erschienen die d -Untereinheit und der N-terminale Bereich der α -Untereinheit wie eine Manschette auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Erst kürzlich gelang es, nach Extraktion des c -Oligomers aus der gesamten V_1V_O -ATPase von *E. hirae* dessen Struktur zu klären. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ergaben, daß sich der Ring aus 7 Monomeren zusammensetzt (MURATA *et al.*, 2003).

Die 100 kDa α -Untereinheit setzt sich aus einem hydrophilen N-terminalen Teil von 50 kDa und einem hydrophoben C-terminalen Bereich von ebenfalls 50 kDa zusammen. Der hydrophobe Teil der 100 kDa-Untereinheit aus Hefe bildet 9 transmembrane Helices, wobei

der N-terminale Teil cytoplasmatisch ist und der C-terminale in das Lumen ragt (LENG *et al.*, 1999). Der C-Terminus enthält einige in der Membran liegende geladene Aminosäurereste, die eine Rolle bei der Ionentranslokation zu spielen scheinen (LENG *et al.*, 1996; LENG *et al.*, 1998; KAWASAKI-NISHI *et al.*, 2001). Besonders Arg735 in der siebten Helix scheint absolut essentiell für den Transfer von Protonen zu sein (KAWASAKI-NISHI *et al.*, 2001). Es ist möglich, daß dieser Rest eine ähnliche Aufgabe wie Arg210 in der *a*-Untereinheit der F-Typ-ATPasen einnimmt (VIK *et al.*, 2000; CAIN, 2000), indem er die Freisetzung der Protonen vom in der Membran eingebetteten Carboxylat-Rest fördert. Auch in der V-Typ-ATPase aus *E. hirae* gibt es einen Arg-Rest, der offensichtlich essentiell für die Translokation von Na⁺-Ionen ist. Durch die Substitution von Arg573 gegen Glu, Leu oder Gln konnte der mutierte Stamm bei pH 10 nicht mehr wachsen, während ein Austausch gegen Lys zum verlangsamten Wachstum führte (KAWANO *et al.*, 2002).

Erst kürzlich wurden auch Untersuchungen zur Rotation in den A/V-ATPasen aus *T. thermophilus* und *S. cerevisiae* angestellt. Um nachzuweisen, daß Untereinheiten in der V₁-ATPase aus *T. thermophilus* rotieren, wurden an die A-Untereinheiten Histidin-Reste fusioniert. Das Köpfchen der ATPase konnte so auf einer Ni²⁺-haltigen Oberfläche immobilisiert werden. Die Rotationssonde wurde durch eine Biotin-Streptavidin-Bindung an die mutmaßlichen Untereinheiten des Zentralstabs, D und F, assoziiert. Bei Zugabe von ATP war in beiden Fällen die Drehung des fluoreszierenden Kugelchens nachzuweisen (IMAMURA *et al.*, 2003). Wenig später berichtete auch die Arbeitsgruppe um FUTAI, daß sie in der V₁-Komponente der V-Typ-ATPase aus *S. cerevisiae* Drehung beobachtet hatte. In dem Fall war das Enzym durch Histidin-Reste am Proteolipid befestigt. Für die Visualisierung der Rotation wurde an die G-Untereinheit (Vma10p) ein fluoreszierendes Actin-Filament fusioniert. Wiederum wurde durch Zugabe von ATP die Rotation der G-Untereinheit relativ zum Proteolipid initiiert (HIRATA *et al.*, 2003). Wird der Motor fixiert, übernimmt der Stator, dessen Bestandteil die G-Untereinheit ist, die Aufgabe des Rotors (ARATA *et al.*, 2002b), wird also offensichtlich zum Rotor. Nicht erwähnt wird, daß Untereinheit G als Dimer im Enzym vorliegt (XU *et al.*, 1999; ARMBRÜSTER *et al.*, 2003), also mindestens teilweise zwei Actin-Filamente an einem ATPase-Molekül befestigt würden, die sich bei Drehung behindern müßten.

Auch in der A₀/V₀-Domäne der ATPase aus *T. thermophilus* konnte Rotation mit dem System wie für die D- und die F-Untereinheit nachgewiesen werden. In diesem Falle wurde

die gesamte A_1A_0/V_1V_0 -ATPase auf einer Nickel-Nitrilo-Acetat-Oberfläche immobilisiert und das Streptavidin mit dem fluoreszierenden Kügelchen wurde an das Proteolipid fusioniert. Bei Zugabe von ATP wurde Rotation beobachtet, die sich durch Inkubation mit DCCD in gleichem Maße wie im gereinigten, nicht markierten Enzym inhibieren ließ (YOKOYAMA *et al.*, 2003).

1.2.3 Struktur und Funktion der A_1A_0 -ATPase

Über die Funktion und die Struktur der A_1A_0 -ATPasen ist wenig bekannt. Erst seit kurzem werden sie separat klassifiziert. Denn zunächst wurden die ATPasen nur in die F- und die V-Typ-ATPasen unterteilt, wobei von den F-Typ-ATPasen angenommen wurde, daß sie das ubiquitär verbreitete System für die ATP-Synthese sind. Es schien also wahrscheinlich, daß die entsprechenden Enzyme der *Archaea* den F-Typ-ATPasen zuzurechnen waren (LÜBBEN und SCHÄFER, 1989; LÜBBEN *et al.*, 1987). Der Unterschied zwischen den A- und den F-Typ ATPasen wurde erstmals durch die Unempfindlichkeit der halobakteriellen ATPase gegenüber Azid aufgezeigt (MUKOHATA und YOSHIDA, 1987a; MUKOHATA und YOSHIDA, 1987b). Anschließend bestätigten immunologische Untersuchungen den Befund: Antikörper, die gegen A_1 gerichtet waren, interagierten nur wenig mit der F-Typ-ATPase, reagierten aber mit der V-Typ-ATPase in dem Maße wie mit A-Typ-ATPasen aus anderen *Archaea* (MUKOHATA *et al.*, 1987). Schließlich wurden die A- und B-Untereinheiten verschiedener *Archaea* aufgereinigt und biochemisch analysiert bzw. deren Gene kloniert und sequenziert (INATOMI *et al.*, 1989b; DENDA *et al.*, 1988; IHARA und MUKOHATA, 1991), womit klar wurde, daß zumindest diese beiden Untereinheiten eher mit den vakuolären als mit den F-Typ-ATPasen verwandt sind (SCHÄFER und MEYERING-VOS, 1992a). Die gleiche Empfindlichkeit von archäellen und vakuolären ATPasen gegenüber den Hemmstoffen Nitrat, NEM, Concanamycin und Bafilomycin untermauern den hohen Verwandtschaftsgrad dieser ATPasen.

Es war schon früh klar, daß die A-ATPasen neben den beiden großen hydrophilen Untereinheiten auch Proteolipide besitzen. Es wurden *c*-Untereinheiten von etwa 8 kDa nachgewiesen (INATOMI *et al.*, 1989; DENDA *et al.*, 1989). Die Größe der *c*-Untereinheit schien der einzige Unterschied zwischen den A- und den V-Typ-ATPasen zu sein (MANDEL *et al.*, 1988), deren molekulare Massen generell ca. 16 kDa betragen. Die bis dahin bekannten

archäischen Proteolipide hatten alle eine molekulare Masse von etwa 8 kDa und schienen demnach den F₀-Proteolipiden homolog, was zur Annahme führte, daß es sich bei den archäischen ATPasen um chimäre Enzyme handelt, die sich aus einer V₁-ähnlichen Domäne und einer F₀-ähnlichen Domäne zusammensetzen (SCHÄFER und MEYERING-VOS, 1992b).

Bis zur Sequenzierung der für A₁A₀-ATPasen kodierenden Operone war die komplette Zusammensetzung der Enzyme unbekannt. Zwar waren vorher A₁A₀-ATPasen und A₁-ATPasen aus einer Reihe von Organismen gereinigt worden, aber die Zusammensetzung der Präparationen war sehr unterschiedlich. Die Anzahl der gereinigten Peptide variierte von drei bis sieben (MÜLLER *et al.*, 1999), was den Eindruck hinterließ, daß die Komposition der archäischen ATPasen sehr variabel ist. Erst die Sequenzierung des Operons aus *M. mazei* (WILMS *et al.*, 1996; RUPPERT *et al.*, 1998) und anschließend in anderen Methanogenen und Archäen legte den Schluß nahe, daß in den Aufreinigungen stets Peptide verloren gegangen waren. Alle Operone setzen sich aus 9 bis 10 Genen zusammen, deren Genprodukte recht ähnlich zu denen der V-Typ-ATPasen sind (Abb. 3). Durch Analyse dieser Daten wurde nun auch klar, daß es sich mitnichten um Enzyme handelt, deren hydrophobe Domäne denen der bakteriellen ATPasen entspricht, vielmehr ist die zweite, membranständige Untereinheit zu denen aus V-ATPasen homolog.

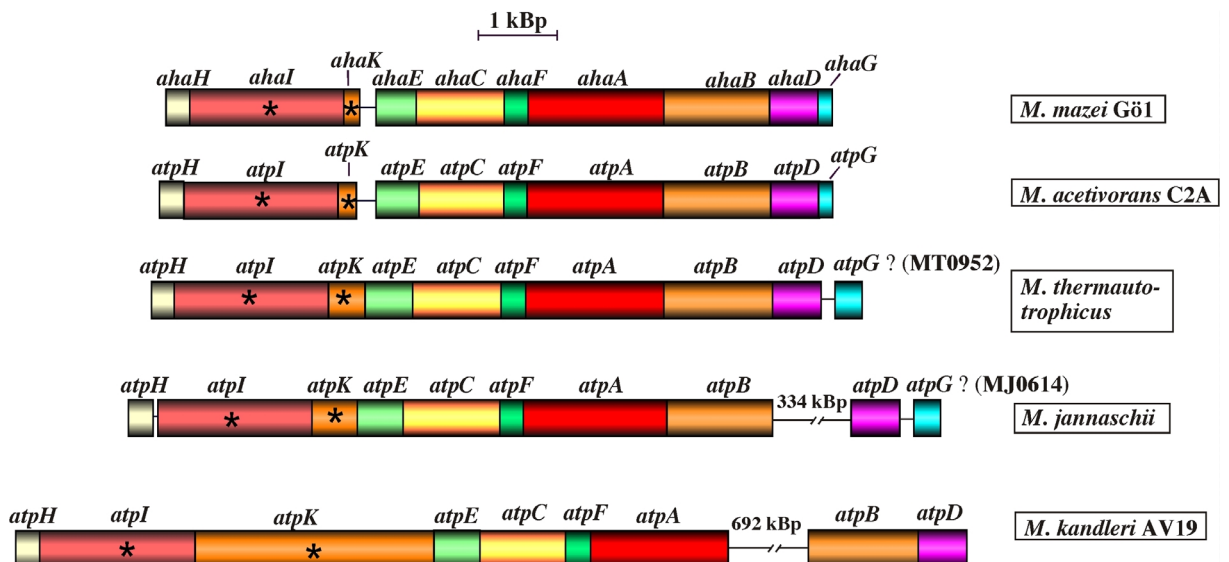


Abb. 3: Physikalische Karte der A₁A₀-ATPase-Gene methanoarchäeller ATPasen. Sterne kennzeichnen Gene, die für hydrophobe Untereinheiten kodieren.

1.2.4 Fragestellung der Arbeit

Das Proteolipid nimmt unter allen Untereinheiten der ATPase in Bezug auf die Ionentranslokation eine herausragende Stellung ein. Durch die zunehmende Anzahl der veröffentlichten archäellen Genome ist es nun möglich, die Struktur dieser äußerst interessanten Proteolipide mit bereits vorhandenen biochemischen Daten zu vergleichen. Bisher schienen die archäellen Proteolipide bezüglich ihrer Größe denen aus F-ATPasen zu entsprechen, die Genome enthielten jedoch Sequenzen, die für triplizierte (*M. jannaschii*) oder duplizierte (*M. thermotrophicus*) Proteolipide kodieren. Im Zentrum des Interesses stand folglich, die Expression dieser ungewöhnlich großen offenen Leserahmen zu verifizieren und damit den Unterschied zwischen A- und V-ATPasen neu zu definieren. Bisher war angenommen worden, daß die Fähigkeit zur ATP-Synthese von der Größe der Proteolipide abhing: F- und A-ATPasen mit 8-kDa-Proteolipiden können ATP synthetisieren, V-ATPasen, die 16-kDa-Proteolipide besitzen, sind ausschließlich ATP-Hydrolasen. Da aber der direkte Nachweis der ATP-Synthese durch die A_1A_0 -ATPasen noch aussteht, sollte das Enzym zum einen in Liposomen rekonstituiert werden. Zum anderen sollte im Zuge dieser Arbeit ein Klon generiert werden, der die Expression der gesamten ATP-Synthase im ATPase-negativen Hintergrund erlaubt, um später Studien zur ATP-Synthese und zur Ionen-Abhängigkeit durchführen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 1: Verwendete Organismen

Stamm	relevanter Geno- oder Phänotyp	Referenz
<i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	Wildtyp	DSM 3647
<i>Methanococcus jannaschii</i>	Wildtyp	DSM 2661
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	Wildtyp	DSM 1053
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Wildtyp	DSM 2133
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80d/ <i>lacZ</i> M15 D(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hspR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	(HANAHAN, 1983)
<i>E. coli</i> DK8	1100 Δ (<i>uncB-uncC</i>) <i>ilv::Tn10</i>	(KLIONSKY <i>et al.</i> , 1984)
<i>E. coli</i> DK6	χ_{1488} Δ (<i>uncB-uncC</i>)	(KLIONSKY <i>et al.</i> , 1984)
<i>E. coli</i> ER2508	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 fhuA2</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>lacY1 lon::miniTn10</i> (Tet ^R) <i>glnV44 galK2 rpsL20</i> (Str ^R) <i>xyl-5 mtl-5</i> Δ (<i>malB</i>) <i>zjc::Tn5</i> (Kan ^R) Δ (<i>mcrC-mrr</i>) _{HB101}	Fa. NEB, U.S.A

Tab. 2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Plasmid	relevantes Merkmal	Referenz
pJLA603	Amp ^R , <i>atpETIR</i> , <i>ci^{ts857}</i> , <i>pR</i> , <i>pL</i>	(SCHAUDER <i>et al.</i> , 1987)
pAK1	pJLA603 :: 663 Bp <i>NdeI/BamHI-atpK</i> -Fragment	(WIMMERS, 1997)
pHSG399	Cm ^R , <i>lacZ'</i>	(TAKESHITA <i>et al.</i> , 1987)
pHSG398	Cm ^R , <i>lacZ'</i>	(TAKESHITA <i>et al.</i> , 1987)
pMal-c2	Amp ^R , <i>malE</i> , <i>lacI</i> , <i>P_{tac}</i> , <i>lacZ</i> , M13 <i>ori</i>	Fa. NEB, U.S.A.
pBAD-TOPO	Amp ^R , <i>P_{BAD}</i> , <i>araC</i>	Fa. Invitrogen, U.S.A.
pVSBAD2	Cm ^R , Str ^R , Spc ^R , <i>pBP2::1,3 kBp ScaI-araCP_{BAD}</i> -Fragment aus pBAD18	Prof. Dr. C. Baron, Hamilton, Canada
pRT103	pHSG399 :: 7,8 kB <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment	(RUPPERT, 1997)
pEW1	pGEM-Z7f(7 ⁺) :: 8 kB <i>BglII</i> -Fragment	(WILMS <i>et al.</i> , 1996)

Tab. 3: Plasmid-Konstrukte

Plasmidname	relevantes Merkmal (endständige Schnittstellen des klonierten Fragments; Gene)	Insertionsgröße	Ursprungsvektor
pMalE-AhaA	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I; <i>ahaA</i>	1654 Bp	pMal-c2
pMalE-AhaB	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I; <i>ahaB</i>	1383 Bp	pMal-c2
pMalE-AhaC	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I; <i>ahaC</i>	1083 Bp	pMal-c2
pMalE-AhaD	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I; <i>ahaD</i>	630 Bp	pMal-c2
pMalE-AhaE	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I; <i>ahaE</i>	552 Bp	pMal-c2
pMalE-AhaF	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I; <i>ahaF</i>	306 Bp	pMal-c2
pMalE-AhaG	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I; <i>ahaG</i>	175 Bp	pMal-c2
pHS3	<i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I; <i>ahaHIK</i> , 5'-Terminus von <i>ahaE</i>	2975 Bp	pBAD-TOPO
pRT0	<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I; 3'-Terminus von <i>ahaE</i> , <i>ahaCFABDG</i> , 5'-Terminus von <i>hypF</i>	6581 Bp	pVSBAD2
pRT1	<i>Sal</i> I/ <i>Sac</i> I; <i>aha</i> -Operon, 5'-Terminus von <i>hypF</i>	9556 Bp	pRT001 und pHS3

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide. Sämtliche Oligonukleotide sind bis auf die integrierten Schnittstellen den genomischen Sequenzen homolog

Bezeichnung	Zielgen/Region	Länge	Schnittstelle
<i>AahaA</i> (B)down	<i>ahaA</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	25 Bp	<i>Bam</i> HI
Sequenz: 5' - CCAAATAGTAGGATCCAAAACCATC - 3'			
<i>AahaA</i> (S)up	<i>ahaA</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	23 Bp	<i>Sal</i> I
Sequenz: 5' - GGCTCTGTTTTGTCGACAAAAAT - 3'			
<i>AahaB</i> (E)down	<i>ahaB</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	25 Bp	<i>Eco</i> RI
Sequenz: 5' - CGGAATTCGTCAAAGAGTACAAGAC - 3'			
<i>AahaB</i> (X)up	<i>ahaB</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	25 Bp	<i>Xba</i> I
Sequenz: 5' - GCTCTAGACAATCACTTAGCCTTTC - 3'			
<i>ahaC</i> .5'(EcoRI)	<i>ahaC</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>Eco</i> RI
Sequenz: 5' - GGTGATGTGAATTCCGGCTTT - 3'			
<i>ahaC</i> .3'(XbaI)	<i>ahaC</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>Xba</i> I
Sequenz: 5' - GCTCTCTCAGATCTTTGCTAA - 3'			
<i>ahaD</i> .5'(BamHI)	<i>ahaD</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>Bam</i> HI
Sequenz: 5' - TAAGTGATTGGATCCGCTCAG - 3'			
<i>ahaD</i> .3'(XbaI)	<i>ahaD</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>Xba</i> I
Sequenz: 5' - TCTGCCATCTAGAAATCAAAC - 3'			

Fortsetzung **Tab. 4**

<i>ahaE</i> .5'(EcoRI)	<i>ahaE</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>EcoRI</i>
Sequenz: 5' -GCATGGGAATTCAGATCGTTG-3'			
<i>ahaE</i> .3'(PstI)	<i>ahaE</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>PstI</i>
Sequenz: 5' -CTCCAAAAGCTGCAGCGAACA-3'			
<i>ahaF</i> .5'(BamHI)	<i>ahaF</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>BamHI</i>
Sequenz: 5' -GTGATTATGGATCCGAGTTAG-3'			
<i>ahaF</i> .3'(PstI)	<i>ahaF</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	21 Bp	<i>PstI</i>
Sequenz: 5' -ACGATAAACTGCAGCTTTTAC-3'			
<i>AahaG</i> (E)down	<i>ahaG</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	24 Bp	<i>EcoRI</i>
Sequenz: 5' -CGGAATTCGCAGAATGCGACGATC-3'			
<i>AahaG</i> (P)up	<i>ahaG</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	25 Bp	<i>PstI</i>
Sequenz: 5' -AACTGCAGCCCTGTCATGTCACATA-3'			
<i>ahaH</i> (SalI).5'	<i>ahaH</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	27 Bp	<i>SalI</i>
Sequenz: 5' -ATATTAAATGTCGACAGACGGAGATTC-3'			
<i>oahaEup</i> (XbaI)	<i>ahaE</i> von <i>M. mazei</i> Gö1	15 Bp	<i>XbaI</i>
Sequenz: 5' -CGGTATCTAGAAGTT-3'			

2.2 Nährmedien

2.2.1 Medien für Methanogene

2.2.1.1 Medium für *Methanocaldococcus jannaschii*

K ₂ HPO ₄	0,14 g
CaCl ₂ x 7 H ₂ O	0,14 g
NH ₄ Cl	0,25 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,4 g
MgCl ₂ x 2 H ₂ O	2,7 g
KCl	0,33 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mg
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,5 mg
NaCl	18 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,01 g
Spurenelementelösung (DSM 141)	1 ml
Vitaminlösung (WOLIN <i>et al.</i> , 1964)	1 ml
Resazurin	1 mg
NaHCO ₃	3 g
Hefeextrakt	1 g

Na ₂ S x (7-9) H ₂ O	0,5 g
H ₂ O _{demin}	ad 1000 ml
pH 6	

Die Spurenelementelösung wurde 10-fach konzentriert und entsprechend den Angaben im DSM-Katalog (Medium 141) angesetzt.

Vitaminlösung, 10 x konzentriert (WOLIN *et al.*, 1964)

Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Thiamin x HCl	50 mg
Riboflavin	50 mg
Nikotinsäure	50 mg
DL-Kalziumpantothenat	50 mg
Vitamin B ₁₂	1 mg
p-Aminobenzoessäure	50 mg
Liponsäure	50 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Die Zellen wurden in einem 300-l-Fermenter bei 85°C angezogen. Der Fermenter wurde mit einem Überdruck von 0,3 MPa mit H₂/CO₂ (80:20) begast. In Abhängigkeit von der Wachstumsphase wurde der Gasfluß zwischen 1 – 7 l/min eingestellt. Die Zellen wurden von Dr. Harald Huber, Regensburg, zur Verfügung gestellt.

2.2.1.2. *Methanosarcina*-Komplexmedium (HIPPE *et al.*, 1979)

Methanosarcina mazei Gö1 wurde in folgendem Medium mit Methanol (150 mM) als Kohlenstoffquelle angezogen:

K ₂ HPO ₄	348 mg
KH ₂ PO ₄	227 mg
NH ₄ Cl	500 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	4 mg
CaCl ₂	188 mg
NaCl	2,25 g
NaHCO ₃	3 g
Na-Acetat	820 mg
Hefeextrakt	2 g
Casiton	2 g
Spurenelementelösung SL6 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)	3 ml
Vitaminlösung (DSM 141, 10 x konz.)	1 ml

Resazurin	1 mg
Cystein-HCl	0,3 g
Na ₂ S x (7-9) H ₂ O	0,3 g
H ₂ O _{demin}	ad 1000 ml
pH 6,9	

Spurenelementelösung SL6 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)

ZnSO ₄	100 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Vitaminlösung

Die Vitaminlösung wurde als 10-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und entsprach in ihrer Zusammensetzung den Angaben im DSM-Katalog (Medium 141).

Die Spurenelemente- und die Vitaminlösung wurden bei 4°C gelagert. Das Nährmedium wurde nach der von Hungate und Bryant beschriebenen Technik unter anaeroben Bedingungen hergestellt (BRYANT, 1972; HUNGATE, 1969). Hierfür wurde es mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80% / 20%, v/v) durchgast. Im Anschluß daran wurde der pH-Wert kontrolliert und falls notwendig auf pH 6,9 – 7,0 eingestellt. Die Kulturgefäße wurden verschlossen autoklaviert. Kurz vor dem Beimpfen wurde das Medium mit Cystein und Na₂S x (7-9) H₂O reduziert.

2.2.1.3. Medium für *Methanothermobacter thermautotrophicus* (DSM 131)

K ₂ HPO ₄	0,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 g
NaCl	0,6 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,12 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,08 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	4,0 mg
K ₂ HPO ₄	0,15 g

Na ₂ CO ₃	4,0 g
Spurenelementelösung	10 ml
Vitaminlösung	10 ml
Resazurin	1 g
Cystein-HCl	1,5 g
Na ₂ S x (7-9) H ₂ O	1,5 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
pH 7,2	

2-l-Serum Flaschen wurden mit 600 ml des Mediums befüllt und autoklaviert. Nach dem Beimpfen wurde in den Flaschen mit H₂/CO₂ ein Überdruck von 0,3 MPa erzeugt. Das Medium wurde bei 60°C in Schüttelwasserbad inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen durch Zentrifugation in einer Sorvall Superspeed RC2-B, (Fa. Kendro Laboratory Products, München) geerntet. Die Sedimente wurden bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 Medium für *Methanothermobacter marburgensis*

KH ₂ PO ₄	6,8 g
NH ₄ Cl	2,14 g
Nitrilioacetat	0,1 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	40 mg
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,24 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,24 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	50 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
pH 7,0	

Der pH-Wert wurde mit 6 ml 1 M Na₂CO₃ eingestellt und das Medium autoklaviert. Nachdem der pH-Wert eingestellt worden war, wurde das Medium mit 80% H₂/ 20% CO₂/ 0,2% H₂S für 15 min mit einer Rate von 1,2 l min⁻¹ durchgast und danach 10%ig angeimpft. Die Kulturen wurden bei 65°C kontinuierlich mit 1100 rpm gerührt und mit 80% H₂/ 20% CO₂/ 0,2% H₂S mit einer Rate von 1,2 l min⁻¹ begast. Jedesmal, wenn die OD₅₇₈ der Kultur um eine Einheit zugenommen hatte, wurde 0,62 ml einer 1 M (NH₄)₂CO₃-Lösung zugegeben, um den pH-Wert konstant zu halten. Die Zellen wurden bei einer OD₅₇₈ von 3,5 unter N₂-Begasung mit Hilfe einer Durchflußzentrifuge Contifuge 17 RS (Heraeus, Osterode)

abzentrifugiert. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. R. Hedderich, Marburg, zur Verfügung gestellt.

2.3 Medium für *Escherichia coli*

LB-(Luria-Bertani) Medium

Trypton	10,0	g
Hefeextrakt	5,0	g
NaCl	10,0	g
H ₂ O	ad 1.000	ml
pH 7,0		

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

E. coli wurde generell aerob in LB-Medium bei 37°C angezogen. Die Medien wurden bei Bedarf mit $100\ \mu\text{g/ml}$ Ampicillin bzw. $50\ \mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol, $100\ \mu\text{g/ml}$ Spectinomycin oder $12,5\ \mu\text{g/ml}$ Tetracyclin versetzt. Bei Nutzung von *lac*- oder *pBAD*-Promotoren in Expressions-Versuchen wurde 1% Glukose zu den Vorkulturen zugefügt, um die basale Transkription möglichst weitgehend zu hemmen.

Sollten die Expression des *aha*-Operons induziert und anschließend Membranen präpariert werden, wurde eine 2-l-Kultur, die mit einer einzelnen Kolonie des jeweiligen Stammes angeimpft worden war, über Nacht bei 30°C angezogen und morgens auf 37°C transferiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0,5. Die Zellen wurden nach zweistündiger Inkubation in einer Sorvall Zentrifuge RC5B (Fa. Kendro Laboratory Products, München) sedimentiert.

2.3.1 Medienzusätze

In Tab. 5 sind die den Medien zugesetzten Substanzen aufgeführt. Die Zugabe erfolgte erst nach dem Autoklavieren und anschließender Abkühlung auf mindestens 60°C .

Tab. 5: Medienzusätze

Komponente	Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Sterilisation	Lagerung	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100	50% Ethanol	-	-20°C	100
Chloramphenicol	25	100% Ethanol	-	-20°C	25
Spectinomycin	10	H ₂ O	Filtration	-20°C	100
Tetracyclin	12,5	50% Ethanol	-	-20°C (dunkel)	12,5-15
IPTG (100 mM)	23,8	H ₂ O	Filtration	-20°C	48
X-Gal	20	Dimethylfomamid	-	-20°C	40

2.4 Großanzucht von *M. mazei* Gö1

Die Kultivierung von *M. mazei* Gö1 erfolgte zunächst in 1-l-Flaschen (Fa. Müller und Krempel, Bülach, Schweiz) bei 37°C nach den Methoden von Hungate und Bryant (BRYANT, 1972; HUNGATE, 1969). Für die Extraktion des Proteolipids mit Chloroform/Methanol wurde *M. mazei* Gö1 in 20-l-Steilbrustflaschen (Fa. Schott, Mainz) angezogen. Die Kulturgefäße wurden mit Stopfen versehen, die über inserierte Stahlrohre steriles Animpfen, Begasen und sterile Probenentnahme ermöglichten.

Die Steilbrustflaschen wurden mit 16 Litern des bereits erwähnten Nährmediums befüllt; NaHCO₃, Methanol und auch die Reduktionsmittel wurden getrennt angesetzt. Nachdem die Komponenten autoklaviert worden waren, wurde das 20-l-Gefäß unter steriler Begasung mit N₂/CO₂ (80%/20%, v/v) abgekühlt. NaHCO₃, die Reduktionsmittel und Methanol wurden mit Hilfe eines N₂/CO₂-Überdruckes durch die Stahlrohre zugegeben. Nach Reduktion des Mediums wurde es 10%-ig mit einer Vorkultur in der log-Phase beimpft und bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde durch Messen der Gasentwicklung verfolgt. Nachdem 60% der erwarteten Gasmenge gebildet waren, wurden die Zellen in einer Milchzentrifuge gerntet.

2.5 Bestimmung von Wachstumsparametern

2.5.1 Bestimmung der Gesamtgasmenge

Die gebildete/verbrauchte Gasmenge in Kulturen von anaerob gezogenen Organismen wurde mit sterilen, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ geschmierten 50-ml-Glasspritzen (Fa. Ochs, Bovenden; Fa. Schütt, Göttingen) bestimmt (CHUNG, 1976). Zur Dosierung des ein- und ausströmenden Gases waren sie mit einem Luer-Lock-Hahn (Fa. Ochs, Bovenden) versehen.

2.5.2 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte durch Trübungsmessung. Für die Bestimmung der OD von Kulturen wurden Proben entnommen und bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Spektralphotometer Modell 100-20 (Fa. Hitachi, Tokyo, Japan) in 1-ml-Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Resazurin enthaltende Proben wurden vor der Messung durch Zugabe eines Reduktionsmittels (Na-Dithionit) entfärbt.

2.6 Membranpräparationen

Für die Extraktion des Proteolipids und MtrD aus Methanogenen durch ein Chloroform/Methanol-Gemisch wurden Membranen wie folgt hergestellt: 40 – 45 g von *M. jannaschii*-Zellen wurden in Puffer (25 mM Tris, pH 6,8), der DNase enthielt, durch osmotischen Schock lysiert. Jeweils 40 – 53 g von *M. mazei* Gö1-, *M. thermautotrophicus*- und *M. marburgensis*-Zellen wurden in Membranpuffer (50 mM Tris, 20 mM NaHSO_3 , 5 mM MgSO_4 , 40 mM KCl, 0,2 mM Dithiothreitol, 0,1 mM PMSF, 10% Glycerin, pH 8,0) aufgenommen und durch zweimalige Passage durch eine French-Press-Zelle bei 500 psi aufgebrochen. Nachdem aus allen Rohextrakten Zelltrümmer durch Zentrifugation (10.000 x g, 30 min, 4°C) entfernt worden waren, wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 90 min bei 4°C sedimentiert. Die Membranen wurden im Fall von *M. jannaschii* in 100 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 10% Glycerin (v/v), pH 7, sonst in bereits erwähntem Membranpuffer aufgenommen und für die Extraktion eingesetzt.

Für die Membranpräparation aus 5 – 7 g *E. coli*-Zellen wurden die Sedimente einmal in TMDG-Puffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 0,1 mM PMSF, 10% [v/v] Glycerin, pH 7,5) gewaschen, in 2 ml TMDG-Puffer/g Zellmaterial aufgenommen und mit 0,1 mg DNase/ml Zellsuspension versetzt. Nach Aufbruch der Zellen in der French-Press-Zelle (dreimal, 13000 psi) wurden Zelltrümmer durch 30-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g bei 4°C entfernt. Durch Ultrazentrifugation wurden die Membranen sedimentiert und zweimal in TMDG-Puffer gewaschen. Diese Membranen wurden für den Nachweis der heterologen Produktion der A₁A₀-ATPase aus *M. mazei* Gö1 und für Aktivitäts-Tests eingesetzt. Aus 2-l-Kulturen wurden etwa 0,5 g Membranen präpariert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 70% [v/v] Ethanol abgewischt. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert.

2.7.2 Standardmethoden

In aller Regel wurden molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktion, Ligation, Fällen der DNS oder Gelelektrophorese nach Sambrook (SAMBROOK *et al.*, 1989) durchgeführt. Enzyme wurden von den Firmen MBI-Fermentas (St. Leon Rot) und Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Plasmidisolierungen aus *E. coli* erfolgten entweder nach der Methode von Holmes und Quigley (HOLMES and QUIGLEY, 1981) oder durch das „Mini-Prep“-System der Firma Qiagen (Hilden). DNS-Fragmente wurden aus Agarose-Gelen mit Hilfe des „Qiaex II Gel Extraction“-Verfahrens gereinigt. Die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch die CaCl₂-Methode (COHEN *et al.*, 1972; INOUE *et al.*, 1990). Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt (HANAHAN, 1983). Transformation durch Elektroporation erfolgte nach DOWER *et al.* (1988) in einem „Gene PulserTM“ (Fa. Bio-Rad Laboratories, München,

Deutschland) mit *E. coli*-Zellen, die vorher dreimal mit 10%-igem Glycerin gewaschen worden waren.

Die Ermittlung von DNS-Sequenzen erfolgte automatisch mit fluoreszenzmarkierter DNS an einem ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.).

2.7.3 Isolierung von chromosomaler DNS mit Glasmilch (MARMUR, 1961; RAHLFS und MÜLLER, 1997)

Es wurden jeweils Kulturen aus der späten logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Eine 500-ml-*M. mazei* Gö1-Kultur wurde abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 28 ml EDTA/Tris-Puffer (100 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl) aufgenommen und mit 4 ml einer 25%igen [w/v] SDS-Lösung lysiert. Dem Zellysyt wurden 100 µl einer Proteinase-K-Lösung (80 µg/ml TE-Puffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0]) zugegeben und für mindestens 30 min bei 65°C inkubiert. Um die DNS zu isolieren, wurden 12 ml einer 6 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung und 0,3 – 0,8 ml Glasmilch (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979) zugegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Umschwenken mit dem Proteinase-behandelten Zellysyt gemischt. Nach Zugabe von 20 ml Isobutanol und dem Absetzen der an die Glasmilch gebundenen DNS wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 10 ml einer NaI-Lösung (16,5 M NaI, 90 mM Na₂SO₃, filtriert und lichtgeschützt gelagert) versetzt. Das Sediment wurde mit 10 ml „new-wash“-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7, 1 mM EDTA, 50% Ethanol, [v/v]) vorsichtig gewaschen und anschließend in 10 ml TE-Puffer aufgenommen. Die DNS wurde durch 15-minütige Inkubation bei 50°C von der Glasmilch eluiert und anschließend sedimentiert (4.000 x g, 4°C, 2 min). Gefällt wurde die DNS aus dem Überstand durch die Zugabe von 1 ml einer 7,5 M NH₄-Acetat-Lösung und 30 ml eiskaltem Ethanol (reinst; 96%, v/v). Die DNS wurde wiederum sedimentiert (3.000 x g, 4°C, 5 min), mit 1 – 2 ml TE-Puffer versetzt und über Nacht bei 37°C gelöst.

2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (MULLIS *et al.*, 1986) wurde in 100 µl Ansätzen in einem Minicycler™ MJ Research (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf) mit den Komponenten des “Taq-PCR- Core-Kits“ (Fa. Qiagen, Hilden) oder des „Expand High Fidelity PCR System“

(Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Programme setzten sich aus einer 5-minütigen Denaturierung der DNS bei 95°C, einer Inkubation bei 85°C von 2 min zur Zugabe der jeweiligen Polymerase und 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94°C, 30 s), Anlagerung (35 - 60°C, 1 min) und Synthese (68 oder 72°C, die Temperatur und die Länge der Synthesezeit stützte sich auf die Angabe des Herstellers der Polymerasen) zusammen. Abbruchfragmente wurden durch Inkubation bei 68 bzw. 72°C für 10 min am Ende des Programms aufgefüllt. Bei Verwendung homologer Oligonukleotide wurde mit Anlagerungstemperaturen von 50 und 60°C gearbeitet. Die Oligonukleotide wurden von MWG-BioTech (Ebersberg) hergestellt.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Lowry oder Bradford (BRADFORD, 1976; LOWRY *et al.*, 1951).

2.8.2 Extraktion des Proteolipids und MtrD durch Chloroform/Methanol

Membranen von 40 – 60 g Zellen (Naßgewicht) wurden in einem möglichst geringen Puffervolumen (7 – 10 ml 25 mM Tris, pH 8,0) aufgenommen, mit 20 Volumenteilen eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1, v/v) versetzt und 22 h im Eisbad bei 4°C gerührt. Der Ansatz wurde anschließend über eine Glasfritte filtriert und mit 0,2 Volumenteilen H₂O_{bdest.} im Eisbad über Nacht gerührt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 10 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase zweimal mit 0,5 Volumenteilen eines Gemisches aus Chloroform/Methanol/H₂O (3:47:48, v/v/v) im Scheidetrichter gewaschen, wobei die Phasen erneut durch Zentrifugation getrennt wurden. Danach wurde die organische Phase mit 1 Volumen Chloroform versetzt und durch Zutropfen von Methanol aufgeklart. Diese Suspension wurde unter Vakuum eingeeengt und in einem kleinen Volumen Chloroform/Methanol (2:1, v/v) resuspendiert. Zur Abtrennung von Lipiden wurde Protein zweimal mit 4 Volumen auf –20°C vorgekühltem Diethylether präzipitiert und in einem kleinen Volumen Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen.

2.8.3 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde ein diskontinuierliches Verfahren verwendet, bei dem das freigesetzte Orthophosphat ermittelt wird (HEINONEN und LATHI, 1981). Hierzu wurde die Probe mit 1 ml Testpuffer je nach Organismus und Test (heterolog produzierte *M. mazei* Gö1-ATPase: 100 mM MES-HCl, 40 mM NaHSO₃, 10 mM MgSO₄, 10% [v/v] Glyzerin, pH 5,2 (WILMS *et al.*, 1996) oder 100 mM MES-HCl, 30 mM NaHSO₃, 8 mM MgSO₄, 40 mM Na-Acetat, pH 5,2 (LEMKER *et al.*, 2002); *M. jannaschii*-ATPase: 100 mM Tris, 100 mM MES, 40 mM NaHSO₃, 10 mM MgCl₂, pH 8,0) gemischt. Nach einer 5-minütigen Vorinkubation bei 37°C im Testpuffer erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 40 µl 0,1 M ATP. Bei Untersuchungen zu den Hemmstoffeinflüssen wurde die A₁-ATPase 30 min mit dem Inhibitor bei 37°C im Testpuffer vorinkubiert, bevor die Reaktion gestartet wurde.

200-µl-Proben wurden zu bestimmten Zeitpunkten entnommen und mit 40 µl 30% TCA versetzt. Die gefällten Proteine wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g entfernt, und 200 µl des Überstandes wurde mit 1 ml AAM-Reagenz (1 Volumen 10 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 1 Volumen 5 N H₂SO₄, 2 Volumen Aceton) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze bei 355 nm gemessen. Eine Eichkurve mit Orthophosphat wurde von 0 – 200 nmol KH₂PO₄ aufgenommen. Die Probenmenge und die Zeitpunkte der Probennahme wurden in Abhängigkeit von der Probe so variiert, daß ein linearer Anstieg des freigesetzten Orthophosphates während des Meßzeitraumes erreicht wurde und eine Extraktproportionalität gewährleistet war.

2.8.4 Messen einer ATP-Neusynthese mit Hilfe von inkorporiertem ³²P_i, modifiziert nach (KAGAWA und SONE, 1979)

Um eine ATP-Synthese aus ADP und P_i durch die in Liposomen rekonstituierte ATPase aus *M. jannaschii* messen zu können, wurde die Inkorporation von ³²P_i in ATP verfolgt, wobei das gebildete ATP im Anschluß über eine ATP-Falle abgefangen und in Glucose-6-Phosphat überführt wurde (HEMPFLING und HERZBERG, 1979).

Die Versuche wurden in mit Butylgummistopfen verschlossenen Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. 1,1 ml Testpuffer (100 mM MES, 100 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 40 mM NaHSO₃, 5 mM K₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄, pH 8,0 oder pH 7,0) wurden bei 80°C für 5 min vorinkubiert und mit 10 µCi Na₂H³²PO₄ (0,165 µCi/µmol Phosphat) versetzt. Nachdem 100 µl für die Nullprobe entnommen worden waren, wurde die ATP-Synthese-Reaktion durch Zugabe von 35 – 50 µl der über Nacht in Beladungspuffer (100 mM Succinat, 5 mM MgCl₂, pH 5,0 oder 4,0) inkubierten Proteoliposomen-Suspension gestartet. Proben wurden zu bestimmten Zeitpunkten (Variationen der Entnahme mit Abständen von je 2, 5 oder 10 min) entnommen. Durch sofortigen Transfer auf Eis wurde die Reaktion abgestoppt.

Um neu-synthetisiertes ATP in Glucose-6-Phosphat umzusetzen, wurden anschließend je 100 µl einer 20 mM Glucose-Lösung mit 1,4 U Hexokinase zugegeben. Diese Ansätze wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurde danach in Hungate-Gefäßen, in denen 2 ml Ammonium-Molybdat-Lösung (2%, w/t, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O in 1,6 N HClO₄) vorgelegt worden war, transferiert und so abgestoppt. Die Zugabe von 100 µl Triethylamin führte zur Präzipitation eines Phosphomolybdat-Protein-Komplexes, der durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm sedimentiert wurde. Der Überstand, der noch geringe Mengen an nicht verestertem ³²P_i enthielt, wurde noch zweimal mit je 2 ml eines Isobutanol/Benzol-Gemisches (1:1, v/v) extrahiert, wobei die Proben jeweils 3 x 1 min auf einem Whirl-Mixer gemischt wurden. Das anorganische ³²P_i löste sich währenddessen in der organischen Phase, verestertes Phosphat, wie beispielsweise Glucose-6-Phosphat verblieb dagegen in der wässrigen Phase. Nach der letzten Extraktion wurden 1,5 ml der wässrigen Phase in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt, und die von verestertem ³²P_i ausgehende Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR, Fa. Packard, Dreieich, Deutschland) gemessen.

2.8.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteinen durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach SCHÄGGER und VON JAGOW, 1987. Um die Proteine nach der Trennung im Gel sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung nach BLUM *et al.* (BLUM *et al.*, 1987) oder eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 (WEBER und OSBORN, 1969) angeschlossen.

2.8.6 Expression von *malE*-Fusionsgenen und Aufreinigung der Fusionsproteine

Die *malE*-Fusionsgene wurden in *E. coli* DH5 α in LB-Medium bei 37°C exprimiert. Die Proteinproduktion wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 2 h nach der Induktion geerntet und in der French-Press aufgebrochen. Durch Affinitätschromatographie über eine Amylose-Matrix wurden die Fusionsproteine nach Angaben des Herstellers (Fa. New England Biolabs, Beverly, U.S.A.) in PD-10-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt.

2.8.7 Herstellung von Antiseren

Zur Herstellung von Antikörpern wurde einem Kaninchen 200 μ g gereinigtes Protein injiziert (Fa. Biomol, Göttingen). Die zweite Immunisierung erfolgte mit 100 μ g nach einem Monat. Das Antiserum wurde nach weiteren zwei Monaten gewonnen. Die IgGs gegen AhaA, AhaB und AhaC wurden vor der Verwendung aus den Antiseren über ProteinA-Sepharose (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) in einer Säule mit 2 ml Bettvolumen aufgereinigt. Als Säulenpuffer diente 20 mM Phosphatpuffer (pH 7). Die Säule wurde mit 2 ml Antiserum beladen und so lange mit Säulenpuffer gespült, bis kein Protein mehr im Durchfluß nachweisbar war. Die gebundenen IgGs wurden mit 0,1 M Na-Citrat (pH 3) eluiert. Um eine Denaturierung der Immunglobuline zu verhindern, wurden Fraktionen von 800 μ l aufgefangen und zur Neutralisierung sofort mit 200 μ l 1 M K₂HPO₄ (pH 9,5) versetzt. War in den Eluaten kein Protein mehr zu detektieren, wurde die Säule mit 20 ml Säulenpuffer regeneriert. Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei -20°C.

2.8.8 Western-Blot-Analyse

Zur immunologischen Analyse von Proteinen mit spezifischen Antiseren wurden die Proteine nach dem Semidry-Verfahren bei 15 V für 30 min unter Verwendung einer „Semi dry transfer cell Transblot SD“-Transferkammer aus einer SDS-PAGE (s. 2.7.4) auf eine Nitrocellulosemembran ProtranBA 85 (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Als Transferpuffer, mit dem die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa. Whatman, Maldstone, GB) angefeuchtet wurden, diente 100 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% Methanol,

pH 7. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Amidoschwarz (0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure) angefärbt. Durch Entfärben mit PBST-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,05% Tween 20, pH 7) wurde die Proteinstandards sichtbar, die angezeichnet wurden. Zur Absättigung der Membranen mit Protein wurden diese für 1 h in 0,1% Milchpulver-Suspension (in PBST) bei Zimmertemperatur geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit PBST wurde das Antiserum in einer Konzentration von 4 – 20 µg/ml PBST zugegeben und über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBST für 30 min wurde diese für 1 h mit Protein A-Konjugat (6 µl/20 ml PBST, Fa. ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA) inkubiert und dann erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Die Detektion von Proteinen erfolgte nach Inkubation der Membran in Detektionslösung (0,03% H₂O₂, 1,2 mM Luminol, 0,2 mM p-Coumarsiure, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) für 2 min. Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (X-OMAT-AR, Fa. Kodak AG, Stuttgart).

2.9 Radioaktive Markierung von Proteinen

Eine sensitive Methode zum Nachweis der Expression von auf Plasmiden kodierten Genen ist die radioaktive Markierung der Genprodukte. Für die *in-vivo*-Markierung wurden aus Kulturen von *E. coli* DH5α(pJLA603) und *E. coli* DH5α(pAK1) bei einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 30°C 200 µl entnommen und die Zellen nachfolgend 2 x in 1 ml Methionin-Assay-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA; 2,6% (w/v) in M9-Medium) gewaschen. Nach der Resuspension der Zellen im 2 ml Methionin-Assay-Medium wurde die Kultur mit 1 µl ³⁵S-Methionin versetzt und für 1 h bei 42°C inkubiert. Eine Temperaturerhöhung auf 42°C induzierte die Expression der zu untersuchenden Gene. Danach wurden die Zellen 2 x in 200 µl Methionin-Assay-Medium gewaschen und in 100 µl Denaturierungspuffer (SCHÄGGER und VON JAGOW, 1987) aufgenommen und 10 min bei 100°C denaturiert. 15 µl dieser Lösung wurden auf ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine über Nacht bei 80 V im Gel aufgetrennt. Nachdem die Gele mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt worden waren, wurden sie kurz mit Wasser gespült und für 1 h in 1 M Natriumsalicylat inkubiert. Die Gele wurden anschließend auf Whatman-Papier getrocknet, bevor ein Röntgenfilm für die Erstellung einer Autoradiographie aufgelegt und in einer Röntgenfilmkassette für ca. 1 h bei -20°C exponiert wurde.

2.10 Heterologe Genexpression in dem Minizell-Produzenten *E. coli* DK 6

Zur Herstellung von Minizellen wurden 250 ml LB-Medium mit 1% Glukose und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Das Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DK6 mit dem entsprechenden Plasmid angeimpft und für etwa 12 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Zellernte (4°C, 15 min, 163.000 x g) in einer Sorvall Superspeed RC 2-B-Zentrifuge wurden die Zellen in 2-3 ml SG-Puffer (150 mM NaCl, 4,2 mM Na₂HPO₄, 2,2 mM KH₂PO₄, 0,01% Gelatine [w/v]) aufgenommen und auf einen Saccharose-Gradienten (2 – 33%, w/v) gegeben. Durch Zentrifugation in einem Sorvall AH629-Rotors bei 3.600 x g für 15 min bei 15°C wurden die vegetativen von den Minizellen getrennt. Die Minizellen wurden bis etwa 1,5 ml über den vegetativen Zellen vorsichtig abgenommen und bei (27.000 x g im SS34-Rotor) sedimentiert. Die Minizellen wurden erneut in SG-Puffer aufgenommen, auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen und in dem AH629-Rotor für 20 min bei 15°C und 2.300 x g zentrifugiert. Die nach dieser Zentrifugation deutlich erkennbare Minizell-Zone wurde vollständig abgenommen (8 – 10 ml) und das genaue Volumen und die optische Dichte bestimmt. Die Minizellen wurden gewaschen und anschließend in Methionin-Assay-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA; 2,6% (w/v) in M9-Medium) zu einer OD₆₀₀ von 2,0 resuspendiert. Die Suspension wurde in 100 µl-Aliquots mit 10% (v/v) Glycerin bei –20°C gelagert oder ohne Glycerin direkt für die Markierungsreaktion eingesetzt.

2.10.1 Markierung der heterolog in *E. coli* DK6 gebildeten Proteine mit ³⁵S-Methionin

Sollten für die Markierungsversuche gelagerte Minizellen eingesetzt werden, wurde das Glycerin durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 8.600 x g) und anschließende Aufnahme des Sediments in 100 µl Methionin-Assay-Medium entfernt. Frisch hergestellte Zellen wurden direkt eingesetzt. Um lebensfähige Zellen abzutöten, wurden die 100 µl-Ansätze mit 5 µl Glukose (40%, w/v) und 2 µl Penicillin-Lösung (0,1%, w/v) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde zu allen Ansätzen 1 µl ³⁵S-Methionin (spezifische Aktivität: 1 mCi/mmol, Konzentration 1 mM) und je nach Bedarf 2 µl IPTG (24 mg/ml H₂O_{dest.}) gegeben. Sollte die Genexpression durch Hitzeschock induziert werden, wurde die Behandlung mit Penicillin bei 30°C durchgeführt. Die Induktion der Genexpression erfolgte in diesem Fall durch Transfer der Ansätze von 30°C auf 42°C. Die Proteinbiosynthese unter

gleichzeitigem Einbau von radioaktiv markiertem Methionin erfolgte für 30 min entweder bei 37°C oder 30°C. Danach wurden die Zellen mit TN-Puffer (50 mM Tris, 0,5% NaCl [w/v]) gewaschen und in 100 µl Denaturierungspuffer (SCHÄGGER und VON JAGOW, 1987) aufgenommen. 30 µl der Proben wurden anschließend in einer SDS-PAGE analysiert. Die Autoradiographie wurde wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt.

2.11 Isolierung der Ether-Lipide aus *Sulfolobus acidocaldarius* und *M. jannaschii*

2.11.1 Herstellung des Lipid-Rohextraktes (BLIGH und DYER, 1959, modifiziert)

Für die Extraktion von Ether-Lipiden aus *S. acidocaldarius* und *M. jannaschii* mittels Soxhlet-Apparatur wurden ganze Zellen eingesetzt, die nach der Ernte lyophilisiert worden waren. In einem Vorlauf mit 100 ml Methanol/Chloroform (1:1, v/v) wurden eventuelle Verunreinigungen aus der Extraktionshülse gewaschen (28 x 80 mm, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel). Anschließend wurden 1,5 g Zellen mit 400 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches (1:1) für 24 h extrahiert. Der Rohextrakt wurde über einen Faltenfilter filtriert.

2.11.2 Fraktionierung der Lipide

Der Lipid-Rohextrakt wurde unter Vakuum bei einer Temperatur von etwa 40°C bis zur Trockne eingeengt und mit 20 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1, v/v) versetzt. Zur besseren Dispersion der Lipide wurden Glaskugeln (Durchmesser 2 – 3 mm) in den Kolben gegeben, und das Gemisch wurde für 15 min in einem Ultraschallwasserbad (Transsonic 460/H, Fa. Elma, Übach-Palenberg) beschallt. Zur vollständigen Homogenisierung wurde die zunächst milchig-trübe Lipid-Suspension unter konstanter Kühlung in 3-ml-Fractionen mit einem Probenultraschall-Gerät (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson Ultrasonics, U.S.A.) mit einem Mikrotip-Limit von 2, 20 Watt und 30% „duty cycle“ 10 x für 10 sec mit 30 sec Pause behandelt, wodurch die Suspension klarer wurde. Anschließend wurde sie auf einer C₁₈-Säule (Waters Sep Pak VacTM 20cc, Waters, Millipore, England) aufgetragen, die zuvor mit 100 ml Methanol und 100 ml Wasser äquilibriert worden war. Nachdem die Lipide in die Matrix eingetreten waren, wurden sie mit folgenden Lösungsmittelgemischen (alle v/v) fraktioniert eluiert:

100 ml Methanol-Wasser	(1:1)	=> Fraktion 1
100 ml Chloroform-Methanol-Wasser	(1:2,5:1)	=> Fraktion 2
100 ml Chloroform-Methanol-Wasser	(65:25:4)	=> Fraktion 3

Durch die stufenweise Erhöhung der Apolarität des Elutionsgemisches ergab sich folglich die Trennung der Lipide hinsichtlich ihrer Apolarität. Fraktion 2 enthielt die für die Rekonstitutionsexperimente erforderlichen Phospholipide. Sie wurden unter Vakuum bei etwa 50°C bis zur Trockne eingengt und unter Beachtung des Kolben-Leergewichtes wurde die Ausbeute bestimmt (etwa 100 mg bei *S. acidocaldarius*, 80 mg bei *M. jannaschii*). Die Lipide wurden zu einer Konzentration von 20 mg/ml in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v/v) aufgenommen und unter einer N₂-Atmosphäre bei 4°C gelagert.

2.12 Herstellung von Liposomen

Je nachdem, wieviel Enzym für die Rekonstitution zur Verfügung stand, wurden 4 – 10 mg der isolierten Lipide entnommen und bei einer Temperatur von 40°C bis zur Trockne eingengt. Die Lipide wurden in 50 mM MOPS-Puffer, pH 7, aufgenommen und wie beschrieben beschallt. Die Suspension klarte auch hierbei auf.

2.13 Rekonstitution der A₁A₀-ATPase von *M. jannaschii* in Liposomen von *S. acidocaldarius* und *M. jannaschii*

Die Rekonstitution von Proteinen in Liposomen kann durch verschiedene Verfahren erreicht werden. Durch Detergenzien, deren Konzentration im Verlauf der Rekonstitution verringert wird, wird die Insertion der hydrophoben Proteine in die Liposomen herbeigeführt. Die Orientierung des Enzyms ist dabei zufällig. Für die Rekonstitution der A₁A₀-ATPase von *M. jannaschii* in Liposomen, die aus *S. acidocaldarius*- oder *M. jannaschii*-Lipiden präpariert worden waren, sollten die Detergenzien sowohl durch Dialyse als auch durch die Verwendung von BioBeads SM2TM (BioRad) entfernt werden. Für beide Verfahren wurden die Liposomen zunächst durch die Zugabe des entsprechenden Detergenz bis zur Abnahme der Extinktion bei 560 nm vorbereitet (RIGAUD *et al.*, 1995). Für das Dialyseverfahren wurden 6 mg Liposomen in 400 ml 50 mM MOPS-Puffer, 5 mM MgCl₂, pH 7, mit 0,008% Octylglucosid gelöst. Die Extinktion reduzierte sich dabei von 0,5 auf 0,36. Liposomen und 120 µg ATPase

(Verhältnis 50:1) wurden in 1,5 ml MOPS-Puffer aufgenommen und bei 4°C im 2000-fachen Volumen für 24 h mit einer Ausschlußgröße von 3,5 kDa dialysiert. Der Puffer wurde dreimal ausgewechselt. Die Probe wurde für 2,5 h bei 230.000 x g bei 4°C zentrifugiert und die sedimentierten Proteoliposomen wurden in 200 µl MOPS-Puffer resuspendiert.

Sollten die Detergenzien durch BioBeads SM2 entfernt werden, mußten diese zunächst gewaschen werden, wozu sie in eine Leersäule gegeben wurden und mit 4 Säulenvolumen Methanol, 3 Säulenvolumen Ethanol und 6 Säulenvolumen H₂O gespült wurden. Bei dieser Art von Rekonstitution wurden Liposomen in MOPS-Puffer aufgenommen und durch die Zugabe von Triton X-100 gelöst bis die Extinktion abnahm. In verschiedenen Verhältnissen wurde ATPase zugegeben und 0,5 h bei Zimmertemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Die Detergenzien wurden durch Zusatz von BioBeads SM2 (80 mg/4 mg Lipide) und dreimaligem Austausch der Perlen entfernt. Der Ansatz wurde zweimal für 2 h bei Zimmertemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Im letzten Schritt wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C geschüttelt, um die Detergenzien vollständig zu entfernen. Die jetzt trübe Lösung wurde vollständig von den Perlen abgenommen, wobei genau darauf geachtet wurde, daß keine BioBeads zurückblieben. Die Proteoliposomen wurden anschließend mit einem „Extruder“ (MACDONALD *et al.*, 1991); Fa. Avestin, Ottawa, Kanada) auf eine einheitliche Größe gebracht, indem sie 19 – 21 mal durch einen 400 nm Filter (Polycarbonat-Membranen, Fa. Avestin) bewegt wurden. Wurde Triton X-100 mit je nur 1 mg BioBeads/h Inkubation aus dem Rekonstitutionsansatz entfernt, entfiel die Behandlung mit dem "Extruder", weil die Größenverteilung der Proteoliposomen schon nach Entnahme des Detergenz einheitlicher war. Die so erhaltenen Proteoliposomen wurden für die Messung von ATP-Synthese und -Hydrolyse verwendet.

2. 14 MALDI-TOF-Analyse

1 µl der Fraktion, die nach der Sephadex LH-60 Chromatographie erhalten wurde, wurde mit 1 µl gesättigter Lösung Sinapinsäure in Acetonitril/0,1%Trifluorsäure (1:1, v/v) gemischt. 0,5 µl dieser Lösung wurden auf die Matrixoberfläche gegeben und getrocknet. Die Messung wurde mit einem VOYAGER-MALDI-TOF (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, Germany) durchgeführt. Die Probe wurde mit einem Stickstofflaser (337 nm, 3 ns Pulslänge) ionisiert. Die MALDI-TOF-Analyse wurde von Herrn Dr. J. Kellermann, Martinsried, ausgeführt.

2.15 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Verfahren wie Negativkontrastierung der Proteoliposomen mit Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure und die Anfertigung der Quetschpräparate wurden nach HOPPERT und HOLZENBURG (1998) durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden an einem Phillips EM 301 Elektronenmikroskop (Fa. Phillips, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV und wurden von Dr. Michael Hoppert, Göttingen, erstellt.

2.16 Chemikalien, Enzyme und Gase

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, USA) und der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie stammten von MBI-Fermentas Deutschland GmbH (St. Leon Rot) und Roche (Mannheim). Standardproteine für die Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden von der Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) und Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Schweden) bezogen. Acrylamid wurde von Gerbu (Gaiberg) und Bisacrylamid von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) erhalten. Detergenzien konnten von Glycon Bioch. GmbH (Luckenwalde) bezogen werden. ATP und PMSF wurden ebenfalls bei der Sigma Chemie GmbH erworben. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Gase stammten von Messer Griesheim (Kassel).

3. ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Struktur und Funktion methanoarchäeller Proteolipide in Bezug auf die Fähigkeit der ATP-Synthese durch die A_1A_0 -ATPasen zu klären. Der Zusammenhang zwischen ATP-Synthese und Methanogenese ist seit langem bekannt (BLAUT und GOTTSCHALK, 1984; PEINEMANN *et al.*, 1989; SCHEEL und SCHÄFER, 1990; PEINEMANN *et al.*, 1990). Während der Einzelschritte der Methanogenese ist die Änderung der freien Energie ΔG^0 zu gering, weshalb Substratkettenphosphorylierung als ATP-Quelle ausgeschlossen werden muss. Vielmehr wurde bereits 1984 gezeigt, daß die Methanogenen durch einen chemiosmotischen Mechanismus ATP synthetisieren (BLAUT und GOTTSCHALK, 1984). Im Zuge der Reduktion des C_1 -Körpers werden Ionen über die Membran transloziert, der Rückfluß der Ionen durch die ATP-Synthase führt dann zur Synthese von ATP. Umgekehrt kann das Enzym jedoch auch ATP hydrolysieren und so die Membran energetisieren. Die V_1V_0 -ATPasen säuern durch die Hydrolyse von ATP Endomembransysteme von Eukaryonten an. Wie bereits erwähnt, sind sich die beiden ATPase-Typen strukturell sehr ähnlich, funktionell jedoch unterscheiden sie sich maßgeblich. In allen bis vor kurzem bekannten A_1A_0 -ATPasen hatte das Proteolipid eine molekulare Masse von 8 kDa, während die V_1V_0 -ATPasen Proteolipide mit einer Größe von 16 kDa aufwiesen. Diese unterschiedlichen Größen wurden stets als Grund für die Unfähigkeit der V_1V_0 -ATPasen zur ATP-Synthese unter physiologischen Bedingungen angesehen. Mit der Veröffentlichung archäeller Genomsequenzen zeichnet sich nun ein ganz anderes Bild ab: die *atpK*-Gene von *M. thermautotrophicus* und *M. jannaschii* kodieren für größere Produkte als die bisher bekannten. Diese Gene liegen dupliziert beziehungsweise tripliziert vor. Im Genom von *Methanopyrus kandleri* wurde sogar ein Proteolipid-Gen entdeckt, das für 13 strukturelle Kopien des einfachen Peptides kodiert. Diese molekularen Befunde waren aufsehenerregend, es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, daß durch posttranskriptionale oder posttranslationale Ereignisse die „großen“ Proteolipide zu 8-kDa-Proteolipiden prozessiert werden. Daher mussten die maturen Proteine gereinigt und charakterisiert werden.

3.1 Das Proteolipid aus *M. jannaschii*

3.1.1 *In Vivo*-Markierung des Proteolipids mit ³⁵S-Methionin

Die Gensequenz sagt vorher, daß das Proteolipid von *M. jannaschii* eine triplizierte Form eines 8-kDa-Proteolipids darstellt. Das heißt, drei Haarnadelstrukturen, die jeweils aus zwei transmembranen Helices mit einem hydrophilen Bogen bestehen, bilden ein Peptid. Die von der Gensequenz abgeleitete molekulare Masse des Proteolipids beträgt 21,3 kDa. Allerdings liegen noch zwei weitere potentielle Translationsstartpunkte innerhalb des offenen Leserahmens vor, so daß auch Peptide von 13,5 oder 10 kDa molekularer Masse synthetisiert werden könnten (Abb. 4). Zudem können post-translationale Modifikationen nicht ausgeschlossen werden, die in der Produktion kleinerer Peptide resultieren würden.

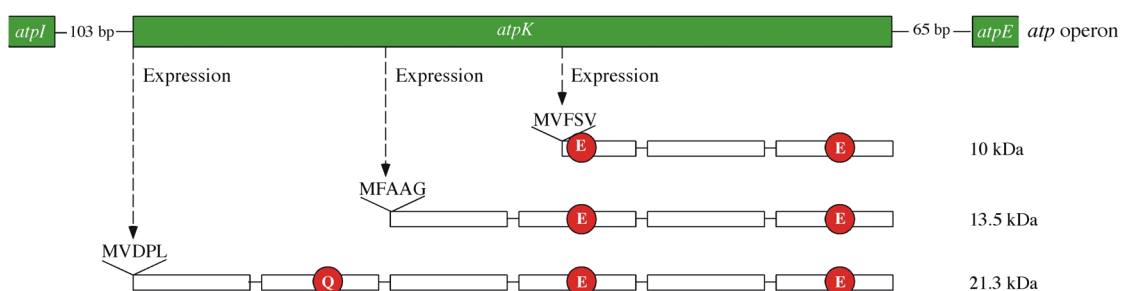


Abb. 4: Physikalische Karte des für das Proteolipid kodierenden Gens, *atpK*, aus *M. jannaschii* und davon abgeleitete, mögliche Peptide. Die Initiierung der Translation von *atpK* 104, 344 oder 461 Bp stromabwärts von *atpI* führt zur Synthese von Peptiden mit einer molekularen Masse von 21,3, 13,5 oder 10 kDa. Die H⁺-translozierenden Carboxylat-Reste und der Glutamin-Rest in Haarnadel eins sind angegeben. Die offenen Balken stellen potentielle transmembrane Helices dar. Sequenzdaten stammen aus BULT *et al.*, 1996.

Um die molekulare Masse des Proteolipids zu bestimmen, wurde der gesamte offene Leserahmen *atpK* zunächst per PCR mit genomischer DNA aus *M. jannaschii* als Matrize amplifiziert und in den Expressionsvektor pJLA603 kloniert, um das Gen heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Dieser Vektor enthält stromabwärts der λ -Promotoren p_R und p_L die hocheffiziente Ribosomenbindestelle von *atpE* aus *E. coli*. Die Transkription des inserierten Gens wird durch den Terminator des Bakteriophagen *fd* beendet. Der Vektor trägt zudem das

Gen für den Hitze-sensitiven λ -Repressor cI^{ts857} , wodurch eine gezielte heterologe Genexpression durch Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C möglich ist (SCHAUDER *et al.*, 1987). Über die bereits erwähnte Amplifikation des Gens wurden artifiziell für die Klonierung und Expression die geeigneten Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde pAK1 genannt (WIMMERS, 1997) und in den ATPase-negativen Stamm *E. coli* DK8 transformiert.

E. coli DK8(pAK1) und die Negativkontrolle *E. coli* DK8(pJLA603) wurden zunächst bei 30°C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezogen und anschließend auf 42°C transferiert, um die Produktion von AtpK für 2 h zu induzieren. Da weder im Rohextrakt noch in den Zellfraktionen nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel ein Peptid von erwarteter Größe detektiert werden konnte, wurde die für den Nachweis von Proteinen sensitivere Methode der radioaktiven Markierung gewählt. Dafür wurden die Zellen wiederum bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezogen, mit ^{35}S -Methionin markiert und in Denaturierungspuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch im SDS-Gel mit 12,5% *T*, 3% *C* aufgetrennt (siehe 2.8). Nach Autoradiographie des getrockneten Gels war eindeutig die Produktion eines Peptides von etwa 15 kDa molekularer Masse zu sehen, das in den Negativkontrollen nicht auftrat (Abb. 5). Um zu verifizieren, daß es sich bei dem 15-kDa-Peptid tatsächlich um Atpk handelt, wurden Expressionsanalysen in Minizellen durchgeführt.

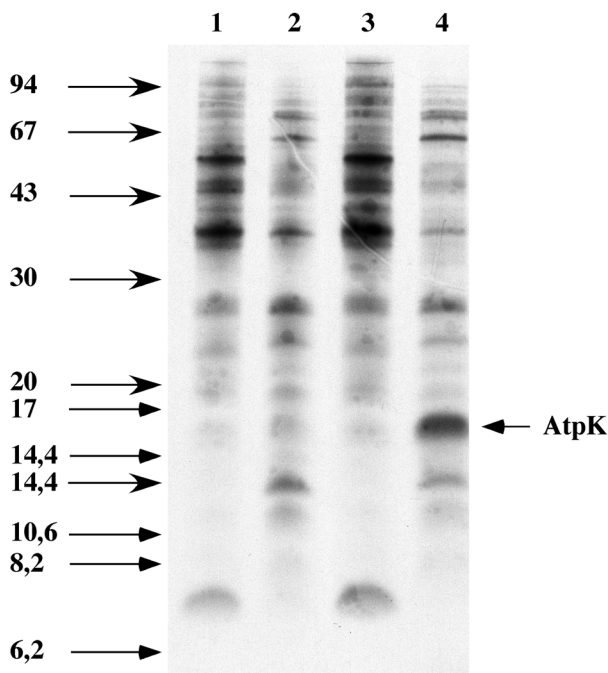


Abb. 5: Autoradiographie der mit ^{35}S -Methionin markierten Zellextrakte von *E. coli* DH5 α (pJLA603) und *E. coli* DH5 α (pAK1). Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 30°C angezogen, mit ^{35}S -Methionin versetzt und für die Induktion der Expression von *atpK* auf 42°C transferiert. Nach 1 h wurden die Zellen gewaschen, mit Denaturierungspuffer versetzt, und der Zellextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, Spur 1: *E. coli* DH5 α (pJLA603), 30°C, Spur 2: *E. coli* DH5 α (pJLA603), 42°C; Spur 3: *E. coli* DH5 α (pAK1), 30°C, Spur 4: *E. coli* DH5 α (pAK1), 42°C. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Pfeile mit dreieckigen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Sigma; Pfeile mit stacheligen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Amersham Pharmacia Biotech.

3.1.2 Minizell-Analyse des heterolog exprimierten *atpK*

Für die Produktion des Proteolipids im Minizellen-produzierenden Stamm *E. coli* DK6 wurde das *atpK* enthaltende Fragment zunächst in die Vektoren pHSG398 beziehungsweise pHSG399 umklont. Die Vektoren enthalten den mit IPTG induzierbaren *lac*-Promotor, der für die Expressionsstudien von *atpK* in Minizellen erfolgversprechender schien als der durch Hitzeschock induzierbare. Das *atpK*-kodierende Fragment aus pAK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bam*HI ausgeschnitten und in die mit *Sal*I und *Bam*HI geschnittenen Vektoren pHSG398 und pHSG399 umklont. In pHSG399 liegt das Gen konvergent zum *lac*-Promotor vor, das Plasmid wurde pAK2 genannt. pHSG398 enthält das divergent orientierte Fragment. Das Plasmid wurde als pAK3 bezeichnet. *E. coli* DK6 wurde mit den Plasmiden pAK2, pAK3, pHSG399 und pHSG398 transformiert und wie unter 2.9 beschrieben angezogen. Minizellen wurden isoliert, und durch Zugabe von IPTG und ³⁵S-Methionin wurde die Genexpression und die Markierung der Genprodukte induziert. Jeweils 30 µl des so behandelten Minizellrohextraktes wurden einer SDS-PAGE-Analyse unterworfen. Bei einer darauffolgenden Autoradiographie konnten markierte Proteine dargestellt werden. In allen verwendeten Stämmen wurde neben der Chloramphenicol-Acetyltransferase nur ein einziges, weiteres Protein gebildet, bei dem es sich um das *atpK*-Genprodukt handeln muss (Abb. 6). Allerdings stimmt auch in diesem Fall die Größe des Peptides von etwa 15 kDa nicht mit den abgeleiteten Massen von 10, 13,5 oder 21,3 kDa überein.

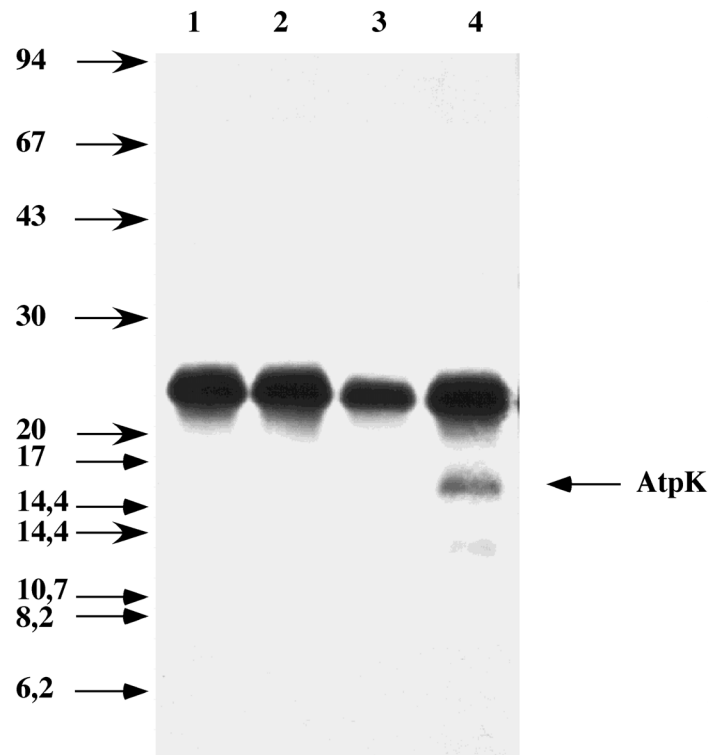


Abb. 6: Heterologe Expression des *atpK*-Gens aus *M. jannaschii* in Minizellen aus *E. coli* DK6. Minizellen wurden präpariert wie unter 2.9 beschrieben und die Genexpression wurde durch Zusatz von IPTG gestartet. Nach der Markierung der Proteine mit ^{35}S -Methionin wurden die Zellextrakte durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Spur 1: *E. coli* DK6(pHSG398), Spur 2: *E. coli* DK6(pHSG399), Spur 3: *E. coli* DK6(pAK3), Spur 4: *E. coli* DK6(pAK2). Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Pfeile mit dreieckigen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Sigma; Pfeile mit stacheligen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Amersham Pharmacia Biotech.

Da die heterologe Expression des *atpK*-Gens in beiden Systemen zur Produktion eines Peptides führte, das nicht den abgeleiteten Größen entsprach, sollte das mature Protein aus *M. jannaschii* isoliert und charakterisiert werden.

3.1.3 Chloroform/Methanol Extraktion des Proteolipids aus *M. jannaschii*

Für die Analyse der molekularen Masse von AtpK musste das Peptid also zunächst aus *M. jannaschii* gereinigt werden. Da es sehr hydrophob und deshalb in organischen Lösungsmitteln löslich ist, wurden Membranen aus etwa 45 g Zellen mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1) extrahiert und mehrfach mit H_2O gewaschen (siehe 2.7.2).

Nach zweimaliger Fällung mit Diethylether zur Abtrennung von Lipiden wurde der Niederschlag in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Der klare Lösungsmittelextrakt war bräunlich gefärbt.

Zwei Peptide konnten aus den cytoplasmatischen Membranen extrahiert werden, eines mit einer molekularen Masse von etwa 18 kDa und eines mit einer Masse von etwa 15 kDa in der SDS-PAGE (Abb. 7). Der experimentell bestimmte N-Terminus des 18-kDa-Peptides (MDIVSAIVPLIEMT) stimmt mit der N-terminalen Sequenz von MtrD überein, einer Untereinheit der Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym M-Methyltransferase, die eine primäre Na^+ Pumpe ist. Die ermittelte molekulare Masse von 18 kDa entspricht nicht der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Masse von 22,9 kDa. Auch die Peptide höherer molekularer Masse (Abb. 7) wurden durch N-terminale Sequenzierung als MtrD identifiziert. MtrD bildete offensichtlich unter den gewählten Bedingungen nicht denaturierbare Aggregate. Das 15-kDa-Peptid wurde als AtpK identifiziert. Die N-terminalen Sequenzen MVDPLILGAVGAGLA und VDPLILGAVGAGLA zeigten, daß das N-terminale Methionin teilweise abgespalten worden war.

Anhand der Sequenzanalyse der N-Termini wurde also bestätigt, daß die Translation von *atpK* am ersten der möglichen Startpunkte beginnt (vergleiche Abb. 4). Würde jedoch der gesamte offene Leserahmen exprimiert, sollte ein Protein von 21,318 kDa gebildet werden. Trotzdem wurden in den Expressionsstudien und auch nach der Extraktion der Membranen Peptide von etwa 15 kDa detektiert. Um eventuell abnormen Laufverhalten des Proteolipids in der SDS-PAGE Rechnung zu tragen, sollten für die SDS-PAGE verschiedene Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid eingesetzt werden. Wie bereits beschrieben, verhielt sich das Proteolipid in Gelen mit 12,5% T, 3% C wie ein 15-kDa-Peptid (Abb. 7a), aber nach Auftrennung in einem Gel mit 16,5% T, 6% C betrug die ermittelte molekulare Masse 19 kDa (Abb. 7b), was dem berechneten Wert bei Translation des gesamten offenen Leserahmens annähernd entspricht. Auch das Auftrennungsverhalten von MtrD änderte sich in Abhängigkeit der Acrylamidkonzentration.

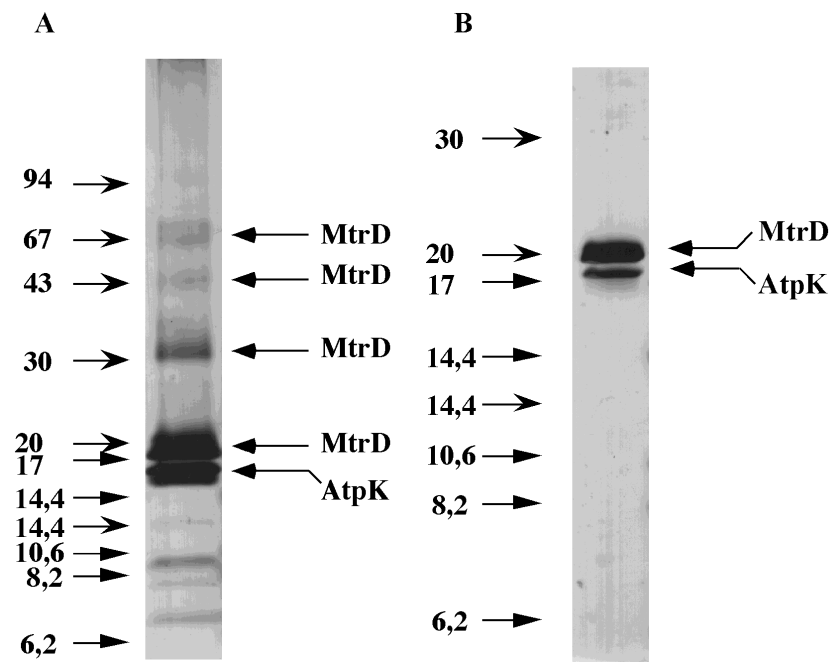


Abb. 7: SDS-PAGE der Proteine, die durch Chloroform/Methanol aus Membranen von *M. jannaschii* extrahiert wurden. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Pfeile mit dreieckigen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Sigma; Pfeile mit stacheligen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Amersham Pharmacia Biotech. Die verwendeten Acrylamid-Konzentrationen waren A) 12,5% T, 3% C und B) 16,5% T, 6% C.

Da die Gelelektrophorese mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen keine eindeutige Bestimmung der molekularen Masse erlaubte und auch per se zur Massenbestimmung nur bedingt geeignet ist, sollte die Masse von AtpK durch MALDI-TOF Analyse ermittelt werden. Dafür mussten zunächst nach Extraktion und anschließender Präzipitation der Proteine die in der Probe verbliebenen Lipide durch Gelfiltration mit Sephadex LH-60 entfernt werden. Kokristallisieren die Matrix und die zu analysierenden Proteine mit Lipiden nach Verdampfen des Lösungsmittels, können weder Matrix- noch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt werden. Daher ist es essentiell, Lipide zu entfernen. Sephadex LH-60 hat in Abhängigkeit vom Lösungsmittel ein Ausschlußvolumen von 0,4 bis 20 kDa, es wird für die Trennung von Lipiden eingesetzt und kann mit organischen Lösungsmitteln verwendet werden (Angaben des Herstellers, Amersham Biosciences, Freiburg). Auf die Säule wurde ein Probenvolumen von 1,5 ml mit einer Konzentration von 1,8 mg Protein/ml aufgetragen, was etwa 1,5% (v/v) des Säulenvolumens entspricht. Im Elutionsprofil (Abb. 8) ist nach Durchfluß von 48 ml ein Maximum mit zwei Schultern bei 36 und 41 ml zu erkennen. Zusätzlich treten kleinere Maxima schon bei 6 und bei 11 ml auf. Da die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen jedoch sehr gering

war (maximal 73 μg Protein/ml), wurden die Proben 1 – 20 (Fraktion I), 21 – 40 (Fraktion II) und 41 – 57 (Fraktion III) vereinigt, und das Lösungsmittelgemisch wurde zur Einengung der Proben unter Vakuum abgedampft. Die Proteinkonzentration betrug nach der Konzentrierung 490 mg Protein/ml (Fraktion I) beziehungsweise jeweils 250 μg Protein/ml (Fraktion II und III). Die Diskrepanz zwischen dem bei 280 nm aufgenommenen Elutionsprofil und dem durch Proteinbestimmung ermittelten Proteingehalt ist dadurch zu erklären, daß der Lösungsmittlextrakt gefärbt war. Vermutlich wurden während der Chloroform/Methanol-Extraktion neben den Peptiden auch Chromophore aus den Membranen gelöst, die ebenfalls bei 280 nm absorbieren.

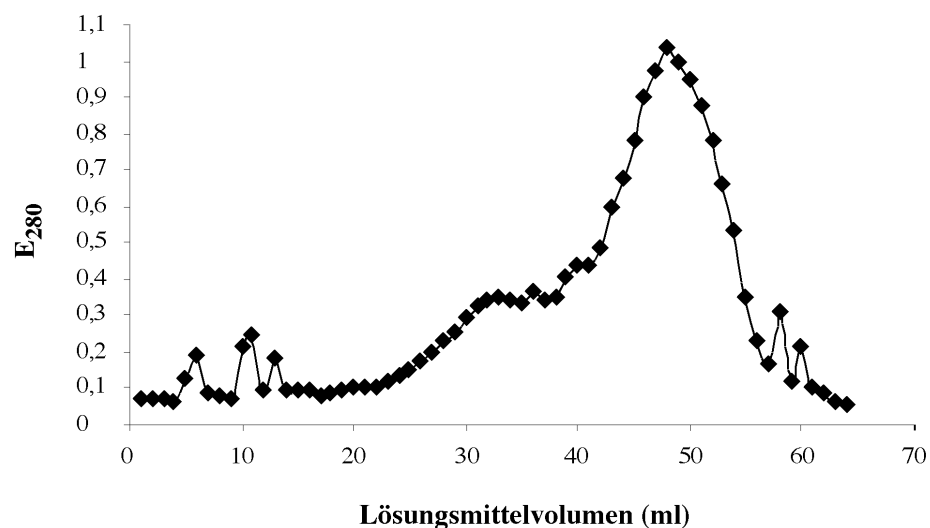


Abb. 8: Entfernung der Lipide aus dem Chloroform/Methanol-Extrakt aus Membranen von *M. jannaschii* durch Gelfiltration an Sephadex LH-60. Elutionsprofil der Sephadex LH-60-Säule gemessen bei 280 nm. Es wurden 1,5 ml des Chloroform/Methanol-Extraktes (Proteingehalt 1,8 mg/ml) aufgetragen und mit dem angegebenen Volumen Chloroform/Methanol (2:1, v/v) eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Nachdem die Lipide aus dem Gemisch entfernt worden waren, wurde Fraktion I durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 9). Nach Silberfärbung des Gels war offensichtlich, daß nur noch das Proteolipid aufgetrennt werden konnte. MtrD bildete solch stabile Aggregate, die auch unter unterschiedlichen Bedingungen nicht denaturiert werden konnten (Abb. 9), so daß ein Großteil des Proteins in den Auftragstaschen verblieb. Die Proben wurden jeweils bei 37°C für 2 h oder bei 100°C für 5 min in Denaturierungspuffer mit 0,1% oder 0,2% SDS inkubiert und auf Gelen elektrophoretisch getrennt, die entweder 0,1% oder 0,2% SDS enthielten (Abb.

9). Die beste Auflösung wurde mit 0,1% SDS und Inkubation bei 37°C für 2 h erzielt, unabhängig davon, ob dem Gel 0,1 oder 0,2% SDS zugefügt worden waren.

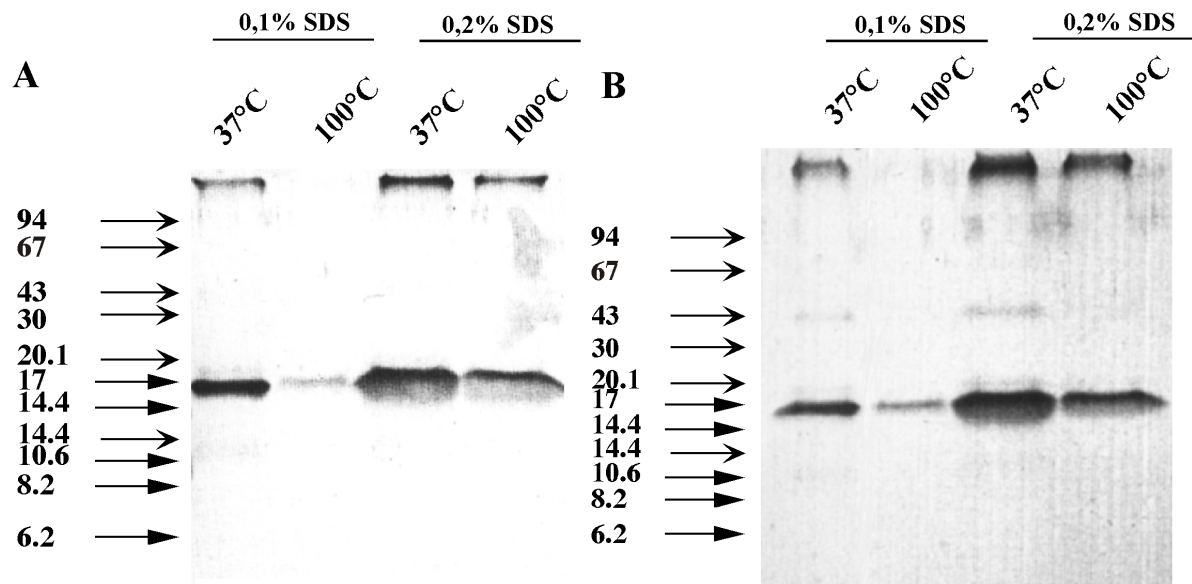


Abb. 9: SDS-PAGE des Chloroform/Methanol-Extraktes aus Membranen von *M. jannaschii* nach der Entfernung der Lipide, analysiert wurde Fraktion I. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Pfeile mit dreieckigen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Sigma; Pfeile mit stacheligen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Amersham Pharmacia Biotech. Die verwendeten Acrylamid-Konzentrationen waren 12,5% T, 3% C. Für die bessere Denaturierung wurden den Gelen entweder A) 0,1% SDS oder B) 0,2% SDS zugesetzt. Die Proben wurden in Denaturierungspuffer nach SCHÄGGER, 1987, aufgenommen und unter unterschiedlichen Bedingungen denaturiert. Die Inkubation bei 37°C erfolgte für 2 h, die bei 100°C für 5 min..

Der von Lipiden gereinigte Chloroform/Methanol-Extrakt, Fraktion I, wurde für die MALDI-TOF Massenspektrometrie herangezogen. In der Analyse wurden zwei Formen des Proteolipids mit molekularen Massen von 21316 Da und 21183 Da detektiert (Abb. 10), was gut mit den berechneten Werten von 21318 und 21187 für die Methionin-freie Form übereinstimmt. Die Abweichungen könnten durch verbliebene Lipide oder Matrix-Effekte verursacht worden sein (Kellermann, persönl. Mitteilung). Die Aggregate von MtrD konnten durch Laserbeschuß nicht von der Matrix gelöst werden, weshalb es kein Signal für dieses Peptid gab.

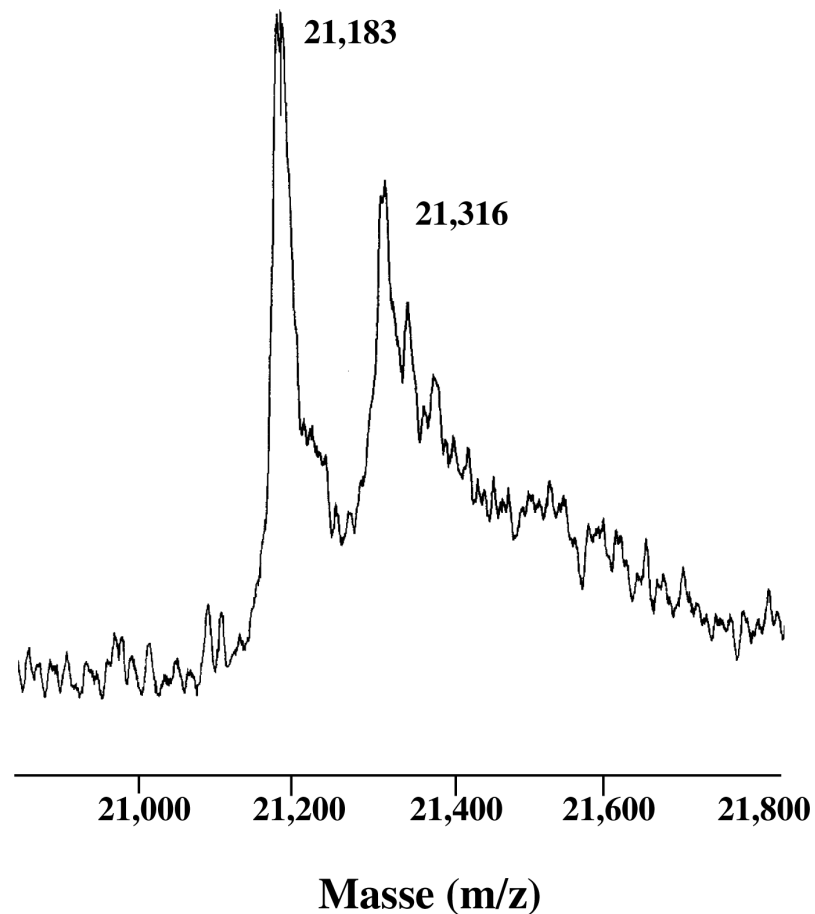


Abb. 10: MALDI-TOF-Analyse des Proteolipids von *M. jannaschii*.

Es konnte also durch MALDI-TOF-Analyse gezeigt werden, daß das Proteolipid von *M. jannaschii* mit 21,3 kDa tatsächlich die dreifache Größe der 8-kDa-Proteolipide hat, die in anderen Archäen gefunden werden. Auch die heterolog produzierten Genprodukte bestanden aus den triplizierten Formen, was durch das ungewöhnliche Laufverhalten des Peptides nicht erkennbar war. In dieser Arbeit wurde also zum ersten Mal ein natürlich auftretendes Proteolipid mit sechs transmembranen Helices isoliert.

3.2 Koisolierung des Proteolipids und MtrD aus verschiedenen Methanoarchäen

Durch die Chloroform/Methanol-Extraktion aus Membranen von *M. jannaschii* konnten zwei membranständige Untereinheiten - AtpK und MtrD - isoliert werden, die Teile der membranintegralen A_1A_0 -ATPase beziehungsweise der Methyltransferase sind. Diese Enzyme translozieren Ionen über die Membran, spielen also in der Bioenergetik der Methanoarchäen eine große Rolle. Die katalytischen Domänen beider Enzyme sind zu einem gewissen Grad untersucht worden, die membran-gebundenen Domänen bislang jedoch nicht. Da die Gene bekannt sind, die für die Untereinheiten beider Enzyme kodieren, wurde bereits versucht, diese besonders interessanten, hydrophoben Peptide zu überproduzieren, was aber nicht erfolgreich war (LIENARD, 1998). Deshalb müssen die hydrophoben Domänen oder Untereinheiten für weiterführende Analysen aus den Membranen der Methanogenen gereinigt werden. Da die Chloroform/Methanol-Extraktion aus *M. jannaschii* zur Isolierung von den direkt am Ionen-Transport beteiligten AtpK und MtrD führte, sollte versucht werden, die Methode auch auf andere Methanogene zu übertragen, die leichter und mit höheren Zellausbeuten zu kultivieren sind. Die Anreicherung des Proteolipids aus *M. thermautotrophicus* war zudem interessant, weil sich im Genom ein für das Proteolipid kodierender duplizierter offener Leserahmen befindet.

3.2.1 Extraktion von AtpK und MtrD aus *M. mazei* Gö1

Der mesophile Organismus *M. mazei* Gö1 wurde auf Methanol gezogen, in der späten exponentiellen Phase geerntet, und aus etwa 50 g Zellen wurden Membranen präpariert. Die Membranen wurden wie beschrieben mit Chloroform/Methanol extrahiert, die Proteine wurden mit Diethylether präzipitiert, in Chloroform/Methanol resuspendiert und einer SDS-PAGE unterworfen (Abb. 11). Wieder wurden zwei Proteine mit molekularen Massen von 21 und 7 kDa durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Beide Proteine wurden N-terminal sequenziert, um sie identifizieren zu können. Die experimentell ermittelte Sequenz für das 21-kDa-Protein stimmte mit der von der Gensequenz abgeleiteten von MtrD aus *M. mazei* überein (MIDAILGNILWMVFIHGGVL). Die Sequenz des 7-kDa-Proteins

(MVDAASTGLFLDAAGMKALGAAI) stimmt genau mit der abgeleiteten von AhaK, dem Proteolipid von *M. mazei* Gö1 überein. Die ermittelten molekularen Massen waren wie im Falle der Peptide aus *M. jannaschii* zu klein. Die Größe von MtrD sollte 25,5 kDa, die von AhaK 7,9 kDa betragen. Die gewünschte Reinigung der membranständigen Untereinheiten der A_1A_0 -ATPase und der Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym M-Methyltransferase aus Membranen von *M. mazei* durch Extraktion mit Chloroform/Methanol war also erfolgreich.

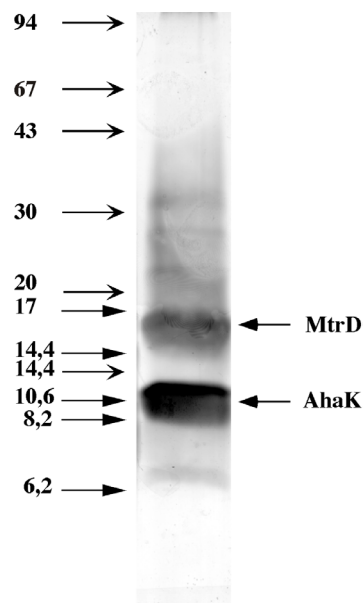


Abb. 11: SDS-PAGE der Proteine, die durch Chloroform/Methanol aus Membranen von *M. mazei* extrahiert wurden. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Pfeile mit dreieckigen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Sigma; Pfeile mit stacheligen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Amersham Pharmacia Biotech. Die Proteine wurden über die N-terminale Sequenz identifiziert.

3.2.2 Extraktion von AtpK und MtrD aus *M. thermautotrophicus* und *M. marburgensis*

Wurden Membranen von *M. thermautotrophicus* und *M. marburgensis* aus je etwa 40 g Zellen, die auf $H_2 + CO_2$ gewachsen waren, mit Chloroform/Methanol extrahiert, konnten nach der SDS-PAGE einige Proteine durch Silber angefärbt werden. Im Chloroform/Methanol-Extrakt von *M. thermautotrophicus*-Membranen wurden wie in den vorangegangenen Fällen zwei Peptide angereichert (Abb. 12a), eines von 16 und eines von 11

kDa. Bei dem 16-kDa-Protein handelt es sich um MtrD, wie von der N-terminalen Sequenz (MDPLLLIGAITAGGVLIGG) abgeleitet werden konnte. Mit der Sequenz VEIALGTALAAIGAGVAV wurde das 11-kDa-Peptid als Proteolipid identifiziert. Die Proteine mit größeren molekularen Massen, die für N-terminale Sequenzierung in zu geringer Konzentration im Extrakt vorlagen, sind vermutlich Aggregate von MtrD. Von dem gereiften Proteolipid wurde das Methionin offensichtlich abgespalten. Die experimentell ermittelte molekulare Masse des Proteolipids aus *M. thermotrophicus* stimmt zwar wieder nicht mit der abgeleiteten von 15,6 kDa überein, aber da das ungewöhnliche Laufverhalten auch bei AtpK aus *M. jannaschii* beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, daß es sich bei diesem Peptid um die duplizierte Form handelt. Dies wird durch die ermittelte N-terminale Aminosäuresequenz bestätigt.

Im aufgetrennten Extrakt (Abb. 12b) von *M. marburgensis* sieht man vier Banden mit molekularen Massen von 29, 19, 16 und 11 kDa. Die N-terminale Sequenz der 29-, 19- und 16-kDa-Peptide waren identisch (MDPLLLIGAI). Es handelte sich bei diesem Peptid um MtrD. Zwar stimmt keine der experimentell ermittelten Daten mit der abgeleiteten molekularen Masse von MtrD von 22,8 kDa überein, aber auch bei diesem Peptid war mit verändertem Laufverhalten im Gel zu rechnen. Bei den größeren und kleineren Formen könnte es sich um Multimere, Abbauprodukte oder anderweitig modifizierte Formen des Peptids handeln. In dem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß MtrD aus *M. jannaschii* auch Aggregate bildet, wenn die Lipide aus dem Extrakt entfernt werden oder der Extrakt länger gelagert wird.

Die Sequenz des 11-kDa-Peptids (VEIALGTALAAIGAGVA) entspricht der abgeleiteten Sequenz von AtpK aus *M. thermotrophicus*. Da die A_1A_0 -ATPase kodierenden Gene aus *M. marburgensis* noch nicht bekannt sind, die Aminosäurefolge aber mit der aus *M. thermotrophicus* übereinstimmt, ist es offensichtlich, daß es sich bei diesem Peptid um das Proteolipid aus *M. marburgensis* handelt. Auch in diesem Fall wurde das Methionin abgespalten.

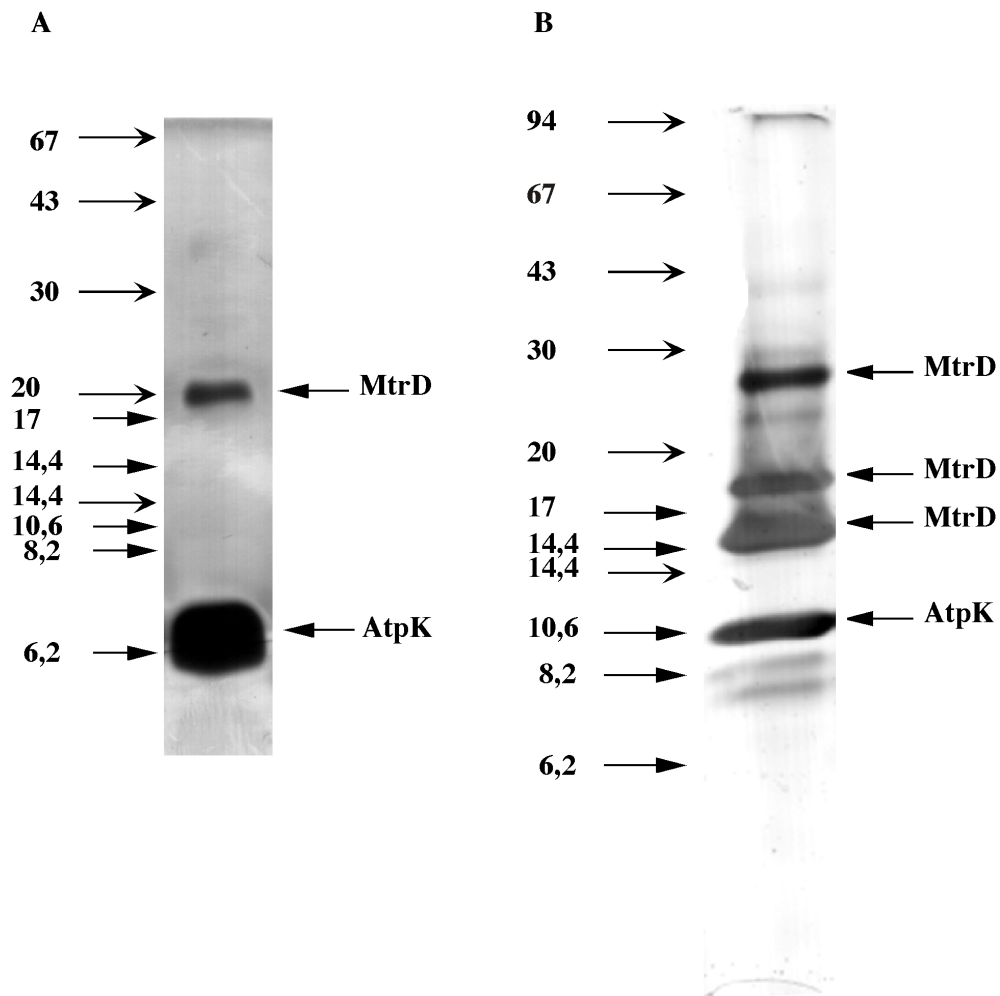


Abb. 12: SDS-PAGE der Proteine, die durch Chloroform/Methanol aus Membranen von *M. thermautotrophicus* (A) und *M. marburgensis* (B) extrahiert wurden. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Pfeile mit dreieckigen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Sigma; Pfeile mit stacheligen Köpfen entsprechen dem LMW-Kit von Amersham Pharmacia Biotech.

Es konnten also MtrD und das Proteolipid selektiv aus Membranen eines mesophilen, zweier thermophiler und eines hyperthermophilen Methanogenen durch Chloroform/Methanol-Extraktion isoliert und deren molekulare Masse bestimmt werden. Zum ersten Mal wurde gezeigt, daß Proteolipidmonomere aus Archäen nicht wie bisher stets angenommen, molekulare Massen von 8 kDa besitzen, sondern auch 21,3 kDa (*M. jannaschii*) oder 15,6 kDa (*M. thermautotrophicus* und *M. marburgensis*) haben können. Dieser Befund entkräftet die These, daß die Größe der Proteolipide einen Einfluß auf die Fähigkeit zur ATP-Synthese hat. Vielmehr ist nach diesen Erkenntnissen davon auszugehen, daß die Anzahl der im ATPase-Molekül enthaltenen Ionen-translozierenden Carboxylat-Gruppen diese Fähigkeit oder Unfähigkeit festlegen (siehe 4.4).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß ATPasen mit Proteolipiden von unterschiedlicher Größe im Reich der Archäen vorkommen, war es von größter Bedeutung, in einem ausschließlich A_1A_0 -ATPase enthaltendem System nachzuweisen, daß diese Enzyme tatsächlich ATP synthetisieren können. Dies war zuvor nur aus Experimenten mit Vesikeln oder ganzen Zellen von Methanogenen geschlossen worden. Zum Nachweis der ATP-Synthese durch A_1A_0 -ATPasen wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen sollte das gereinigte Enzym aus *M. jannaschii* in Liposomen von *Sulfolobus acidocaldarius* oder *M. jannaschii* rekonstituiert werden und durch artifizielle Triebkräfte zur ATP-Synthese gebracht werden, zum anderen sollte ein Klon erstellt werden, mit dem das gesamte A_1A_0 -ATPase-kodierende Operon aus *M. mazei* Gö1 in dem ATPase-negativen Stamm *E. coli* DK8 exprimierbar war, da methanogene Archäen nur schlecht bis gar nicht genetisch zugänglich sind. Das letztere System könnte zudem die Grundlage für molekulare Analysen zur Struktur und Funktion der A_1A_0 -ATPasen legen.

3.3 Rekonstitution der A_1A_0 -ATPasen in Liposomen

Die Synthese von ATP durch eine archäelle ATPase in Proteoliposomen sollte mit dem Enzym von *M. jannaschii* nachgewiesen werden. Diese ATPase ist die bisher einzige gereinigte archäelle ATPase, die alle Untereinheiten enthält (LINGL *et al.*, 2003). In der Präparation konnten alle neun ATPase-Genprodukte durch N-terminale Sequenzierung identifiziert werden. Um Proteine in Liposomen einzubauen, können vier Strategien verfolgt werden: 1) Rekonstitution durch organische Lösungsmittel, 2) Rekonstitution durch mechanische Verfahren wie Ultraschallbehandlung, 3) Rekonstitution durch Nutzung von destabilisierenden Agenzien (JAIN und ZAKIM, 1987) und 4) durch Detergenzien vermittelte Rekonstitution. Da die ATPase ohnehin unter Verwendung von Triton X-100 aufgereinigt wurde, wurde die vierte Methode für den Einbau gewählt.

3.3.1 Herstellung von Liposomen aus Lipiden von *S. acidocaldarius* und *M. jannaschii*

Für die Herstellung von Liposomen wurden zunächst Lipide aus *S. acidocaldarius* verarbeitet. Diese Lipide wurden ausgewählt, weil zum einen die Extraktion von Lipiden aus *S. acidocaldarius* und die Rekonstitution von Enzymen in Lipide dieses Organismus gut etabliert waren (GLEISSNER *et al.*, 1997; GLEISSNER *et al.*, 1994; ELFERINK *et al.*, 1993), zum anderen handelt es sich bei *S. acidocaldarius* um ein thermophiles Archäon mit einem Wachstumsoptimum von 70°C (BROCK *et al.*, 1972). *M. jannaschii* ist ebenfalls ein thermophiles Archäon, dessen ATPase höchste Hydrolyse-Aktivität bei 80°C aufweist (WIMMERS, 1997), einer Temperatur, bei der Lipide aus mesophilen Organismen durchlässig für Protonen werden. Im weiteren Verlauf der Rekonstitutionsexperimente wurden aber auch Lipide aus *M. jannaschii* verwendet.

Lipide von *S. acidocaldarius* und *M. jannaschii* wurden jeweils aus 1,5 g lyophilisierten Zellen für 24 h mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (1:1) in einer Soxhlett-Apparatur extrahiert wie unter 2.10.1 beschrieben. Die in diesem Lipid-Rohextrakt enthaltenen Phospholipide wurden durch Reversed-Phase-Chromatographie von den anderen Lipiden getrennt. Die Ausbeute betrug für *S. acidocaldarius* etwa 100 mg Phospholipide/1,5 g lyophilisierte Zellen, für *M. jannaschii* etwa 80 mg Phospholipide/1,5 g lyophilisierte Zellen. Die Lipide wurden bis zur Trockne eingeengt, gewogen und in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v/v) zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml aufgenommen und bei 4°C gelagert. Um die Liposomen zu präparieren wurden zwischen 6 und 10 mg Lipid entnommen, das Lösungsmittelgemisch wurde abgedampft, und die Lipide wurden im Rekonstitutionspuffer (50 mM MOPS, 5 mM MgCl₂, pH 7,0) aufgenommen. Die Liposomen bildeten sich während der Behandlung mit Ultraschall, was durch die Änderung der Trübung der Lösung beobachtet werden konnte. Die Liposomen wurden für den Einbau der ATPase vorbereitet, indem Detergenz zugegeben wurde bis die OD_{560nm} abnahm. Dadurch werden die Liposomen vorgelöst und der Einbau des Proteins wird erleichtert (RIGAUD *et al.*, 1995).

3.3.2 Rekonstitution der A₁A₀-ATPase aus *M. jannaschii*

Die A₁A₀-ATPase aus *M. jannaschii* wurde generell für die Rekonstitutionen nach der von LINGL *et al.* (2003) beschriebenen Methode gereinigt, lediglich im ersten Einbauexperiment, in dem das Detergenz durch Dialyse entfernt werden sollte, wurde im letzten Schritt, der Gelfiltration, 0,1% Triton X-100 (v/v) im Puffer gegen 0,1% (w/v) N-Octyl- β -glucopyranosid ausgetauscht. Zunächst wurde die A₁A₀-ATPase in Liposomen rekonstituiert, die aus Lipiden von *S. acidocaldarius* hergestellt worden waren. Für den Einbau durch Dialyse wurden Liposomen und Enzym (120 μ g Protein, Gesamthydrolyse-Aktivität: 510 mU) im Verhältnis von 50:1 gemischt und in einen Dialyseschlauch mit einem Ausschlußvolumen von 3,5 kDa gefüllt. Die Probe wurde bei 4°C in einem 2000-fachen Volumen für 24 h mit dreifachem Wechsel des Puffers dialysiert. Durch Zentrifugation bei 230.000 x g für 2,5 h bei 4°C wurden die Proteoliposomen sedimentiert. Die Proteoliposomen wurden dann in 200 μ l Rekonstitutionspuffer resuspendiert. Eine Fraktion des Überstands, eine Fraktion des Überstands kurz oberhalb des Sediments und die Proteoliposomen wurden auf ATPase-Aktivität getestet. Die gesamte ATPase-Aktivität in den beiden Fraktionen des Überstands betragen 15 mU beziehungsweise 110 mU, was bedeutet, daß die Proteoliposomen nicht vollständig sedimentiert wurden.

Die sedimentierten und resuspendierten Proteoliposomen wiesen 120 mU ATP-Hydrolyse-Aktivität auf. Von den eingesetzten 510 mU konnten letztlich nur noch 245 mU Gesamthydrolyse-Aktivität detektiert werden, etwa 50% der ATPase-Aktivität gingen also bei Einbau und Dialyse verloren, was vermutlich zum einen an der thermodynamischen Hemmung der ATPasen, zum anderen am Zerfall von ATPase-Molekülen während der Dialyse lag. Durch die Hydrolyse von ATP werden Ionen ins Innere der Liposomen gepumpt, wodurch die ATPase-Aktivität gehemmt wird (thermodynamische Hemmung). Die Annahme der möglichen Dissoziation des Enzyms wurde durch die Beobachtung erhärtet, daß bei weiteren Reinigungen der A₁A₀-ATPase aus *M. jannaschii* nach der Gelfiltration mit 0,1% (w/v) N-Octyl- β -glucopyranosid anstelle von Triton X-100 die ATPase-Aktivität gänzlich verloren ging. In der ersten Präparation stabilisierte aus vorhergehenden Aufreinigungen im Säulenmaterial verbliebenes Triton X-100, das auch nach mehrfachem Spülen des Materials nicht entfernt worden war, die ATPase. In späteren Reinigungen war das Triton X-100 offensichtlich herausgewaschen worden.

Einer der wichtigsten Parameter zur Beschreibung von Detergenzien ist die kritische Mizellen-Konzentration, bezeichnet durch den cmc ("critical micell concentration")-Wert. Er gibt an, ab welcher Konzentration des Detergenz Mizellen ausgebildet werden. Durch den niedrigen cmc-Wert von Triton X-100, der bei 20°C bis 25°C zwischen 0,22 und 0,24 mM liegt, formen sich bei Zugabe von 0,1% (v/v) (entspricht 1,7 mM) Mizellen des Detergenz. Diese können das Enzym stabilisieren. N-Octyl- β -glucopyranosid hat einen weitaus höheren cmc-Wert (20 bis 25 mM). Werden nur 0,1% (w/v) (entspricht 0,3 mM) N-Octyl- β -glucopyranosid zugesetzt, kann die A_1A_0 -ATPase nicht in Mizellen integriert vorliegen und zerfällt deshalb offensichtlich. Vom Einbauverfahren durch Dialyse musste deshalb auch Abstand genommen werden, denn Triton X-100, das aufgrund des niedrigen cmc-Wertes große Mizellen bildet, läßt sich nicht dialysieren (RIGAUD *et al.*, 1995).

Detergenzien mit niedrigem cmc-Wert können durch Adsorption an hydrophobe Matrizes aus Lösungen entfernt werden (HOLLOWAY, 1973). BioBeads SM2 (BioRad; Richmond, California) sind poröse, mit Divinylbenzol vernetzte Polystyrolkugeln, deren Oberfläche hydrophobes Material aus wässrigen Lösungen adsorbieren kann. Triton X-100 wird gut durch diese BioBeads entfernt (RIGAUD *et al.*, 1995). Für die nachfolgenden Einbauversuche wurden also stets BioBeads verwendet.

Die durch Dialyse erhaltenen Proteoliposomen wurden zusätzlich elektronenmikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, daß tatsächlich ATPasen in die Liposomen eingebaut worden waren (Abb. 13), allerdings lagen etwa 80% des Proteins in langen Aggregatketten vor (Dr. M. Hoppert, persönl. Mitteilung), die nicht eingebaut waren und vermutlich jedwedes neu synthetisierte ATP sofort wieder hydrolysieren würden. In den darauffolgenden Rekonstitutionsexperimenten wurde deshalb das Lipid-zu-Protein-Verhältnis variiert.

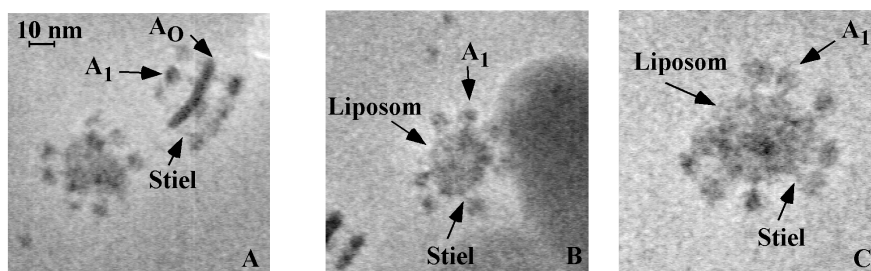


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der durch Dialyse in Liposomen rekonstituierten ATP-Synthase aus *M. jannaschii*. In Abbildung A sind die aggregierten A_1A_0 -ATPasen zu sehen. Die ATPase-Monomere lagern sich an ihren hydrophoben Domänen an, die A_1 -Domänen sind aufgrund der sterischen Behinderung alternierend angeordnet. In Abbildung B und C sind in Liposomen unterschiedlicher Größe rekonstituierte ATPasen gezeigt.

Da es bei der schnellen Entfernung des Detergenz aus Lösungen, wie mit SM2 BioBeads zu erwarten, zu Umlagerungen der Liposomen kommt, müssen für eine einheitliche Größenverteilung die Proteoliposomen mit Hilfe eines "Extruders" durch eine Polycarbonat-Membran gepreßt werden. Die danach erhaltenen Vesikel wurden anschließend in einem umgekehrten Dichtegradienten zentrifugiert, um nicht eingebautes Enzym aus der Präparation zu entfernen. Nach 24stündiger Zentrifugation hatten sich verschiedene, durch die rötliche Färbung der Liposomen aus *S. acidocaldarius* gut sichtbare Banden gebildet, die alle abgenommen und wiederum sedimentiert wurden. Für die Ansäuerung der Liposomen wurden sie in Ladepuffer (100 mM Succinat, 5 mM MgCl₂, pH 4) aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Transfer in Reaktionspuffer (100 mM Tris, 100 mM MES, 40 mM NaHSO₃, 5 mM MgCl₂, 5 mM K₂HPO₄, 5 mM ADP, 10 µCi ³²PO₄, pH 7) sollten Protonen durch die ATPase-Moleküle ausströmen und die Synthese von ATP katalysieren, wodurch radioaktiv markiertes ATP gebildet werden sollte. In keinem der Versuche, in denen das Protein:Lipid-Verhältnis geändert wurde oder der pH-Sprung von pH 4 auf pH 7 oder von pH 5 auf pH 8 erfolgte, konnte jedoch ATP-Synthese detektiert werden.

Der Einbau der A₁A₀-ATPase aus *M. jannaschii* in Lipide aus *S. acidocaldarius* führte nicht zur Synthese von ATP, weshalb das Enzym in Lipide aus *M. jannaschii* eingebaut werden sollte, denn die Anwesenheit von spezifischen Lipiden spielt in Bezug auf die Funktionalität und Aktivität eines Enzyms eine gewichtige Rolle (OPEKAROVA und TANNER, 2003). In diesem Fall wurden die Liposomen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis hergestellt. Wieder wurden die Liposomen durch Zugabe von Triton X-100 vorgelöst. Um das optimale Lipid:Protein-Verhältnis zu ermitteln, wurden unterschiedlichste Lipidmengen mit 270 µg Protein von 600 mU ATP-Hydrolyse-Aktivität gemischt und 30 min bei Zimmertemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden stündlich nur je 1 mg BioBeads hinzugegeben, um das Detergenz möglichst langsam zu entfernen und so Umlagerungen der Liposomen und Aggregieren der ATPase-Moleküle zu verhindern. Über Nacht wurden die Rekonstitutionsansätze im Kühlraum weiter geschüttelt. Die Lipide wurden so lange mit BioBeads inkubiert, bis die Lösung trüb wurde, was die Entfernung des Detergenz und die Bildung von Proteoliposomen anzeigte. Anschließend wurden die Proteoliposomen bei 175.000 x g für 1 h bei 4°C sedimentiert und in 50 µl Beladungspuffer aufgenommen. Die Ansätze wurden auf ATP-Hydrolyse, ATP-Synthese und durch Elektronenmikroskopie untersucht. In allen Fällen konnte im resuspendierten Sediment und im Überstand ATP-Hydrolyse gemessen werden, allerdings wie bereits zuvor beschrieben bei Rekonstitution durch BioBeads mit deutlichem Verlust an ATPase-Aktivität von mehr als

50%. Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 14) war ersichtlich, daß die ATPase auch in Lipide von *M. jannaschii* in der gewünschten Orientierung mit der A₁-Domäne nach außen inseriert. In Abhängigkeit der Lipidmenge haben die Liposomen einen Durchmesser zwischen 50 und 100 nm beziehungsweise 100 bis 500 nm. Die Größenverteilung zeigte, daß nach der langsamen Entfernung des Detergenz keine Bearbeitung der Proteoliposomen durch einen "Extruder" notwendig war, womit die ATPase weniger Scherkräften ausgesetzt war. EM-Aufnahmen ergaben, daß die kleinen Liposomen sehr dicht mit der A₁A₀-ATPase belegt sind, so daß eine Liposomen-Membran als Grenze nicht mehr erkennbar ist. In einigen Proben liegen viele A₁-Domänen frei vor, die zur beobachteten ATP-Hydrolyse-Aktivität beitragen können. Die ATPase wurde also erfolgreich rekonstituiert.

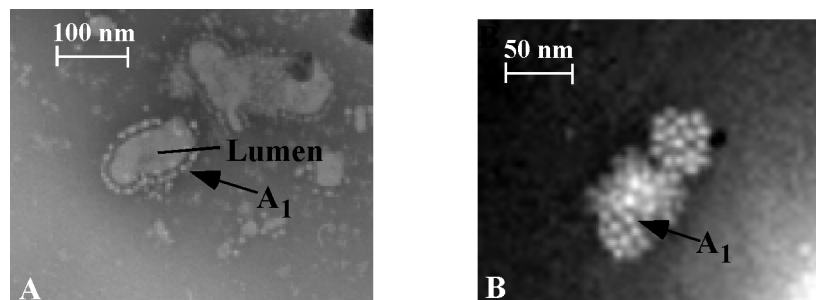


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proteoliposomen nach Entfernung des Detergenz durch Behandlung mit BioBeads SM2. In Abbildung A ist ein Querschnäparat der negativkontrastierten Proteoliposomen gezeigt.

Um die Synthese von ATP nachzuweisen, wurden diese Liposomen zunächzt durch Inkubation in Succinat-Puffer, pH 5, über Nacht mit Protonen beladen. Durch Transfer in den ATP-Synthese-Puffer von pH 8, dem $^{32}\text{PO}_4^{-2}$ zugesetzt wurde, sollte es zum Ausstrom von Ionen durch die ATPase kommen, wodurch das Enzym radioaktiv markiertes ATP synthetisieren sollte. Allerdings führte auch dieser Ansatz nicht zur Synthese von ATP.

Nachdem keine ATP-Synthese gemessen werden konnte, sollte untersucht werden, ob die ATPase-Aktivität einer thermodynamischen Hemmung unterlag, was auf einen funktionellen Einbau der ATPase hindeuten würde. Die Hydrolyse von ATP ist an das Einströmen von Protonen in das Lumen der Vesikel gekoppelt, wodurch an diesen ein elektrochemischer Gradient entsteht. Dieser Gradient hemmt den weiteren Transport von Protonen und damit die ATP-Hydrolyse. Die Hemmung muss jedoch aufhebbar sein, wenn die Lipide für Protonen durchlässig gemacht werden. Das kann durch Zugabe eines Detergenz

wie Triton X-100 erreicht werden. Zusätzlich sollte bei einer erneuten Rekonstitution mit geringerer g -Zahl und kürzer zentrifugiert werden, um den Anteil nicht eingebauten Enzyms im Sediment zu minimieren.

Für die erneute Rekonstitution wurden 400 μ l vorgelöster Liposomen mit 1 mg ATPase (Gesamthydrolyse-Aktivität: 2,6 U) eingesetzt. Nach Entfernen des Detergenz wurden die Proteoliposomen für 30 min bei 100.000 $\times g$ sedimentiert und anschließend in 150 μ l Succinat-Puffer aufgenommen. Die ATPase-Aktivität im Sediment betrug 520 mU, im Überstand verblieben 580 mU. Wieder gingen 60% der Aktivität während der Rekonstitution verloren. Durch Zusatz von 1% Triton X-100 ließ sich die elektrochemische Kopplung aufheben und die ATP-Hydrolyse-Aktivität um den Faktor 2,2 von 3,5 U/ml auf 7,745 U/ml steigern, was auf den richtigen Einbau des Enzyms und ein intaktes Membransystem hinwies. Die Aufhebung der elektrochemischen Hemmung durch Protonophore wurde nicht getestet.

Nachdem die ATP-Hydrolyse durch Triton X-100 stimulierbar war, sollte eine mögliche ATP-Synthese nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der Test-Ansatz variiert, denn bei der F_1F_0 -ATPase aus *Paracoccus denitrificans* war ein Einfluß von Sulfit auf die ATPase-Aktivität beobachtet worden. Sulfit aktivierte einerseits die ATP-Hydrolyse, andererseits aber inhibierte Sulfit die Synthese von ATP (PACHECO-MOISES *et al.*, 2002). Auch die ATP-Hydrolyse durch die A_1A_0 -ATPase aus *M. jannaschii* wird durch Sulfit stimuliert (LINGL, persönl. Mitteilung). Um eine mögliche Inhibition der ATPase durch das im Reaktionspuffer enthaltene Sulfit auszuschließen, wurde die ATP-Synthese-Reaktion in Anwesenheit und in Abwesenheit von Sulfit durchgeführt, allerdings konnte in keinem Fall keine ATP-Synthese nachgewiesen werden.

Es gelang also, die A_1A_0 -ATPase aus *M. jannaschii* in Lipide aus *S. acidocaldarius* und *M. jannaschii* in der gewünschten Orientierung zu integrieren. Allerdings wurden keine Versuchsbedingungen gefunden, in denen das Enzym ATP synthetisiert.

3.4 Heterologe Produktion der A_1A_0 -ATPase aus *M. mazei* in *E. coli*

Eine andere Möglichkeit, eine archäelle ATPase auf ihre Fähigkeit zur ATP-Synthese und in Bezug auf ihre Ionen-Spezifität zu untersuchen, ist, sie heterolog in einem ATP-Synthase-negativen Hintergrund zu produzieren. Dafür muss ein System gefunden werden, in dem die für die ATPase kodierenden Gene exprimiert werden, die Gen-Produkte nativ assemblieren und in die Membran inserieren. Die A_1 -Domäne der ATPase aus *M. mazei* ist bereits erfolgreich in *E. coli* DK8, einem ATPase-negativen *E. coli*-Stamm, produziert worden (LEMKER *et al.*, 2002). Zudem war aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, daß das Proteolipid aus der A_1A_0 -ATPase von *M. mazei* trotz der unterschiedlichen chemischen Natur der Lipide aus Bakterien und Archäen in die Membran von *E. coli* inseriert (RUPPERT *et al.*, 1998). Es schien daher erfolgversprechend, das vollständige Enzym aus *M. mazei* in *E. coli* DK8 zu produzieren. Die für die ATPase kodierenden Gene aus *M. mazei* wurden deshalb ausgewählt, weil alle potentiellen ATPase-Gene in einem Operon organisiert vorliegen.

3.4.1 Überproduktion einzelner A_1 -ATPase-Untereinheiten als MalE-Fusionen und Gewinnung von Antiseren

Zum Nachweis der Expression des A_1A_0 -Operons und der Lokalisation der Gen-Produkte war es zunächst notwendig, Antikörper gegen die einzelnen ATPase-Untereinheiten herzustellen. Dazu wurden die Gene *ahaA*, *ahaB*, *ahaC*, *ahaD*, *ahaE*, *ahaF* und *ahaG* jeweils durch PCR amplifiziert und an das für das Maltosebindeprotein aus *E. coli* kodierende Gen *malE* fusioniert. Anschließend wurde *E. coli* DH5 α mit den Konstrukten transformiert, und die Genexpression durch Zugabe von IPTG gestartet. Wie nach der Auftrennung der *E. coli*-Extrakte im SDS-Gel zu sehen (Abb. 15), wurden alle Fusionsproteine produziert. Diese aus MalE und den entsprechenden ATPase-Untereinheiten bestehenden Proteine wurden über Affinitätschromatographie gereinigt und in Kaninchen injiziert.

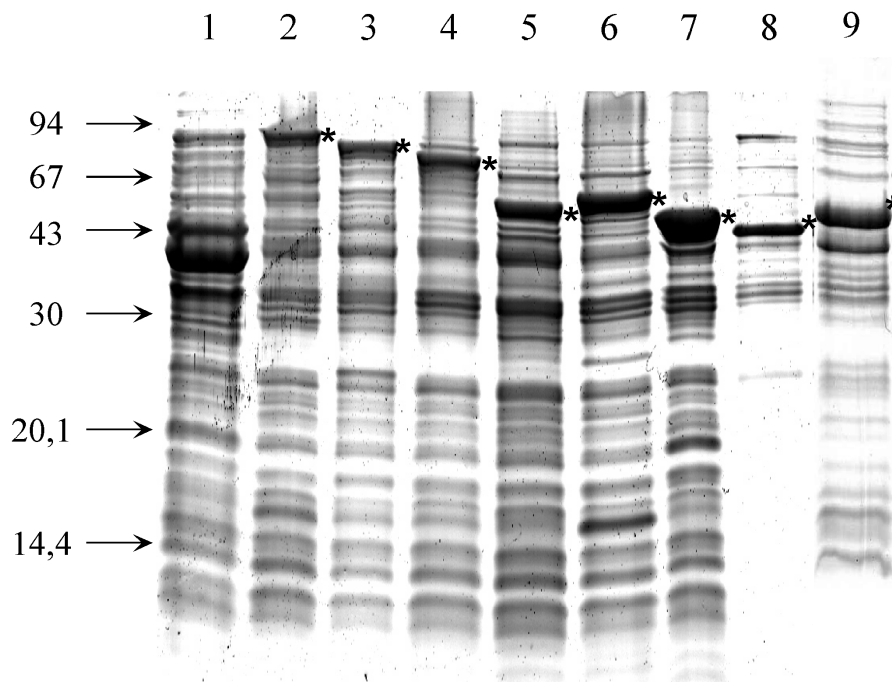


Abb. 15: Produktion der Fusionsproteine aus MalE und den jeweiligen ATPase-Untereinheiten aus *M. mazei* in *E. coli*. Die Fusionsproteine wurden wie beschrieben in *E. coli* produziert, Zellextrakte wurden hergestellt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Spur 1: MalE, Spur 2: MalE-AhaA-Fusion, Spur 3: MalE-AhaB-Fusion, Spur 4: MalE-AhaC-Fusion; Spur 5: MalE-AhaD-Fusion, Spur 6: MalE-AhaE-Fusion, Spur 7: MalE-AhaF-Fusion, Spur 8: MalE-AhaG-Fusion, Spur 9: MalE-AhaK-Fusion. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben. Die Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die erhaltenen Antiseren wurden auf ihre Spezifität hin untersucht. Für diese Analyse wurde *M. mazei* Gö1 auf Methanol gezogen, ein Zellextrakt hergestellt und dieser in Western-Blots gegen die jeweiligen Antikörper hybridisiert. Das Antiserum gegen AhaA reagierte mit einem einzelnen Protein von 65 kDa (Abb. 16), was gut mit der abgeleiteten molekularen Masse von 64 kDa übereinstimmt. Auch die Antiseren gegen AhaB und AhaC reagierten jeweils ausschließlich mit einem Protein von 55 und 41 kDa, was den vorhergesagten Massen von 51 beziehungsweise 41,5 kDa entspricht. Das einzige Protein, das durch das Antiserum gegen AhaE erkannt wurde, entspricht mit 22 kDa molekularer Masse auch der abgeleiteten von 20 kDa. Diese vier Antiseren sind folglich sehr spezifisch für ihre Antigene, wohingegen das Antiserum gegen AhaF nur eingeschränkt verwendbar für den Nachweis war, da es neben der Reaktion mit einem Protein von erwarteter Masse (9 kDa, abgeleitete Masse 11 kDa) auch mit größeren Proteinen kreuzreagierte. Das Antiserum gegen AhaD reagierte nur mit einem 67-kDa-Protein, was nicht mit der erwarteten Masse von 24 kDa übereinstimmt. Das Antiserum gegen AhaG zeigte keine Reaktion mit dem Zellextrakt von *M. mazei* Gö1 (Daten

nicht gezeigt). Das Antiserum gegen AhaK reagierte mit einem Peptid der erwarteten Größe. Das Antiserum gegen AhaI lag bereits vor (Kavermann, 1999). Demnach konnten für die Expressionsstudien die polyklonalen Antiseren gegen die hydrophilen Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC und AhaE und die hydrophoben Untereinheiten AhaK und AhaI für den Nachweis und die Lokalisation der ATPase genutzt werden.

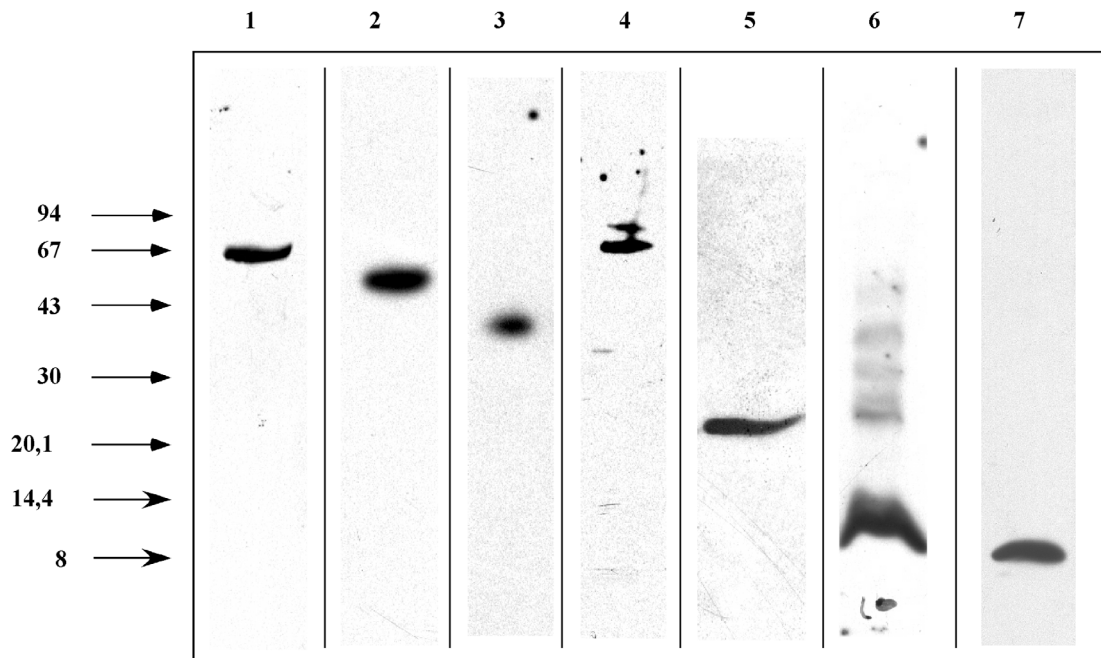


Abb. 16: Überprüfung der Spezifität der gegen die Untereinheiten der A_1A_0 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 gerichteten Antikörper. Zellextrakte von auf Methanol gezogenen Zellen von *M. mazei* Gö1 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nylon- beziehungsweise auf PDF-Membranen (Anti-AhaK) geblottet. Die Blots wurden mit den Antiseren gegen AhaA (Spur 1), AhaB (Spur 2), AhaC (Spur 3), AhaD (Spur 4), AhaE (Spur 5), AhaF (Spur 6) und AhaK (Spur 7) inkubiert.

3.4.2 Klonierung von pRT1

Ziel der Erstellung eines Klonen mit dem gesamten *aha*-Operon war es, eine Möglichkeit für die heterologe Produktion der vollständigen A_1A_0 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 in *E. coli* zu schaffen, um zum einen nachweisen zu können, daß die A_1A_0 -ATPase ATP synthetisieren kann und zum anderen, gezielte Mutationen einführen zu können, um die Ionen-Abhängigkeit des Enzyms klären zu können.

Die meisten Gene für hydrophile Untereinheiten (3'-Terminus von *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG*) waren aus chromosomaler DNS erhalten worden und lagen als *XbaI/KpnI*-Element in verschiedenen Vektoren vor. Die stromaufwärts gelegene Region (*ahaH*, *ahaI*, *ahaK* und der 5'-Terminus von *ahaE*) lag zwar als Teil in pEW1 kloniert vor, enthielt allerdings in *ahaI* ein Insertionselement (RUPPERT, 1997). Zudem fehlten für die weitere Umklonierung dieser Gene geeignete Schnittstellen, die durch PCR mit genomischer DNS aus *M. mazei* Gö1 als Matrize eingeführt werden mussten. Die Starteroligonukleotide *ahaH*(*SalI*).5' und *oahaEup*(*XbaI*) wurden dafür eingesetzt. Das gereinigte PCR-Fragment wurde durch den „pBAD TOPO TA Cloning[®] Kit“ kloniert, und das resultierende Plasmid wurde pHS3 genannt. Die pBAD-Vektoren enthalten neben dem *araBAD*-Promotor das Gen für den Repressor AraC, der an den Promotor bindet und damit die Transkription verhindert. Außerdem wird der Promotor Katabolit-reprimiert, also wird bei Wachstum auf Glukose und ohne Arabinose die Transkription zusätzlich unterdrückt. Da eine geringe Produktion der beiden hydrophoben ATPase-Untereinheiten schon letal für die Zelle sein kann, wurde auch für die Herstellung des Gesamt-Klons auf dieses Expressionssystem zurückgegriffen.

Durch die Restriktion von pRT103 (RUPPERT, 1997) mit *XbaI* und *SacI* wurde ein 6581 Basenpaar großes Fragment ausgeschnitten, das den 3'-Terminus von *ahaE* und die Gene *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* und 723 Bp von *hypF* enthielt. Das Element wurde in den ebenso mit *XbaI* und *SacI* behandelten Vektor pVSBAD2 kloniert (Abb. 17). Das resultierende Plasmid wurde pRT0 genannt. Für die Integration von *ahaH*, *ahaI*, *ahaK* und den 5'-Terminus von *ahaE* in pRT0 wurde anschließend die oben bereits erwähnten Plasmide pHS3 und pRT0 mit *SalI* und *XbaI* inkubiert, wodurch pRT0 für die Insertion des 3065 Bp-Fragmentes aus pHS3 vorbereitet wurde. Durch die Ligation von pRT0 mit dem Fragment aus pHS3, das *ahaHIK* und das 5'-Ende von *ahaE* enthält, entstand pRT1, das das gesamte *aha*-Operon trägt und für die Produktion der vollständigen ATPase eingesetzt werden konnte (Abb. 17).

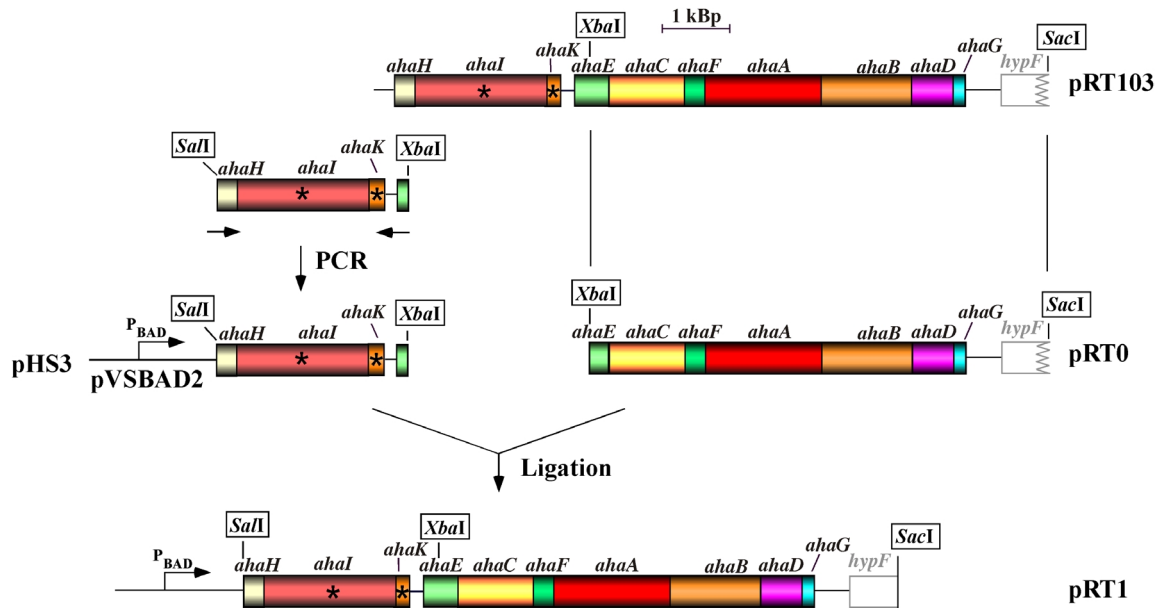


Abb. 17: Klonierungsschema von pRT1. Die für die jeweilige Klonierung verwendeten Enzyme sind an den Pfeilen angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

3.4.3 Produktion der A₁A₀-ATPase aus *M. mazei* in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Zunächst wurde *E. coli* DH5α mit pRT1 transformiert, in 5 ml LB-Medium angezogen, und die Expression des *aha*-Operons wurde durch Zugabe von 0,2% Arabinose bei einer OD₆₀₀ von 0,5 induziert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet, und die Produktion der ATPase-Untereinheiten wurde durch Western Blot-Analyse überprüft. Da das Operon eine intergene Region von 211 bp zwischen *ahaK* und *ahaE* enthält und es bekannt ist, daß AhaI sehr Proteolyse-sensitiv ist und als ganzes noch nie heterolog produziert werden konnte, sollte zunächst geklärt werden, ob die Genprodukte von *ahaI*, *ahaE*, *ahaC* und *ahaA* gebildet wurden. Die Detektion dieser Genprodukte wurde ausgewählt, weil die Antiseren gegen diese Untereinheiten sehr zuverlässig hybridisierten. Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abb. 18 wiedergegeben. Das Genprodukt von *ahaA* wird gebildet (Abb. 18a). Bei 65 kDa wird ein Protein detektiert, das in der Negativ-Kontrolle in Spur 1 nicht auftritt. Im Zellextrakt von *E. coli* DH5α(pRT1) reagiert neben anderen Proteinen eines bei etwa 43 kDa mit dem Antiserum gegen AhaC, was gut mit der abgeleiteten Masse von AhaC von 41,5 kDa übereinstimmt (Abb. 18b). AhaC wird also ebenfalls synthetisiert. Im

Fall von AhaE tritt zusätzlich eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem Protein auf, das nur wenig kleiner als AhaE ist. Jedoch läßt sich eindeutig ein Protein von etwa 21 kDa oberhalb dieses unspezifisch reagierenden Proteins erkennen (Abb. 18c). Das entspricht gut der abgeleiteten Masse von 20 kDa. Damit wurde AhaE zum ersten Mal als Teil der A_1A_0 -ATPase heterolog produziert. Bei der Produktion der hydrophilen A_1 -ATPase alleine hingegen konnte AhaE nicht nachgewiesen werden (LEMKER *et al.*, 2002). Wie die Western Blot-Analyse mit dem Antiserum gegen AhaI ergab, wurde dieses Protein nicht gebildet oder sofort proteolysiert. Es konnte keine Bande bei 72 kDa detektiert werden (Abb. 18d).

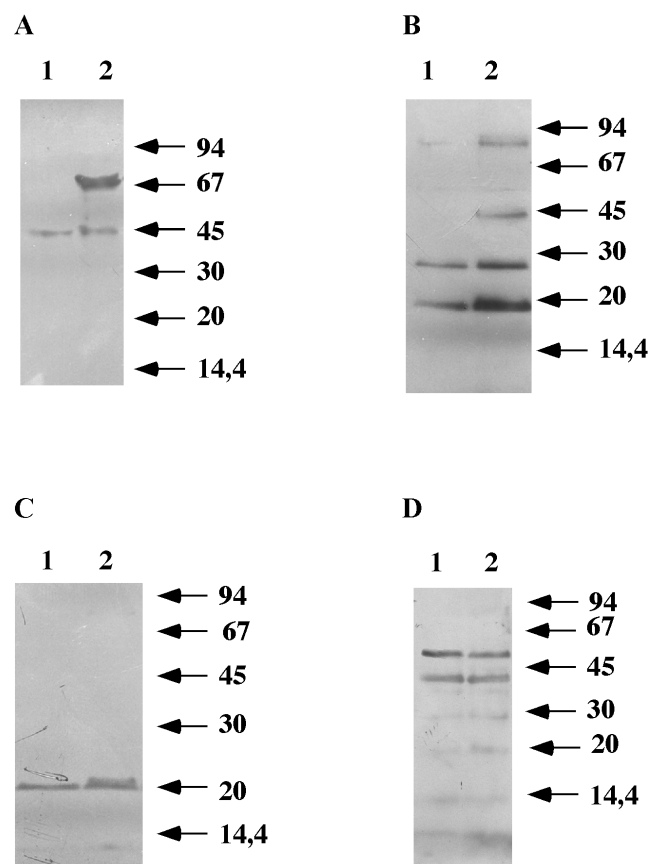


Abb. 18: Nachweis der Produktion von ATPase-Untereinheiten in *E. coli* DH5 α (pRT1). Die Genexpression wurde in *E. coli* DH5 α (pVSBAD2) (Spur 1) und *E. coli* DH5 α (pRT1) (Spur 2) durch Zusatz von 0,2% Arabinose induziert. 2 h nach Beginn der Expression wurde ein Zellextrakt hergestellt, in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit den Antiseren gegen AhaA (A), AhaC (B), AhaE (C) und AhaI (D) hybridisiert. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben.

Nach diesen Erkenntnissen war davon auszugehen, daß ein Großteil der hydrophilen Untereinheiten, und zum ersten Mal auch AhaE, gebildet wurden, aber AhaI, das essentiell für eine an Ionentranslokation gekoppelte ATP-Synthese ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Um einen eventuellen Abbau des Proteins zu verhindern, sollten verschiedene, Protease-negative *E. coli*-Stämme und *E. coli* DK8 als ATPase-negativer Stamm auf die Produktion von AhaI getestet werden. Dazu wurden *E. coli* CAG626, *E. coli* ER2508, *E. coli* KS1000 und *E. coli* DK8 mit pRT1 transformiert, in LB-Medium angezogen, und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Genexpression mit 0,2% Arabinose induziert. Nach 2 h wurden Aliquots entnommen und ebenfalls per Western Blot analysiert. In allen verwendeten Stämmen konnte die Synthese von AhaI nachgewiesen werden. Da nun geklärt war, daß AhaI auch in dem ATPase-negativen Stamm *E. coli* DK8 produziert und nicht abgebaut wurde, wurde für die weiteren Expressions- und ATP-Hydrolyse-Studien dieser Stamm verwendet, da bei einer möglichen Aufreinigung die heterolog produzierte A₁A₀-ATPase und vorhandene F₁F₀-ATPase schwer zu trennen gewesen wären. Die Produktion der weiteren ATPase-Untereinheiten, gegen die Antikörper vorlagen, wurde durch Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Auch wenn die verwendeten Antikörper durch MalE-Fusionen erhalten worden waren, sie also mit MalE und auch mit anderen Proteinen unspezifisch kreuzreagierten, ist doch die Produktion aller untersuchten Untereinheiten deutlich erkennbar (Abb. 19). Die Anti-AhaA- und Anti-AhaB-Antikörper reagieren mit Peptiden von erwarteter Größe. Zudem konnte durch den Expressionsnachweis gezeigt werden, daß *ahaA* und *ahaB* konstitutiv exprimiert werden. Signale treten sowohl im zellfreien Extrakt der nicht-induzierten Kontrolle von *E. coli* DK8(pRT1) als auch im Extrakt des induzierten Stammes auf (Abb. 19a und 19b). Es muss also ein Promotor vorliegen, der vom Proteinbiosynthese-Apparat aus *E. coli* erkannt wird. In *M. mazei* gibt es für diese beiden Untereinheiten, die mit jeweils drei Kopien pro ATPase-Molekül vorliegen, neben dem vor *ahaH* liegenden keinen zusätzlichen Promotor, wie mRNA-Analysen bereits gezeigt hatten (LEMKER *et al.*, 2002). Der Nachweis von AhaC im Rohextrakt von *E. coli* DK8 war nicht möglich, weil zur Synthese des Antikörpers eine MalE-AhaC-Fusion benutzt worden war und das Signal von MalE das von AhaC überdeckte. Daher wurde die Produktion von AhaC in der MalE-negativen Mutante *E. coli* ER2508 gezeigt (Abb. 19c). AhaE wird teilweise abgebaut. Neben dem erwarteten Protein von 20 kDa molekularer Masse tritt in Spur 2 (Abb. 19d) ein zusätzliches Protein bei 15 kDa auf, was die Empfindlichkeit von AhaE gegenüber Hydrolyse unterstreicht. Bei der Produktion der A₁-Domäne alleine war das Peptid völlig abgebaut worden (LEMKER *et al.*, 2002). Das Proteolipid, AhaK, konnte ohne Kreuzreaktionen mit

anderen Peptiden in der erwarteten Höhe nachgewiesen werden, weil ein Antikörper verwendet wurde, der aus dem durch Chloroform/Methanol gereinigten Peptid generiert wurde (WILMS *et al.*, 1996).

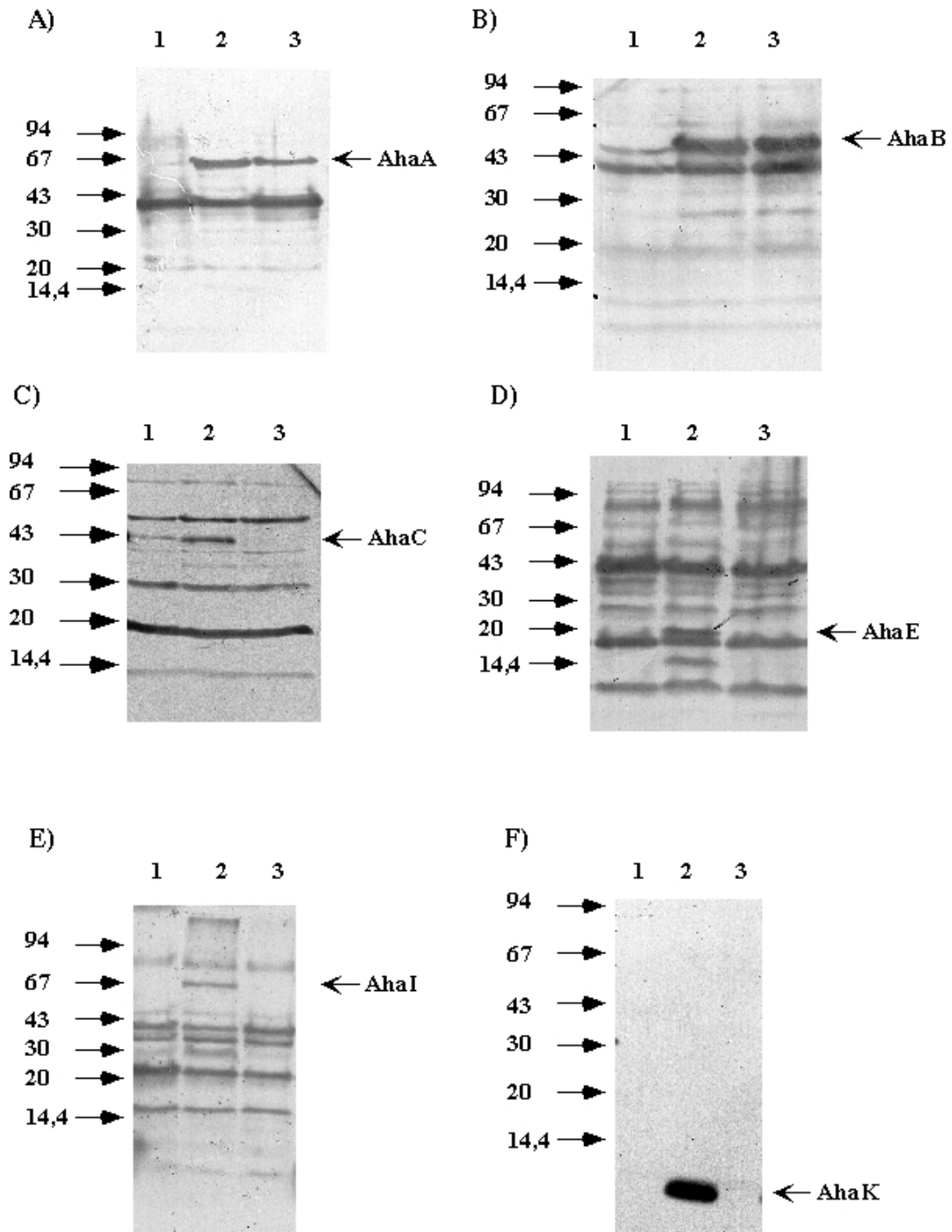


Abb. 19: Nachweis der Produktion von ATPase-Untereinheiten in *E. coli* DK8 und *E. coli* ER2508. Die Genexpression wurde in *E. coli* DK8(pVSBAD2) (Spur 1) und *E. coli* DK8(pRT1) (Spur 2) durch Zusatz von 0,2% Arabinose induziert. Es wurde eine nicht-induzierte Kontrolle von *E. coli* DK8(pRT1) mitgeführt (Spur 3). 2 h nach Beginn der Expression wurden Zellextrakte hergestellt, in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit den Antiseren gegen AhaA (A), AhaB (B), AhaE (D), AhaI (E) und AhaK (F) hybridisiert. Zum Nachweis von AhaC (C) wurde der Stamm *E. coli* ER2508 herangezogen. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben.

Da zum ersten Mal eine vollständige archäelle ATPase heterolog produziert werden konnte, musste nun geklärt werden, ob sie funktionell war, also ob sie ATP hydrolysiert, ob die hydrophoben Untereinheiten in die bakterielle Membran inserieren und die hydrophilen Untereinheiten somit assoziiert mit der Membran vorliegen. Die Insertion und die Assoziation sind insbesondere für künftige Experimente zur Ionen-Translokation wichtig. Das *aha*-Operon wurde also erneut in *E. coli* DK8 exprimiert. Dafür wurde eine 2-l-Kultur mit einer Einzelkolonie beimpft, über Nacht bei 30°C inkubiert und morgens auf 37°C umgesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression des *aha*-Operons durch Zugabe von 0,2% Arabinose für 2 h induziert. Nachdem die Zellen mit TMDG-Puffer gewaschen worden waren, wurden Membranen hergestellt (siehe 2.5). Diese wurden dann zweimal mit TMDG-Puffer gewaschen, der 0,1 mM PMSF enthielt. Anschließend wurde die ATP-Hydrolyse an Membranen und im Cytoplasma durch die Bestimmung des aus ATP freigesetzten Phosphats gemessen, und die Produktion und Lokalisation der Peptide wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft. Als Reinheitskontrolle der Membranpräparation kann die Kreuzreaktion der durch MalE-Fusion gewonnen Antikörper mit MalE dienen. Das Maltosebindeprotein MalE liegt im Periplasma vor. Durch die angewandte Methode der Herstellung von Membranen werden die periplasmatischen mit den cytoplasmatischen Proteinen vereint. MalE mit einer molekularen Masse von 41 kDa sollte also nach Abtrennung der Membranen nur in der als Cytoplasma bezeichneten Fraktion zu finden sein, was auch der Fall ist. In keinem der Western Blots wurde MalE in der Membranfraktion detektiert. Das Anti-AhaI-Antiserum reagiert nur leicht mit MalE, aber auch in dem Fall ist eine Auftrennung der Fraktionen zu beobachten, allerdings reagiert ein Protein in der Membranfraktion, das nur wenig kleiner als MalE ist. Der gegen AhaK verwendete Antikörper wurde aus dem durch Chloroform/Methanol-gereinigten Peptid gewonnen (WILMS *et al.*, 1996), so daß keine Kreuzreaktion mit MalE zu erwarten war.

Alle Untereinheiten, gegen die Antikörper vorlagen, assoziierten mit oder integrierten in die Membran, trotz der unterschiedlichen chemischen Natur der archäellen und der bakteriellen Lipide. Ein großer Teil der Untereinheiten AhaA (Abb. 20a) und AhaB (Abb. 20b) war jedoch auch im Cytoplasma zu finden. Ob auch AhaC (Abb. 20c) teilweise im Cytoplasma vorhanden war, kann nicht analysiert werden, weil das Signal für MalE das für AhaC überdeckt. AhaE konnte zwar nur schwach nachgewiesen werden, aber auch diese Untereinheit befand sich sowohl in der Membran- als auch in der Cytoplasma-Fraktion (Abb. 20d). Die hydrophilen Untereinheiten können sowohl während der Produktion cytoplasmatisch verblieben sein als auch durch den Zellaufbruch von den membranständigen

Untereinheiten abgeschert worden sein. Die beiden hydrophoben Untereinheiten AhaI und AhaK (Abb. 20e und 20f) inserieren vermutlich in die Membran und führen so zur Assoziation der hydrophilen Untereinheiten an die Membran. AhaI kann auch im Cytoplasma nachgewiesen werden, AhaK jedoch war nur in der Membranpräparation detektierbar.

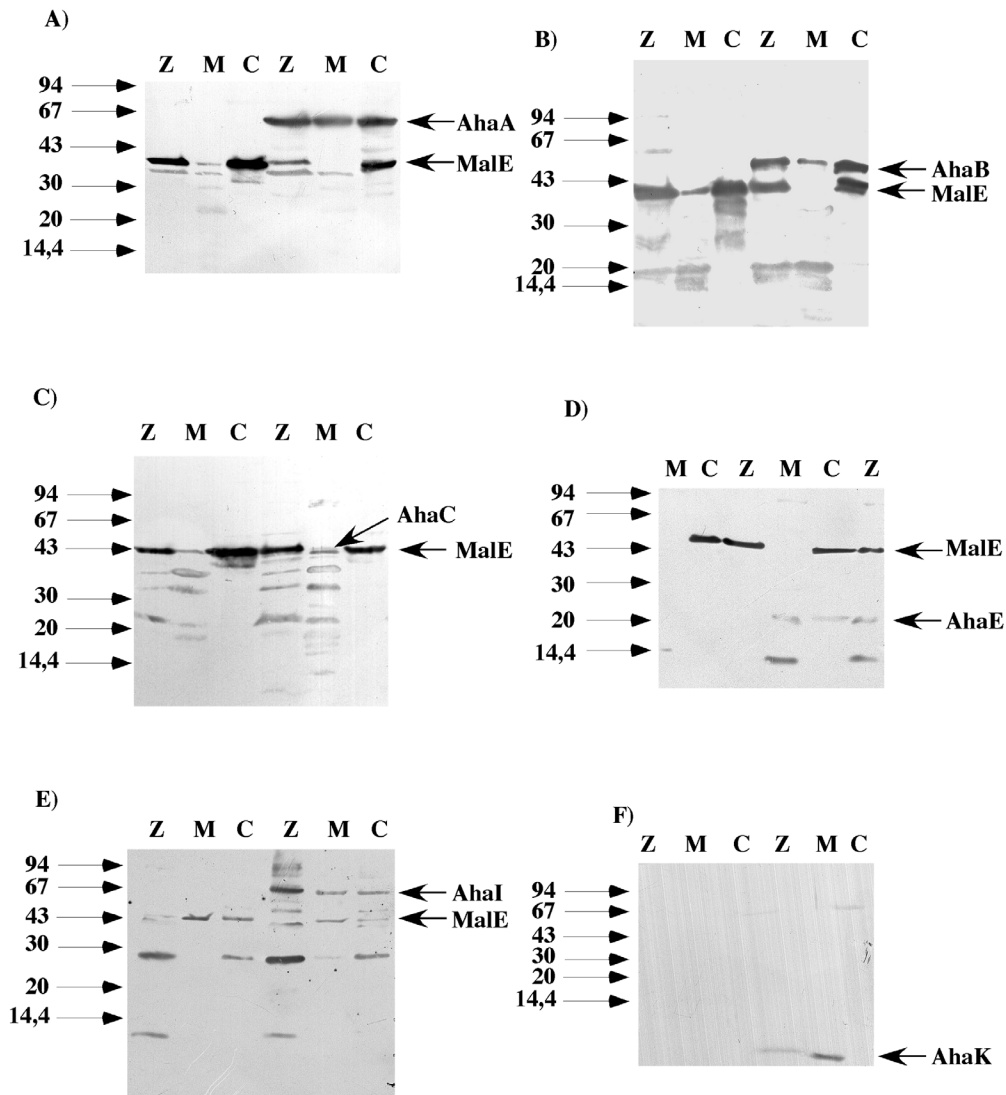


Abb. 20: Nachweis der Produktion der A_1A_0 -ATPase-Untereinheiten und deren Lokalisation in der bakteriellen Zelle. Nach der Expression des *aha*-Operons in *E. coli* DK8(pRT1) (Spur 4 bis 6) und der Negativ-Kontrolle *E. coli* DK8(pVSBAD2) (Spur 1 bis 3) wurden Membranen und Cytoplasma präpariert. Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurden Zellektrakt (Z), Membranen (M) und Cytoplasma (C) auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit den Antiseren gegen AhaA (A), AhaB (B), AhaC (C), AhaE (D), AhaI (E) und AhaK (F) hybridisiert. Die molekulare Masse ist in kDa angegeben.

Sowohl an der Membran als auch im Cytoplasma wurde ATP-Hydrolyse-Aktivität detektiert. An den Membranen betrug sie 67 mU/mg Protein und im Cytoplasma 54 mU/mg Protein, womit gezeigt wurde, daß nur etwa 50% der gebildeten ATPase an der Membran lokalisiert ist. Dieser Befund überrascht in Kenntnis der Analyse der Lokalisation der Untereinheiten nicht. Für die Hydrolyse von ATP sind bei F-Typ-ATPasen nur α , β und γ notwendig (DUNN und FUTAI, 1980; AMANO *et al.*, 1996), die vermutlich zu AhaB, AhaA und AhaD homolog sind. AhaB und AhaA wurden durch Western-Blot-Analyse im Cytoplasma bereits nachgewiesen, gegen AhaD lag noch kein Antikörper vor. Die Anreicherung der genannten Untereinheiten im Cytoplasma kann sowohl durch Abscheren während der Membranpräparation als auch durch fehlende Assemblierung mit den membranintegralen Untereinheiten während der Translation erfolgt sein. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität an Membranen ließ sich wie die ATPase-Aktivität der A_1 -Domäne (LEMKER *et al.*, 2002) durch Zusatz von 40 mM NaAcetat im Reaktionspuffer um den Faktor 2,2 auf 150 mU/mg Protein steigern.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte weder im Cytoplasma noch an der Membran von *E. coli* DK8 zelleigene ATPase-Aktivität nachgewiesen werden. Das pH-Optimum der A_1A_0 -ATPase aus *M. mazei* liegt bei 5,2, einem Wert, bei dem die ATP-hydrolysierenden Enzyme aus *E. coli* offensichtlich inhibiert werden. Folglich ist die Freisetzung von anorganischem Phosphat auf die Aktivität der heterolog produzierten A_1A_0 -ATPase zurückzuführen. Da sich die F_1F_0 -, V_1V_0 - und A_1A_0 -ATPasen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Inhibitoren unterscheiden, konnte diese Annahme durch Hemmung der ATPase mit DES, einem der effektivsten Inhibitoren für methanoarchäelle ATPasen (BECHER und MÜLLER, 1994), weiter untermauert werden. DES inhibiert die ATPase wirkungsvoll mit einem I_{50} -Wert von 200 nmol DES/mg Protein (Abb. 21), was vergleichbar mit der Hemmung der A_1 -Domäne durch DES im Rohextrakt ist. Der I_{50} -Wert liegt in dem Fall bei 120 nmol DES/mg Protein (LEMKER *et al.*, 2002).

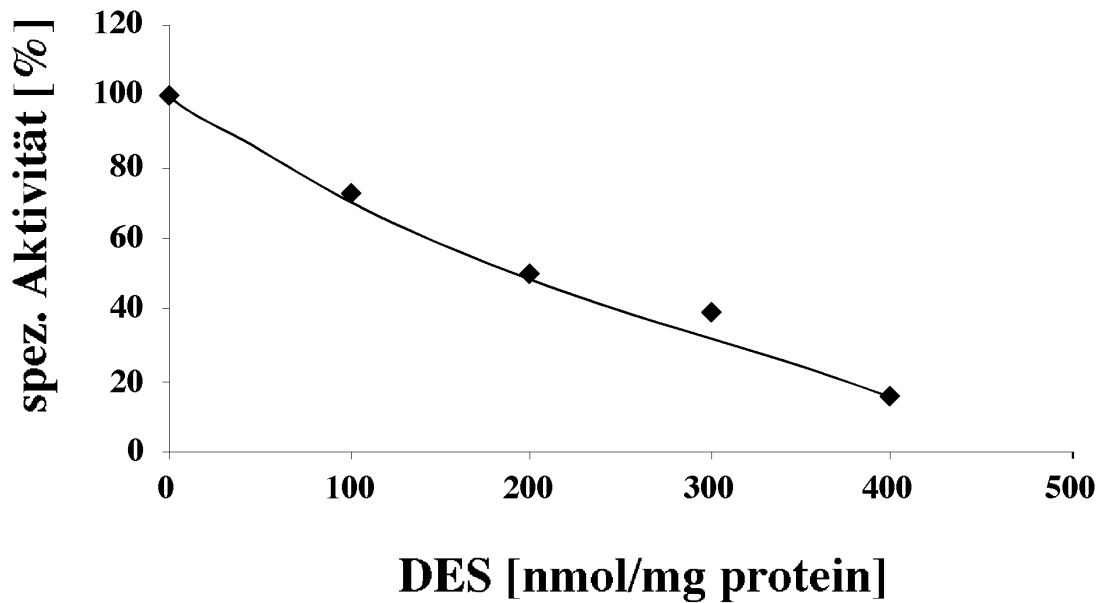


Abb. 21: Hemmung der heterolog produzierten A_1A_0 -ATPase durch DES. Die ATPase-Aktivität wurde an Membranen von *E. coli* DK8(pRT1) bestimmt. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug 1 mg Protein/ml. Der Extrakt wurde mit DES 30 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 4 mM ATP gestartet wurde. 100% entspricht 64 mU/mg Protein.

Im nächsten Schritt musste untersucht werden, ob die an der Membran befindliche ATPase funktionell inseriert hatte. Um das nachzuweisen, wird die ATPase mit DCCD gehemmt, das an den für die Ionen-Translokation essentiellen Carboxylat-Rest bindet, somit die Ionen-Translokation und folglich auch die ATP-Hydrolyse-Aktivität des Enzyms hemmt. DCCD wurde dem Enzymtestpuffer in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt, was einer Konzentration von 2 μ mol DCCD/mg Protein entspricht. Da selbst bei solch einer hohen Konzentration nur 43% des Enzyms gehemmt wurden (Abb. 22), ist davon auszugehen, daß weniger als die Hälfte der synthetisierten ATPase gekoppelt war.

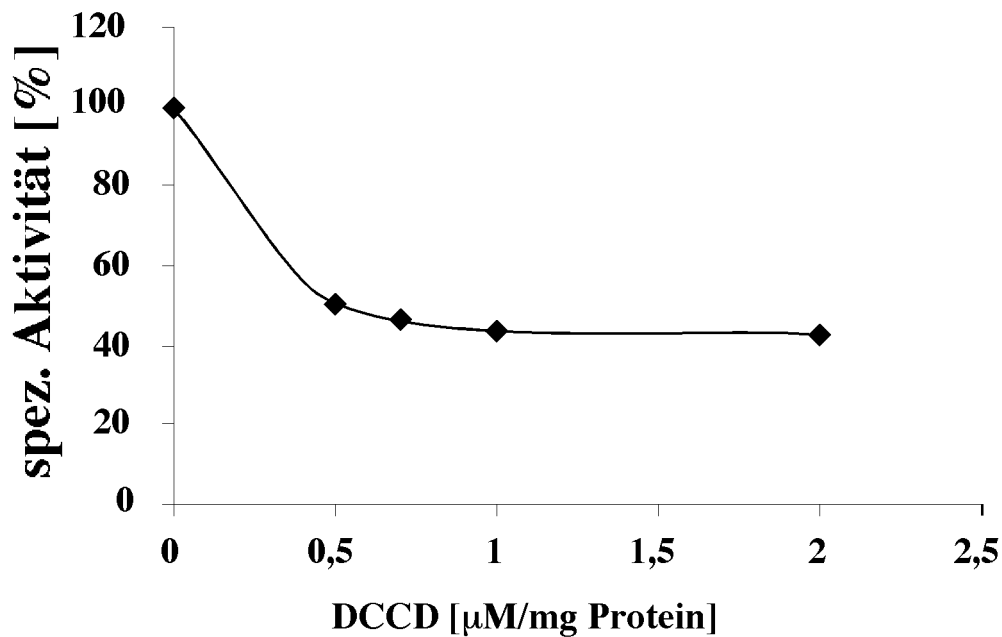


Abb. 22: Hemmung der heterolog produzierten A_1A_0 -ATPase durch DCCD. Die ATPase-Aktivität wurde an Membranen von *E. coli* DK8(pRT1) bestimmt. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug 1 mg Protein/ml. Der Extrakt wurde mit DCCD 30 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 4 mM ATP gestartet wurde. 100% entspricht 64 mU/mg Protein.

Da die ATPase aus mindestens 9 Untereinheiten in unterschiedlicher Kopienzahl zusammengesetzt ist, ist es möglich, daß die notwendigen regulierenden, archäellen Elemente im bakteriellen Hintergrund nicht erkannt werden. Insbesondere bei der Produktion des Proteolipids, das in einer Kopienzahl von 10 Monomeren in der ATPase von *E. coli* vorkommt (JIANG *et al.*, 2001), spielt aber die Regulation der Produktion dieses Peptids eine gewichtige Rolle. Wird nun das Proteolipid in nicht ausreichender Menge gebildet, ist es möglich, daß zwar der ATP-hydrolysierende A_1 -Teil über die hydrophoben Untereinheiten an die Membran bindet, die Hydrolyse aber nicht mit der Translokation von Ionen gekoppelt ist. Um die Menge an gebildetem Proteolipid und damit auch die Anzahl der funktionellen ATPasen zu erhöhen, wurde das für das Proteolipid kodierende Gen *ahaK* von einem zusätzlichen Plasmid, pRT202, aus exprimiert. pRT202 ist ein pHSG399-Derivat, die Expression des Gens unterliegt damit dem mit IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor (RUPPERT, 1997). *E. coli* DK8(pRT1) wurde mit pRT202 transformiert, die Expression des *aha*-Operons wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Expression von *ahaK* wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Nach 2-stündiger Inkubation wurden wieder Membranen präpariert, an denen die ATP-Hydrolyse-Aktivität und die Inhibition durch DCCD bestimmt wurde.

Auch mit dem zusätzlichen, Proteolipid-kodierenden Plasmid konnte der Anteil an gekoppeltem Enzym nicht erhöht werden. Wieder war nur etwa die Hälfte des gebildeten Enzyms mit DCCD hemmbar. Außerdem verringerte sich an den Membranen des Stammes DK8(pRT1, pRT202) die Hydrolyse-Aktivität um den Faktor 11,7 (Tab.6).

Tab. 6: Produktion einer funktionellen A_1A_0 -ATPase von *M. mazei* Gö1 in *E. coli* DK8. Die Expression der A_1A_0 -ATPase-Gene wurde durch Zusatz von 0,2% Arabinose induziert. Enthielt der Stamm zusätzlich pRT202, wurde die Expression des *ahaK*-Gens mit IPTG induziert.

Expressionsstamm	spez. ATPase-Aktivität [mU/mg Protein]
<i>E. coli</i> DK8(pRT1)	117
<i>E. coli</i> DK8(pRT1, pRT202) Anzucht mit Chloramphenicol	10
<i>E. coli</i> DK8(pRT1, pRT202) Anzucht ohne Chloramphenicol	21

Um auszuschließen, daß es sich bei dieser Abnahme an Aktivität um einen Effekt des zur Stabilisierung des Plasmids in der Zelle zugesetzten Antibiotikums handelte, wurden die Zellen über Nacht ohne Chloramphenicol angezogen. Erst bei Induktion wurde es der Gen-Expression hinzugefügt. Aber auch diese Membranen wiesen mit 21 mU/mg Protein nur 18% der Ursprungsaktivität auf. Folglich sollte in weiterführenden Experimenten auf zusätzliche Expression des Proteolipid-kodierenden Gens verzichtet werden.

4. DISKUSSION

4.1 Die Biochemie der Methanogenese

Die Methanogenese ist essentiell für die Erhaltung des Kohlenstoffzyklus auf der Erde, denn die methanogenen Archäen katalysieren den letzten Schritt des Abbaus von organischem Material in vielen anaeroben Habitaten (GARCIA *et al.*, 2000). Die Bildung von CH_4 aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, Formiat, methylierten C_1 -Verbindungen (Methanol, Methylamine, Methylthiole) oder Acetat zeichnet die Methanogenen als Gruppe aus. Die Substrate werden im Zuge des Abbaus von organischem Material gebildet. CH_4 und CO_2 , die Produkte der Methanogenese, werden aus den anaeroben Habitaten freigesetzt und können wieder in den Kohlenstoffzyklus eintreten. Ein Teil des Methans wird als Kohlenstoff- und Energiequelle durch aerobe methylotherme Bakterien verwertet oder chemisch zu CO_2 oxidiert (MURRELL *et al.*, 1998). Ein Drittel des gebildeten Methans steigt jedoch in die Atmosphäre auf, entzieht sich damit dem Kohlenstoffkreislauf und trägt neben CO_2 und N_2O erheblich zur globalen Erwärmung bei (DEMEYER und FIEVEZ, 2000).

Während der schrittweisen Reduktion der Substrate zu CH_4 bzw. der Oxidation zu CO_2 sind die Intermediate an ungewöhnliche Cofaktoren wie Methanofuran (ROMESSER und WOLFE, 1982; LEIGH *et al.*, 1985) und Tetrahydromethanopterin (ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1984; VAN BEELEN *et al.*, 1984) gebunden (Zur Übersicht: FERRY, 1992; BLAUT, 1994; DEPPENMEIER, 2002b). Bei der weitverbreiteten Methanogenese aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (Abb. 23) wird im ersten Schritt aus CO_2 und Methanofuran (MF) *N*-Carboxymethanofuran gebildet, das anschließend durch einen membranständigen Formyl-MF-Dehydrogenase-Komplex (Formyl-MF-DH) zu Formyl-MF reduziert wird (THAUER *et al.*, 1993). Der direkte Elektronendonator in der endergonen Reaktion ist vermutlich reduziertes Ferredoxin, das durch die H_2 -oxidierende *Ech*-Hydrogenase mit Elektronen beladen wird (MEUER *et al.*, 1999; KURKIN *et al.*, 2002). In der nächsten Reaktion wird die Formyl-Gruppe auf Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) übertragen. Dann wird das resultierende Formyl- H_4MPT schrittweise zu Methyl- H_4MPT reduziert. Die Elektronen kommen vom reduzierten Cofaktor F_{420} (F_{420}H_2), der seine Reduktionsäquivalente von der F_{420} -reduzierenden Hydrogenase erhält. Die Methyl-Gruppe wird anschließend durch die Methyl- H_4MPT :HS-CoM-Methyltransferase auf Coenzym M (HS-CoM) übertragen. Diese exergone

Reaktion wird an die Bildung eines elektrochemischen Na^+ -Gradienten gekoppelt (MÜLLER, 1988b; MÜLLER, 1988a; GOTTSCHALK und THAUER, 2001).

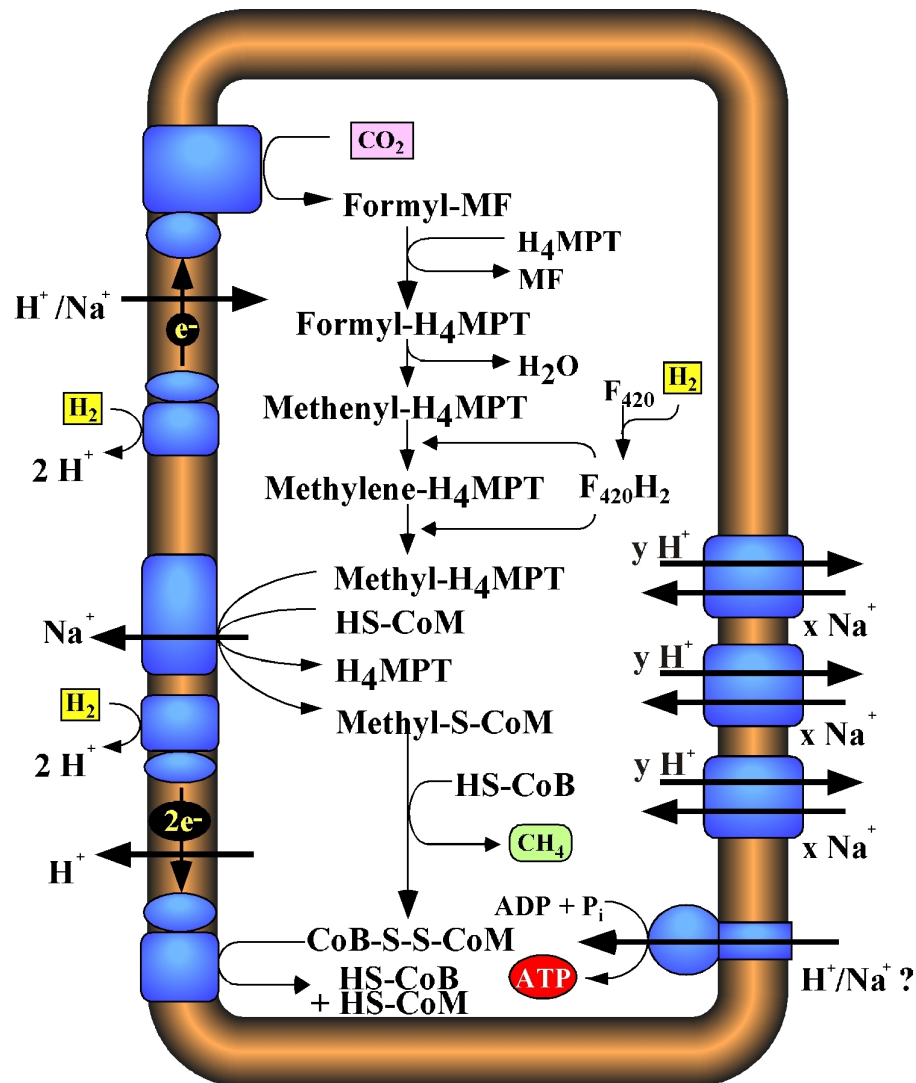


Abb. 23: Die Methanogenese aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$

In der letzten Reaktion entstehen aus Methyl-S-CoM und Coenzym B (HS-CoB) Methan und aus den beiden Thiol-Gruppen-enthaltenden Coenzymen (THAUER, 1998) das Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB). Dieses Heterodisulfid ist der terminale Elektronenakzeptor der Atmungskette. CoM-S-S-CoB wird durch eine membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase reduziert, die als terminale respiratorische Reduktase fungiert. Wächst *M. mazei* in Anwesenheit von molekularem Wasserstoff, kann eine membrangebundene Hydrogenase, die

F₄₂₀-unabhängige Hydrogenase, zusammen mit Cytochrom *b* und dem kürzlich entdeckten Elektronenüberträger Methanophenazin (ABKEN *et al.*, 1998; BEIFUSS *et al.*, 2000) Elektronen zu der Heterodisulfid-Reduktase leiten, die den terminalen Elektronen-Akzeptor reduziert (DEPPENMEIER *et al.*, 1996). Die dabei entstehenden Protonen sind am Aufbau eines $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ beteiligt. Die Reduktion von CO₂ zu Methan bewirkt folglich den gleichzeitigen Aufbau eines H⁺-Gradienten und eines Na⁺-Gradienten, die beide zur ATP-Synthese genutzt werden können (siehe 4.3.2).

Im Zuge der Methanogenese ist die Synthese von ATP durch Substratkettenphosphorylierung ausgeschlossen, weil die Änderung der freien Energie (ΔG°) in den Teilreaktionen zu gering ist. Die Energiekonservierung erfolgt vielmehr über Ionengradienten-getriebene Phosphorylierung. Da zwei verschiedene Gradienten, ein ΔpH und ein ΔpNa , aufgebaut werden, bleibt zu klären, wie diese zu ATP umgesetzt werden. Bereits 1978 konnte MOUNTFORT zeigen, daß ein artifizieller Protonengradient an ruhenden Zellen von *M. barkeri* die Synthese von ATP treibt (MOUNTFORT, 1978). Zusatz von DCCD inhibierte die ATP-Synthese, was bestätigte, daß *M. barkeri* eine H⁺-abhängige ATPase besitzt. Wie profitieren die methanogenen Archäen aber vom Na⁺-Gradienten? Drei verschiedene Szenarien sind denkbar: 1) Es existieren zwei ATPasen in den Methanogenen, eine nutzt den H⁺-Gradienten, die andere den Na⁺-Gradienten. 2) Ein Na⁺/H⁺-Antiporter konvertiert den Na⁺-Gradienten in einen H⁺-Gradienten, der dann ATP-Synthese treibt. 3) Beide Ionengradienten können über die gleiche ATPase zu ATP umgesetzt werden.

Seit Bekanntwerden verschiedenster archäeller Genomdaten kann Möglichkeit 1) ausgeschlossen werden. Wie bereits in der Einleitung erläutert, konnten in den meisten Fällen keine für F-ATPasen kodierenden Gene neben denen für die archäellen Enzyme identifiziert werden. Bei *M. barkeri* MS wurde zwar ein F-Typ-Operon entdeckt (SUMI *et al.*, 1997; Abb. 24), aber weder konnten ein Transkript noch ein Protein gefunden werden. (LEMKER, 1997). Auch in den Genomen von *M. barkeri* Fusaro und *M. acetivorans* wurden Gene für eine F-Typ-ATPase identifiziert (Abb. 24; GALAGAN *et al.*, 2002), http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/methanosarcina/methano_homepage.html). Expressionsanalysen des F-ATPase-Operons aus *M. acetivorans* liegen noch nicht vor. Die F-ATPase-Operone der aufgeführten Organismen sind identisch aufgebaut. Die Untereinheiten der archäellen F-Typ-ATPase aus *M. barkeri* MS weisen zwischen 29,6% (*b*) und 52,1% (α) Identität zu den entsprechenden Untereinheiten der F-ATPase aus *E. coli* auf. Allerdings fehlt ein zu der Untereinheit δ homologer Leserahmen und die *b*-Untereinheit der *Archaea* ist mehr als

doppelt so groß wie der bakteriellen F_1F_0 -ATPasen. Die abgeleitete molekulare Masse der b -Untereinheit aus *M. barkeri* MS beträgt 44,5 kDa, die aus *M. acetivorans* 37,8 kDa. Über die molekulare Masse von b aus *M. barkeri* Fusaro läßt sich keine Aussage machen, weil zum Abschluß dieser Arbeit die Sequenzierung des Organismus noch nicht beendet ist. Da das einer δ -Untereinheit entsprechende Gen in den Operonen der archäellen F_1F_0 -ATPasen fehlt, ist es möglich, daß sich die für δ kodierende Gensequenz im ungewöhnlich großen offenen Leserahmen von b befindet. Eine detaillierte Analyse der Sequenzdaten ergab, daß die Ähnlichkeiten zwischen den C-Termini der archäellen b -Untereinheiten und den bakteriellen δ -Untereinheiten zwischen 44 und 38% liegen, so daß dieser Teil die Aufgabe von δ übernehmen könnte.

Der als Orf1 bezeichnete Leserahmen (Abb. 24) ist in den Operonen, die in Archäen für die F-ATPasen kodieren, konserviert. Die Aminosäuresequenzen von *M. acetivorans* und *M. barkeri* MS und Fusaro sind zu 66,3 beziehungsweise 66,7% identisch, während die Identität zwischen den Sequenzen von *M. barkeri* MS und Fusaro sogar zu 97% identisch sind. Die F-Typ-ATPasen bakteriellen Ursprungs enthalten kein homologes Peptid. Ob die F_1F_0 -ATPasen tatsächlich in *M. acetivorans* und *M. barkeri* Fusaro synthetisiert werden, bleibt zu prüfen. Zumindest für *M. barkeri* MS ist dies zweifelhaft.

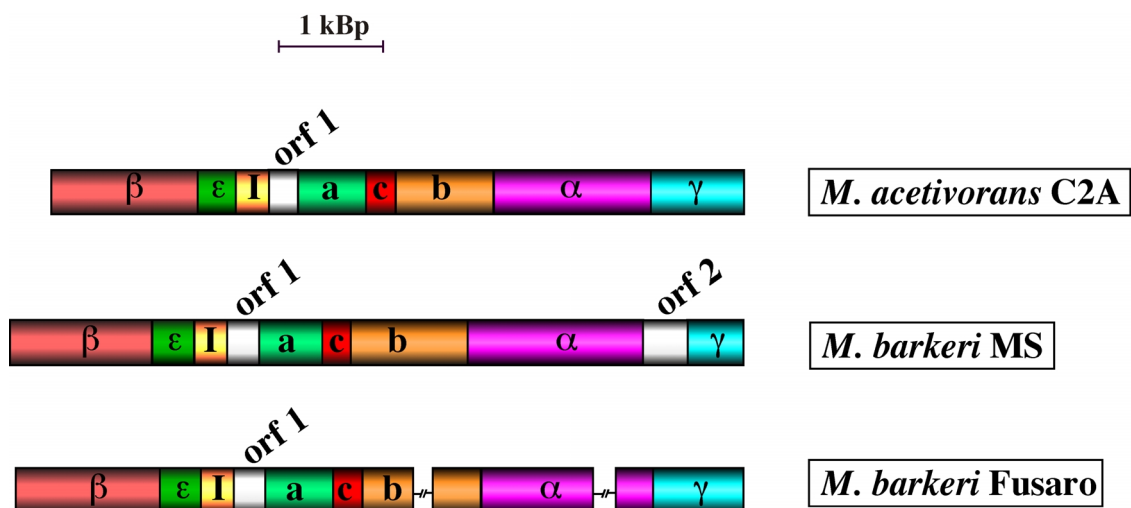


Abb. 24: Physikalische Karte von F_1F_0 -ATPase-Genen aus *M. acetivorans*, *M. barkeri* Stamm MS und Stamm Fusaro. Orf1 ist konserviert innerhalb der F_1F_0 -ATPasen aus Archäen, allerdings nicht in bakteriellen F_1F_0 -ATPasen. Orf2 könnte der ergänzende Teil für die γ -Untereinheit sein.

Die zweite Hypothese, nämlich daß der Na^+ -Gradient in einen H^+ -Gradienten konvertiert wird, wird durch Untersuchungen von KAESLER und SCHÖNHEIT (1989) unterstützt, die in *M. thermautotrophicus* einen Na^+/H^+ -Antiporter nachweisen konnten. Dieser wandelt den Na^+ -Gradienten, der durch die Methyltransferase aufgebaut wird, in einen sekundären H^+ -Gradienten um und treibt nachfolgend ATP-Synthese.

Nichtsdestotrotz wurden in *M. thermautotrophicus* (SMIGAN *et al.*, 1988) und *Methanococcus voltae* (CRIDER *et al.*, 1985) auch Na^+ -abhängige ATP-Synthasen nachgewiesen. Studien mit Rhodamin 6G an Zellen von *M. thermautotrophicus* ergaben Aktivitäten einer Na^+ - und einer H^+ -abhängigen ATPase (SMIGAN *et al.*, 1994). In Inhibitorstudien mit Vesikeln von *M. mazei* konnten ebenfalls beide Aktivitäten nachgewiesen werden (BECHER und MÜLLER, 1994). Vor diesem Hintergrund und mit dem Wissen, daß es nur ein ATPase-Operon in *M. mazei* und *M. thermautotrophicus* gibt, wird immer wahrscheinlicher, daß einige archäelle ATPasen sowohl den H^+ - als auch den Na^+ -Gradienten nutzen können. Um diese Hypothese zu untermauern, mußte jedoch zunächst die Zusammensetzung und die molekulargenetische Organisation der archäellen ATPasen geklärt werden.

4.2 Archäelle ATPasen

Im Folgenden sollen die archäellen ATPasen hinsichtlich ihrer molekulargenetischen Organisation und der Möglichkeit der heterologen Produktion diskutiert werden.

4.2.1 Molekulargenetische Organisation der bekannten archäellen ATPasen

Bis zum Beginn dieser Arbeit war die Zusammensetzung der archäellen ATPasen weitgehend ungeklärt, insbesondere über den Aufbau der Membrandomäne war wenig bekannt. Mehrere Male war versucht worden, archäelle ATPasen aufzureinigen, aber die unterschiedlichen Präparationen enthielten nur zwischen drei und sechs Peptiden (CHEN und

KONISKY, 1993; HOCHSTEIN *et al.*, 1987; HOCHSTEIN und STAN-LOTTER, 1992; IHARA *et al.*, 1997; INATOMI, 1986; INATOMI *et al.*, 1993; LÜBBEN *et al.*, 1987; LÜBBEN und SCHÄFER, 1989; NANBA und MUKOHOTA, 1987; SCHEEL und SCHÄFER, 1990; STEINERT und BICKEL-SANDKÖTTER, 1996; WILMS *et al.*, 1996), so daß nicht klar war, aus welchen Untereinheiten archäelle ATPasen aufgebaut sind. Nur die beiden großen Untereinheiten A und B konnten in allen Präparationen durch immunologische Nachweise und N-terminale Sequenzierungen identifiziert werden. Die kleineren und auch die membranständigen Untereinheiten blieben unbekannt. Erst mit der Sequenzierung des Operons aus *M. mazei* (WILMS *et al.*, 1996; RUPPERT *et al.*, 1998) und der anschließenden Veröffentlichung der Genome von *M. jannaschii*, *M. thermotrophicus* und anderer Archäen konnten die für die ATPasen kodierenden Operone identifiziert und die Untereinheitenzusammensetzung der ATPasen verglichen werden. Obwohl biochemische Präparationen der A₁A₀-ATPasen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten, wurde klar, daß ihre molekulare Organisation sehr ähnlich ist und daß sie aus 8-10 Untereinheiten bestehen (Abb. 25). Die meisten der bisher bekannten Operone enthalten am 5'-Ende ein Gen, bei *M. mazei* *ahaH*, das für ein hydrophiles Peptid mit unbekannter Funktion kodiert. In F- und V-Typ-ATPasen existieren keine bekannten homologen Peptide (MÜLLER *et al.*, 1999). Auf *ahaH* folgen die beiden Leserahmen *ahaI* und *ahaK*, die für die membranständige Domäne der A₁A₀-ATPasen kodieren. *AhaI* ist der vakuolären *a*-Untereinheit homolog, *ahaK* kodiert für das Proteolipid, das in ATPasen aller Klassen vorhanden ist. Die darauf folgenden Gene kodieren für die hydrophilen Peptide *AhaE*, *AhaC*, *AhaF*, *AhaA*, *AhaB* und *AhaD*, die große Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten E, d, F, A, B und D vakuolärer ATPasen aufweisen. *AhaA*, *AhaB* und *AhaD* sind die Homologen der Untereinheiten α , β und γ aus F-Typ-ATPasen verwandt. Dem Operon von *M. mazei* schließt sich ein kleiner offener Leserahmen von 168 Bp an, dessen Genprodukt bisher allerdings nur in einer heterolog produzierten ATPase und nicht in Zellextrakten von *M. mazei* gefunden wurde. In Operonen anderer Archäen, mit Ausnahme des zu *M. mazei* sehr eng verwandten *M. barkeri*, konnte bislang auch kein homologer Leserahmen identifiziert werden. Allerdings liegt an der selben Position im Operon der V₁V₀-ATPase von *E. hirae* das homologe Gen *ntpH* (TAKASE *et al.*, 1994), dessen Genprodukt als Teil eines K⁺/H⁺-Austauschsystems fungiert. In *S. acidocaldarius* (DENDA *et al.*, 1990), *S. solfataricus* (SHE *et al.*, 2001) und *Sulfolobus tokodaii* (KAWARABAYASI *et al.*, 2001) befindet sich an dieser Stelle im A₁A₀-ATPase-Operon das Gen *atpG*, dessen Produkt Ähnlichkeiten zu NtpH aufweist

([http://srs.ebi.ac.uk/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-id+1QeUE1Ka0OF+-e+\[SWALL:ˆMTPE_SULTO\)](http://srs.ebi.ac.uk/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-id+1QeUE1Ka0OF+-e+[SWALL:ˆMTPE_SULTO))).

Die bisher bekannten, für A_1A_0 -ATPasen kodierenden Operone lassen sich, sofern die Gene identifizierbar waren, in zwei Gruppen einordnen, deren Einteilung im Folgenden erläutert wird. Interessanterweise entspricht diese Einteilung der archäellen ATPasen genau der Klassifizierung der *Archaea*. Es lassen sich die Reiche der Euryarchäota und die der Crenarchäota unterscheiden (Abb. 25). Lange Zeit wurde angenommen, daß es nur thermophile Crenarchäen gibt. Allerdings wurden durch Sequenzierung von rRNA, *in situ*-Hybridisierungen und phylogenetische Analysen crenarchäelle Sequenzen auch in mesophilen Habitaten gefunden. Crenarchäen treten im Boden (BUCKLEY *et al.*, 1998), an Wurzeln von Pflanzen (SIMON *et al.*, 2000), an marinen Standorten (DELONG, 1992; VETRIANI *et al.*, 1999; FUHRMAN *et al.*, 1992; DELONG *et al.*, 1994) und in Seen auf (JURGENS *et al.*, 2000; ØVREÅS, 1997). Diese Crenarchäen sind bisher nicht kultiviert worden.

Die Euryarchäen fassen ein Potpourri aller archäellen Stoffwechselformen zusammen. Die Methanogenen bilden die größte Gruppe in den Euryarchäen. Hinzu kommen noch die extrem halophilen, die thermophilen, sulfat-reduzierenden Archäen, die Thermoplasmatales und die Thermococcales. Neben den Euryarchäota und den Crenarchäota gibt es zwei weitere Phyla, nämlich die Korarchäota, von denen bisher nur DNA-Sequenzen aus Bodenproben vorhanden sind (WOESE *et al.*, 1990; BARNS *et al.*, 1996) und die vor kurzem entdeckten Nanoarchäota. Der bislang einzige Vertreter dieses Phylums ist *Nanoarchaeum equitans* (HUBER *et al.*, 2002). *N. equitans* wurde zusammen mit einer autotrophen, sulfat-reduzierenden Spezies des Genus *Ignicoccus* angereichert (HUBER *et al.*, 2002). Mit 0,5 MBp besitzt *N. equitans* das bisher kleinste bekannte archäelle Genom. Die Sequenzen wurden zum Abschluß dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht.

Bislang wurde die Sequenzierung von 16 archäellen Genomen abgeschlossen, darunter sind mit *Pyrobaculum aerophilum* (FITZ-GIBBON *et al.*, 2002), *S. tokodaii* (KAWARABAYASI *et al.*, 2001), *S. solfataricus* (SHE *et al.*, 2001) und *Aeropyrum pernix* (KAWARABAYASI *et al.*, 1999) nur vier crenarchäelle Sequenzen vertreten (Abb. 25). Obwohl sich die Crenarchäen untereinander phänotypisch ähneln und deren enge phylogenetische Verwandtschaft durch rRNA-Analysen belegt wird, ist die Organisation der ATPase-Gene uneinheitlicher als bei den Euryarchäen. Vor allem fällt im Vergleich mit den Sequenzen der Euryarchäen auf, daß sie insbesondere bei *P. aerophilum* und bei *A. pernix* im

gesamten Genom verteilt vorliegen. Bei keinem der Crenarchäota wurde ein Gen, das zu *ahaH* homolog ist, annotiert und auch durch Sequenz-Vergleiche konnte kein entsprechendes Gen gefunden werden. Daß es sich bei *atpH/ahaH* jedoch um authentische Gene handelt, konnte an der ATPase von *M. jannaschii* nachgewiesen werden. Das gereinigte Enzym enthielt die AtpH-Untereinheit wie die N-terminale Sequenzierung ergab (LINGL *et al.*, 2003). Das *atpC*-Gen liegt in keinem der crenarchäellen Operone vor und wurde auch nur bei *P. aerophilum* annotiert. In den anderen Fällen wurde es durch BLAST-Vergleiche mit AtpC aus *P. aerophilum* als Anfrage identifiziert.

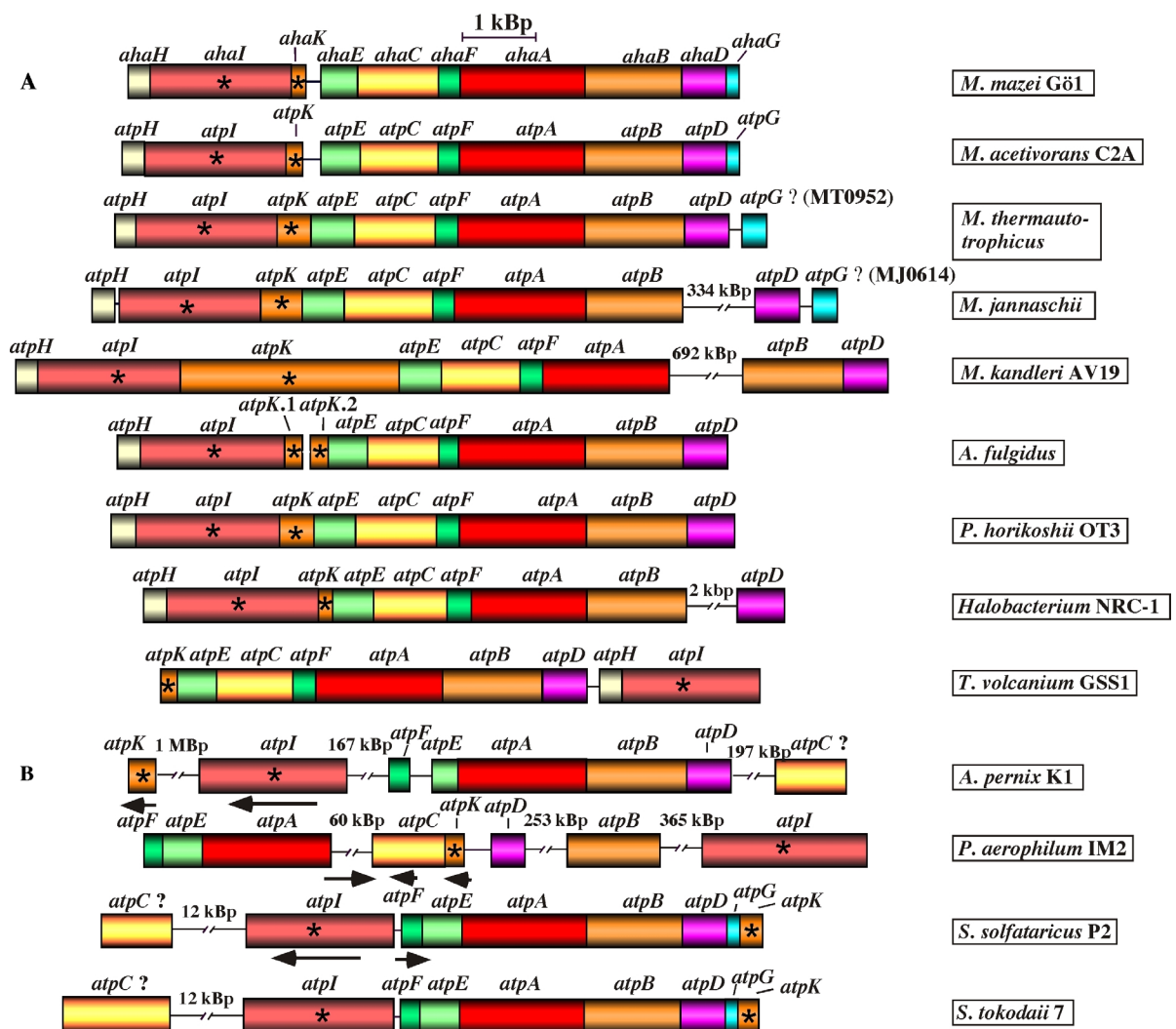


Abb. 25: Physikalische Karten der A₁A₀-ATPase-Gene von den bisher vollständig sequenzierten Archäen. A, ATPase-Operone der Euryarchäota *M. mazei* Gö1, *M. acetivorans*, *M. thermautotrophicus*, *M. jannaschii*, *M. kandleri*, *A. fulgidus*, *P. horikoschii*, *Halobacterium* NRC-1. B, ATPase-Operone der Crenarchäota *A. pernix* K1, *P. aerophilum*, *S. solfataricus*, *S. tokodaii* 7.

Die Euryarchäen besitzen nahezu identische ATPase-Operone, in denen alle Gene liegen, die für die Untereinheiten einer ATPase kodieren (Abb. 25). Das erste Gen eines jeden Operons kodiert für eine hydrophile Untereinheit. Auf dieses Gen folgen die für hydrophobe Peptide kodierenden Gene. Die übrigen Gene kodieren wiederum für die cytoplasmatische A₁-Domäne der ATPase. Eine Ausnahme bildet die Organisation der ATPase-Gene bei *Thermoplasma volcanium* (KAWASHIMA *et al.*, 2000). Im Laufe der Evolution wurden die beiden ersten Gene *atpH* und *atpI* umpositioniert. Sie liegen nun durch eine intergene Region von 151 Bp vom Rest getrennt am 3'-Ende des Operons. Die ATPase-Gene von *M. jannaschii*, *M. kandleri* und *Halobacterium* NRC-1 sind nicht in einem, sondern in zwei Operonen organisiert, die 334 kBp, 692 kBp beziehungsweise 2 kBp von einander entfernt liegen. Bei *M. kandleri* gruppieren *atpB* und *atpD* vom Rest getrennt, bei *M. jannaschii* und *Halobacterium* NRC-1 ist nur *atpD* vom restlichen Operon getrennt.

4.2.2 Heterologe Überproduktion der A₁A₀-ATPase

Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß sich das Proteolipid aus *M. mazei* heterolog in *E. coli* DK8 überproduzieren ließ und trotz des unterschiedlichen chemischen Aufbaus archäeller und bakterieller Lipide in die Membran inserierte (RUPPERT *et al.*, 1998). Die Andersartigkeit der Lipide von Eukaryonten, Bakterien und Archäen führt häufig zu Problemen bei der heterologen Expression, da Membranproteine meistens Protein-Lipid-Komplexe sind (zur Übersicht OPEKAROVA und TANNER, 2003). Fehlen die für die Funktionalität der Membranproteine erforderlichen Lipide, kann man unterschiedlichste Schwierigkeiten sogar in homologen Expressionssystemen beobachten. So konnte beispielsweise für die Laktose-Permease (LacY) bereits 1984 gezeigt werden, daß für eine Membranpotential-abhängige Laktose-Aufnahme unbedingt Phosphatidylethanolamin benötigt wird (CHEN *et al.*, 1984; SETO-YOUNG *et al.*, 1985). Bei einem Energie-unabhängigen, von LacY vermittelten Gegenstrom jedoch wurde eine breite Toleranz gegenüber verschiedensten Lipiden beobachtet. Phosphatidylethanolamin spielt zudem eine Rolle als Chaperon, indem es die richtige Assemblierung von LacY in der Membran lenkt (BOGDANOV *et al.*, 2002). Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß die Topologie

der Permease in der Membran durch die Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von Phosphatidylethanolamin reversibel geändert wird. Der N-Terminus von LacY ragt im *E. coli*-Wildtyp in das Cytoplasma (KABACK *et al.*, 2001). Wird die Permease nun in Zellen von *E. coli* ohne Phosphatidylethanolamin (RIETVELD *et al.*, 1995) produziert, kehrt sich die Ausrichtung um und der N-Terminus weist ins Periplasma. Diese Orientierung ist umkehrbar, wenn nach der Insertion von LacY Phosphatidylethanolamin synthetisiert wird. Wie wichtig die richtige Lipid-Umgebung für ein Membranprotein ist, erschließt sich auch aus der Tatsache, daß bei Überproduktion der Untereinheit *b* der F₁F₀-ATPase in *E. coli* intrazelluläre Membranen ausgebildet werden, die sich in ihrer Zusammensetzung von der inneren Membran unterscheiden (ARECHAGA *et al.*, 2000). Die Membranen aus den Zellen, in denen *b* nicht produziert wurde, bestehen zu 2 – 4% aus Cardiolipin, während der Gehalt an diesem Lipid in den intrazellulären Membranen mit *b*-Untereinheit auf 14% anstieg. Leider wurde der Einfluß von artfremden Lipiden bezüglich der Auswirkungen auf archäelle Membranproteine noch nicht untersucht.

Auch die A₁-Domäne der *M. mazei*-ATPase konnte funktionell in *E. coli* DK8 produziert werden (LEMKER *et al.*, 2001; LEMKER *et al.*, 2003), deshalb schien der Ansatz erfolgversprechend, das vollständige ATPase-Operon für die Untersuchung von Funktion und Struktur der ATPase zu klonieren und in *E. coli* zu exprimieren. Trotzdem waren zuvor mehrere Versuche gescheitert, die für die hydrophoben Untereinheiten kodierenden Gene *ahaK* und *ahaI* gemeinsam, *ahaI* als ganzes (KAVERMANN, 1999) oder das gesamte *aha*-Operon hinter eine *lac*-Promotor zu klonieren. Diese Beobachtungen spiegeln wider, daß es problematisch ist, Proteine zu produzieren, die in den Energiehaushalt der Zelle eingreifen. Es mußte also ein Expressionssystem verwendet werden, bei dem eine Basaltranskription minimiert und damit eine Produktion von eventuell toxischen Proteinen nahezu ausgeschlossen werden konnte. Vektoren, in denen die Expression der Kontrolle eines *ara*-Promotors unterliegt, erfüllen diese Bedingungen, wie GUZMANN *et al.* zeigten (GUZMAN *et al.*, 1995). Die Arbeitsgruppe um BECKWITH konnte nachweisen, daß die Repression des *ara*-Promotors 12- bis 40-fach größer ist als die des *tac*-Promotors.

Ein weiterer kritischer Faktor für die heterologe Produktion der A₁A₀-ATPase aus *M. mazei* in *E. coli* könnten die unterschiedlichen Expressionsapparate der Archäen und der Bakterien darstellen. Durch die Wahl des *ara*-Promotors aus *E. coli* jedoch werden die Unterschiede der archäellen und bakteriellen Transkription umgangen, die Transkription des *aha*-Operons ist also gewährleistet. Die Ribosomenbindestellen zwischen *E. coli* und *M.*

mazei Gö1 sind wie zwischen allen Prokaryonten und Archäen so konserviert, daß sie die Proteinbiosynthese nicht behindern. Im Genom von *E. coli* lautet die Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz AUCACCUCCUUA, und obwohl sie in den archäellen Genomen einige Variationen aufweisen kann, lautet die Kern-Region doch auch CCUCC (MA *et al.*, 2002), wie auch mit AUCACCUCCU im Falle von *M. mazei* (DEPPENMEIER, persönliche Mitteilung). Somit ist die Initiation der Synthese von Proteinen aus *M. mazei* in *E. coli* gewährleistet.

Allerdings ist die unterschiedliche Nutzung der Codons in Archäen und Bakterien für eine erfolgreiche Expression von Bedeutung. In *E. coli* gibt es eine klare Ungleichheit der Verwendung von bestimmten Triplets in der mRNA, und die Menge an gebildeten tRNAs scheint direkt proportional zur Häufigkeit der Nutzung der Codons zu sein (SORENSEN *et al.*, 1989; ROBINSON *et al.*, 1984; BONEKAMP und JENSEN, 1988). Vergleicht man nun die Triplets des *aha*-Operons mit denen aus der mRNA von *E. coli* (NAKAMURA *et al.*, 2000), findet man einen Teil, nämlich AGA/AGG (Arginin), ACA (Threonin), AUA (Isoleucin), CUU (Leucin), CCU (Prolin) und GGA (Glycin), die in *E. coli* nur wenig verwendet werden, von denen also auch wenig tRNAs in der Zelle vorliegen. Insbesondere AGA/AGG ist zu 1,3 und 1,6% im *aha*-Operon vorhanden, während sich der Anteil in der mRNA von *E. coli* nur auf 0,4 beziehungsweise 0,2% beläuft, was damit den am wenigsten produzierten tRNAs entspricht. Auch AUA und CCU mit 2,0 und 1,5% im *aha*-Operon, aber nur 0,7 und 0,8% in *E. coli* könnten während der Translation Schwierigkeiten bereiten. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß ein Überschuß an solchen Triplets in den zu exprimierenden Genen zu einer verminderten Proteinproduktion führen können (IKEMURA, 1981; IKEMURA, 1985; BRINKMANN *et al.*, 1989). Fehler äußern sich unter anderem durch Rasterschub-Mutationen oder durch falsche Translation, die in verminderter enzymatischer Aktivität resultieren kann (CALDERONE *et al.*, 1996; KLEBER-JANKE und BECKER, 2000). Um diese Probleme zu umgehen, kann *E. coli* mit den Genen für diese tRNAs komplementiert werden. Der Vektor pUBS520 (BRINKMANN *et al.*, 1989) trägt die Gene für die AGA/AGG-tRNA und wurde bereits zur Steigerung der ATP-Hydrolyse-Aktivität mit dem Plasmid pSö1, das die Gene der A₁-ATPase enthält, in verschiedene *E. coli*-Stämme kotransformiert. Allerdings war mit zusätzlicher tRNA keine Änderung der ATPase-Aktivität feststellbar (LEMKER, 2001), weshalb im Expressionssystem für das gesamte ATPase-Operon davon Abstand genommen wurde, pUBS520 zusätzlich zu transformieren. Das in *E. coli* BL21 RIL zusätzlich eingeführte Gen für die tRNA CUA (Leucin) ist im *aha*-Operon nur zu 0,3% vorhanden, sollte also nicht limitierend sein. Auf die im geringen Maße vorhandene, aber ebenfalls in *E. coli* BL21 RIL zusätzlich produzierte AUA-tRNA wurde

zugunsten des ATPase-negativen Stammes *E. coli* DK8 insbesondere in Hinblick auf eine später angestrebte Reinigung der A₁A₀-ATPase verzichtet.

Zusätzlich birgt die Überproduktion von membranständigen Peptiden das Risiko von cytotoxischen Wirkungen. Bisher gelang es, Gene für F-Typ-ATPasen zu überexprimieren. Zunächst wurden das *unc*-Operon aus *E. coli* über einen λ -transduzierenden Phagen in das Chromosom von *E. coli* integriert, und durch Hitzeinduktion wurde die Transkription initiiert. Mit dem System wurde eine sechsfache Überproduktion erreicht (KANAZAWA *et al.*, 1979; FOSTER *et al.*, 1980), obwohl das ATPase-Operon nur mit zwei Kopien vorlag. Später gelang es der Arbeitsgruppe um FUTAI unter Verwendung eines pBR322-Derivates ohne *rop*-Gen, das die Replikation des Plasmids negativ reguliert, die ATPase in *E. coli* DK8 zehnfach zu überproduzieren (MORIYAMA *et al.*, 1991). Leider wurde in dem System nicht untersucht, mit wieviel Kopien das Plasmid in der Zelle vorkommt. Der Ausgangsvektor pBR322 ist 15 bis 20fach vorhanden. pVSBAD, der Vektor, der in dieser Arbeit verwendet wurde, um das *aha*-Operon zu exprimieren, enthält den Replikationsursprung von pBR322, somit ist das *aha*-Operon ebenfalls 15 bis 20 mal pro Zelle vorhanden.

Die Auswirkungen einer zu starken Überproduktion der *E. coli* F-Typ-ATPase in *E. coli* wurde 1984 von VON MEYENBURG *et al.* analysiert (VON MEYENBURG *et al.*, 1984). Die ATPase-Gene waren in dem Fall in pBR322 kloniert und mit unterschiedlicher Effektivität überproduziert. Der Einfluß einer starken Überproduktion auf das Wachstum und die Zellmorphologie wurde untersucht worden. Eine zwei- bis fünffache Expression wirkte sich nur geringfügig aus. Bei einer zehn- bis zwölffachen Überexpression jedoch sank die Wachstumsrate um den Faktor drei ab, der Zellertrag sank um 30%, die Zellteilung war gestört und es wurden intrazelluläre Membranvesikel und Einschluß gebildet. Die A₁-Domäne, die vom Vektor pGEM4Z (Kopienzahl 400 – 500) abgelesen wurde, machte nur 4% der cytoplasmatischen Fraktion aus (LEMKER *et al.*, 2003).

Trotz der geschilderten Hindernisse konnten alle Untereinheiten der A₁A₀-ATPase, gegen die Antikörper vorlagen, nach heterologer Expression sowohl im Rohextrakt als auch in Membranpräparationen von *E. coli* DK8 immunologisch nachgewiesen werden. Alle Genprodukte hatten die erwartete Größe, die ATPase-Aktivität lag mit 150 mU/mg in etwa um den Faktor fünf höher als die in Membranen von *M. mazei* (WILMS *et al.*, 1996), was drauf schließen läßt, daß zumindest die ATP hydrolysierende A₁-Domäne funktionell synthetisiert worden ist. Daß sich nur etwa 50% der ATPase mit DCCD hemmen ließen,

könnte zum Teil an der oben diskutierten Lipidzusammensetzung der bakteriellen Membran liegen.

Nach der Expression des gesamten *aha*-Operons wurde auch AhaE detektiert. Bei der Produktion der A₁-Domäne alleine mit dem Plasmid pTL2, auf dem die Gene *ahaECFABDG* ohne *ahaHIK* liegen, war die Produktion von AhaE nicht nachzuweisen. Der Grund hierfür könnte eine fehlende oder falsche Assemblierung der Untereinheit an die A₁-ATPase sein, denn in Studien mit der V-Typ-ATPase aus *S. cerevisiae* bildete die zu AhaE homologe Untereinheit Vma4p mit dem Proteolipid, der G-Untereinheit oder Vma10p (entspricht AhaH; zum Vergleich der ATPase-Untereinheiten der verschiedenen Klassen, siehe Tab. 7) und der B-Untereinheit Vernetzungsprodukte (ADACHI *et al.*, 1990; TOMASHEK *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1999; CHARSKY *et al.*, 2000; ARATA *et al.*, 2002b). Das Fehlen von AhaE nach alleiniger Expression der für den A₁-Teil kodierenden Gene ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß AhaE ohne AhaH nicht richtig positioniert wird, was zur Hydrolyse von AhaE geführt haben könnte.

Tab. 7: Vergleich der Untereinheitenstruktur der verschiedenen ATPase-Typen

ATPase-Typ		
A ₁ A ₀ (<i>M. mazei</i> Gö1)	V ₁ V ₀ (<i>S. cerevisiae</i>)	F ₁ F ₀ (<i>E. coli</i>)
A	Vma1p (A)	β
B	Vma2p (B)	α
C	Vma6p (d)	-
D	Vma8p (D)	γ
E	Vma4p (E)	δ
F	Vma7p (F)	ε
	Vma13p (H)	-
	Vma5p (C)	-
H	Vma10p (G)	lösliches b?
G	-	-
I	Vph1p/Stv1p (a)	a+b?
K	Vma3p (c)	c
-	Vma11p (c')	-
-	Vma16p (c'')	-

AhaG konnte weder in der in *E. coli* heterolog produzierten, gereinigten A_1 -ATPase, noch im Zellextrakt, noch in der gereinigten ATPase aus *M. mazei* (WILMS *et al.*, 1996) nachgewiesen werden. Der Beweis, daß es sich bei *ahaG* um ein authentisches Gen handelt, steht folglich noch aus.

4.2.3 Vergleich der A_1A_0 -ATPase mit den V_1V_0 - und den F_1F_0 -ATPase

Die heterolog in *E. coli* produzierte und daraus gereinigte A_1 -ATPase von *M. mazei* besteht aus den Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaD und AhaF mit molekularen Massen von 65, 55, 41, 28 und 9 kDa. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der ATPase aus *M. mazei* hatten gezeigt, daß die Untereinheiten A und B jeweils in drei Kopien in alternierender Folge um eine zentrale Masse herum angeordnet sind (WILMS *et al.*, 1996). In den F_1F_0 -ATPasen inseriert Untereinheit γ in das Hexamer und bildet die zentrale Masse. γ spielt eine wichtige Rolle in der Energievermittlung zwischen der hydrophoben, membranständigen und der hydrophilen, cytoplasmatischen Domäne (ABRAHAMS *et al.*, 1994; NOJI *et al.*, 1997; SABBERT *et al.*, 1996; ZHOU *et al.*, 1997). Sequenzvergleichen zufolge könnten AhaD und Vma8p (Untereinheit D) von V-Typ-ATPasen homolog zu der Untereinheit γ der F_1F_0 -ATPasen sein (Tab. 7). Neuere elektronenmikroskopische Analysen und Vernetzungsstudien mit V-Typ-ATPasen aus der Pflanze *Kalanchoë daigremontiana* und aus *S. cerevisiae* bestätigen diese Annahmen (DOMGALL *et al.*, 2002; ARATA *et al.*, 2002b). Da bei einem tryptischen Verdau des A_3B_3CDF -Komplexes AhaD vor Proteolyse geschützt vorliegt (GRÜBER *et al.*, 2001), wird die Rolle von AhaD als γ -Homolog noch wahrscheinlicher. Die F-Untereinheit (Vma7p; homolog zu F-Untereinheit aus A-Typ-ATPasen, siehe Tab. 7) liegt nahe Untereinheit D (TOMASHEK *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999) und würde zusammen mit Untereinheit D der Masse entsprechen, die für den Zentralstab beobachtet worden ist (DOMGALL *et al.*, 2002). Die C-Untereinheit aus V-Typ-ATPasen bildet wie die E-Untereinheit Vernetzungsprodukte mit den Proteolipiden (ADACHI *et al.*, 1990; PUOPOLO *et al.*, 1992). Während der Glukose-vermittelten Dissoziation der V_1V_0 -ATPase ist die C-Untereinheit die einzige, die sich von V_1 und V_0 löst (KANE, 1995), was bedeuten würde, daß Untereinheit C eine peripher gelegene Untereinheit ist. DOMGALL *et al.* schließen daraus, daß die C-Untereinheit zusammen mit dem hydrophilen Teil der a -Untereinheit einen weiteren Stil zwischen V_0 und V_1 bilden (DOMGALL *et al.*, 2002). In den

A_1A_0 -ATPasen gibt es kein zu C homologes Peptid. Die zu AhaC homologe Untereinheit ist die *d*-Untereinheit (Vma6p, siehe Tab.7) (WILMS *et al.*, 1996). Untereinheit *d* wird bei DOMGALL *et al.* als auf dem Proteolipid-Ring sitzend positioniert, weil sie zwar hydrophil ist, aber an nach Abscheren der V_1 - und der V_0 -Domäne an V_0 assoziiert (BAUERLE *et al.*, 1998).

In jüngeren Arbeiten wurde die A_1 -Domäne aus *M. mazei* mittels Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Mit dieser Methode, die Auflösungen von etwa 30 Å erlaubt, können Eigenschaften errechnet werden, die zwar nicht die genaue Positionierung von Untereinheiten erlaubt, die aber bereits die Dimensionen und groben Formen des Enzyms preisgaben (GRÜBER *et al.*, 2001). Es wurde ermittelt, daß die A_1 -Domäne mit einer Gesamtlänge von 17,8 nm in Bezug auf die Länge zwischen der F_1 - und der V_1 -ATPasen lag. Der Stiel, der die hydrophile und die hydrophobe Domäne verbindet, ist der Grund für die unterschiedlichen Größen. Er ist bei den V-Typ-ATPasen am längsten, der archäelle Stiel liegt dazwischen und der Stab aus F-Typ-ATPasen ist der kürzeste (GRÜBER *et al.*, 2001).

Zum ersten Mal konnten in dieser Arbeit die Untereinheiten AhaH, AhaI, AhaK und AhaE von einem Plasmid aus exprimiert werden, das alle Gene des A_1A_0 -ATPase-Operons trug. AhaH und AhaK wurden zuvor heterolog in *E. coli* produziert, wenn auch im Falle von AhaH nur als Fusionsprotein, von AhaI jedoch ließ sich nur der hydrophile Teil als Fusionsprotein synthetisieren. Die Produktion des hydrophoben C-Terminus war nicht möglich gewesen (Kavermann, 1999). Im Folgenden sollen die Peptide AhaH, AhaI und AhaK genauer vorgestellt werden.

AhaH, das zu der G-Untereinheit aus V-ATPasen homolog ist (siehe Tab. 7, 52% Identität zu Vma10p aus *S. cerevisiae* (SUPEKOVA *et al.*, 1995)), hat eine abgeleitete molekulare Masse von 12,2 kDa und besteht aus 109 Aminosäure-Resten. Der pI beträgt 4,74. Das Peptid ist geladen, 21 und 16% der Aminosäuren sind sauer beziehungsweise basisch. Zu den archäellen H-Untereinheiten ist AhaH zwischen 25 (*M. thermautotrophicus* (SMITH *et al.*, 1997) und 29% (*Archaeoglobus fulgidus* (KLENK *et al.*, 1997)) identisch. Auch mit NtpF der V-Typ-ATPase aus *E. hirae* ist AhaH verwandt (23% Identität).

AhaI ist den 100 kDa- oder *a*-Untereinheiten der V-Typ-ATPasen sehr ähnlich (siehe Tab. 7). Es hat eine berechnete molekulare Masse von 72 kDa und einen pI von 5,8. Es weist die höchste Identität zu AtpI aus den Methanosarcinaceen auf (85,5%, *M. barkeri*; 81,6% *M. acetivorans*). Entfernter verwandt sind die I-Untereinheiten aus *A. fulgidus* (35,9% Identität),

Halobacterium NRC-1 (34,7% Identität) und *P. horikoshii* (30% Identität). Überraschenderweise sind die I-Untereinheiten zwischen den methylo-trophen und den hydrogenotrophen Methanogenen nicht sehr konserviert. Die Identitäten liegen zwischen 33 (*M. jannaschii*) und 30% (*M. thermautotrophicus*). Die Identität der I-Untereinheiten zu den V-Typ-ATPasen aus Eukarya beträgt zwischen 20 (Vph1p aus *S. cerevisiae* (MANOLSON *et al.*, 1992)) und 24% (Vph1p aus *Bos taurus* (PENG *et al.*, 1994)). 27% der Aminosäuren von NtpI aus *E. hirae* (TAKASE *et al.*, 1994) sind zu denen aus AhaI identisch. Hydrophobizitätsanalysen zeigen, daß AhaI aus einem sehr hydrophilen N-terminalen Teil von 39 kDa und einem hydrophoben Teil von 33 kDa besteht. Der hydrophile Teil von AhaI, wie der von der *b*-Untereinheit aus *E. coli*, ist größtenteils α -helical, wie die Garnier-Analyse ergab. Im hydrophoben Teil durchspannen wahrscheinlich sechs bis acht α -Helices die Membran. Es wird angenommen, daß der C-Terminus funktionell homolog zu der *a*-Untereinheit der F_1F_0 -ATPasen ist (MÜLLER *et al.*, 1999), obwohl die Aminosäuresequenzen nur zu 20% ähnlich sind. Es ist bekannt, daß die hydrophobe Domäne von Vph1p und die *a*-Untereinheit der F-Typ-ATPasen an der H^+ -Translokation beteiligt sind (DECKERS-HEBESTREIT und ALTENDORF, 1996; FILLINGAME *et al.*, 1998b; LENG *et al.*, 1996; LENG *et al.*, 1998).

Das *ahaK*-Gen aus *M. mazei* kodiert für ein Peptid mit 80 Aminosäure-Resten und einer berechneten molekularen Masse von 7,9 kDa. Das Polypeptid faltet sich laut Hydrophobizitätsanalyse in der Membran wie eine Haarnadel mit zwei hydrophoben Helices, die durch einen hydrophilen, cytoplasmatischen Bogen verbunden werden. Proteolipide sind aus einer Reihe von Archäen isoliert und charakterisiert worden. In fast allen Fällen hatten sie molekulare Massen von etwa 8 kDa, was bedeutet, daß sie zwei transmembrane Helices aufweisen (IHARA *et al.*, 1997; INATOMI, 1986; LÜBBEN und SCHÄFER, 1989; STEINERT und BICKEL-SANDKÖTTER, 1996; WILMS *et al.*, 1996). Diese Größe stimmt mit der Größe der Proteolipide aus F_1F_0 -ATPasen überein und wurde bisher stets als Grund für die F_1F_0 -ähnlichen Eigenschaften der A-Typ-ATPasen, also ihrer Fähigkeit zur ATP-Synthese, angesehen. Das *M. mazei*-Proteolipid wurde durch Chloroform/Methanol-Extraktion aus Membranen gereinigt (RUPPERT *et al.*, 2001) und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. Die Sequenz entspricht genau der vorhergesagten und bestätigt damit den vermuteten Translationsstartpunkt. Dieses Proteolipid ähnelt also mit 8 kDa wie die meisten anderen Proteolipide aus Archäen den bakteriellen Peptiden. Allerdings wurde vor kurzem bei den F-Typ-ATPasen auch ein dupliziertes Proteolipid entdeckt. *Acetobacterium*

woodii enthält im ATPase-Operon neben zwei Genen, die für 8-kDa-Proteolipide kodieren, auch ein Gen, das für ein Peptid von 18 kDa kodiert (RAHLFS *et al.*, 1999).

Einer der grundlegendsten Unterschiede der drei ATPase-Klassen ist die Fähigkeit der isolierten cytoplasmatischen Domäne, ATP zu hydrolysieren. Die reversible Dissoziation von V_1 - und V_O -Domäne stellt einen regulierenden Mechanismus dar, weshalb die abgelöste V_1 -Domäne nur noch mit reduzierter Aktivität ATP hydrolysieren kann (KANE, 1995; SUMNER *et al.*, 1995). Solch ein Kontrollmechanismus ist für F- und A-Typ-ATPasen nicht vorhanden und wird durch die Physiologie der Organismen, die diese ATPasen besitzen, nicht benötigt. Diese funktionelle Besonderheit der V-ATPasen liegt vermutlich in den hydrophilen Untereinheiten H (Vma13p) und C (Vma5p) begründet, die nur in den vakuolären ATPasen zu finden sind.

Das wichtigste funktionelle Merkmal der ATPasen ist jedoch ihre Fähigkeit ATP zu synthetisieren. F_1F_O - und A_1A_O -ATPasen synthetisieren unter den meisten Bedingungen in der Zelle ATP, während die V_1V_O -ATPasen unter physiologischen Bedingungen ATP hydrolysieren. Auf die der Funktion zugrunde liegenden strukturellen Unterschiede soll später eingegangen werden (siehe unten).

4.3 Archäelle Proteolipide

4.3.1 Die Struktur archäeller Proteolipide

Bis zur Sequenzierung des Genoms von *M. jannaschii* waren nur archäelle Proteolipide mit einer molekularen Masse von 8 kDa bekannt, die wie die Proteolipide der F_1F_O -ATPasen aus zwei transmembranen Helices mit einer hydrophilen Schleife bestanden. Es wurde folglich angenommen, daß die Größe des Proteolipids die Fähigkeit zur ATP-Synthese determiniert. Wie bereits erwähnt, können A_1A_O - und F_1F_O -ATPasen ATP synthetisieren, während die V_1V_O -ATPasen unter physiologischen Bedingungen ausschließlich ATP hydrolysieren, was auf die Duplikation dieser Proteolipide zurückgeführt wurde (MANDEL *et al.*, 1988). V_1V_O -ATPasen besitzen 16-kDa-Proteolipide.

Überraschenderweise ergab die Analyse des für das Proteolipid aus *M. jannaschii* kodierende Gen, *atpK*, daß es sich um die triplizierte Variante der bis dahin bekannten Proteolipid-Gene handelte (Abb. 26). Das Peptid von 21,3 kDa molekularer Masse läßt sich in drei Haarnadel-Strukturen aufteilen, die sehr konserviert sind. Die Teile AtpK1:AtpK2 sind zu 58% identisch, AtpK2:AtpK3 zu 57% und AtpK3:AtpK1 zu 46%, was klar auf eine Vervielfachung des Gens und anschließender Fusion hinweist (RUPPERT *et al.*, 1999). Das für die Ionentranslokation essentielle Carboxylat befindet sich in Helix vier und sechs. In Helix zwei substituiert ein Glutamin-Rest das Glutamat. Nach weiteren Genom-Analysen von Methanogenen ergab sich ein sehr variables Bild für die methanoarchäellen Proteolipide: das *atpK*-Gen aus *M. thermautotrophicus* ist dupliziert (RUPPERT *et al.*, 2001) und das Gen aus *M. kandleri* kodiert sogar für ein verdreizehnfaches Peptid (Abb. 26) (SLESAREV *et al.*, 2002)! Das Peptid von *M. thermautotrophicus* hat eine abgeleitete molekulare Masse von 15,6 kDa, die beiden Haarnadeln sind zu 67% identisch und das ionentranslozierende Carboxylat ist in Helix zwei und vier konserviert. Die dreizehn Haarnadeln, aus denen sich das Proteolipid von *M. kandleri* zusammensetzt, sind höchst konserviert, 55,9 bis 86,3% der Aminosäuren sind identisch und der aktive Carboxylat-Rest liegt in jeder zweiten Helix vor.

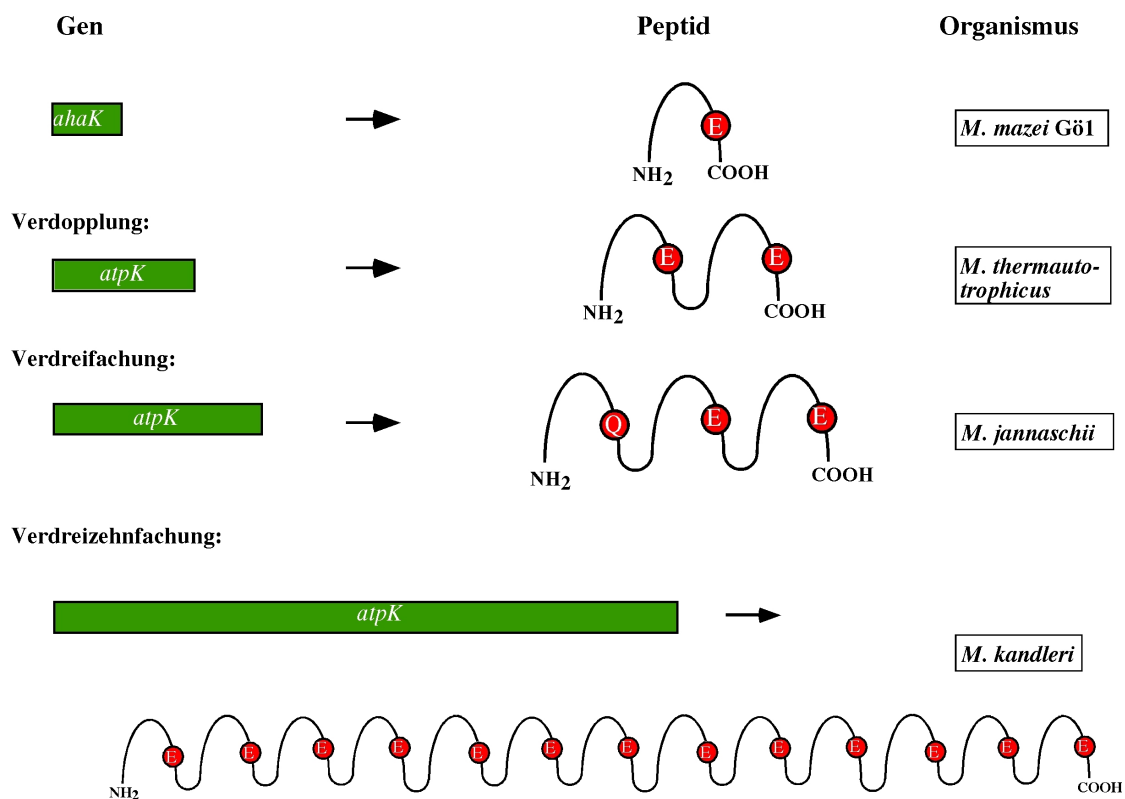


Abb. 26: Die methanoarchäellen Proteolipide haben abgeleitete molekulare Massen von 8, 16, 21 und 97 kDa.

Bisher wurden die Proteolipide aus *M. thermotrophicus*, *Methanothermobacter marburgensis* und *M. jannaschii* wie das Peptid aus *M. mazei* durch Chloroform/Methanol-Extraktion gereinigt (RUPPERT *et al.*, 2001; RUPPERT *et al.*, 1999). In beiden Fällen wurde bestätigt, daß es sich um ein verdoppeltes beziehungsweise verdreifachtes Peptid der bisher bekannten archäellen Proteolipide handelt. Untersuchungen des Peptides von *M. kandleri* stehen noch aus. Das *atpK*-Gen von 3063 Bp Länge konnte jedoch bereits mit genomischer DNA von *M. kandleri* als Matrize amplifiziert werden (LINGL, persönl. Mitteilung). Eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft des Proteolipids aus *M. jannaschii* ist der für die Ionentranslokation essentielle Carboxylat-Rest, der in Haarnadel I durch ein Glutamin substituiert ist. Im Operon von *A. fulgidus* liegen zwei Gene vor, die für Proteolipide kodieren. In diesem Fall scheint *atpK* schon dupliziert worden zu sein, jedoch fand keine Fusion statt.

Was könnte der Sinn solcher Vervielfachungen der Proteolipid-Gene sein? Die Proteolipid-Monomere treten in einer höheren Kopienanzahl als die anderen ATPase-Untereinheiten auf. Sofern aber das für das Proteolipid kodierende Gen in einer polycistronischen mRNA vorliegt, gibt es nur wenige Mechanismen, die Synthese des Proteolipids zu verstärken. Zum einen kann das durch die Steigerung der Translation wie in *E. coli* (McCARTHY *et al.*, 1985) oder zum anderen durch die zusätzliche Transkription des für das Proteolipid kodierende Gen wie bei *M. mazei* (RUPPERT *et al.*, 1998) erreicht werden. Die dritte Möglichkeit wäre die Multiplikation des für das Proteolipid kodierenden Gens.

Im Falle des bisher größten bekannten Proteolipids von *M. kandleri* könnte auch die hohe Wachstumstemperatur (bis 110°C) eine Ursache für die Vervielfachung darstellen. Da der Proteolipid-Ring im Zuge der Ionentranslokation rotiert, ist die strukturelle Integrität eher bei einem großen Monomer gegeben als bei mehreren Untereinheiten, die nur durch Wechselwirkungen aneinander haften. Die Vervielfältigung der methanoarchäellen Proteolipide untermauert diese Annahme weiterhin: *M. mazei* hat ein Wachstumsoptimum bei 37°C und enthält eine Haarnadel pro Proteolipidmonomer, *M. thermotrophicus* hat zwei Haarnadeln im Proteolipidmonomer bei einem Wachstumsoptimum von 65°C, *M. jannaschii* wächst bei einer Temperatur von 85°C und trägt die triplizierte Form des Proteolipids. *M. kandleri* mit dem höchsten Temperaturoptimum enthält das größte Proteolipid mit einem Monomer von dreizehn Haarnadeln.

Die Pyrococcen *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* und *Pyrococcus abyssi* sind anaerobe Archäen mit einem strikt fermentativen Metabolismus. Auch ihre Gene, die für

die Proteolipide kodieren, entstanden durch Duplikation und anschließende Fusion eines Vorläufergens, das für eine Haarnadel kodierte (ROBB *et al.*, 2001; KAWARABAYASI *et al.*, 1998). Das duplizierte Proteolipid enthält nur ein aktives Carboxylat in Haarnadel zwei, aber nicht in eins, was bedeutet, daß sie den 16-kDa-Proteolipiden der V_1V_0 -ATPasen aus Eukaryoten entsprechen. Die A-Untereinheiten der Pyrococcen gruppieren in phylogenetischen Analysen jedoch mit den A-Untereinheiten der *Archaea* (SENEJANI *et al.*, 2001).

4.3.2 Das Na^+ -Bindemotiv in archäellen Proteolipiden

Wie bereits erwähnt, wurde die Ionen-Spezifität der A_1A_0 -ATPasen noch nicht genügend untersucht. Einige Methanoarchäen können einen künstlich angelegten H^+ -Gradienten zur ATP-Synthese nutzen. Die Bedeutung des Na^+ -Gradienten in Bezug auf die ATP-Synthese ist jedoch noch unklar.

Die Ionen-Spezifität der bakteriellen F-Typ-ATPasen wird durch den membranständigen Teil determiniert, wie zunächst Versuche mit der Na^+ -abhängigen F-Typ-ATPase aus *P. modestum* zeigten. Ein Hybrid aus dem F_0 -Teil von *P. modestum* und dem F_1 -Teil aus *E. coli* transloziert Na^+ -Ionen (KAIM und DIMROTH, 1994). Später wurde ein Na^+ -Bindemotiv im Proteolipid der Na^+ -translozierenden ATPase von *A. woodii* entdeckt (RAHLFS und MÜLLER, 1997), das durch Mutationsanalysen bestätigt werden konnte (KAIM *et al.*, 1997). Aminosäure-Reste, die an der Translokation von Na^+ -Ionen beteiligt sind, müssen in der Membran liegen, ein freies Elektronenpaar besitzen und dürfen nicht in den H^+ -translozierenden Enzymen auftreten. In den bakteriellen Peptiden erfüllt das Motiv PXXXQ in Helix I und ET/S in Helix II diese Anforderungen (RAHLFS und MÜLLER, 1997). Durch Sequenzvergleiche sollte überprüft werden, ob dieses Na^+ -Bindemotiv auch in der c-Untereinheit der A_1A_0 -ATPasen enthalten ist. Die vervielfachten Proteolipidsequenzen aus *M. thermotrophicus*, *M. jannaschii* und *M. kandleri* wurden für den Sequenzvergleich in einzelne, einer Haarnadel entsprechende Sequenzen aufgeteilt (Abb. 27). Als die zu den anderen Haarnadeln am stärksten konservierte Einheit im Proteolipid aus *M. kandleri* wurde Haarnadel Nummer I für den Vergleich herangezogen (Abb. 27).

Die methanoarchäellen Proteolipide und das Proteolipid von *T. volcanium* enthalten potentielle Na⁺-Bindestellen, die abgesehen von konservierten Austauschungen sehr verwandt zu den bakteriellen sind (Abb. 27): In den archäellen Peptiden der *Methanosarcinacea* wird das bakterielle Prolin durch ein Serin oder im Falle von *T. volcanium* und *T. acidophilum* durch ein Threonin ersetzt. Das Glutamin ist sowohl in Bakterien als auch in Archäen mit Ausnahme von *M. mazei* konserviert. In *M. mazei*, *M. acetiovorans* und *M. barkeri* substituiert zudem ein Glutamat das Glutamin. Alle ausgetauschten Aminosäuren tragen freie Elektronenpaare und können folglich Na⁺ komplexieren, so daß das Motiv I des Na⁺-Bindemotivs in P/S/TXXXQ/E erweitert werden sollte. Haarnadel I des triplizierten Proteolipids von *M. jannaschii* besitzt an Stelle von Glutamin/Glutamat einen ungeladenen Aminosäure-Rest, nämlich ein Alanin, das kein Na⁺ binden kann. In dieser Haarnadel ist der höchst konservierte Carboxylat-Rest zudem durch ein Glutamin substituiert, was bedeutet, daß diese Haarnadel nicht an einer Ionentranslokation beteiligt sein kann.

Das Na⁺-Bindemotiv aus Helix II (Motiv II) enthält die bereits erwähnte Carboxyl-Gruppe, die für die Translokation von Ionen, H⁺ und Na⁺, unablässig ist. Sie wird in jeder Haarnadel der ATP-synthetisierenden Enzyme gefunden. Neben diesem Carboxylat befindet sich in allen bisher bekannten archäellen Proteolipid-Sequenzen ein Threonin. Zusammengefaßt könnte das archäelle Na⁺-Bindemotiv also lauten: P/S/TXXXQ/E (Motiv I) – ET (Motiv II) (Abb. 28a).

Die Proteolipide von *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* und *P. aerophilum* enthalten dieses Na⁺-Bindemotiv nicht. Nur das Glutamat aus Motiv II, das für den Protonentransport essentiell ist, ist vorhanden. Gleiches gilt für die Peptide aus *Halobacterium* NRC-1 und *Halobacterium salinarium*. Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß diese Enzyme Na⁺ translozieren.

Das beschriebene Na⁺-Bindemotiv und auch die Hypothese, daß manche archäellen Enzyme die ATP-Synthese sowohl an eine H⁺- als auch an eine Na⁺-Translokation koppeln können, indizieren, daß die A₁A₀-ATPasen Natriumionen pumpen können. Dies bleibt aber experimentell zu bestätigen. Klarheit darüber könnten Versuche mit einem heterolog produzierten Enzym, dessen Na⁺-Bindemotiv mutiert wurde, und in Liposomen rekonstituiertes Enzym schaffen. Da die heterolog produzierte A₁A₀-ATPase aus *M. mazei* funktionell ist und gesamtheitlich an der Membran von *E. coli* DK8 assoziiert, scheint dieser Lösungsweg sehr aussichtsreich, das Na⁺-Bindemotiv zu verifizieren. Die A₁A₀-ATPase aus *M. jannaschii* konnte zwar in Liposomen rekonstituiert werden und konnte ATP

hydrolysieren, allerdings wurde bisher keine Synthese von ATP beobachtet. Weitere Veränderungen der Versuchsbedingungen, die zur Synthese von ATP führen, sind in diesem Fall noch erforderlich.

Ionen- Abhängigkeit		Motiv I	
Na ⁺	Awo	ME----GL---DFIKACS-----AIGAGIAM-IAGVGGIGGFAAG	34
	Pmo	MD----MVLAKTVVLAAS-----AVGAGAAM-IAGIGPVGQGYAAG	37
	Mac. AtpE	MT----LDYTTTIIAVAS-----IATSLTIGIGVLGPAIGGRAVA	38
	Mba. AtpE	MA----LDYTTTIIAVAS-----IATAGITIGIGVIGPAIGGRAVA	38
	Mma	M----VDA--A-STGLFLDAAGMKAL-----GAATIAVTGLASAIAEKDIGT	41
	Mac. AtpK	M----VGE--ELISGFPLDADGMKAL-----GAALAITVTGLASAWAEKEIGT	42
	Mba. AtpK	M----VDG--A-TANLFLDAAGAKAI-----GASIAIALTGLIASAIAEKDIGT	41
	Mth. AtpK1	M----V--E--IALGTALA-----AIGAGVAVGFAGLGSGLOGGIAAA	35
	Mth. AtpK2	G-----G--KGLDVTAGLV-----AVGAGAAI GFAGLGSGLGOGITSA	36
	Mja. AtpK1	M----V--DPLI--LG-----AVGAGLAVGIAGLGSIGIGAGITGA	32
	Mja. AtpK2	M-----V-----FAAGLAAGLAGL-SAIGOGITAA	23
	Mja. AtpK3	V-----GVFKGNAGAETVA-----ALGAGFAVGAGL-SGIGOGITAA	37
	Mka. AtpK1	M-----VSTELTIA-----AIGAGLAAGVAVGSGIGOGIAAA	33
	Tac	M-----VTVDAL-----LATAASIS IAGGLITGMAQQGIGA	33
	Tvo	M-----VTVDAL-----LATAASIS IAGGLITGMAQQGIGA	33
	Ehi. NtpK1	M----MDYLITQNGGMVFAV-----LAMATATIFSGISAKGVGMTGE	39
	Ehi. NtpK2	-----MSVVQ---GLNFLGASLP IAFITGLFSGIADKVA	32
	Pab. AtpK1	M-----NVMEPIV---YV-----ALGMALGAGLAGAASSFGVGIAGA	34
	Pab. AtpK2	-----GGFKFSN---DLIS---SAILFAGLVLVGLTGL-SAIPGGIIAS	37
	Pfu. AtpK1	M-----DPIV---YV-----ALGMALGAGIAGAASSFGVGIAGA	31
Pfu. AtpK2	-----GGFKFAEPTTENLIK---SAILFAGLVLVGLTGL-SAIPGGIIAS	41	
Pho. AtpK1	M-----KIMDPIV---YV-----SLGMALGAGLAGAASSFGVGIAGA	34	
Pho. AtpK2	-----GGFKFAEPTTENIIK---SAILFAGLVLVGLTGL-SAIPGGIIAG	41	
H ⁺	Afu	M-----ED--ALAKGLI-----AV-----GAGLAVGLAGIAGLGSIGIGA	34
	Pae	MKSKALL-----AIVLAATIAFAQT--DGQRY---IGAGLAVGLAGLGGIGVGIAGA	49
	Sac	-----QAPYDTAQGFEGLNIGAGLAI GLAAIGAGVAVGMAAA	37
	Sso	MKRASLILAFILPVLVSSVIAAAQAPSDTAQGFAGINIGAGLAVGLAAIGAGIAGVGMAAA	60
	HNRC-1	M-----FETFQQLSTILAETGSNMPAITPKA-----AAALAVGLAALAGYAEERGIGS	48
	Hsa	M-----FETFQQLSTILAETGSNMPAITPKA-----AAALAVGLAALAGYAEERGIGS	48
		Motiv II	
Na ⁺	Awo	KGAEAVGRQPEAQSDIIRTMLGAAVAETGTGIYGLIVALILLFGKPIFLKTVTR	89
	Pmo	KAVESVARQPEAKGDIISTMVLGQAIAESTGIYSLVIALILLYANP-FVLLG	89
	Mac. AtpE	TALSSLAQQPDASATITRTLVFLGAMIESLSIYCFVVMILIFANPFWNTATV	91
	Mba. AtpE	TALSSLAQQPDASATITRTLVFLGAMIESLAIYCFVVMILIFANPFWNRALT	91
	Mma	AAIGAMAENEGL---FGKGLILT-VIPETIVIFGLVVALIN-Q	80
	Mac. AtpK	AAIGAMAENEGL---FGKGLILT-VIPETIVIFGLVVALINSA	82
	Mba. AtpK	AAIGAMAENEGL---FGKGLILT-VIPETIVIFGLVVALINSA	81
	Mth. AtpK1	ESVGAVAENS DM---FARGIIFS-TLPETQAIYGFLLIALLLVFSGLLG	80
	Mth. AtpK2	SSVGAVVEDPDM---FARGIIFS-ALSETQAIYGFLLIALLLMVFGGILGG	82
	Mja. AtpK1	SGAGVAEDPNK---FGTAIVFQ-ALPQTQGLYGFVAILILF---VFKTVPWA	80
	Mja. AtpK2	AGLGVAEDNSI---FGKAMVFS-VLPETQAIYGLLIALLL	61
	Mja. AtpK3	GAGATARDPDA---MGKLVLA-VMPETFAIFGLLIALLIMLMI-----K	79
	Mka. AtpK1	AGAGVAEDEAT---FGKAVFS-VLPETQAIYGLLTAILIMVIGILLGAAKAVT	84
	Tac	AGMGI IAEKPEK---FGQVLFVF-VIPETLWVIGLALGI ILLLHI-----I	75
	Tvo	AGMGI IAEKPEK---FGQVLFVF-VIPETLWVIGLALGI ILLLHI-----I	75
	Ehi. NtpK1	AAAALTTSQPEK---FGQALILQ-LLPQTQGLYGFVIAFLIFINLGS-----D	83
	Ehi. NtpK2	AGIQILAKKPEH---ATKGIIFA-AMVETIYAILGFVIFLVLVNA	73
	Pab. AtpK1	AAAGVAEDEKN---FRNALILQ-GLPMTQSIYGLITLFLIGMTAGIIGG	80
	Pab. AtpK2	SGIGAVSKNPR---FTQNLIFA-AMAETMAIFGLVGAAILIMSL	78
	Pfu. AtpK1	AAAGVAEDERN---FRNALILE-GLPMTQSIYGLITLFLIGMTAGIIGG	77
Pfu. AtpK2	SGIGAVSKNPKT---FTQNLIFA-AMAETMAIFGLVGAAILIMSL	82	
Pho. AtpK1	AAAGVAEDERN---FRNALILE-GLPMTQSIYGLITLFLIGMAAGIIGG	80	
Pho. AtpK2	SGIGAVSKNPR---FTQNLIFA-AMAETMAIFGLVGAAILIMSL	82	
H ⁺	Afu	AAVGATAEDRGF---FGLGILFT-VIPETIVIFGLVIAFILMFAF	75
	Pae	AAMSALVEKPQE---RVWYLIFL-ALAEATAIYGLLVSILLI	87
	Sac	AGIGVLTERRDM---FGTILIFV-AIGEGIAVYGLIFAVLMLF--GKF	79
	Sso	AGVGVLTERRDM---FGTVLIFV-AIGEGIAVYGLIFAVLMLF--GKF	102
	HNRC-1	AAVGAI AEDPDL---FGTGLILT-VLPETLVI LALVVVVFVPTFF	89
	Hsa	AAVGAI AEDPDL---FGTGLILT-VLPETLVI LALVVVVFVPTFF	89

Abb. 27: Sequenzvergleich archäeller Proteolipide mit Proteolipiden aus den beiden bekannten Na⁺-abhängigen F₁F₀-ATPasen. Die Aminosäuresequenz von AtpK aus *M. thermotrophicus* wurde zweigeteilt, die aus *M. jannaschii* dreigeteilt. Von dem verdreizehnfachen Peptid aus *M. kandleri* wurde nur Haarnadel I für den Vergleich herangezogen. Die Anzahl der Aminosäuren sind rechts des Vergleichs angegeben. Das mögliche Na⁺-Bindemotiv ist umrahmt. Am linken Rand ist die mögliche Ionen-Abhängigkeit angegeben. Abkürzungen: Awo: *A. woodii*; Pmo: *P. modestum*; Mac.AtpE: *M. acetivorans*, F-Typ-Proteolipid; Mba.AtpE: *M. barkeri*, F-Typ-Proteolipid; Mma: *M. mazei*; Mac: *M. acetivorans*, A-Typ-Proteolipid; Mba: *M. barkeri*, A-Typ-Proteolipid; Mth.AtpK1, Mth.AtpK2: *M. thermotrophicus*, Haarnadel I und II; (Fortsetzung der Bildunterschrift siehe nächste Seite)

Mja.AtpK1, Mja.AtpK2, Mja.AtpK3: *M. jannaschii*, Haarnadeln I bis III; Mka.AtpK1: *M. kandleri*, Haarnadel I; Tac: *T. acidophilum*; Tvo: *T. volcanium*; Ehi.NtpK1, Ehi.NtpK2: *E. hirae*, Haarnadel I und II; Pab.AtpK1, Pab.AtpK2: *P. abyssi*, Haarnadel I und II; Pfu.AtpK1, Pfu.AtpK2: *P. furiosus*, Haarnadel I und II; Pho.AtpK1, Pho.AtpK2: *P. horikoshii*, Haarnadel I und II; Afu: *A. fulgidus*; Pae: *P. aerophilum*; Sac: *S. acidocaldarius*; Sso: *S. solfataricus*; HNRC-1: Halobacterium HNRC-1; Hsa: *H. salinarium*.

Für die ATP-Synthese durch die F-Typ-ATPase aus *Paracoccus denitrificans* erwies sich beispielsweise die Sulfit-Konzentration als wichtiger Faktor (PACHECO-MOISES *et al.*, 2000; PACHECO-MOISES *et al.*, 2002). Entgegen den Erwartungen beeinflusste aber weder die Anwesenheit noch die Abwesenheit von Sulfit im Test-Puffer die ATP-Synthese durch die *M. jannaschii* ATPase.

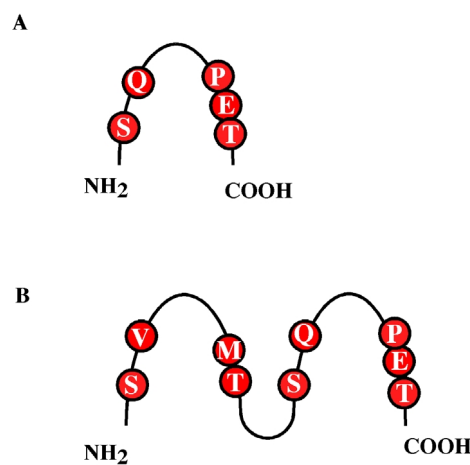


Abb. 28: Das mögliche Na⁺-Bindemotiv in archäellen (A) und vakuolären (B) Proteolipiden. Bei den vakuolären Peptiden ging der für die Ionentranslokation essentielle Carboxylat-Rest in Helix II verloren.

M. acetivorans und *M. barkeri* besitzen neben den A₁A₀-ATPasen F₁F₀-ATPasen in ihren Genomen und es wurde angenommen, daß F-Typ-ATPasen mit Na⁺, die A-Typ-ATPasen hingegen mit Protonen koppeln. (BECHER und MÜLLER, 1994). Interessanterweise tragen die Proteolipide der archäellen F₁F₀-ATPasen das Na⁺-Bindemotiv PXXXXE (Motiv I) – ES (Motiv II). Sollten diese Enzyme produziert werden, sollten sie Na⁺ translozieren können. Wie bereits erwähnt, konnte die Expression der F-ATPase-Gene von *M. barkeri* nicht nachgewiesen werden (LEMKER, 1997).

Die duplizierten Proteolipide der *Pyrococci* bestehen wie die V-Typ-Proteolipide aus zwei Haarnadeln (Abb. 28b). Der Sequenzvergleich ergab, daß nur Haarnadel II das Na⁺-Bindemotiv SXXXQ (Motiv I) – ET (Motiv II) besitzt.

Neben dem Befund, daß nur Haarnadel zwei der 16-kDa-Proteolipide aus den Pyrococci das Na^+ -Bindemotiv enthält, ergab der Sequenzvergleich eine weitere, bemerkenswerte Eigenschaft: In Haarnadel eins gibt es kein aktives Carboxylat. Die Proteolipide der A_1A_0 -ATPasen der Pyrococci stellen also das Pendant zu den 16-kDa-Peptiden der eukaryotischen Na^+ -abhängigen V-Typ-ATPasen dar, was größte Bedeutung für die Funktion des Enzyms hat. Die Fähigkeit zur ATP-Synthese ist von der Anzahl der Ionen, die pro synthetisiertes ATP transloziert werden, direkt abhängig. Gemäß

$$\Delta G_p = n \cdot F \cdot \Delta p,$$

wird ein Phosphorylierungspotential (ΔG_p) von ~50-70 kJ/mol bei einem physiologischen elektrochemischen H^+ -Potential von -180 mV (Δp) durch $n = 3 - 4$ (H^+/Na^+)/ATP erreicht. Ist aber die Anzahl an Ionen geringer, kann kein ATP synthetisiert werden. Das Proteolipidoligomer der F-Typ-ATPasen besteht aus 10 bis 14 Monomeren mit 10 bis 14 Carboxylat-Gruppen. Nimmt man drei ATP-synthetisierende oder -hydrolysierende Zentren an, würde das zu einer (H^+/Na^+)/ATP-Stöchiometrie von 3,3 bis 4,7 führen. Der Proteolipidring der V-Typ-ATPasen enthält 6 Kopien eines Proteolipids mit 2 Haarnadeln. (ARAI *et al.*, 1988). Die H^+/ATP -Stöchiometrie wäre also 2. Der Proteolipid-Ring der A/V-ATPase aus *E. hirae* enthält sieben Monomere (MURATA *et al.*, 2003), was ein (H^+/Na^+)/ATP-Stöchiometrie von 2,3 ergibt. Beide Verhältnisse sind zu niedrig für die Synthese von ATP. Allerdings bedeutet das auch, daß die V_1V_0 -ATPasen durch das reduzierte (H^+/Na^+)/ATP-Verhältnis bessere Ionenpumpen sind, denn das selbe ΔG_p kann ein höheres Δp ergeben. Das entspricht der Aufgabe der V-Typ-ATPasen aus *Eukarya*, die zur Ansäuerung von Zellorganellen benötigt werden. Wenn Δp künstlich erhöht wird, kann das Enzym dazu gezwungen werden, ATP zu synthetisieren, wie in Versuchen mit der V-ATPase aus *S. cerevisiae* gezeigt wurde (HIRATA *et al.*, 2000). In *M. jannaschii* ist die H^+ -translozierende Gruppe in Helix II durch einen Glutamin-Rest substituiert, somit enthält das Enzym bei einer konstanten Anzahl von 24 Helices nur acht aktive Carboxylate, was ein (H^+/Na^+)/ATP-Verhältnis von 2,7 ergeben würde. Offensichtlich reicht dieses niedrige Verhältnis aus, um ATP zu synthetisieren, denn die ATPase von *M. jannaschii* ist eine ATP-Synthase.

In der zweiten, membranständigen Untereinheit, der I-Untereinheit der archäellen ATPasen oder der *a*-Untereinheit der vakuolären ATPasen, konnten keine Reste identifiziert werden, die die notwendigen Voraussetzungen für ein Na⁺-Bindemotiv erfüllen würden. Unumstritten ist jedoch, daß ein in der Membran gelegener Arginin-Rest essentiell für die Translokation von Na⁺ und Protonen ist. Er wurde zunächst in Vph1p aus *S. cerevisiae* gefunden (KAWASAKI-NISHI *et al.*, 2001). Vor kurzem gelang es auch der Arbeitsgruppe um KAKINUMA die Bedeutung dieses Arginin-Rests für die I-Untereinheit aus *E. hirae* durch Mutationsanalysen zu identifizieren (KAWANO *et al.*, 2002). Dadurch, daß er sowohl in einer H⁺- als auch in einer Na⁺-nutzenden V-ATPase gefunden wurde, kommt ihm wahrscheinlich die gleiche Bedeutung zu wie dem Arginin in der *a*-Untereinheit der F-Typ-ATPasen. Es wird angenommen, daß Arg210 mit Asp61 (Numerierung wie in *E. coli*) aus der *c*-Untereinheit interagiert und so zur Verringerung des pK_a-Wertes für den Carboxylat-Rest und damit auch zu einer gekoppelten Ionentranslokation führt. Ersetzt man nun das Arginin durch Alanin, verbleibt der Carboxylat-Rest mit einem hohen pK_a-Wert, was zu einer passiven Ionentranslokation führt (zur Übersicht FILLINGAME *et al.*, 1998b).

4.4 Evolution der ATPasen

Die verschiedenen ATPase-Klassen entstanden aus einem gemeinsamen Vorläufer, der bereits vor der Aufteilung in die verschiedenen Spezies zu datieren ist (GOGARTEN und TAIZ, 1992a; DAVIS, 2002). Die großen Untereinheiten A und B, beziehungsweise β und α, haben ihren Ursprung in der Verdopplung eines Gens. Es schlossen sich eine Reihe von Deletionen und Insertionen an, die zum Verlust der katalytischen Aktivität der einen Untereinheit des A₃B₃/β₃α₃-Partikels führte. Diese Veränderungen bewirkten die Vergrößerung der katalytischen gegenüber der nicht-katalytischen Untereinheit. In den F₁F₀-ATPasen entwickelten sich die Untereinheiten genau gegensätzlich, so daß die katalytische die kleine und die nicht-katalytische Untereinheit die größere ist, die Abtrennung der A- und V-ATPasen von den F-ATPasen war die Folge.

DENDA *et al.* (1989) entdeckten, daß *S. acidocaldarius* ein für ein Proteolipid kodierendes Gen, *atpP*, mit einer Wiederholung von 11-Aminosäure-Resten enthält. Diese

Wiederholung tritt in einer transmembranen Helix auf (DENDA *et al.*, 1989). Die Analyse der internen Homologie in Helix I von AtpP unterstreicht die Theorie, daß ein Proteolipid-Vorläufer vor der Teilung der Spezies mehrfach duplizierte und fusionierte (DAVIS, 2002). DAVIS schlägt nach Analyse von 107 Proteolipidsequenzen aus allen drei Domänen des Lebens vor, daß das für ein Proteolipid kodierende Gen aus einem Gen für 4 hydrophobe Aminosäurereste entstanden ist. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung könnte dieser Stammvater des Proteolipids Bestandteil einer sehr frühen permeablen Zellmembran gewesen sein (DAVIS, 2002). Nach einigen Duplikationen und Fusionen entstand dann das Ur-Proteolipid von 8 kDa mit zwei transmembranen Helices.

Lange Zeit wurde angenommen, daß die Trennung der A- und der V-Typ-ATPasen mit der Duplikation und nachfolgender Fusion des Gens einherging, das für ein 8-kDa-Proteolipid kodiert (NELSON, 1992). Zudem wurde die These aufgestellt, daß die Umgestaltung von einer A_1A_0 - zu einer V_1V_0 -ATPasen auftrat, nachdem ein Archäon in der Entwicklung zum Eukaryoten einen bakteriellen Symbionten aufgenommen hat (CROSS und TAI, 1990).

Mit dem Wissen um die Diversität der archäellen Proteolipide läßt sich diese Hypothese nicht länger halten. Im ATPase-Operon von *A. fulgidus* gibt es zwei Gene, die für Proteolipide kodieren (KLENK *et al.*, 1997), was eine evolutive Zwischenstufe darstellt. Duplizierte, triplizierte und sogar verdreizehnfache Proteolipid-kodierende Gene, die durch Vervielfachung und anschließende Fusion entstanden, wurden, wie erwähnt, im Zuge dieser Arbeit in den Genomen methanogener Organismen identifiziert. Mit diesen Fund wurde die Annahme widerlegt, daß 16-kDa-Proteolipide nur in V_1V_0 -ATPasen existieren. Interessanterweise sind diese „großen“ Proteolipide keine Ebenbilder der eukaryotischen, sondern enthalten in jeder Haarnadel einen für die Ionentranslokation essentiellen Carboxylat-Rest, wie bei *M. thermotrophicus* und *M. kandleri*, oder in zweien von dreien, wie bei *M. jannaschii*. Allerdings gibt es auch in Archäen Proteolipide, die den eukaryontischen entsprechen: Die *Pyrococci* besitzen auch nur in Haarnadel zwei ein Glutamat (KAWARABAYASI *et al.*, 1998; ROBB *et al.*, 2001). Diese A_1A_0 -ATPasen scheinen also die ersten zu sein, die ein typisch eukaryotisches 16-kDa-Proteolipid besitzen. Die strikt fermentativen *Pyrococci* gewinnen ATP durch Substratkettenphosphorylierung und benötigen die ATP hydrolysierende A-ATPase somit, um die Membran zu energetisieren.

Es wurde angenommen, daß die Transition von A- zu V-ATPase auftrat, nachdem ein Archäon auf dem Weg zum Eukaryoten einen bakteriellen Symbionten aufgenommen hat

(CROSS und TAIZ, 1990). Nachdem nun die V_1V_0 -ähnlichen Proteolipide der *Pyrococci* bekannt geworden sind, ist klar, daß die A_1A_0 -ATPase früher umgestaltet worden sein muß. Triebkraft könnte der Verlust der Ionengradienten-getriebenen Phosphorylierung gewesen sein (MÜLLER und GRÜBER, 2003), wodurch eine andere Möglichkeit zum Aufbau und zur Regulation eines elektrochemischen Potentials geschaffen werden mußte. Die *Pyrococci* oder deren Vorfahren könnten also die Wirtszellen gewesen sein, aus denen sich später die Eukaryoten entwickelt haben.

Auch in einer F_1F_0 -ATPase wurde ein Proteolipid von 16 kDa gefunden. Im ATPase-Operon von *A. woodii* gibt es zwei Gene für 8 kDa-Proteolipide, die eine identische Primärsequenz haben, und ein Gen für ein 16-kDa-Proteolipid (MÜLLER *et al.*, 2001). Das große Peptid hat nur in Haarnadel eins ein aktives Carboxylat. Diese F_1F_0 -ATPase ist die erste, die neben 8 kDa-Peptiden mindestens ein V-Typ-Proteolipid besitzt, was wieder untermauert, daß die 16-kDa-Proteolipide nicht auf V_1V_0 -ATPasen beschränkt sind (Abb. 29).

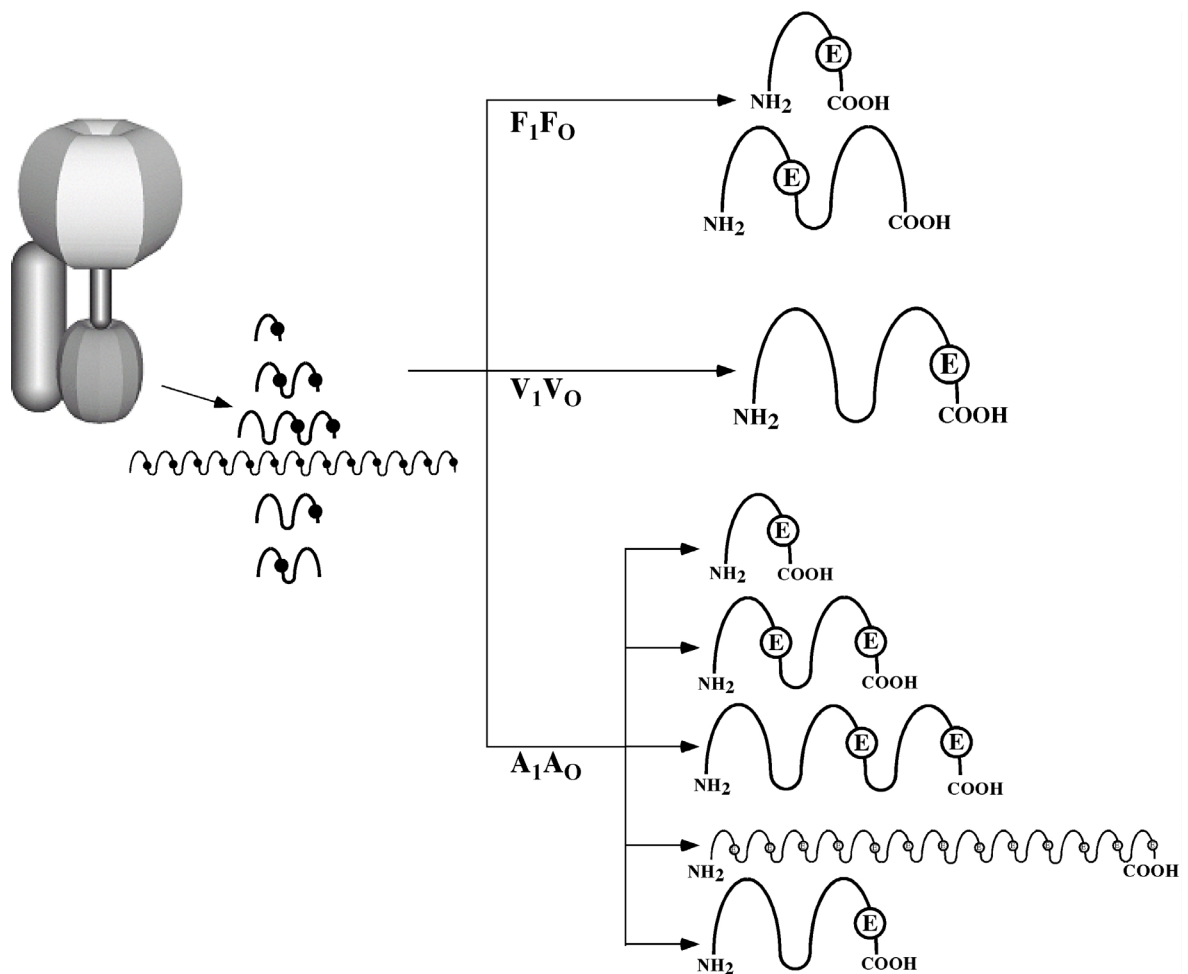


Abb. 29: Evolution der Proteolipide.

Die Multiplikationsereignisse, die zu vergrößerten Proteolipiden führen, sind also nicht ausschließlich in den V_1V_O -ATPasen zu finden, sondern in allen drei Domänen des Lebens (Abb. 29), weshalb die Größe des Proteolipids kein Kriterium sein kann, um A- und V-ATPasen von einander zu unterscheiden. Es ist für die Funktion eines Enzyms nicht entscheidend, wie groß das Proteolipid ist, sondern vielmehr, wie viele ionisierbare Gruppen im *c*-Oligomer vorhanden sind. Eine *E. coli*-Mutante mit einem genetisch fusionierten Proteolipid kann auf einem fermentierbaren Substrat wachsen (JONES und FILLINGAME, 1998), was diese These unterstreicht. Für bestimmte Organismen und Organellen war es von Vorteil, die Anzahl der ionentranslozierenden Gruppen zu reduzieren, so daß diese ATPasen bessere Ionenpumpen wurden.

Alle heute bekannten Formen der Proteolipide wurden folglich schon in den Archäen angelegt. Die A_1A_O -ATPasen bilden damit ein Reservoir an Möglichkeiten, aus denen die F- und die V-Typ-ATPasen gespeist wurden (Abb. 29).

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Das für das Proteolipid aus *Methanocaldococcus jannaschii* kodierende Gen *atpK* wurde in *E. coli* DH5 α und in dem Minizell-Produzenten *E. coli* DK6 exprimiert. Das Genprodukt wurde durch radioaktive Markierung nachgewiesen.
2. Aus den Membranen der thermophilen, hydrogenotrophen methanogenen Archaea *M. jannaschii*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanothermobacter marburgensis* sowie aus den Membranen des mesophilen, methyltrophen methanogenen Archäons *Methanosarcina mazei* Gö1 wurden mit Chloroform/Methanol die Proteolipide der A₁A₀-ATPasen und die MtrD-Untereinheiten der Methyltetrahydromethanopterin:CoenzymM-methyl-transferase extrahiert. Die einzelnen Peptide wurden mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert.
3. Durch MALDI-TOF-Analyse wurde die molekulare Masse des muren Proteolipids aus *M. jannaschii* zu 21316 Da und 21183 Da (Methionin-freie Form) bestimmt. Zusammen mit der Gensequenz konnte daraus gefolgert werden, daß es sich um eine triplizierte Form des bakteriellen 8-kDa Proteolipids handelt, also 3 Haarnadel-Domänen ausweist. Die ionentranslozierenden Carboxylate sind nur in Haarnadel 2 und 3 konserviert. Bei einer angenommenen Anzahl von 24 Helices im *c*-Oligomer bedeutet das, daß ein Ionen/ATP-Verhältnis von 2,7 für die Synthese von ATP ausreichen würde.
4. Die Proteolipide aus *M. thermautotrophicus* und *M. marburgensis* besitzen duplizierte Proteolipide. Die aktiven Carboxylat-Reste sind im Gegensatz zu den bisher bekannten duplizierten Proteolipiden der V₁V₀-ATPasen in beiden Haarnadeln konserviert.
5. Die archäellen A₁A₀-ATPasen-Operone der Pyrococcen enthalten ebenfalls Gene, die für duplizierte Proteolipide kodieren. Allerdings sind die für die Ionentranslokation essentiellen Carboxylat-Reste wie in den Proteolipiden der V-Typ-ATPasen nur in der zweiten Haarnadel vorhanden. Die Abtrennung der A₁A₀- und V₁V₀-ATPasen muß daher vor der Entwicklung der Eukaryonten erfolgt sein.

6. Sequenzanalysen haben gezeigt, daß das Proteolipid-Gen aus *Methanopyrus kandleri* dreizehnmal so groß wie das aus Bakterien ist. Es kodiert für ein Protein mit 13 Haarnadel-Domänen. Die Ionenbindstelle ist in jeder Haarnadel konserviert.
7. Alle heute bekannten Formen der Proteolipide der V- und F-ATPasen waren schon in den *Archaea* enthalten. Die Vielfalt an Proteolipid-Größen und -Formen der archäellen ATPasen läßt vermuten, daß sie ein Reservoir an Möglichkeiten darstellen, aus denen die V_1V_O - und F_1F_O -ATPasen gespeist wurden.
8. Durch Sequenzvergleich mit den Na^+ -translozierenden Proteolipiden der bakteriellen F_1F_O -ATPasen wurde auch in den Proteolipiden der A_1A_O -ATPasen ein Na^+ -Bindemotiv identifiziert. Es lautet: P/S/T-XXX-Q/E (Motiv I in Helix eins), ET/S (Motiv II in Helix zwei).
9. Aus Membranen von *Sulfolobus acidocaldarius* und *M. jannaschii* wurden durch Chloroform/Methanol Lipide extrahiert, anschließend wurde aus diesen Lipiden Liposomen hergestellt, in die die A_1A_O -ATPase aus *M. jannaschii* rekonstituiert wurde. Die Synthese von ATP konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.
10. Die ATPase-Gene *ahaK*, *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* wurden in den Fusionsvektor pMal kloniert und in *Escherichia coli* exprimiert. Die Fusionsproteine wurden aus dem Zellextrakt isoliert und zur Immunisierung von Kanninchen eingesetzt. Die erhaltenen Antiseren gegen die ATPase-Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaK und AhaE waren spezifisch und wurden für die Analysen dieser Arbeit eingesetzt.
11. Das für die gesamte A_1A_O -ATPase kodierende Operon *ahaHIKECFABDG* des methanogenen Archäons *Methanosarcina mazei* Gö1 wurde in den Expressionsvektor pVSBAD2 hinter den *ara*-Promotor kloniert. Das Konstrukt wurde pRT1 genannt.
12. Die auf pRT1 lokalisierten Gene wurden heterolog in *E. coli* DK8 exprimiert. Die A_1A_O -ATPase war in *E. coli* membran-assoziiert und funktionell. Die spezifische ATPase-Aktivität an Membranen von *E. coli* DK8 betrug 150 mU/mg Protein.

13. DCCD und der für archäelle ATPasen spezifische Inhibitor DES hemmten das Enzym. Die I_{50} -Wert betrug $0,5 \mu\text{M}/\text{mg}$ Protein, beziehungsweise $200 \text{ nmol}/\text{mg}$ Protein.

14. Die Synthese von AhaA, AhaB, AhaC, AhaE, AhaH, AhaK, und zum ersten Mal auch des gesamten AhaI, konnten nachgewiesen werden. Gegen AhaF, AhaD und AhaG lagen keine funktionellen Antikörper vor.

6. LITERTUR

Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U. und Deppenmeier, U. (1998) *J. Bacteriol.* **180**: 2027-2032.

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. und Walker, J. E. (1994) *Nature* **370**: 621-628.

Adachi, I., Puopolo, K., Marquez-Sterling, N., Arai, H. und Forgac, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 967-973.

Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. und Kinoshita, K., Jr. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 7243-7247.

Aggeler, R., Ogilvie, I. und Capaldi, R. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 19621-19624.

Amano, T., Hisabori, T., Muneyuki, E. und Yoshida, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 18128-18233.

Arai, H., Terres, G., Pink, S. und Forgac, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 8796-802.

Arata, Y., Baleja, J. D. und Forgac, M. (2002a) *Biochemistry* **41**: 11301-11307.

Arata, Y., Baleja, J. D. und Forgac, M. (2002b) *J. Biol. Chem.* **277**: 3357-3363.

Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (2000) *FEBS Lett.* **482**: 215-219.

Armbrüster, A., Bailer, S. M., Koch, M. H., Godovac-Zimmermann, J. und Grüber, G. (2003) *FEBS Lett.* **546**: 395-400.

Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D., Dawson, S. C., Hershberger, K. L. und Pace, N. R. (1996) In *Evolution of Hydrothermal Eco.* Bock, G. R. und Goode (Hrsg), John Wiley & Sons Ltd. 202: 24-39

Bauerle, C., Magembe, C. und Briskin, D. P. (1998) *Plant Physiol.* **117**: 859-867.

- Becher, B. und Müller, V.** (1994) *J. Bacteriol.* **176**: 2543-2550.
- Beifuss, U., Tietze, M., Bäumer, S. und Deppenmeier, U.** (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 2470-2473.
- Birkenhäger, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F. und Altendorf, K.** (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**: 58-67.
- Blaut, M. und Gottschalk, G.** (1984) *Eur. J. Biochem.* **141**: 217-222.
- Blaut, M.** (1994) *Antonie Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **66**: 187-208.
- Bligh, E. G. und Dyer, W. J.** (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J.** (1987) *Electrophoresis* **8**: 93-98.
- Boekema, E. J., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J. S., Brisson, A. und Konings, W. N.** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 14291-14293.
- Boekema, E. J., van Breemen, J. F., Brisson, A., Ubbink-Kok, T., Konings, W. N. und Lolkema, J. S.** (1999) *Nature* **401**: 37-38.
- Bogdanov, M., Heacock, P. N. und Dowhan, W.** (2002) *EMBO J.* **21**: 2107-2116.
- Bonekamp, F. und Jensen, K. F.** (1988) *Nucleic Acid Res.* **16**: 3013-3024.
- Bowman, E. J., Steinhardt, A. und Bowman, B. J.** (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1237**: 95-98.
- Bowman, B. J. und Bowman, E. J.** (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 3965-3972.
- Bradford, M. M.** (1976) *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brinkmann, U., Mattes, R. E. und Buckel, P.** (1989) *Gene* **85**: 109-114.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. und Weiss, R. L.** (1972) *Arch. Microbiol.* **84**: 54-68.

- Bryant, M. P.** (1972) *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1324-1328.
- Buckley, D. H., Graber, J. R. und Schmidt, T. M.** (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4333-4339.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L. X., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., Fitzgerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M., Weidman, J. F., Fuhrmann, J. L., Nguyen, D., Utterback, T. R., Kelley, J. M., Peterson, J. D., Sadow, P. W., Hanna, M. C., Cotton, M. D., Roberts, K. M., Hurst, M. A., Kaine, B. P., Borodovsky, M., Klenk, H. P., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R. und Venter, J. G.** (1996) *Science* **273**: 1058-1073.
- Cain, B. D.** (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**: 365-371.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D. und Oas, T. G.** (1996) *J. Mol. Biol.* **262**: 407-412.
- Capaldi, R. A., Aggeler, R., Wilkens, S. und Grüber, G.** (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 397-401.
- Charsky, C. M., Schumann, N. J. und Kane, P. M.** (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 37232-37239.
- Chen, C. C. und Wilson, T. H.** (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 10150-10158.
- Chung, K. T.** (1976) *Arch. Environ. Microbiol.* **31**: 342-348.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L.** (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 2110-2114.
- Crider, B. P., Carper, S. W. und Lancaster, J. R.** (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6793-6796.
- Cross, R. L.** (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 681-714.
- Cross, R. L., Grubmeyer, C. und Penefsky, H. S.** (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 12101-12105.

Cross, R. L. und Taiz, L. (1990) FEBS Lett **259**: 22227-22229.

Davis, B. K. (2002) Prog. Biophys. Mol. Biol. **79**: 77-133.

Deckers-Hebestreit, G. und Altendorf, K. (1996) Annu. Rev. Microbiol. **50**: 791-824.

DeLong, E. F. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 5685-5689.

DeLong, E. F., Wu, K. Y., Prezelin, B. B. und Jovine, R. V. M. (1994) Nature **371**: 695-697.

Demeyer, D. und Fievez, V. (2000) Ann. Zootechnie **49**: 95-112.

Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1988) J. Biol. Chem. **263**: 17251-17254.

Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1989) J. Biol. Chem. **264**: 7119 - 7121.

Denda, K., Konishi, J., Hajiro, K., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1990) J. Biol. Chem. **265**: 21509-21513.

Deppenmeier, U., Müller, V. und Gottschalk, G. (1996) Arch. Microbiol. **165**: 149-163.

Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R. A., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Bäumer, S., Jacobi, C., Brüggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Bömeke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H.-P., Gunsalus, R. P., Fritz, H.-J. und Gottschalk, G. (2002a) J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **4**: 453-461.

Deppenmeier, U. (2002b) Cell. Mol. Life Sci. **59**: 1513-1533.

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

Dimroth, P., Wang, H., Grabe, M. und Oster, G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**: 4924-4929.

Domgall, I., Venzke, D., Lüttge, U., Ratajczak, R. und Böttcher, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 13115-13121.

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.

Duncan, T. M., Zhou, Y., Bulygin, V. V., Hutcheon, M. L. und Cross, R. L. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 736-741.

Dunn, S. D. und Futai, M. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 113-118.

Dunn, S. D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 7630-7636.

Elferink, M. G. L., Dewit, J. G., Driessen, A. J. M. und Konings, W. N. (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**: 917-925.

Escalante-Semerena, J. C., Leigh, J. A., Rinehart, K. L. und Wolfe, R. S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1976-1980.

Ferry, J. G. (1992) *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **27**: 473-503.

Fillingame, R. H. (1975) *J. Bacteriol.* **124**: 870-883.

Fillingame, R. H., Girvin, M. E. und Zhang, Y. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 760-766.

Fillingame, R. H., Jones, P. C., Jiang, W., Valiyaveetil, F. I. und Dmitriev, O. Y. (1998a) *Biochem. Biophys. Acta* **1365**: 135-142.

Fillingame, R. H., Girvin, M. E., Jiang, W., Valiyaveetil, F. und Hermolin, J. (1998b) *Scund. Suppl.* **643**: 163-168.

Fillingame, R. H. (1999) *Science* **286**: 1687-1688.

Fillingame, R. H., Jiang, W. und Dmitriev, O. Y. (2000) *J. Exp. Biol.* **203**: 9-17.

Fitz-Gibbon, S. T., Ladner, H., Kim, U. J., Stetter, K. O., Simon, M. I. und Miller, J. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 984-989.

Forgac, M. (1999) *J. Biol. Chem* **274**: 12951-12954.

Foster, D. L. und Fillingame, R. H. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 2009-2015.

Foster, D. L., Mosher, M. E., Futai, M. und Fillingame, R. H. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 12037-12041.

Fuhrman, J. A., Mccallum, K. und Davis, A. A. (1992) *Nature* **356**: 148-149.

Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R. D., Cann, I., Graham, D. E., Grahame, D. A., Guss, A. M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H. C., Krzycki, J. A., Leigh, J. A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J. N., Smith, K., Springer, T. A., Umayam, L. A., White, O., White, R. H., Conway de Macario, E., Ferry, J. G., Jarrell, K. F., Jing, H., Macario, A. J., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K. R., Swanson, R. V., Zinder, S. H., Lunder, E., Metcalf, W. W. und Birren, B. (2002) *Genome Res.* **12**: 532-542.

Garcia, J. L., Patel, B. K. und Olliver, B. (2000) *Anaerobe* **6**: 205-226.

Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. und Walker, J. E. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1055-1061.

Girvin, M. E. und Fillingame, R. H. (1993) *Biochemistry* **32**: 12167-12177.

Girvin, M. E. und Fillingame, R. H. (1994) *Biochemistry* **58**: 7652 - 7659.

Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L. und Fillingame, R. H. (1998) *Biochemistry* **37**: 8817-8824.

Gleissner, M., Elferink, M. G., Driessen, A. J., Konings, W. N., Anemüller, S. und Schäfer, G. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**: 983-990.

Gleissner, M., Kaiser, U., Antonopoulos, E. und Schäfer, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 8417-8426.

Gogarten, J. P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E. J., Bowman, B. J., Manolson, M. F., Poole, R. J., Date, T. und Oshima, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6661-6665.

Gogarten, J. P. und Taiz, L. (1992a) *Photosynth. Res.* **33**: 137-146.

Gogarten, J. P., Starke, T., Kibak, H., Fishmann, J. und Taiz, L. (1992b) *J. Exp. Biol.* **172**: 137-147.

Gottschalk, G. und Thauer, R. K. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1505**: 28-36.

Groth, G. und Walker, J. E. (1997) *FEBS Lett.* **410**: 117-123.

Groth, G. und Pohl, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 1345-1352.

Grüber, G., Svergun, D. I., Coskun, Ü., Lemker, T., Koch, M. H., Schägger, H. und Müller, V. (2001) *Biochemistry* **40**: 1890-1896.

Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. und Beckwith, J. (1995) *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.

Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hatch, L. P., Cox, G. B. und Howitt, S. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 29407-29412.

Hausrath, A. C., Grüber, G., Matthews, B. W. und Capaldi, R. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 13697-13702.

Heefner, D. L. und Harold, F. M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 2798-2802.

Heinonen, J. E. und Lahti, R. J. (1981) *Anal. Biochem.* **113**: 313-317.

Hempfling, W. P. und Hertzberg, E. L. (1979) *Methods Enzymol.* **55**: 164-175.

Hermolin, J., Dmitriev, O. Y., Zhang, Y. und Fillingame, R. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 17011-17016.

Hilario, E. und Gogarten, J. P. (1998) *J. Mol. Evol.* **46**: 703-715.

Hippe, H., Caspari, D., Fiebig, K. und Gottschalk, G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 494-498.

Hirata, R., Graham, L. A., Takatsuki, A., Stevens, T. H. und Anraku, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 4795-4803.

Hirata, T., Nakamura, N., Omote, H., Wada, Y. und Futai, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 386-389.

Hirata, T., Iwamoto-Kihara, A., Sun-Wada, G. H., Okajima, T., Wada, Y. und Futai, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 23714-23719.

Hochstein, L. I. (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* **97**: 155-159.

Hochstein, L. I. und Lawson, D. (1993) *Experientia* **49**: 1059-1063.

Holloway, P. W. (1973) *Anal. Biochem.* **53**: 304-308.

Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981) *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.

Höner zu Bentrup, K., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J. S. und Konings, W. N. (1997) *J. Bacteriol.* **179**: 1274-1279.

Hoppert, M. und Holzenburg, A. (1989) *Electron Microscopy in Microbiology*. Bios. Scientific Publ., Oxford, UK.

Howitt, S. M., Rodgers, A. J. W., Jeffrey, P. D. und Cox, G. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 7038-7042.

Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. und Stetter, K. O. (2002) *Nature* **417**: 63-67.

Hungate, R. E. (1969) In *Methods in Microbiology*. Norris, J. R. und Ribbons, D. W. (Hrsg.), Academic Press, New York, U.S.A. **3**: 117-132

Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Drose, S., Zeeck, A., Altendorf, K. und Wieczorek, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 40544-40548.

Ihara, K. und Mukohata, Y. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 111-116.

Ihara, K., Watanabe, S., Sugimura, K. und Mukohata, Y. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **341**: 267-272.

Ikemura, T. (1981) *J. Mol. Biol.* **151**: 389-409.

Ikemura, T. (1985) *Mol. Biol. Evol.* **2**: 13-34.

Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M. und Yokoyama, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 2312-2315.

Inatomi, K. I. (1986) *J. Bacteriol.* **167**: 837-841.

Inatomi, K. I., Eya, S., Maeda, M. und Futai, M. (1989a) *J. Biol. Chem.* **264**: 10954-10959.

Inatomi, K. I., Maeda, M. und Futai, M. (1989b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 1585-1590.

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990) *Gene* **96**: 23-28.

Jäger, H., Birkenhager, R., Stalz, W. D., Altendorf, K. und Deckers-Hebestreit, G. (1998) *Eur. J. Biochem.* **251**: 122-132.

Jain, M. K. und Zakim, D. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 33-68.

Jiang, W. und Fillingame, R. H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6607-6612.

Jiang, W., Hermolin, J. und Fillingame, R. H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 4966-4971.

- Jones, P. C., Jiang, W. und Fillingame, R. H.** (1998a) *J. Biol. Chem.* **273**: 17178-17185.
- Jones, P. C. und Fillingame, R. H.** (1998b) *J. Biol. Chem.* **273**: 29701-29705.
- Junge, W., Lill, H. und Engelbrecht, S.** (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**: 420-423.
- Jurgens, G., Glockner, F., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolammi, M. und Münster, U.** (2000) *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 45-56.
- Kaback, H. R., Sahin-Toth, M. und Weinglass, A. B.** (2001) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 610-620.
- Kaesler, B. und Schönheit, P.** (1989) *Eur. J. Biochem.* **186**: 309 - 316.
- Kagawa, Y. und Sone, N.** (1979) *Methods Enzymol.* **55**: 364-372.
- Kaim, G. und Dimroth, P.** (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**: 615-623.
- Kaim, G., Wehrle, F., Gerike, U. und Dimroth, P.** (1997) *Biochemistry* **36**: 9185-9194.
- Kaim, G. und Dimroth, P.** (1998a) *EMBO J.* **17**: 5887-5895.
- Kaim, G., Matthey, U. und Dimroth, P.** (1998b) *EMBO J.* **17**: 688-695.
- Kaim, G., Prummer, M., Sick, B., Zumofen, G., Renn, A., Wild, U. P. und Dimroth, P.** (2002) *FEBS Lett.* **525**: 156-163.
- Kakinuma, Y.** (1987) *J. Bacteriol.* **169**: 4403-4405.
- Kakinuma, Y. und Igarashi, K.** (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**: 679-692.
- Kakinuma, Y. und Igarashi, K.** (1990) *FEBS Lett.* **271**: 102-105.
- Kakinuma, Y., Igarashi, K., Konishi, K. und Yamato, I.** (1991) *FEBS Lett.* **292**: 64-68.
- Kakinuma, Y., Kakinuma, S., Takase, K., Konishi, K., Igarashi, K. und Yamato, I.** (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 1063 - 1069.

Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1994) *J. Biochem.* **116**: 1302-1308.

Kanazawa, H. und Futai, M. (1979) *FEBS Lett.* **15**: 275-277.

Kane, P. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 17025-17032.

Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K., Jr. und Yoshida, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 19375-19377.

Kavermann, H. (1999) Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen

Kawano, M., Igarashi, K., Yamato, I. und Kakinuma, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 24405-24410.

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. und Kikuchi, H. (1998) *DNA Res.* **5**: 147-155.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Kikuchi, H. (1999) *DNA Res* **6**: 83-101 und 145-152.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima, T. und Kikuchi, H. (2001) *DNA Res.* **8**: 123-140.

Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. und Forgac, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12397-402.

Kawashima, T., Amano, N., Koike, H., Makino, S., Higuchi, S., Kawashima-Ohya, Y., Watanabe, K., Yamazaki, M., Kanehori, K., Kawamoto, T., Nunoshiba, T., Yamamoto, Y., Aramaki, H., Makino, K. und Suzuki, M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 14257-14262.

Kibak, H., Taiz, L., Starke, T., Bernasconi, P. und Gogarten, J. P. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 415-424.

Kleber-Janke, T. und Becker, W. M. (2000) *Protein Expr. Purif.* **19**: 419-424.

Klenk, H.-P., Clayton, R. A., Tomb, J.-F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodsens, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenny, K., Adams, M. D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C. I., McNeil, L. K., Badger, J. H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J. D., Weidman, J. F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M. D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B. P., Sykes, S. M., Sadow, P. W., D'Undrea, K. P., Bowman, C., Fujii, C., Garlund, S. A., Mason, T. M., Olsen, G. J., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R. und Venter, J. C. (1997) *Nature* **390**: 364-370.

Klionsky, D. J., William, S. A., Brusilow, A. und Simoni, R. D. (1984) *J. Bacteriol.* **160**: 1055-1060.

Kohlbrenner, W. E. und Boyer, P. D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 3441-3446.

Kurkin, S., Meuer, J., Koch, J., Hedderich, R. und Albracht, S. P. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**: 6101-6111.

Leigh, J. A., Rinehart, K. L. und Wolfe, R. S. (1985) *Biochemistry* **24**: 995-999.

Lemker, T. (1997) Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen

Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S. und Müller, V. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**: 3744-3750.

- Lemker, T.** (2002) Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Lemker, T., Grüber, G., Schmid, R. und Müller, V.** (2003) *FEBS Lett.* **544**: 206-209.
- Leng, X. H., Manolson, M. F., Liu, Q. und Forgac, M.** (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 22487-22493.
- Leng, X.-H., Manolson, M. F. und Forgac, M.** (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 6717-6723.
- Leng, X. H., Nishi, T. und Forgac, M.** (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 14655-14661.
- Lienard, T.** (1998) Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen
- Lingl, A., Huber, H., Stetter, K. O., Mayer, F., Kellermann, J. und Müller, V.** (2003) *Extremophiles* **7**: 249 - 257.
- Long, J. C., Wang, S. und Vik, S. B.** (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 16235-16240.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Rundall, R. J.** (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lübben, M., Lunsdorf, H. und Schäfer, G.** (1987) *Eur. J. Biochem.* **167**: 211-219.
- Lübben, M. und Schäfer, G.** (1989) *J. Bacteriol.* **171**: 6106-6116.
- Ma, J., Campbell, A. und Karlin, S.** (2002) *J. Bacteriol.* **184**: 5733-5745.
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K. und Hu, L. R.** (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1061**: 297-303.
- Mundel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J. D., Pan, Y.-C. E., Nelson, H. und Nelson, N.** (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 5521 - 5524.

Manolson, M. F., Proteau, D., Preston, R. A., Stenbit, A., Roberts, B. T., Hoyt, M. A., Preuss, D., Mulholland, J., Botstein, D. und Jones, E. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 14294 - 14303.

Marmur, J. (1961) *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.

Matthey, U., Braun, D. und Dimroth, P. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**: 1942-1946.

McCarthy, J. E., Schairer, H. U. und Sebald, W. (1985) *EMBO J.* **4**: 519-526.

McLachlin, D. T. und Dunn, S. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 21233-21239.

Meier, T., Matthey, U., Henzen, F., Dimroth, P. und Muller, D. J. (2001) *FEBS Lett.* **505**: 353-356.

Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Kunkel, A. und Hedderich, R. (1999) *Eur. J. Biochem.* **265**: 325-335.

Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M. und Futai, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 22141-22146.

Mountfort, D. O. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**: 1346-1350.

Mukohata, Y. und Yoshida, M. (1987a) Activation und inhibition of ATP synthesis in cell envelope vesicles of *Halobacterium halobium*. *J. Biochem.* **101**: 311-318.

Mukohata, Y. und Yoshida, M. (1987b) The H⁺-translocating ATP synthase in *Halobacterium halobium* differs from F₀F₁-ATPase/synthase. *J. Biochem.* **102**: 797-802.

Mukohata, Y., Ihara, K., Yoshida, M., Konishi, J. und Sugiyama, Y. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **259**: 650-653.

Müller, V., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1988a) *Eur. J. Biochem.* **172**: 601-606.

Müller, V., Winner, C. und Gottschalk, G. (1988b) *Eur. J. Biochem.* **178**: 519-525.

- Müller, V., Blaut, M., Heise, R., Winner, C. und Gottschalk, G.** (1990) *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 373-377.
- Müller, V., Blaut, M. und Gottschalk, G.** (1993) In: *Methanogenesis*. Ferry, J. G. (Hrsg.) Chapman & Hall, New York, 360 - 406
- Müller, V., Ruppert, C. und Lemker, T.** (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 15-28.
- Müller, V., Aufurth, S. und Rahlfs, S.** (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1505**: 108-120.
- Müller, V. und Grüber, G.** (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 474-494.
- Mullis, K., Faloon, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Murata, T., Arechaga, I., Fearnley, I. M., Kakinuma, Y., Yamato, I. und Walker, J. E.** (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 21162-21167.
- Murrell, J. C., McDonald, I. R. und Bourne, D. G.** (1998) *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 103-114.
- Nakamoto, R. K.** (1996) *J. Membrane Biol.* **151**: 101-111.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. und Ikemura, T.** (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**: 292.
- Nanba, T. und Mukohata, Y.** (1987) *J. Biochem.* **102**: 591-598.
- Nelson, H. und Nelson, N.** (1989) *FEBS Lett.* **247**: 147 - 153.
- Nelson, N.** (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1100**: 109-124.
- Nelson, H., Mundiyan, S. und Nelson, N.** (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 497-501.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H.,**

Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. und DasSarma, S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 12176-12181.

Nishi, T. und Forgac, M. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* **3**: 94-103.

Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. und Forgac, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **276**: 34122-34130.

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

Ogilvie, I., Aggeler, R. und Capaldi, R. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 16652-16656.

Opekarova, M. und Tanner, W. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1610**: 11-22.

Ovreas, L., Forney, L., L., D. F. und Torsvik, V. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3367-3373.

Pacheco-Moises, F., Garcia, J. J., Rodriguez-Zavala, J. S. und Moreno-Sanchez, R. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**: 993-1000.

Pacheco-Moises, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. und Garcia, J. J. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**: 269-278.

Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W. und Engelbrecht, S. (2000) *FEBS Lett.* **472**: 34-38.

Peinemann, S., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **186**: 175-180.

Peinemann, S., Hedderich, R., Blaut, M., Thauer, R. K. und Gottschalk, G. (1990) *FEBS Lett.* **263**: 57-60.

Peng, S. B., Crider, B. P., Xie, X.-S. und Stone, D. K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 17262 - 17266.

Pfennig, G. N. und Lippert, K. D. (1966) *Arch. Microbiol.* **55**: 245-256.

Powell, B., Graham, L. A. und Stevens, T. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 23654-23660.

- Puopolo, K., Szecan, M., Magner, R. und Forgac, M.** (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 5171-5176.
- Radax, C., Sigurdsson, O., Hreggvidsson, G. O., Aichinger, N., Gruber, C., Kristjansson, J. K. und Stan-Lotter, H.** (1998) *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 12-22.
- Rahlfs, S. und Müller, V.** (1997) *FEBS Lett.* **404**: 269-271.
- Rahlfs, S., Aufurth, S. und Müller, V.** (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 33999-34004.
- Rastogi, V. K. und Girvin, M. E.** (1999) *Nature* **402**: 263-268.
- Rietveld, A. G., Koorengevel, M. C. und Kruijff, B.** (1995) *EMBO J.* **14**: 5506-5513.
- Rigaud, J. L., Pitard, B. und Levy, D.** (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246.
- Robb, F. T., Maeder, D. L., Brown, J. R., DiRuggiero, J., Stump, M. D., Yeh, R. K., Weiss, R. B. und Dunn, D. M.** (2001) *Methods Enzymol.* **330**: 134-157.
- Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J. S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M. und Humphreys, G.** (1984) *Nucleic Acids Res.* **121**: 6663-6671.
- Rodgers, A. J., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M. B., Howitt, S. M. und Capaldi, R. A.** (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 1058-1064.
- Rodgers, A. J. W. und Capaldi, R. A.** (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 29406-29410.
- Rodgers, A. J. und Wilce, M. C.** (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1051-1054.
- Romesser, J. A. und Wolfe, R. S.** (1982) *J. Bacteriol.* **152**: 840-847.
- Ruppert, C.** (1997) Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen
- Ruppert, C., Kavermann, H., Wimmers, S., Schmid, R., Kellermann, J., Lottspeich, F., Huber, H., Stetter, K. O. und Müller, V.** (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 25281-25284.

Ruppert, C., Schmid, R., Hedderich, R. und Müller, V. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 47-51.

Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. und Müller, V. (1998) *J. Bacteriol.* **180**: 3448-3452.

Sabbert, D., Engelbrecht, S. und Junge, W. (1996) *Nature* **381**: 623-625.

Sabbert, D. und Junge, W. (1997a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 2312-2317.

Sabbert, D., Engelbrecht, S. und Junge, W. (1997b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 4401-4405.

Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. und Futai, M. (1999) *Science* **286**: 1722-1724.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schäfer, G. und Meyering-Vos, M. (1992a) *Biochim. Biophys. Acta* **1101**: 232-235.

Schäfer, G. und Meyering-Vos, M. (1992b) In *Ion - Motive ATPases: Structure, Function, und Regulation*. Scarpa, A., Carafoli, E. und Papa, S. (Hrsg.), New York Acad. Sciences. 671: 293-309

Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**: 369-379.

Schauder, B., Blöcker, H., Frank, R. und McCarthy, J. E. G. (1987) *Gene* **52**: 279-283.

Scheel, E. und Schäfer, G. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187**: 727-735.

Schmidt, R. A., Hsu, D. K. W., Deckershebestreit, G., Altendorf, K. und Brusilow, W. S. A. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **323**: 423-428.

Schmidt, R. A., Qu, J., Williams, J. R. und Brusilow, W. S. (1998) *J. Bacteriol.* **180**: 3205-3208.

Schnick, C., Forrest, L. R., Sansom, M. S. und Groth, G. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**: 49-60.

Schobert, B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 8008-8014.

Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H. und Müller, D. J. (2000) *Nature* **405**: 418-419.

Senejani, A. G., Hilario, E. und Gogarten, J. P. (2001) *BMC Biochem.* **2**: 13.

Senior, A. E. (1988) *Physiol. Rev.* **68**: 177-231.

Seto-Young, D., Chen, C. C. und Wilson, T. H. (1985) *J. Membr. Biol.* **84**: 259-267.

She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterlund, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. und Van der Oost, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7835-7840.

Shirakihara, Y., Leslie, A. G. W., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y. und Yoshida, M. (1997) *Structure* **5**: 825-836.

Simon, H. M., Dodsworth, J. A. und Goodman, R. M. (2000) *Environ. Microbiol.* **2**: 495-505.

Singh, S., Turina, P., Bustamante, C. J., Keller, D. J. und Capaldi, R. (1996) *FEBS Lett.* **397**: 30-34.

Skulachev, V. P. (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**: 203-209.

Slesarev, A. I., Mezhevaya, K. V., Makarova, K. S., Polushin, N. N., Shcherbinina, O. V., Shakhova, V. V., Belova, G. I., Aravind, L., Natale, D. A., Rogozin, I. B., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Stetter, K. O., Malykh, A. G., Koonin, E. V. und Kozyavkin, S. A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 4644-4649.

Smigan, P., Horovska, L. und Greksak, M. (1988) FEBS Lett. **242**: 85-88.

Smigan, P., Majernik, A. und Greksak, M. (1994) FEBS Lett. **347**: 190-194.

Smigan, P., Majernik, A., Polak, P., Hapala, I. und Greksak, M. (1995) FEBS Lett. **371**: 119-122.

Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Safer, H., Patwell, D., Prabhakar, S., McDougall, S., Shimer, G., Goyal, A., Pietrokovski, S., Church, G. M., Daniels, C. J., Mao, J.-I., Rice, P., Nölling, J. und Reeve, J. N. (1997) J. Bacteriol. **179**: 7135-7155.

Sorensen, M. A., Kurlund, C. G. und Pedersen, S. (1989) J. Mol. Biol. **207**: 365-377.

Sorgen, P. L., Bubb, M. R., McCormick, K. A., Edison, A. S. und Cain, B. D. (1998) Biochemistry **37**: 923-932.

Stahlberg, H., Müller, D. J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U. und Dimroth, P. (2001) EMBO Rep. **2**: 229-233.

Steinert, K. und Bickel-Sundkötter, S. (1996) Z. Naturforsch. **51**: 29-39.

Stock, D., Leslie, A. G. und Walker, J. E. (1999) Science **286**: 1700-1705.

Sumi, M., Sato, M. H., Denda, K., Date, T. und Yoshida, M. (1992) FEBS Lett. **314**: 207-210.

Sumi, M., Yohda, M., Koga, Y. und Yoshida, M. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. **241**: 427-433.

Sumner, J. P., Dow, J. A., Earley, F. G., Klein, U., Jager, D. und Wieczorek, H. (1995) J. Biol. Chem. **270**: 5649-5653.

Supekova, L., Supek, F. und Nelson, N. (1995) J. Biol. Chem. **270**: 13726-13732.

Svergun, D. I., Aldag, I., Sieck, T., Altendorf, K., Koch, M. H., Kane, D. J., Kozin, M. B. und Grüber, G. (1998) *Biophys. J.* **75**: 2212-2219.

Takase, K., Kakinuma, S., Yamato, I., Konishi, K., Igarashi, K. und Kakinuma, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 11037-11044.

Takehita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. und Hashimoto-Gotoh, T. (1987) *Gene* **61**: 63 - 74.

Takeyasu, K., Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Iwamotokihara, A. und Futai, M. (1996) *FEBS Lett.* **392**: 110-113.

Thauer, R. K., Hedderich, R. und Fischer, R. (1993) In *Methanogenesis*, Ferry, J. G. (Hrsg.), Chapman und Hall, New York, 209-252

Thauer, R. K. (1998) *Microbiology* **144**: 2377-406.

Tomashek, J. J., Sonnenburg, J. L., Artimovich, J. M. und Klionsky, D. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 10397-10404.

Tomashek, J. J., Graham, L. A., Hutchins, M. U., Stevens, T. H. und Klionsky, D. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 26787-26793.

Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J., Aggeler, R., Wilce, M. C., Yoshida, M. und Capaldi, R. A. (2001a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 6560-6564.

Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Yoshida, M. und Capaldi, R. A. (2001b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 898-902.

Ubbink-Kok, T., Boekema, E. J., van Breemen, J. F., Brisson, A., Konings, W. N. und Lolkema, J. S. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**: 311-321.

Uhlen, U., Cox, G. B. und Guss, J. M. (1997) *Structure* **5**: 1219-1230.

Valiyaveetil, F. I. und Fillingame, R. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 32635-32641.

Van Beelen, P., de Cock, R. M., Guijt, W., Haasnoot, A. G. und Vogels, G. D. (1984). *FEMS Microbiol. Lett.* **21**: 159-163.

Vetriani, C., Jannasch, H. W., MacGregor, B. J., Stahl, D. A. und Reysenbach, A. L. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4375-4384.

Vik, S. B., Cain, B. D., Chun, K. T. und Simoni, R. D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 6599-6605.

Vik, S. B., Patterson, A. R. und Antonio, B. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 16229-16234.

Vik, S. B., Long, J. C., Wada, T. und Zhang, D. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1458**: 457-466.

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 615-619.

von Ballmoos, C., Meier, T. und Dimroth, P. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**: 5581-5589.

von Meyenburg, K., Jorgensen, B. B. und van Deurs, B. (1984) *EMBO J.* **3**: 1791-1797.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. und Gay, N. J. (1982) *EMBO J.* **1**: 945-951.

Waser, M., Hessbienz, D., Davies, K. und Solioz, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 5396-5400.

Watts, S. D., Zhang, Y., Fillingame, R. H. und Capaldi, R. A. (1995) *FEBS Lett.* **368**: 235-238.

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

Weber, J. und Senior, A. E. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1458**: 300-309.

Weber, K. und Osborne, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.

Wilkins, S. und Forgac, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 44064-44068.

Wilkins, S., Dahlquist, F. W., McIntosh, L. P., Donaldson, L. W. und Capaldi, R. A. (1995). *Nature Struct. Biology* **2**: 961-967.

- Wilkins, S., Vasilyeva, E. und Forgac, M.** (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 31804-31810.
- Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F. und Müller, V.** (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 18843-18852.
- Wimmers, S.** (1997) Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen
- Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis, M. L.** (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4576-4579.
- Wolin, E. A., Wolfe, R. R. und Wolin, M. J.** (1964) *J. Bacteriol.* **87**: 993-998.
- Xu, T. und Forgac, M.** (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 22075-22081.
- Xu, T., Vasilyeva, E. und Forgac, M.** (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 28909-28915.
- Yamada, H., Moriyama, Y., Maeda, M. und Futai, M.** (1996) *FEBS Lett.* **390**: 34-38.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr. und Yoshida, M.** (1998) *Cell* **93**: 1117-1124.
- Yokoyama, K., Akabane, Y., Ishii, N. und Yoshida, M.** (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 12248-12253.
- Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M. und Ohkuma, S.** (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 20504-10.
- Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M. und Tamakoshi, M.** (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 24255-24258.
- Zhou, Y. T., Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Hutcheon, M. L. und Cross, R. L.** (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**: 96-100.
- Zhou, Y. T., Duncan, T. M. und Cross, R. L.** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 10583-10587.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Volker Müller, der mir das spannende Thema A_1A_0 -ATPasen zur Bearbeitung überlassen hat. Danke auch für die stetige Unterstützung, das Interesse am Fortgang der Arbeit und die Bereitschaft zu stimulierenden Diskussionen.

Für die Einführung in die Präparation von Liposomen und die Rekonstitution der ATP-Synthasen bedanke ich mich bei Dr. Sonja Albers und Prof. Dr. Arnold Driessen aus Groningen, Niederlande.

Dr. Michael Hoppert aus Göttingen danke ich ganz besonders herzlich für die stets schnelle und hervorragende Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Den Alt-Göttingern Sascha, Thorsten und Smurf möchte ich gesondert danken: Sascha für die guten Tipps im Labor-Alltag, Thorsten nicht zuletzt für die Hilfe bei Computer-Problemen und Smurf für seine Freundschaft.

Danke an die anderen Doktoranden Andi, Frank und Kathi für das gute Arbeitsklima und die Bereitschaft zu ernsthaften und nicht ernsthaften Diskussionen. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner ATPase-Mitstreiterin Astrid bedanken, ohne deren Hilfe mancher ATPase-Test blau geworden wäre und manche Zentrifuge stundenlang weitergelaufen wäre. Auch für die Bereitstellung von Enzym für die wundersame Welt der Rekonstitutionen danke ich ihr. Heiko, Holger und Volker, die ihre Diplomarbeiten zu den methanogenen A_1A_0 -ATPasen angefertigt haben, danke ich für die freundschaftliche und fruchtbare Zusammenarbeit. Allen anderen Mitarbeitern der AG Müller, ohne die der Alltag um einiges trister gewesen wäre, und den anderen Mitarbeitern am Institut danke ich für die gewährte Unterstützung jeglicher Art.

Meinem Mann Gerhard danke ich für die Ermöglichung mancher Unmöglichkeiten, für das Verständnis und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein riesengroßes Danke geht an meine Familie: an meine Schwester Frauke, die mir immer zur Seite stand, an meine Eltern, ohne die ich die Biologie nie für mich entdeckt hätte. Danke, daß Ihr mir das alles ermöglicht habt.

LEBENS LAUF

Name: Claudia Weidner, geb. Ruppert

Geburtsort: Langenhagen
Geburtsdatum: 10.9.1969
Familienstand: verheiratet seit Oktober 2000 mit Dr. Gerhard Weidner
Kinder: Philipp, geboren am 25.04.2000

1976 – 1980 Besuch der Grundschulen in Basse und Otternhagen
1980 – 1982 Besuch der Orientierungsstufe Süd in Neustadt am Rübenberge
1982 – 1989 Besuch des Gymnasiums Neustadt am Rübenberge
1989 – 1990 Au pair-Aufenthalt in El Paso, Texas
1990 – 1991 Freie Mitarbeit bei der Hannoverschen Allgemeinen Zeitung
Oktober 1991 Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen
im Studiengang Biologie
Oktober 1993 Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische
und Physikalische Chemie
November 1995 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Organische Chemie
und Biochemie
Dezember 1995 bis
Januar 1997 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie unter der
Anleitung von Prof. Dr. V. Müller mit dem Thema
„Molekularbiologische Charakterisierung von Genen der A₁A₀-
ATPase aus *Methanosarcina mazei* Gö1“
März 1997 Beginn der experimentellen Arbeiten zu vorliegender Arbeit

März 2000
bis November 2000 Erziehungsurlaub

August 2001
bis September 2001 Forschungsaufenthalt in Groningen, Niederlande