

Na⁺-translozierende rotatorische
Membranproteinkomplexe aus dem anaeroben
Bakterium *Acetobacterium woodii*:
Vergleichende molekulare und biochemische Analyse
des Flagellums und der F₁F₀-ATPase

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
vorgelegt von
Sascha Aufferth
aus Drebber
im April 2001

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Struktur und Funktion der Flagellen	2
1.1.1 Struktur der Flagellen	3
1.1.2 Der Flagellenantrieb	4
1.2 Struktur und Funktion der F₁F₀-ATPase	7
1.2.1 Struktur der F ₁ -Domäne	9
1.2.2 Struktur der F ₀ -Domäne	10
1.2.3 Funktion der F ₁ F ₀ -ATPase	10
1.3 Na⁺-translozierende Proteine und ihre Bedeutung für die Bioenergetik	12
1.4 Aufbau und Nutzung transmembraner Na⁺-Gradienten in <i>A. woodii</i>	14
1.5 Fragestellung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	19
2.2 Anzucht von Organismen	22
2.2.1 Medien	22
2.2.2 Anzucht von <i>A. woodii</i>	23
2.2.3 Anzucht von <i>E. coli</i>	23
2.3 Herstellung von Sphäroplasten aus <i>A. woodii</i>	24
2.4 Herstellung gewaschener Membranen	24
2.5 Molekularbiologische Methoden	25
2.5.1 Standardmethoden	25
2.5.2 Aufreinigung von DNA mittels Glasmilch	25
2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.5.4 Transfer von DNA auf Nylonmembranen	26
2.5.5 Transfer von Zellen auf Nylonmembranen zur Koloniehybridisierung	26
2.5.6 DNA-DNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	27
2.5.7 Heterologe Expression von Genen in Minizellen von <i>E. coli</i> DK6	27
2.5.8 Expression von <i>malE</i> -Fusionsgenen und Aufreinigung der Fusionsproteine	28
2.6 Biochemische Methoden	28
2.6.1 Standardmethoden	28
2.6.2 Deglycosylierung	29
2.6.3 Bestimmung der ATPase-Aktivität	29

2.6.4	Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.6.4.1	SDS-PAGE	30
2.6.4.2	Blue-Native-PAGE	30
2.6.4.3	Native Gradienten-PAGE	30
2.6.5	Chloroform:Methanol-Extraktion von Membranproteinen	31
2.6.6	Herstellung von Antiseren	31
2.6.7	Aufreinigung von IgGs	32
2.6.8	Western-Blot-Analyse	32
2.6.9	Reinigung der Na ⁺ -F ₁ F ₀ -ATPase	33
2.6.9.1	Solubilisierung	33
2.6.9.2	Gelfiltration	33
2.6.9.3	Dichtegradientenzentrifugation	33
2.6.9.4	Ionenaustauscher-Chromatographie	34
2.6.10	Reinigung von Flagellen	34
2.7	Elektronenmikroskopie	35
2.8	Chemikalien, Enzyme und Gase	35
3.	Experimente und Ergebnisse	36
3.1	Strukturelle und molekulare Organisation des Flagellums aus <i>A. woodii</i>	36
3.1.1	Versuche zur Klonierung der <i>mot</i> -Gene aus <i>A. woodii</i>	36
3.1.1.1	Hybridisierung chromosomaler DNA aus <i>A. woodii</i> mit heterologen <i>mot</i> -Sonden	36
3.1.1.2	Versuche zur Amplifikation der <i>mot</i> -Gene und des <i>fliG</i> -Gens aus <i>A. woodii</i> mittels PCR	37
3.1.2	Klonierung des Flagellings aus <i>A. woodii</i>	39
3.1.2.1	Amplifizierung des Flagellings mittels PCR	39
3.1.2.2	Klonierung von pSA6 aus chromosomaler DNA von <i>A. woodii</i>	41
3.1.2.3	Klonierung von pSA13	42
3.1.3	Analyse der Sequenzdaten	49
3.1.3.1	Identifizierung offener Leserahmen	49
3.1.3.2	Transkriptions- und Translationssignale	51
3.1.3.3	Eigenschaften der abgeleiteten Genprodukte	53
3.1.4	Expression von <i>orfA</i> in <i>E. coli</i>	57
3.1.5	Reinigung von ganzen Flagellen aus <i>A. woodii</i>	59
3.1.6	Elektronenmikroskopische Analyse der Haken-Basalkörper-Struktur	62
3.1.7	Elektronenmikroskopische Analyse von Mot-Komplexen aus <i>A. woodii</i>	64

3.2	Analyse der Untereinheitenzusammensetzung der Na^+-F_1F_0-ATPase aus <i>A. woodii</i>	66
3.2.1	Herstellung von Antiseren gegen die Untereinheiten β , <i>a</i> , <i>b</i> und c_1	67
3.2.2	Immunologischer Nachweis der Untereinheiten <i>a</i> , <i>b</i> und c_1 in <i>A. woodii</i>	70
3.2.3	Zweidimensionale Auftrennung von Membranproteinkomplexen durch Blue-Native- und SDS-PAGE	74
3.2.3.1	Solubilisierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase	74
3.2.3.2	Identifizierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase in der Blue-Native-PAGE	76
3.2.3.3	Untereinheitenzusammensetzung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase	77
3.2.4	Immunologischer Nachweis der Untereinheit c_1 im Na^+ - F_1F_0 -ATPase-Komplex	79
3.2.4.1	Herstellung eines Antiserums gegen die Untereinheiten c_2/c_3	79
3.2.4.2	Spezifität der anti- c_1 - und anti- c_2/c_3 -Antiseren	81
3.2.4.3	Immunologischer Nachweis der Untereinheit c_1 im nativen ATPase-Komplex durch BN-PAGE	82
3.3	Vergleichende Analyse der Synthese von Untereinheit c_1 in Abhängigkeit des Substrates und der Na^+-Konzentration	84
3.4	Reinigung der F_1F_0-ATPase aus <i>A. woodii</i>	89
3.4.1	Solubilisierung der ATPase	89
3.4.2	Gelfiltration	91
3.4.3	Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation	93
3.4.4	Zusammenfassung der Reinigung	94
4.	Diskussion	98
4.1	Struktur des F_0-Komplexes	98
4.1.1	Struktur und Funktion der Untereinheit <i>a</i>	98
4.1.2	Struktur und Funktion der Untereinheit <i>b</i>	100
4.1.3	Struktur und Funktion der Untereinheit <i>c</i>	100
4.1.4	Protein-Protein Interaktion im F_0 -Komplex	104
4.2	Struktur und Funktion der Proteolipide	106
4.2.1	Vergleich der Proteolipidstruktur in F_1F_0 -, V_1V_0 - und A_1A_0 -ATPasen	106
4.2.2	Evolution der Proteolipide	109
4.2.3	Zur Struktur und Funktion des Untereinheit <i>c</i> -Oligomers der ATPasen	112
4.3	Genetische Organisation und Expression der Flagellengene	114
4.4	Struktur der bakteriellen Flagellen	116
4.4.1	Struktur des Filamentes	116
4.4.2	Struktur des Haken-Basalkörper-Komplexes	119
4.4.3	Struktur des Flagellenmotors	120

4.5	Vergleich der Rotationsmechanismen von Flagellen und ATPasen	122
4.6	Ausblick	126
5.	Zusammenfassung	128
6.	Literatur	130
	Anhang	158

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BN	Blue-Native
ca.	circa
Ci	Curie
CO-DH	CO-Dehydrogenase
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
min	Minuten
OD _x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
P _i	anorganisches Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFMS	Trifluormethansulfonat
THF	Tetrahydrofolat
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v:v	Volumen pro Volumen
w:v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1. Einleitung

Der Mechanismus der Kopplung exergoner und endergoner Reaktionen des Stoffwechsels ist eine der zentralen Fragen der Bioenergetik. Nach formalen Kriterien werden primäre und sekundäre Mechanismen unterschieden. Bei primären Mechanismen wird die exergone direkt mit der endergonen Reaktion gekoppelt. Beispiele dafür sind die Substratkettenphosphorylierung oder der ATP-getriebene Stofftransport von Ionen und Molekülen über die Cytoplasmamembran. Bei einem sekundären Mechanismus ist die Kopplung indirekt, z. B. über einen transmembranen Ionengradienten. Dabei wird die Energie, die in einer exergonen Reaktion frei wird, zunächst in Form eines transmembranen elektrochemischen Ionengradienten konserviert. Dieser Ionengradient wird als Triebkraft der endergonen Reaktion genutzt. Daraus folgt, daß sekundäre Energiekonverter alle membrandurchspannend sind und einen Ionenfluß über die Cytoplasmamembran katalysieren. Durch den Ionenfluß werden mechanische, chemische oder osmotische Reaktionen angetrieben. Als Beispiele sind die bakterielle Flagellenrotation, die ATP-Synthese durch ATP-Synthasen (ATPasen) und der Stofftransport durch Anti- und Symporter zu nennen.

Obwohl die Postulierung solcher Kopplungsfaktoren oder sekundärer Energiekonverter bereits auf Mitchell (1961) zurückgeht, ist deren Funktion und Struktur in der Regel wenig verstanden. Dies liegt vor allem daran, daß diese stark hydrophoben Proteine häufig einer Reinigung nicht zugänglich sind, der von ihnen katalysierte Ionentransport und die daran gekoppelte Reaktion häufig schwierig nachzuweisen und die funktionelle Rekonstitution in Liposomen technisch schwierig sind. In den letzten Jahren hat es verstärkte Anstrengungen gegeben, durch Kristallisation und Analyse hochauflösender Raumstrukturen mehr über die Struktur und damit auch mehr über die Funktionsweise dieser Proteine zu erfahren. So gelang z. B. die Aufklärung der Raumstruktur der Cytochrom-Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* (Ostermaier *et al.*, 1995) und aus Rinderherzmitochondrien (Tsukihara *et al.*, 1996), des Cytochrom bc₁-Komplexes aus Rinderherzmitochondrien (Xia *et al.*, 1997; Iwata *et al.*, 1998) und *Saccharomyces cerevisiae* (Hunte *et al.*, 2000) und von Teilen der F₁F₀-ATPasen (Groth und Pohl, 2001; Abrahams *et al.*, 1994; Uhlin *et al.*, 1997; Shirakihara *et al.*, 1997; Hausrath *et al.*, 1999; Svergun *et al.*, 1998; Stock *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2000).

Sekundäre Stofftransporter sind in aller Regel von wenig komplexer Untereinheitenstruktur, während der bakterielle Flagellenmotor und die ATP-Synthase komplex aufgebaute Strukturen besitzen. Von beiden ist die prinzipielle Untereinheitenzusammensetzung bekannt. Vollkommen unklar ist dagegen in beiden Fällen, wie der Ionenfluß über die Membran katalysiert wird und wie dieser an die Verrichtung chemischer und mechanischer Arbeit gekoppelt ist. Die ATP-Synthasen sind in den drei Domänen des Lebens sehr stark konserviert, so daß die Ergebnisse, die an einem Untersuchungsobjekt erhalten werden, auf andere übertragbar sind. Gleiches trifft sehr wahrscheinlich auch für die bakteriellen

Flagellenmotoren zu. Daher gibt es zur Zeit Bestrebungen, sekundäre Energiekonverter aus Mikroorganismen mit ungewöhnlichen Eigenschaften zu studieren, in der Hoffnung, daß diese sich leichter darstellen und analysieren lassen. Vorteile bieten dabei z. B. Enzyme aus thermophilen Bakterien, gerade im Hinblick auf ihre Stabilität und Kristallisationseigenschaften. Durch den Vergleich von Enzymen mit ungewöhnlichen Eigenschaften, sind außerdem weitere Aufschlüsse über ihre Funktionsweise zu erwarten. Als Untersuchungsobjekt bieten sich Enzyme an, die alternative Kopplungen nutzen. Während die allermeisten Spezies Protonen als Kopplung in sekundären Energieconvertern verwenden, nutzen einige Organismen statt dessen Na^+ . Das Studium solcher Na^+ -abhängigen Enzyme hat bereits signifikant zum Verständnis des Mechanismus der Ionentranslokation im allgemeinen beigetragen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Na^+ -abhängigen Flagellenmotor und die Na^+ -abhängige ATP-Synthase aus dem anaeroben Bakterium *Acetobacterium woodii* vergleichend biochemisch, funktionell und strukturell zu analysieren. Im Vordergrund stand die Klärung der Untereinheitszusammensetzung dieser Membranproteinkomplexe und deren Vergleich mit H^+ -abhängigen Enzymen. Im folgenden sollen diese Komplexe und ihre Funktion in *A. woodii* kurz vorgestellt werden.

1.1 Struktur und Funktion der Flagellen

Bakterien sind in der Lage, sich auf festen und in flüssigen Medien aktiv zu bewegen. Die Fortbewegung kann durch Gleiten, Schnappen, Schwärmen oder Schwimmen erfolgen. Am besten charakterisiert ist die Schwimmbewegung, die sich im Lichtmikroskop an einer geradlinigen Fortbewegung der Bakterien im dreidimensionalen Raum, unterbrochen von Taumelbewegungen oder Stops, erkennen läßt. Die Schwimmbewegung wird durch ein membranintegrales Organell, das Flagellum, erreicht, das aus einem extrazellulären Filament besteht, welches über einen Basalkörper in der Cytoplasmamembran inseriert ist (Vaituzis und Doetsch, 1969; DePamphilis und Adler, 1971a, b). Daß die Schwimmbewegung nicht durch eine Pendelbewegung der Flagellen sondern durch deren Rotation hervorgerufen wird, wurde schon früh vermutet (Berg und Anderson, 1973) und experimentell belegt (Silverman und Simon, 1974). Richtungsänderungen werden in *E. coli* durch eine Änderung der Rotationsrichtung, die zum Taumeln führt (Taylor und Koshland, 1974), oder in *Rhodobacter sphaeroides* und *Sinorhizobium meliloti* durch einen einfachen Stop der Flagellenrotation (Armitage und Macnab, 1987; Götz und Schmitt, 1987) erreicht. Die Richtungsänderungen erfolgen als Antwort auf einen chemischen oder physikalischen Reiz (Berg und Brown, 1972; Macnab und Koshland, 1972; Larsen *et al.*, 1974a). Die Reize werden durch Rezeptoren in der Cytoplasmamembran wahrgenommen und durch die Signaltransduktionskette des chemotaktischen Systems an das Flagellum weitergeleitet. Lange Zeit wurde in Analogie zu den eukaryontischen Flagellen ATP als Energiequelle der bakteriellen Flagellenrotation

favorisiert. Seitdem beobachtet wurde, daß ATP-Synthase-defiziente-Mutanten von *E. coli* auch in Anwesenheit von Glucose, wenn ihnen ATP durch Substratkettenphosphorylierung zur Verfügung steht, nicht beweglich sind, wurde ATP als Antrieb der Flagellenrotation ausgeschlossen (Larsen *et al.*, 1974b). Da sich die Beweglichkeit von *E. coli* durch einen Entkoppler hemmen ließ, wurde bereits von Larsen *et al.* (1974b) vermutet, daß ein Intermediat der oxidativen Phosphorylierung die eigentliche Antriebskraft der Flagellenrotation darstellt. Manson *et al.* (1977) konnten dann durch die Induktion von Schwimm- und Taumelbewegung in ruhenden Zellen von *Streptococcus* V4051 durch ein Kaliumdiffusionspotential und durch einen pH-Gradienten direkt nachweisen, daß das transmembrane elektrochemische Protonenpotential den Antrieb der Flagellenrotation darstellt. Ein noch überzeugenderer Nachweis war schließlich die Induktion einer Flagellenrotation in Zellhüllen von *E. coli* durch ein artifizielles Membranpotential (Ravid und Eisenstein, 1984). Die Kopplung von Flagellenrotation und transmembranen elektrochemischen Protonenpotential konnte mittlerweile für eine Reihe von Bakterien nachgewiesen werden, wie z. B. *Bacillus subtilis* (Miller und Koshland, 1977; Shioi *et al.*, 1978) oder *Rhodospirillum rubrum* (Glagolev und Skulachev, 1978) und ist allgemein gültig für bakterielle Flagellen.

1.1.1 Struktur der Flagellen

Die Struktur der Flagellen läßt sich grob in die drei Elemente Filament, Haken und Basalkörper unterteilen (Abb. 1). Das Filament besteht in den meisten Bakterien aus einem Protein, dem Flagellin (FliC), in einigen wenigen Bakterien konnten aber auch mehrere unterschiedliche Flagelline identifiziert werden (Joys, 1988). An den Enden des Filamentes sind die Haken-assoziierten Proteine (HAP) lokalisiert, am zelldistalem Ende das HAP-2 (FliD) und am zellproximalen Ende die Proteine HAP-1 (FlgK) und HAP-3 (FlgL). Die Proteine HAP-1 und HAP-3 bilden den Übergang vom Filament zum Haken (Ikeda *et al.*, 1987). Der Haken besteht aus einem Protein (FlgE) und stellt die Verbindung zum Basalkörper her (Silverman und Simon, 1972; Abram *et al.*, 1970; Komeda *et al.*, 1978). Der Basalkörper durchspannt die gesamte Zellhülle und besteht aus einem Stab als Verlängerung des Hakens, um den in Gram-negativen Bakterien vier Ringstrukturen gruppiert sind, die in der Cytoplasmamembran (M- und S-Ring), in der Zellwand (P-Ring) und in der äußeren Membran (L-Ring) verankert sind (DePamphilis und Adler, 1971a, 1971b). In Gram-positiven Bakterien wurden nur die beiden Ringstrukturen der Cytoplasmamembran (M- und S-Ring) identifiziert (DePamphilis und Adler, 1971a). Durch Überproduktion von FliF und elektronenmikroskopische Analyse der gebildeten Flagellen konnten Ueno *et al.* (1992) zeigen, daß der M- und S-Ring nur durch ein Protein (FliF) gebildet wird und somit die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen M- und S-Ringe nur zwei Domänen desselben Proteins darstellen. Im folgenden wird daher vom MS-Ring gesprochen. Der MS-Ring

umschließt einen Hohlraum, in dem nach neueren Erkenntnissen die Komponenten des Export und Assemblierungsapparates der Flagellen lokalisiert sind (Minamino und Macnab, 1999; Fan *et al.*, 1997). Die L- und P-Ringe werden durch zwei verschiedene Proteine, FlaY und FlaM, gebildet (Jones *et al.*, 1987). Der Stab besteht bei *E. coli* aus vier Proteinen (FlgB, FlgC, FlgF und FlgG) (Aizawa *et al.*, 1985). An den Basalkörper schließt sich an der cytoplasmatischen Seite der C- (cytoplasmatische) Ring an (Driks und DeRosier, 1990; Khan *et al.*, 1991, 1992a). Dieser besteht in *E. coli* und *S. typhimurium* aus den drei Proteinen FliG, FliM und FliN (Francis *et al.*, 1992, 1994; Zhao *et al.*, 1996a, b; Lux *et al.*, 2000). Die carboxyterminale Domäne von FliG aus *Thermotoga maritima* stellt den einzigen Bereich des C-Rings dar, der bisher kristallisiert wurde und dessen hochauflösende Struktur bekannt ist. Diese Domäne besteht aus sechs α -helikalen Bereichen. Interessanterweise sind mehrere geladene Aminosäuren in einer Reihe an der Außenseite von FliG und damit des C-Rings exponiert (Lloyd *et al.*, 1999).

Um den MS- und C-Ring ist in der Cytoplasmamembran ein Ring aus acht bis zwölf Proteinkomplexen gruppiert. Durch Mutationsanalysen wurde gezeigt, daß jeder Komplex aus den Produkten der Gene *motA* und *motB* aufgebaut ist. Daher werden diese auch Mot-Komplexe genannt (Khan *et al.*, 1988; Stolz und Berg, 1991). Sequenzanalysen und eine Reihe von Untersuchungen zur Topologie von MotA und MotB belegten, daß MotA vier transmembrane Helices und MotB eine transmembrane Helix sowie eine periplasmatische Domäne besitzt (Chun und Parkinson, 1988; Sharp *et al.*, 1995a,b). Die periplasmatische Domäne enthält Bereiche, die Ähnlichkeiten zu Proteinen der äußeren Membran aufweisen, weswegen vermutet wurde, daß MotB über seine periplasmatische Domäne an die Zellwand gebunden ist und den Mot-Komplex dadurch fixiert (De Mot und Vanderleyden, 1994).

1.1.2 Der Flagellenantrieb

Alle Komponenten des Flagellums vom Filament bis zum MS-Ring stellen passive Strukturen dar. Nur die Komponenten des C-Rings und des Mot-Komplexes besitzen Aktivitäten, die über eine rein strukturelle Funktion hinausgehen und den Antrieb der Flagellen direkt betreffen. Mutationen in den Genen *fliG*, *fliM* und *fliN* können in *E. coli* und *S. typhimurium* drei unterschiedliche Phänotypen hervorrufen. Die Zellen können trotz strukturell intakter Flagellen vollständig paralysiert sein, die Flagellen können fehlen oder die Rotation kann konstitutiv in eine Richtung erfolgen (Irikura *et al.*, 1993; Sockett *et al.*, 1992). Es wurde daher angenommen, daß der C-Ring an drei entscheidenden Prozessen beteiligt ist, dem Antrieb des Flagellums, dem Export von Proteinen und der Verbindung zur Signaltransduktionskette der Chemotaxis. Durch die Analyse von FliM-Deletionsmutanten wurden drei Bereiche in FliM identifiziert, die für eine Interaktion mit FliN und FliG sowie mit einer Komponente der Signaltransduktionskette verantwortlich sind (Toker und Macnab, 1997; Bren und Eisenbach, 1998; Matthews *et al.*, 1998). FliG ist offensichtlich für die

Bindung des C-Rings an den MS-Ring verantwortlich (Francis *et al.*, 1992). Mutationsanalysen belegten, daß FliG auch direkt am Antrieb des Flagellums beteiligt ist (Lloyd und Blair, 1997; Lloyd *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den Komponenten des C-Rings führen Mutationen im *motA*- oder *motB*-Gen nur zu einem Phänotyp, der Paralyse der Zellen bei intakter Flagellenstruktur, so daß für sie nur eine Funktion für den Flagellenantrieb in Frage kam.

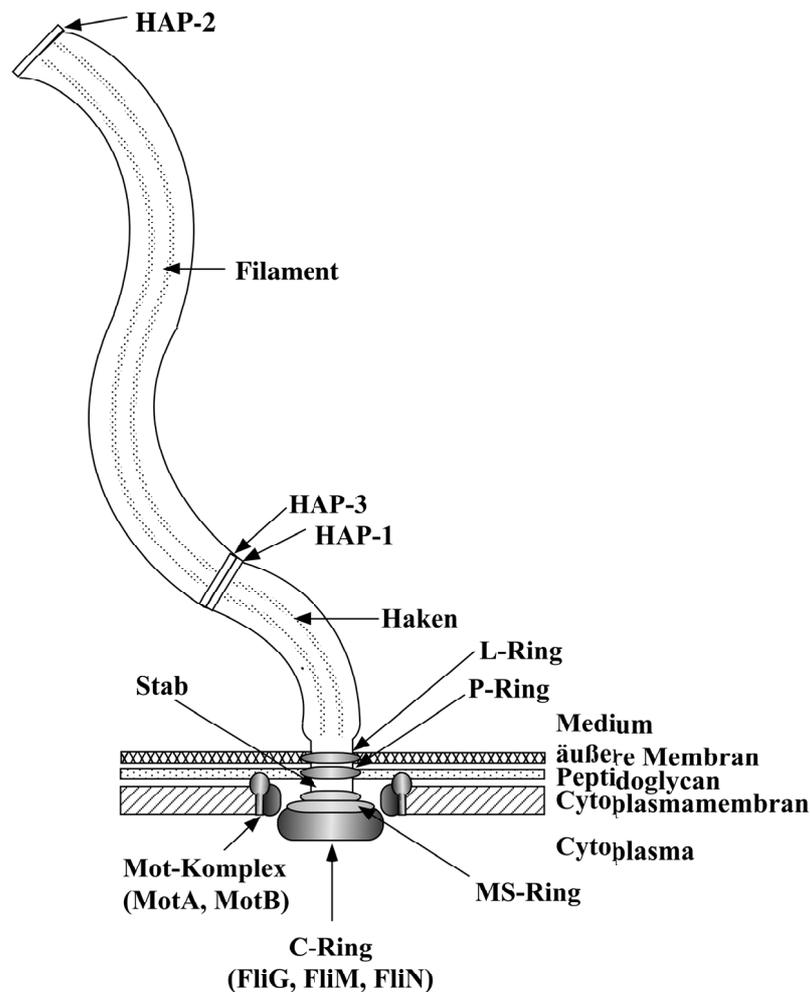


Abb. 1. Schematische Darstellung des Flagellums von *E. coli* und *S. typhimurium*.
Modifiziert nach Macnab (1992).

Erste Belege für eine Funktion der Mot-Komplexe beim Antrieb der Flagellen bot die Arbeit von Blair und Berg (1988), die zeigte, daß die Beweglichkeit in *motA*- und *motB*-Mutanten durch die Expression dieser Untereinheiten wiederhergestellt werden kann. Die Rotationsgeschwindigkeit nahm in acht Schritten in Abhängigkeit von der Expressionsstärke der *mot*-Gene zu, was der modularen Organisation des Mot-Rings aus acht bis zwölf Komplexen entspricht. Dies führte zu der Vermutung, daß jeder einzelne Mot-Komplex in der Lage ist, das Flagellum anzutreiben und daß die Anzahl an Mot-Komplexen die

Geschwindigkeit limitiert. Da die Überproduktion von MotA in *E. coli* zu einer erhöhten H⁺-Permeabilität von Membranvesikeln führte, wurde eine direkte Beteiligung von MotA am Protonentransfer angenommen (Blair und Berg, 1990, 1991). Durch Mutations und Suppressorstudien wurden Aminosäuren identifiziert, die für eine Interaktion zwischen den Mot-Proteinen und FliG verantwortlich sind (Zhou und Blair, 1997; Lloyd und Blair, 1997; Garza *et al.*, 1995, 1996; Zhou *et al.*, 1998).

Aufgrund dieser Daten wird generell ein Modell des Flagellenantriebs favorisiert, in dem die Mot-Komplexe die Statorkomponente und das FliG-Protein die Rotorkomponente darstellen. Die Rotation wird durch eine nicht genauer bekannte Interaktion zwischen Rotor und Stator hervorgerufen. Den Antrieb dieser Interaktion stellt das transmembrane elektrochemische Protonenpotential dar. Völlig ungeklärt ist aber die Struktur des Protonenkanals und der Protonenbindungsstellen im Mot-Komplex. Auch über den Mechanismus, der die Reversibilität der Flagellenrotation und ihre Kopplung an ein Membranpotential gleicher Polarität verursacht, ist bisher nichts bekannt.

Das größte Problem bei der Klärung dieser Fragen stellt die große Komplexität des Flagellums dar. Insgesamt kodieren 40 - 60 Gene für Proteine, die an der Struktur, am Antrieb und an der Assemblierung der Flagellen beteiligt sind. Alleine das Flagellum besteht aus mindestens 15 Proteinen, wobei die genaue Zahl noch nicht bekannt ist, da gerade die Struktur des C-Rings noch nicht abschließend geklärt ist. Auch hat sich in der Vergangenheit gezeigt, daß viele Komponenten des Flagellums sehr labil gegenüber verschiedenen Faktoren wie Temperatur, Ionenkonzentrationen und Detergenzien sind (Khan *et al.*, 1992a). Eine erfolgreiche Reinigung der Flagellenproteine und ihre Rekonstitution zu funktionalen Flagellen in Liposomen ist aus diesen Gründen bisher noch nicht möglich gewesen und hat die Aufklärung der Funktionsweise des Flagellenantriebs stark eingeschränkt.

In jüngster Zeit gelang der Nachweis, daß auch die F₁F₀-ATPase eine Rotationsmaschine darstellt, die ein transmembranes elektrochemisches Protonenpotential an eine Rotation koppelt (Duncan *et al.*, 1995; Sabbert *et al.*, 1996; Noji *et al.*, 1997; Yasuda *et al.*, 1998; Sambongi *et al.*, 1999). Da die F₁F₀-ATPase eine im Vergleich zum Flagellum wesentlich einfachere Untereinheitenzusammensetzung aufweist und zudem Methoden zu ihrer Reinigung und Rekonstitution in Liposomen existieren, sollte die Klärung des Rotationsmechanismus in diesem Enzym wesentlich einfacher sein. Da die Gene aller Untereinheiten der bakteriellen F₁F₀-ATPasen in einem Operon organisiert sind, vereinfacht dies zudem ihre heterologe Expression und ihre genetische Manipulation. Durch den Vergleich zum Flagellum könnten auch Hinweise auf die Funktionsweise des Flagellenmotors erhalten werden. Es soll daher im folgenden kurz die Struktur und Funktion der F₁F₀-ATPase dargestellt werden.

1.2 Struktur und Funktion der F₁F₀-ATPase

Die F₁F₀-ATPase ist ein membrangebundenes Enzym, das den Transfer von Protonen über die Cytoplasmamembran an die Synthese oder Hydrolyse von ATP koppelt. Die endergone ATP-Synthese ist mit einem Transfer von Protonen entlang des transmembranen elektrochemischen Membranpotentials und die exergone ATP-Hydrolyse mit dem Protonentransport entgegen dem Membranpotential gekoppelt. Anders gesagt äquilibriert der Protonenfluß durch die ATPase das Phosphorylierungspotential (ΔG_P) mit dem transmembranen elektrochemischen Protonenpotential ($\Delta\mu_{H^+}$) nach folgender Beziehung:

$$\Delta G_P = n \cdot F \cdot \Delta\mu_{H^+}$$

n = translozierte Protonen

F = Faraday-Konstante

$\Delta\mu_{H^+}$ = transmembranen elektrochemisches Protonenpotential

ΔG_P = Phosphorylierungspotential

Der Transfer der Protonen entlang des transmembranen elektrochemischen Protonenpotentials muß ausreichend freie Energie zur Synthese von ATP zur Verfügung stellen. Die Anzahl der transportierten Protonen ist proportional zur freien Energiedifferenz, die zur ATP-Synthese genutzt werden kann (ΔG_P). Bei einem physiologischen elektrochemischen Protonenpotential von 180 mV und einem ΔG_P von 50 - 70 mV müssen drei bis vier Protonen transloziert werden, um die Synthese eines ATP zu ermöglichen. Umgekehrt erlaubt die Hydrolyse eines ATP-Moleküls den Transport von maximal drei bis vier Protonen über die Cytoplasmamembran entgegen dem physiologischen elektrochemischen Membranpotential. Hieraus wird klar, daß die Richtung der Reaktion von der Größe des transmembranen elektrochemischen Protonenpotentials, dem Phosphorylierungspotential der Zelle ($ATP \cdot (ADP \cdot P_i)^{-1}$) und der Anzahl der transportierten Protonen abhängig ist.

In Gären, wie z. B. den Milchsäurebakterien, die nicht über die Möglichkeit einer Elektronentransport-getriebenen H⁺-Translokation über die Cytoplasmamembran verfügen und ATP durch Substratkettenphosphorylierung synthetisieren, läuft die Reaktion überwiegend in Richtung der ATP-Hydrolyse und damit der H⁺-Extrusion ab. In diesem Fall dient die F₁F₀-ATPase als primäre H⁺-Pumpe zum Aufbau eines transmembranen elektrochemischen Protonenpotentials, das dem Antrieb des sekundären Stofftransports und der Flagellenrotation dient. In Bakterien, die dagegen über eine Elektronentransport-getriebene H⁺-Translokation verfügen, liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der ATP-Bildung und die F₁F₀-ATPase wirkt überwiegend als sekundärer Energiekonverter. Auch ein hoher ADP-Gehalt in den Zellen (also ein niedriges Phosphorylierungspotential) verschiebt das Gleichgewicht in Richtung der ATP-Synthese.

Neben der F_1F_0 -ATPase, die bisher nur in den *Bacteria* sowie in Chloroplasten und Mitochondrien nachgewiesen wurden, existieren zwei weitere membrangebundene ATPase-Typen, die die ATP-Hydrolyse bzw. -Synthese mit dem Protonentransfer über die Cytoplasmamembran koppeln. In den *Archaea* sind die A_1A_0 -ATPasen zu finden, die ähnlich der F_1F_0 -ATPase sowohl eine $\Delta\mu_{H^+}$ -abhängige ATP-Synthese als auch eine ATP-Hydrolyse katalysieren (Schäfer *et al.*, 1999). In den *Eucarya*, aber auch einigen *Bacteria* ist ein dritter ATPase-Typ vorhanden, die V_1V_0 -ATPase, die allerdings nur zur ATP-Hydrolyse befähigt ist. Unterschiede zwischen den drei ATPase-Typen bestehen im Hinblick auf ihre Inhibitorsensitivität und Untereinheitenzusammensetzung (Abb. 2).

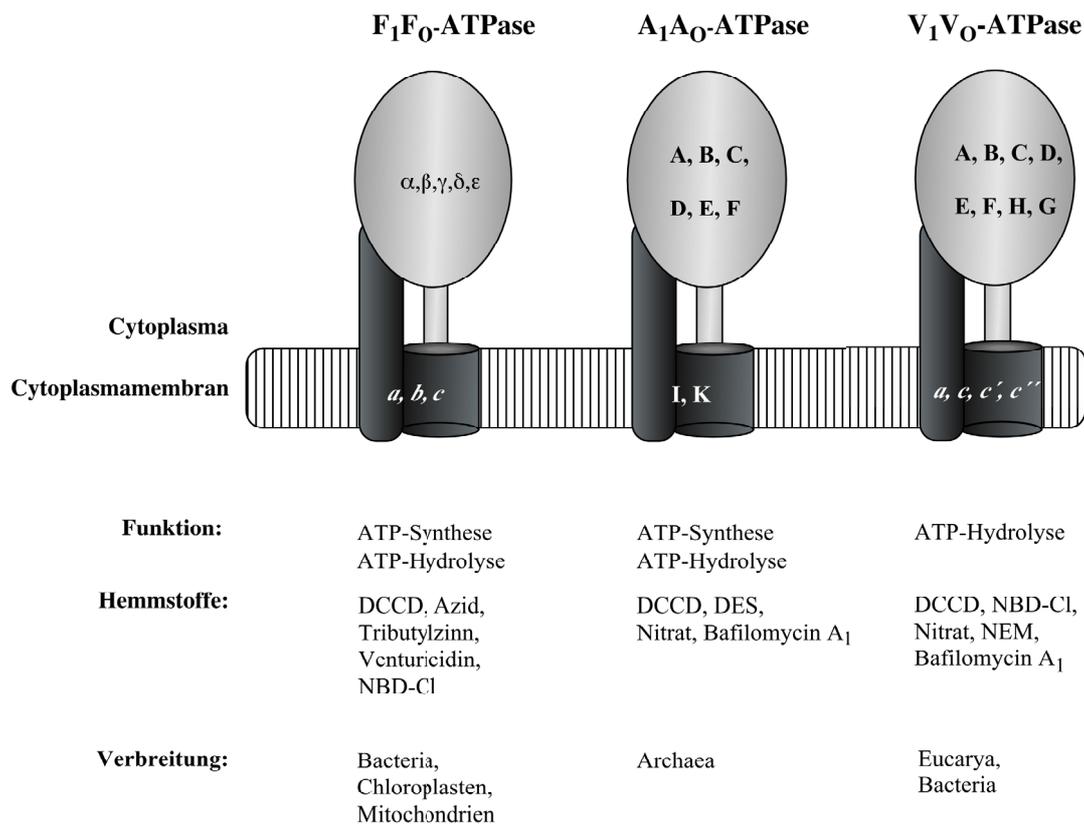


Abb. 2. Vergleich charakteristischer Merkmale von F_1F_0 -, A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen
Die F_1 -, A_1 - und V_1 -Domänen sind hell, die F_0 -, A_0 - und V_0 -Domänen dunkel dargestellt. Es ist beispielhaft die Untereinheitenzusammensetzung der F_1F_0 -ATPase aus *E. coli*, der A_1A_0 -ATPase aus *Methanosarcina mazei* Gö1 und der V_1V_0 -ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt.

Ihre Ultrastruktur ist dagegen sehr ähnlich. Generell bestehen die ATPasen aus zwei Domänen. Eine Domäne (A_0 , V_0 , F_0) ist in der Cytoplasmamembran verankert und über zwei Stiele mit der cytoplasmatischen Domäne (A_1 , V_1 , F_1) verbunden. Am besten charakterisiert im Hinblick auf ihre Struktur, die Kopplung von ATP-Synthese und Protonentransfer und den Rotationsmechanismus ist bisher die F_1F_0 -ATPase. Die Struktur der F_1 - und F_0 -Domäne sowie ihre Funktion werden daher im folgenden genauer dargestellt.

1.2.1 Struktur der F₁-Domäne

Die F₁-Domäne der F₁F₀-ATPase der Bakterien und Chloroplasten besteht aus den fünf Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ , die in einer Stöchiometrie von 3:3:1:1:1 vorliegen (Foster und Fillingame, 1982). Abweichungen von dieser Untereinheitenzusammensetzung wurden bisher nur in der mitochondrialen F₁-Domäne gefunden. In diesen ist keine zur δ -Untereinheit ähnliche Untereinheit vorhanden, jedoch zwei weitere, die als OSCP und ϵ bezeichnet werden. Die zur ϵ -Untereinheit der bakteriellen F₁F₀-ATPase homologe Untereinheit wird in der mitochondrialen F₁F₀-ATPase als δ bezeichnet. Die α - und β -Untereinheiten bilden ein $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer, in dem die beiden Untereinheiten alternierend angeordnet sind. Die γ -Untereinheit stellt einen Stiel dar, der vom Inneren des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers zur F₀-Domäne reicht. Die ϵ -Untereinheit liegt an der Basis des Stiels und bindet an die γ -Untereinheit und die F₀-Domäne (Lücken *et al.*, 1990). Eine hochauflösende Struktur eines $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Subkomplexes mit einer Auflösung von 2,8 Å wurde zum ersten Mal von Abrahams *et al.* (1994) für die F₁F₀-ATPase aus Mitochondrien beschrieben. Dabei zeigte sich, daß die α - und β -Untereinheiten eine sehr ähnliche Form mit einer aminoterminalen β -"barrel"-Struktur und einem carboxyterminalen Bündel aus α -Helices besitzen. Die Nukleotidbindungsstellen wurden in den Grenzbereichen zwischen den α - und β -Untereinheiten identifiziert, wobei die β -Untereinheit den Großteil der Aminosäuren für die katalytisch aktiven Zentren zur Verfügung stellt. Die Nukleotidbindungsstellen waren in diesen Kristallen mit unterschiedlichen Nukleotiden (ATP, ADP) besetzt, bzw. eine Bindungsstelle war unbesetzt. Im Zentrum des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers lagen zwei parallele α -Helices, die die Amino- und Carboxytermini der γ -Untereinheit darstellten. Die γ -Untereinheit lag jedoch zu 65% in ungeordneter Form vor, so daß zunächst keine Aussagen über die Struktur der Untereinheit γ unterhalb des Hexamers gemacht werden konnten. Durch neuere Strukturanalysen zur F₁-Domäne aus Hefe und Rinderherzmitochondrien wurde bestätigt, daß die γ -Untereinheit einen Stiel bildet, an dessen Ende sich die δ - (entspricht der ϵ -Untereinheit in bakterieller F₁) und ϵ -Untereinheit (keine entsprechende Untereinheit in bakterieller F₁) befinden (Stock *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2000). Vor kurzem gelang ebenfalls die Kristallisation eines $\alpha_3\beta_3\epsilon\gamma$ -Subkomplexes der Chloroplasten F₁F₀-ATPase mit einer Auflösung von 3,2 Å (Groth und Pohl, 2001). Dabei stellte sich die Struktur als sehr ähnlich zu denen der F₁-Domäne aus mitochondrialen F₁F₀-ATPase dar. Durch die Kristallisation des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers aus *Bacillus* PS3 (Shirakihara *et al.*, 1997), der ϵ -Untereinheit aus *E. coli* (Uhlin *et al.*, 1997) und eines $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ -Komplexes aus *E. coli* (Hausrath *et al.*, 1999; Svergun *et al.*, 1998) wurde gezeigt, daß die Struktur der bakteriellen F₁-Domäne der mitochondrialen F₁-Domäne ebenfalls sehr ähnlich ist. Zur Struktur der δ -Untereinheit liegen bisher nur sehr wenige Daten vor, da diese Untereinheit zur Verbesserung der Röntgenbeugung bei den bisherigen Kristallisationen aus der F₁-Domäne entfernt wurde. Lediglich Svergun *et al.* (1998) gelang es, die gesamte *E. coli* F₁-Domäne zu kristallisieren, allerdings war die erzielte

Auflösung gering. In diesen Kristallen wurde ein elektronendichter Bereich an der unteren Peripherie des $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes ausgemacht, der in seiner Größe der δ -Untereinheit entspricht. Diese Lage der δ -Untereinheit steht aber im Widerspruch zu elektronenmikroskopischen Analysen, die eine Positionierung der δ -Untereinheit an der Spitze der F_1 -Domäne favorisieren (Wilkins *et al.* 1999).

1.2.2 Struktur der F_0 -Domäne

Die Struktur der F_0 -Domäne der bakteriellen F_1F_0 -ATPase ist wesentlich schlechter charakterisiert als die der F_1 -Domäne. Sie besteht aus den drei Untereinheiten *a*, *b* und *c*. Die F_0 -Domäne der Bakterien scheint die minimale Untereinheitenzusammensetzung zu besitzen, die für die Funktion der F_1F_0 -ATPase nötig ist. In den F_0 -Domänen aus Chloroplasten und Mitochondrien wurden dagegen weitere Untereinheiten identifiziert. In der F_0 -Domäne der Hefe liegen mindestens vier weitere Untereinheiten vor (su.d, su.f, su.h und su.8), über deren Struktur und Funktion allerdings nichts bekannt ist (Velours *et al.*, 2000). Die F_0 -Domäne der Chloroplasten setzt sich aus vier Untereinheiten (I, II, III, IV) zusammen (Böttcher und Gräber, 2000). Die Untereinheit III entspricht der *c*-Untereinheit und die Untereinheit IV der *a*-Untereinheit der bakteriellen Enzyme. Die Untereinheiten II und III sind beide der *b*-Untereinheit ähnlich (Blair *et al.*, 1996).

Bisher gibt es nur wenig hochauflösende Strukturen für die einzelnen Untereinheiten, die entweder durch Elektronenmikroskopie oder NMR ermittelt wurden. Die meisten strukturellen Daten wurden indirekt durch eine Reihe von immunologischen Methoden, Mutationsanalysen und Quervernetzungsexperimenten erhalten. Die *a*-Untereinheit ist mit einer Kopie in der F_1F_0 -ATPase vertreten (Foster und Fillingame, 1982). Sie besitzt fünf bis sechs transmembrane Helices (Valiyaveetil und Fillingame, 1998; Jäger *et al.*, 1998). Die *b*-Untereinheit besteht aus einer transmembranen Helix und einer cytoplasmatischen Domäne und bildet einen Dimer in der F_1F_0 -ATPase, der Kontakt zur F_1 -Domäne herstellt. Die Untereinheit *c* liegt in einer Kopienzahl von neun bis zwölf Untereinheiten vor. Sie hat in allen bisher beschriebenen F_1F_0 -ATPasen eine molekulare Masse von 8 kDa. Die Monomere bilden zwei transmembrane Helices aus, die über eine cytoplasmatische Schleife miteinander verbunden sind (Fillingame, 1992; Girvin *et al.*, 1998). Aufgrund von Mutationsanalysen und Quervernetzungsexperimenten wird zur Zeit ein Modell favorisiert, in dem die *c*-Untereinheiten einen Ring in der Cytoplasmamembran bilden, an dessen Peripherie die *a*- und *b*-Untereinheiten liegen (DeckersHebestreit und Altendorf, 1996).

1.2.3 Funktion der F_1F_0 -ATPase

Von Boyer (1993) wurde ein Modell formuliert, in dem die ATP-Synthese durch die F_1F_0 -ATPase in drei Schritten erfolgt. Im ersten Schritt wird $ADP + P_i$ zu ATP umgesetzt. Im

zweiten Schritt wird das gebildete ATP schwächer gebunden, so daß es im dritten Schritt gegen $\text{ADP} + \text{P}_i$ ausgetauscht werden kann. Alle drei Schritte führen zu einem Bindungswechsel, der durch den transmembranen elektrochemischen Protonengradienten angetrieben wird. Eine Nukleotidbindungsstelle muß alle drei Bindungszustände zur Synthese eines ATP-Moleküls durchlaufen. Erreicht werden die unterschiedlichen Bindungszustände durch Strukturveränderungen in den β -Untereinheiten. Der Wechsel der Konformationen erfolgt kooperativ, so daß zwei Untereinheiten nie dieselbe Konformation aufweisen. Dieses Modell konnte durch die Strukturanalysen bestätigt werden und führte zu der Vermutung, daß die Konformationsänderungen durch eine Rotation der Untereinheit γ im $\alpha_3\beta_3$ -Komplex hervorgerufen werden und durch eine Interaktion der γ -Untereinheit mit dem c -Oligomer der F_0 -Domäne an die Ionentranslokation gekoppelt sind (Abrahams *et al.*, 1994). Eine ATP-abhängige Rotation der γ -Untereinheit im $\alpha_3\beta_3$ -Komplex der F_1F_0 -ATPase aus *Bacillus PS3* konnte zum ersten Mal von Noji *et al.* (1997) nachgewiesen werden. Die Rotation wurde durch ein an die γ -Untereinheit gebundenes fluoreszierendes Actin-Filament visualisiert und erfolgte entsprechend der dreifachen Anzahl der $\alpha\beta$ -Dimere in Schritten von 120° (Yasuda *et al.*, 1998; Hisabori *et al.*, 1999). Um einen Einfluß des Actin-Filamentes auf die Rotation auszuschließen, wurde in neueren Arbeiten ein einzelnes Fluorophor verwendet. Auch bei dieser geringeren Ladung konnte eine Rotation der Untereinheit γ in Schritten von 120° beobachtet werden (Adachi *et al.*, 2000).

Die Funktion der F_0 -Domäne besteht zum einen in der Verankerung der ATPase in der Cytoplasmamembran und zum anderen in der Katalyse des Protonentransfers über die Cytoplasmamembran. Durch die Beobachtung, daß sich die ATP-Synthese und die Protonentranslokation durch eine kovalente Bindung des Hemmstoffes Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) an die c -Untereinheit inhibieren ließ, wurde schon recht früh eine Beteiligung der Untereinheit c an der Protonentranslokation vermutet (Fillingame, 1975; Altendorf und Zitzmann, 1975). Durch eine Reihe unterschiedlichster experimenteller Ansätze wurde erkannt, daß Aspartat-61 der *E. coli* c -Untereinheit direkt an der Protonentranslokation beteiligt ist. Dieses Carboxylat ist als Aspartat oder Glutamat in allen ATP-Synthasen strikt konserviert. Die Bedeutung des protonentranslozierenden Carboxylates für die ATP-Synthese wird besonders deutlich durch den Vergleich zu den V_1V_0 -ATPasen. In diesen liegen duplizierte c -Untereinheiten mit vier transmembranen Helices vor, in denen das erste protonentranslozierende Carboxylat nicht konserviert ist. Die geringere Anzahl an Carboxylaten wird als wesentlicher Grund für die Unfähigkeit der V_1V_0 -ATPase zur ATP-Synthese betrachtet. Eine Beteiligung der Untereinheit a am Protonentransfer wird aufgrund von Mutationsstudien ebenfalls vermutet. Bis heute wurden aber keine Aminosäuren identifiziert, die direkt an der Protonenbindung beteiligt sind.

Eine Beteiligung der F_0 -Domäne an der Rotation ist nach wie vor umstritten. Hinweise auf eine Beteiligung der Untereinheit c an der Rotation wurden kürzlich in Analogie zum Nachweis der γ -Rotation durch die Kopplung des c -Rings mit einem fluoreszierenden Actin-

Filament und durch Quervernetzungsexperimente erhalten (Sambongi *et al.*, 1999; Pänke *et al.*, 2000; Tsunoda *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Tsunoda *et al.*, 2001).

Modelle zur Kopplung des Protonentransfers an die Rotation postulieren eine Rotor-Stator-Struktur der F_O-Domäne. Die *a*-Untereinheit stellt in allen Modellen den Stator und der *c*-Ring den Rotor dar. Protonen fließen durch einen Kanal im Stator zur Protonenbindungsstelle im Rotor und versetzen diesen durch elektrostatische Wechselwirkungen in Rotation (Elston *et al.*, 1998; Dimroth *et al.*, 1999). Ungeklärt ist aber nach wie vor der Mechanismus der Ionentranslokation und ihre genaue Kopplung an die ATP-Synthese. Zur Aufklärung dieser Fragen kann das Studium von ATPasen mit ungewöhnlichen Eigenschaften und alternativen Kopplungslösungen neue Ansatzpunkte bieten. In den letzten Jahren gewann daher das Studium von Rotationsmaschinen (Flagellen und ATPasen), die als alternatives Kopplungslösung Na⁺ nutzen, an Bedeutung.

1.3 Na⁺-translozierende Proteine und ihre Bedeutung für die Bioenergetik

In einigen Fällen kann es für Bakterien vorteilhafter sein, Na⁺ statt H⁺ als Kopplungslösung zu nutzen. Dies ist z. B. der Fall bei hohen Temperaturen, die zu einer erhöhten H⁺-Permeabilität der Cytoplasmamembranen führen, oder bei alkalischen pH-Werten (Skulachev, 1994). Daher verwundert es nicht, daß Bakterien gefunden wurden, die über Na⁺-abhängige NADH-Dehydrogenasen (Tokuda und Unemoto, 1984; Hayashi *et al.*, 1996), Cytochrom-Oxidasen (Park *et al.*, 1996), ATP-Synthasen (Hilpert und Dimroth, 1984; Heise *et al.*, 1991), Stofftransporter (Hama *et al.*, 1987; van der Rest *et al.*, 1992) und Flagellenmotoren (Hirota und Imae, 1981; Dibrov *et al.*, 1996) verfügen. Darüber hinaus wurden primäre Na⁺-Pumpen identifiziert, für die es keine entsprechenden Beispiele aus H⁺-abhängigen Energiekreisläufen gibt. So wurden Na⁺-translozierende Methyltransferasen in den methanogenen *Archaea* (Müller *et al.*, 1988; Becher *et al.*, 1992) und Na⁺-translozierende Decarboxylasen in den *Bacteria* (Dimroth, 1980; Buckel und Semmler, 1983) identifiziert. Trotz dieser Vielzahl an Na⁺-abhängigen Prozessen wurden bisher nur zwei Organismen gefunden, *Propionigenium modestum* und *A. woodii*, die ihre Bioenergetik vollständig auf Na⁺ umgestellt haben.

In *Vibrio*-Arten (Dibrov *et al.*, 1986; Atsumi *et al.*, 1992a; Kawagishi *et al.*, 1995; Kojima *et al.*, 1999a) und alkaliphilen Bakterien (Hirota und Imae, 1981, 1983; Chernyak *et al.*, 1983) wurden zuerst Na⁺-Gradienten als Triebkraft der Flagellenrotation erkannt. Die Flagellenmotoren in *V. alginolyticus* und alkaliphilen *Bacilli* wurden spezifisch durch Hemmstoffe von Na⁺-Kanälen, Amilorid und Phenamil, gehemmt (Sugiyama *et al.*, 1988; Atsumi *et al.*, 1990; Atsumi *et al.*, 1992b). Die Hemmung war auf eine direkte Konkurrenz zwischen dem Na⁺ und den Amiloriden um eine Na⁺-Bindungsstelle im Flagellenmotor zurückzuführen (Atsumi *et al.*, 1990). Durch die sukzessive Hemmung des Flagellenmotors mittels photoaktivierbarer Amilorid-Derivate, die zu einer schrittweisen Verringerung der Flagellenrotation führte, wurde in Analogie zu *E. coli* eine modulare Struktur des Motors

vermutet (Muramoto *et al.*, 1994). Durch eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration bei gleichbleibendem Membranpotential wurde die Beweglichkeit von *V. alginolyticus* ebenfalls gehemmt. Daraus wurde geschlossen, daß der Na^+ -abhängige Flagellenmotor eine Na^+ -Bindungsstelle an der cytoplasmatische Seite der Cytoplasmamembran besitzen muß (Yoshida *et al.*, 1990). Als Komponenten des Na^+ -abhängigen Flagellenmotors wurden zunächst zwei Proteine, MotX und MotY, aus *V. parahaemolyticus* identifiziert, deren abgeleitete Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeiten zu MotA oder MotB aufwies, die aber einen *mot*-Phänotyp komplementierten und deren Überexpression zu erhöhter Na^+ -Permeabilität der Cytoplasmamembran führte (McCarter, 1994a, b). Später wurden aus *V. alginolyticus* zwei Gene, *pomA* und *pomB*, kloniert, die für Proteine kodierte, welche ca. 30% Identität in ihrer Aminosäuresequenz zu MotA und MotB aus *Rhodobactersphaeroides* und *B. subtilis* aufwies (Asai *et al.* 1997). Aminosäuresubstitutionen in diesen Proteinen führten zu einem phenamilresistenten Phänotyp (Kojima *et al.*, 1997; Kojima *et al.*, 1999b). Durch die Beobachtung, daß sich die Schwimgeschwindigkeit einer *pomA*-Mutante durch den Expressionsgrad von *pomA* regulieren läßt, wurde ein direkter Nachweis der Beteiligung von PomA am Flagellenantrieb erbracht (Asai *et al.*, 1997). Mittlerweile werden die PomAB-Proteine als Bestandteile des Mot-Komplexes der Na^+ -abhängigen Flagellen betrachtet.

Erste Hinweise auf eine Na^+ -abhängige ATP-Synthese wurden von Hilpert *et al.* (1984) erhalten, die in Vesikeln von *Propionigenium modestum* eine ATP-abhängige Na^+ -Aufnahme sowie eine Stimulierung der ATP-Synthese durch Na^+ nachweisen konnten. Hemmstoffstudien zeigten, daß es sich dabei um eine F_1F_0 -ATPase handelte (Laubinger und Dimroth, 1987). Durch die Reinigung des Enzyms aus *P. modestum* und die spätere aminoterminal Sequenzierung seiner Untereinheiten konnte dies bestätigt werden. Die Na^+ -abhängige F_1F_0 -ATPase (Na^+ - F_1F_0 -ATPase) von *P. modestum* besteht wie das *E. coli*-Enzym aus acht Untereinheiten. Die *c*-Untereinheit wurde wie in den H^+ -abhängigen Enzymen durch DCCD gehemmt (Laubinger und Dimroth, 1988; Gericke und Dimroth, 1993). Diese Hemmung ließ sich durch eine Vorinkubation mit Na^+ unterbinden, was auf eine direkte Konkurrenz zwischen DCCD und Na^+ um eine Na^+ -Bindungsstelle hindeutete (Kluge und Dimroth, 1993a, b). In Analogie zu dem *E. coli*-Enzym wurde ein ionentranslozierendes Carboxylat (Glutamat-65) in der *c*-Untereinheit der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *P. modestum* nachgewiesen (Ludwig *et al.*, 1990; Esser *et al.*, 1990). Eine carboxylierte Aminosäure schien also unabhängig von der Ionenspezifität an der Ionenbindung beteiligt zu sein. Die Klonierung und Sequenzierung des *atp*-Operons aus *P. modestum* ergab eine zum *atp*-Operon aus *E. coli* identische Struktur mit den neun Genen *atpI*, *atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD* und *atpC* (Amann *et al.*, 1988; Kaim *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Krumholz *et al.*, 1992). Das Produkt von *atpI* ist keine Untereinheit der ATPasen. Es wurde zwar immunologisch in der Cytoplasmamembran von *E. coli* identifiziert, aber eine Funktion konnte ihm bisher nicht zugewiesen werden (Schnepp *et al.*, 1991). Die große Ähnlichkeit

zwischen den Na^+ - und H^+ -abhängigen F_1F_0 -aTPasen konnte am eindrucksvollsten durch die Herstellung einer Hybrid-ATPase, bestehend aus der F_1 -Domäne aus *E. coli* und der F_0 -Domäne von *P. modestum*, gezeigt werden. Dieses Enzym war aktiv und katalysierte in *E. coli* eine Na^+ -abhängige ATP-Synthese (Kaim und Dimroth, 1993). Aufgrund der großen Ähnlichkeit beider Enzyme war eine genauere Charakterisierung der Determinanten der Na^+ -Spezifität zunächst nicht möglich. Erst der Vergleich mit einer zweiten Na^+ - F_1F_0 -ATPase in dem homoacetogenen Bakterium *A. woodii* erbrachte hier Fortschritte. Da in *A. woodii* beide Rotationsmaschinen, die F_1F_0 -ATPase und das Flagellum, durch Na^+ angetrieben werden, stellt *A. woodii* ein Modellorganismus zur vergleichenden Analyse Na^+ -abhängiger Prozesse dar und soll im folgenden genauer beschrieben werden.

1.4 Aufbau und Nutzung transmembraner Na^+ -Gradienten in *A. woodii*

A. woodii ist ein anaerobes, homoacetogenes Bakterium, das in der Lage ist, sowohl heterotroph auf Hexosen und methylierten Verbindungen als auch autotroph auf $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ zu wachsen (Balch *et al.*, 1977). Bei Wachstum auf Hexosen wird ausschließlich Acetat gebildet. Die Umsetzung von Zuckern erfolgt zunächst über den Embden-Meyerhof-Weg zu Pyruvat. Das Pyruvat wird durch eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu CO_2 und Acetat umgesetzt. Das CO_2 wird allerdings nicht freigesetzt, sondern dient als Akzeptor der im Embden-Meyerhof-Weg freiwerdenden Elektronen, wodurch zwei mol CO_2 zu einem mol Acetat umgesetzt werden. Diese Reduktion wird durch einen speziellen Stoffwechselweg, den Acetyl-CoA-Weg katalysiert (Wood, 1991; Ragsdale, 1991). In diesem wird 1 mol CO_2 zunächst durch die Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert, das dann unter ATP-Verbrauch auf den C1-Carrier Tetrahydrofolat (THF) übertragen wird. Formyl-THF wird anschließend über Methylen- und Methenyl-THF zu Methyl-THF reduziert. Die Methylgruppe wird durch eine Methyltransferase vom THF zuerst auf ein Corrinoid und dann auf die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase (CODH) übertragen. Ein weiteres Mol CO_2 wird durch die CODH zu CO oxidiert und mit der Methylgruppe zu Acetyl-CoA kondensiert. Das Acetyl-CoA wird schließlich durch die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase zu Acetat umgesetzt, wobei ein ATP synthetisiert wird. Der Acetyl-CoA-Weg ermöglicht auch autotrophes Wachstum auf $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (Abb. 3) oder auf Methylgruppenhaltigen Substraten wie z. B. Methanol oder Vanillat. Die Methylgruppenhaltigen Substrate werden durch lösliche Methyltransferasen demethyliert und die Methylgruppen auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen (Göbner *et al.*, 1994). Das Methyl-THF wird in den Acetyl-CoA-Weg eingebracht und zu CO_2 und Acetat disproportioniert.

Die Synthese von ATP erfolgt bei heterotrophem Wachstum auf Zuckern durch Substratkettenphosphorylierung. Bei autotrophem Wachstum kann zwar ebenfalls durch die Reaktion der Acetat-Kinase 1 mol ATP pro 2 mol CO_2 durch Substratkettenphosphorylierung synthetisiert werden, da zur Aktivierung des Formiats zum Formyl-THF aber ein ATP

verbraucht wird, erfolgt bei autotrophen Wachstum keine Netto-ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung. Die Netto-Synthese von ATP kann also bei autotrophen Wachstum nur über einen chemiosmotischen Mechanismus erfolgen. Aus einigen homoacetogenen Bakterien, wie z. B. *Moorella thermoacetica*, ist bekannt, daß sie ein transmembranes elektrochemische Protonenpotential aufbauen (Baronofsky *et al.*, 1984) und eine H⁺-getriebene ATP-Synthase besitzen (Ivey und Ljungdahl, 1986; Das und Ljungdahl, 1997). In der Cytoplasmamembran dieser homoacetogenen Organismen wurden Redoxcarrier (Menaquinone und Cytochrome) nachgewiesen (Gottwald *et al.*, 1975), und die membrangebundene Methylen-THF-Reduktase wird als primäre H⁺-Pumpe favorisiert (Hugenholz und Ljungdahl, 1990). Untersuchungen an *A. woodii* zeigten jedoch, daß dieser Mechanismus der Energiekonservierung nicht in allen homoacetogenen Bakterien konserviert ist. Na⁺ führte zu einer Stimulierung des Wachstums von *A. woodii* auf Fruktose und waren unerlässlich bei autotrophen Wachstum (Heise *et al.*, 1989). Na⁺-Ionophore, aber nicht Protonophore, führten zum Zusammenbruch des transmembranen Na⁺-Gradienten, was die Bildung dieses Gradienten durch eine primäre Na⁺-Pumpe belegte. Durch die Nutzung von Substraten verschiedener Redoxstufen konnte die den Na⁺-Gradienten aufbauende Reaktion auf die Umsetzung vom Methylen-THF zum Methyl-CODH eingeschränkt werden. Die beiden an diesen Reaktionen beteiligten Enzyme, die Methylen-THF-Reduktase und die Methyl-THF:Co/FeS-P-Methyltransferase, katalysieren exergone Reaktionen. Die Methylen-THF-Reduktase war allerdings ausschließlich im Cytoplasma nachzuweisen (Heise, 1992), so daß nur die Methyltransferase als Na⁺-Pumpe in Frage kommt. Ein direkter Nachweis dieser Hypothese gelang bisher jedoch nicht. Unterstützt wird diese Hypothese allerdings durch den Vergleich zu den methanogenen *Archaea*, in denen eine Na⁺-pumpende Methyltransferase im Acetyl-CoA-Weg nachgewiesen wurde (Müller *et al.*, 1988; Becher *et al.*, 1992). Zudem zeigten Dangel *et al.* (1987), daß in der Cytoplasmamembran von *A. woodii* Corrinnoide, die Cofaktoren des Methylgruppentransfers, vorliegen, während diese in H⁺-abhängigen Homoacetogenen nicht nachgewiesen wurden. Obwohl also die Na⁺-translozierende Reaktion noch nicht nachgewiesen werden konnte, ist die Acetatbildung aus H₂ + CO₂ mit dem Aufbau eines primären Na⁺-Gradienten verbunden, der für die Synthese von ATP genutzt werden könnte.

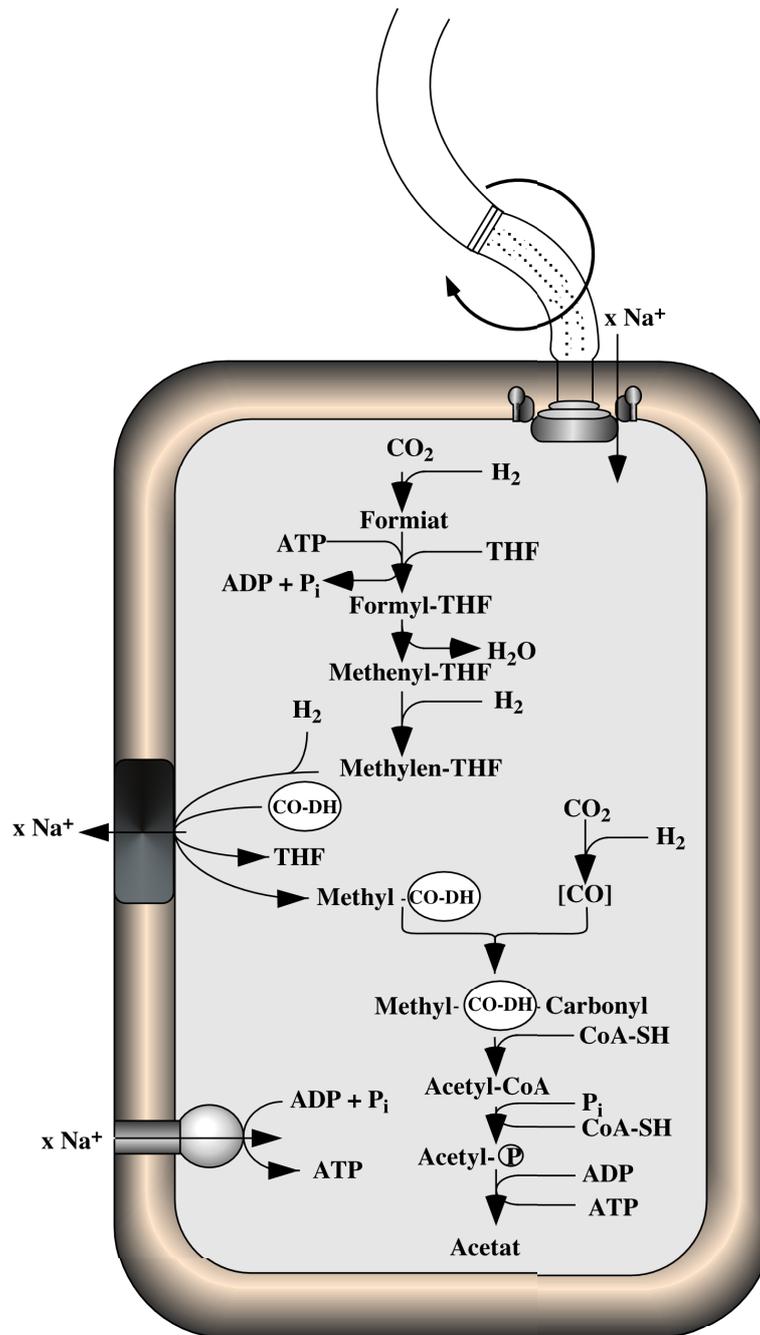


Abb. 3. Schematische Darstellung des Na⁺-abhängigen Energiestoffwechsels in *A. woodii*. Es ist der Zustand während autotrophen Wachstums auf H₂ + CO₂ gezeigt. THF: Tetrahydrofolat; CO-DH: CO-Dehydrogenase.

An ruhenden Zellen von *A. woodii* ließ sich auch eine Na⁺-abhängige ATP-Synthase nachweisen (Heise *et al.*, 1989). Durch Hemmstoffstudien wurde die ATP-Synthase als ein Enzym des F₁F₀-Typs identifiziert (Heise *et al.*, 1992, 1993). Die Reinigung und Analyse des Enzyms ergab eine Untereinheitenzusammensetzung aus sechs Proteinen, die als die Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ identifiziert wurden. Das in Liposomen rekonstituierte Enzym katalysierte einen ATP-abhängigen Na⁺-Transport (Reidlinger und Müller, 1994; Spruth *et al.*, 1994). Die elektronenmikroskopische Analyse des Enzyms zeigte eine Struktur, die

derjenigen der H^+ -abhängigen F_1F_0 -ATPasen entsprach (Reidlinger *et al.*, 1994). Die Untereinheiten *a* und *b* konnten allerdings in dem gereinigten Enzym nicht detektiert werden. Eine einfachere Untereinheitenzusammensetzung im Vergleich zur *E. coli*- F_1F_0 -ATPase war zuvor schon für die F_1F_0 -ATPasen der Clostridien berichtet worden. Aus *Clostridium pasteurianum* (Clarke *et al.*, 1979) wurde eine F_1F_0 -ATPase gereinigt, die nur drei Untereinheiten der F_1 - und eine Untereinheit der F_0 -Domäne besaß, was zu der Vermutung führte, daß diese ATPasen einen ursprünglichen Vorläufer darstellen (Maloney und Wilson, 1985). In den gereinigten F_1F_0 -ATPasen aus *M. thermoacetica* und *Moorella thermoautotrophica* ließen sich die Untereinheiten *a* und *b* ebenfalls nicht nachweisen (Das *et al.*, 1997). Die Klonierung und Sequenzierung der *atp*-Operone aus diesen Organismen zeigte jedoch die Präsenz offener Leserahmen, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten zu beiden Untereinheiten aufwiesen (Das und Ljungdahl, 1997). Die Klonierung und Sequenzierung des *atp*-Operons aus *A. woodii* erbrachte dasselbe Ergebnis (Rahlfs und Müller, 1997, 1999; Forster *et al.*, 1995; Rahlfs *et al.*, 1999). Auch in *A. woodii* wurden offene Leserahmen gefunden, deren potentielle Produkte Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten *a* (*atpB*) und *b* (*atpF*) aufwiesen. Durch Northern-Blot-Analysen wurde nachgewiesen, daß das *atp*-Operon von *A. woodii* als ein ca. 10 kBp großes Transkript abgelesen wird (Rahlfs *et al.*, 1999). Die bereits oben beschriebene Bedeutung der Untereinheiten *a* und *b* macht es außerdem schwerlich vorstellbar, daß eine ATP-Synthase ohne diese Untereinheiten funktionsfähig wäre. Daher bestand die vordringliche Aufgabe, die An- oder Abwesenheit der Untereinheiten *a* und *b* in der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* zu überprüfen.

Die Sequenzierung des *atp*-Operons aus *A. woodii* brachte neben der Identifizierung der Gene *atpB* und *atpF* eine Besonderheit dieser Na^+ - F_1F_0 -ATPase zu Tage. Das *atp*-Operon aus *A. woodii* entspricht denen bekannter bakterieller F_1F_0 -ATPasen, mit der Genabfolge *atpI*, *atpB* (Untereinheit *a*), *atpE* (Untereinheit *c*), *atpF* (Untereinheit *b*), *atpH* (Untereinheit δ), *atpA* (Untereinheit α), *atpG* (Untereinheit γ), *atpD* (Untereinheit β) und *atpC* (Untereinheit ϵ) (Walker *et al.*, 1984). Abweichend von diesem Schema besitzt das *atp*-Operon aus *A. woodii* drei aufeinanderfolgende Gene, die für die Untereinheit *c* (*atpE₁*, *atpE₂*, *atpE₃*) kodieren (Rahlfs *et al.*, 1999). Zwei von diesen (*atpE₂* und *atpE₃*) kodieren für typische *c*-Untereinheiten der F_1F_0 -ATPasen mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 8 kDa und sind in ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz völlig identisch. Das dritte Gen (*atpE₁*) kodiert für eine verdoppelte *c*-Untereinheit mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 18 kDa. Diese Untereinheit besitzt zudem in ihrer ersten Hälfte an der Position des Na^+ -translozierenden Carboxylates (Glutamat) ein Glutamin. Duplizierte und triplizierte *c*-Untereinheiten (auch Proteolipide) waren bisher nur aus den A_1A_0 -ATPasen (Müller *et al.*, 1999; Ruppert *et al.*, 1999, 2001) und den V_1V_0 -ATPasen (Arai *et al.*, 1988) bekannt. Duplizierte *c*-Untereinheiten mit nur einem ionentranslozierenden Carboxylat waren zudem nur in den V_1V_0 -ATPasen anzutreffen und wurden für deren Unfähigkeit zur ATP-Synthese

verantwortlich gemacht (Nelson und Taiz., 1989). Es stellt sich damit natürlich die Frage, ob die Untereinheit c_1 tatsächlich Bestandteil der Na^+ - F_1F_0 -ATPase in *A. woodii* ist.

Neben der ATP-Synthese ist auch die Beweglichkeit von *A. woodii* Na^+ -abhängig, wobei die Schwimmgeschwindigkeit proportional mit der Na^+ -Konzentration anstieg und bei 50 mM NaCl ein Maximum erreichte. Die Beweglichkeit wurde außerdem durch Phenamil gehemmt (Müller und Bowien, 1995). Durch die Präsenz zweier Na^+ -abhängiger sekundärer Energiekonverter in einem Organismus bietet sich die Gelegenheit, durch den direkten Vergleich beider Systeme wesentlich zum Verständnis der Na^+ -Translokation und ihrer Kopplung an die Rotation beizutragen. In Bezug auf das Flagellum stellt sich zunächst die Frage nach seiner Ultrastruktur. Zudem ist für eine genauere Charakterisierung eine molekulare Analyse der Flagellengene unerlässlich.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Wie gezeigt, sind Flagellenmotoren und F_1F_0 -ATPasen rotatorische Maschinen, die durch ein transmembranes elektrochemisches Ionenpotential angetrieben werden. Ungeklärt ist nach wie vor der Mechanismus der Ionentranslokation und seine Kopplung an die Rotation. Der Vergleich von Prozessen mit unterschiedlicher Ionenspezifität kann einen bedeutenden Beitrag zur Klärung der Rotationsmechanismen leisten. Da in *A. woodii* beide Rotationsmechanismen Na^+ -abhängig sind, eignet sich dieses Bakterium besonders für solche Studien. Allerdings ist vor einer detaillierten Funktionsanalyse erst die Struktur des Flagellums und der Na^+ - F_1F_0 -ATPase zu klären. Daher stand in dieser Arbeit die Klärung der Untereinhenzuzusammensetzung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase und ihre Reinigung sowie die strukturelle Analyse des Flagellums im Vordergrund.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>A. woodii</i> (DSMZ1030)	Wildtyp	Balch <i>et al.</i> (1977)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F Φ 80 Δ / <i>lacZ</i> M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hspR17</i> (<i>r_km_k⁺</i>) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i> JM109	F(<i>traD36 proAB⁺ lacI^qZ</i> Δ M15) Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 hsdR17 relA1 supE44</i> λ	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)

Tab. 2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pBluescript SKII ⁺ (pBSK ⁺ II)	Ap ^r , <i>lacZ'</i> , <i>colE1</i> , <i>oriR</i>	Fa. Stratagene (San Diego, USA)
pHSG399	Cm ^r , <i>lacZ'</i>	Fa. Takara Shuzo Co. (Kyoto, Japan)
pHSG398	Cm ^r , <i>lacZ'</i>	Fa. Takara Shuzo Co. (Kyoto, Japan)
pHK2	<i>pomAB</i> von <i>V. alginolyticus</i> in pSU2	Asai <i>et al.</i> (1997)
pMalc2	Ap ^r , <i>malE</i> , <i>lacI</i> , P _{tac} , <i>lacZ</i> , M13 <i>ori</i>	New England Biolabs (Beverly, USA)
pMalc1.4	<i>atpE₁</i> in pMalc2X	Rahlfs (1998)

Tab. 3. Plasmid-Konstrukte

Plasmidname	Insert	Insertionsgröße (Bp)	Ursprungsvektor
pSA1	<i>fliC</i> in pBSK ⁺	1090	pBSK ⁺ II
pSA6	<i>Cla</i> I: (<i>flgK</i>) ^a <i>flgL</i> , <i>orfA</i> , (<i>fliC</i>)	2824	pBSK ⁺ II
pSA6-1	<i>Cla</i> I/ <i>Hind</i> III: (<i>flgK</i>), (<i>flgL</i>)	847	pBSK ⁺ II
pSA6-2	<i>Hind</i> III/ <i>Cla</i> I: (<i>flgL</i>), <i>orfA</i> , (<i>fliC</i>)	1977	pBSK ⁺ II

Fortsetzung Tab. 3

Plasmidname	Insert	Insertionsgröße (Bp)	Ursprungsvektor
pSA6-3	<i>ClaI/SacI: (flgK), flgK, (orfA)</i>	1569	pBSK ⁺ II
pSA6-4	<i>SacI/ClaI: (orfA), (fliC)</i>	1255	pBSK ⁺ II
pSA13	<i>HindIII: (flgL), orfA, fliC, orfB, orfC, (orfD)</i>	5003	pBSK ⁺ II
pSA13-2	<i>ClaI: (fliC), (orfB)</i>	1281	pBSK ⁺ II
pSA13-4	<i>ClaI: (orfB), orfC, (orfD)</i>	1640	pBSK ⁺ II
pSA13-7	<i>EcoRI: (fliC), orfB, (orfC)</i>	1037	pBSK ⁺ II
pSA6-399	<i>KpnI/EcoRI</i> aus pSA6: <i>(flgL), flgK, orfA, (fliC)</i>	2824	pHSG399
pSA64-398	<i>SacI/XbaI</i> aus pSA6: <i>(orfA), (fliC)</i>	1255	pHSG398
pMalatpF	<i>EcoRI/PstI: atpF</i> (1 552)	552	pMalc2X
pMalatpD	<i>EcoRI/PstI: atpD</i>	1398	pMalc2X
pMalatpB*	<i>EcoRI/PstI: atpB</i> (433 633)	200	pMalc2X
pMalatpF*	<i>EcoRI/PstI: atpF</i> (190 552)	362	pMalc2X
pMalatpE ₁ *	<i>EcoRI/PstI: atpE₁</i> (152 214)	62	pMalc2X

^aGene in Klammern liegen nicht vollständig auf den Plasmiden vor

Tab. 4. Verwendete Oligonukleotide

Name	Bindungsort ^a	Sequenz (5'→3') ^b
OS1	<i>fliC</i> von <i>A. woodii</i> 2465 - 2481	CGGAATTCATHAAYCAYAAYATHGC
OS6	<i>fliC</i> von <i>A. woodii</i> 3556 - 3539	CCGGAATTCGRTTTTGNACNGCNCC
OS12	<i>fliC</i> von <i>A. woodii</i>	CGGAATTCARAAYATGGARAARYT
OS14	<i>fliC</i> von <i>A. woodii</i>	CGGAATTCGGYTGYTGRTTNGCYTG
Ppsa6+2	<i>flgL</i> von <i>A. woodii</i> 286 - 267	CTTAAACACCCATCTTATTG
PpSA6+1	intergener Bereich zwischen <i>orfA</i> und <i>fliC</i> 2262 - 2243	AACGTCATTAATGGGGTTGC
PpSA61	<i>flgL</i> von <i>A. woodii</i> 458 - 477	GTCTTCTGCCGTTAGAGGGT

Fortsetzung Tab. 4

Name	Bindungsort ^a	Sequenz (5' → 3') ^b
PpSA62	<i>flgL</i> von <i>A. woodii</i> 1237 - 1256	TTGATGGTGTGATGCTGCC
PpSA63	intergener Bereich zwischen <i>orfA</i> und <i>fliC</i> 2243 - 2262	GCAACCCCATTAATGACGTT
PSA11P1	<i>fliC</i> von <i>A. woodii</i> 3055 - 3078	AGCACAACAGACTGCCAAAGGAAC
PSA1P1	<i>fliC</i> von <i>A. woodii</i> 2670 - 2693	CGTTAATTCAAACGGCAGAAGGCG
mothin1	<i>MotA</i>	ATGGARGARCGNCAYAG
mothin2	<i>MotA</i>	ATGGARGARAGACAYAG
motrück1	<i>MotB</i>	GANARYTCCCAR T THGA
motrück2	<i>MotB</i>	GANARYTCCCAR T TACT
pAtpB1	<i>atpB</i> von <i>A. woodii</i> 1156 - 1179	GTAATTGGGGAATTCGCTAATCCC
pAtpB2	<i>atpB</i> von <i>A. woodii</i>	GTTCCCTCCAAGCTGCAGCATAA
pAtpF1	<i>atpF</i> von <i>A. woodii</i> 2560 - 2583	GGTGATTCAGAATTCAAAACTTG
pAtpF2	<i>atpF</i> von <i>A. woodii</i> 3147 - 3124	CGTATTTACCTGCAGCTAAACTCA
PatpF3	<i>atpF</i> von <i>A. woodii</i> 2761 - 2780	GTGACGGCTGAATTCCTCGG
PatpE ₁ 3	<i>atpE₁</i> von <i>A. woodii</i> 1539 - 1559	ATCGGACAGGAATTCGCGGCC
PatpE ₁ 4	<i>atpE₁</i> von <i>A. woodii</i> 1634 - 1613	TGCTCCTAGCTGCAGAATCAT
PatpD1	<i>atpD</i> von <i>A. woodii</i> 6207 - 6224	GGTTAGTGGAATTCGCCC
PatpD2	<i>atpD</i> von <i>A. woodii</i> 7651 - 7632	TCTGAAAGCTGCAGCCATTA

Fortsetzung Tab. 4

<i>fliG</i> _{back}	<i>fliG</i>	GGATGTTTCYTGYTGRATAAA
<i>fliG</i> _{hin}	<i>fliG</i>	AAACARAAAGCNGCNATTTT

^a Es sind die Namen der Gene sowie die Basenpaare bezogen auf die in dieser Arbeit veröffentlichten Sequenzen bzw. die in Datenbanken (Genbank U150505) hinterlegten Sequenzen angegeben.

^b Restriktionsschnittstellen in den Sequenzen sind unterstrichen. Für degenerierte Basen in den Oligonukleotiden wurden folgende Abkürzungen verwendet:

H = ACT, N = ACGT, R = AG, Y = CT

2.2 Anzucht von Organismen**2.2.1 Medien**Carbonat-gepuffertes Medium für *A. woodii*

K ₂ HPO ₄	0,2 g	1,5 mM
NH ₄ Cl	0,25 g	4,7 mM
CaCl ₂	0,11 g	1 mM
KCl	0,5 g	6,7 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,45 g	1,63 mM
NaCl	1,16 g	20 mM
Hefeextrakt	2,0 g	
Spurenelementelösung SL9	2 ml	
Selenitlösung	1 ml	
Vitaminlösung	2 ml	
KHCO ₃	6,0 g	60 mM
Resazurin	1,0 mg	
Cystein-HCl	0,5 g	
pH	7,0 - 7,2	

Selenitlösung

NaOH	0,5 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	3 mg
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	4 mg
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Spurenelementelösung (SL9)

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,8 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ x 2H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg
Nitrilotriessigsäure	12,8 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Die Vitaminlösung wurde als 10fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und entsprach in ihrer Zusammensetzung den Angaben im DSMZ-Katalog (Medium Nr. 141). Kulturen, die zur Herstellung gewaschener Membranen dienten, wurden zusätzlich mit 0,4% Glycin supplementiert.

2.2.2 Anzucht von *A. woodii*

Die Herstellung der anaeroben Medien für *A. woodii* erfolgte durch Begasen des Mediums im Kulturgefäß mit N₂/CO₂ bis ein pH von 7,0 - 7,2 erreicht wurde. Die Substrate wurden nach dem Autoklavieren aus anaeroben Stammlösungen mit sterilen Plastikspritzen zu den Medien gegeben. *A. woodii* wurde auf Carbonat-gepuffertem Medium bei 30°C unter einer N₂/CO₂Atmosphäre angezogen. Zur Herstellung von zellfreien Extrakten wurden Kulturvolumina von 0,3 und 1 l in 1-l-Serumflaschen (Fa. Müller Krempel, Schweiz) bzw. 2-l-Steilbrustflaschen (Fa. Schott, Mainz, BRD) verwendet. Zur Herstellung von gewaschenen Membranen wurden 17,5-l-Kulturen in 20-l-Steilbrustflaschen (Fa. Schott, Mainz, BRD) herangezogen. Bei den 17,5-l-Kulturen wurde neben dem Substrat auch KHCO₃ und Cystein erst nach dem Autoklavieren zugegeben, da diese Medien offen autoklaviert werden mußten. Als Substrate dienten Fruktose (20 mM), Methanol (60 mM), Formiat (200 mM) oder H₂/CO₂ (80:20, v:v).

2.2.3 Anzucht von *E. coli*

E. coli DH5α wurde aerob in Luria-Bertani-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C angezogen. Die Medien wurden mit 100 µg Ampicillin/ml Medium bzw. 50 µg Chloramphenicol/ml Medium versetzt. Bei Nutzung von *lac*-Promotoren in Expressions-Versuchen wurde Glucose mit einer Endkonzentration von 1% in die Vorkulturen gegeben, um die basale Transkription möglichst weitgehend zu hemmen. Zur Selektion auf

rekombinante Klone wurden Agarplatten mit 48 µg IPTG /ml Medium und 40 µg X-Gal /ml Medium supplementiert, um eine Blau-Weiß -Selektion zu ermöglichen.

2.3 Herstellung von Sphäroplasten aus *A. woodii*

Für die Herstellung von Sphäroplasten zur Reinigung der Flagellen wurde *A. woodii* in 17,5-l-Kulturen auf Carbonat-gepuffertem Medium, das mit 420 mM Saccharose und 0,4% Glycin supplementiert war, angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wurde den Kulturen 0,6 g Penicillin zugesetzt. Die Protoplastierung wurde lichtmikroskopisch verfolgt. Sie war außerdem an der Reduktion der OD₆₀₀ (ca. zwei Generationszeiten nach der Penicillinzugabe) zu erkennen. In der Regel war nach 20 h Wachstum und bei einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,2 eine vollständige Sphäroplastenbildung erreicht. Die Sphäroplasten wurden geerntet, in Protoplastenpuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 420 mM Saccharose, pH 8) resuspendiert und sofort weiterverarbeitet.

2.4 Herstellung gewaschener Membranen

Zur Herstellung gewaschener Membranen für die Expressionsstudien und die Reinigung der Na⁺-F₁F₀-ATPase wurde *A. woodii* im 17,5-l-Maßstab in 20-l-Steilbrustflaschen in Carbonat-gepuffertem Medium, das mit 0,4% Glycin supplementiert war, angezogen. Nach der Zellernte (20 min, 6.000 x g, 4°C, Sorvall GS3-Rotor, Zentrifuge Sorvall RC5B, Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) bei einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,2 wurden die Zellen (20 - 30 g Naßgewicht) in 200 ml Erntepuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) resuspendiert und viermal gewaschen. Die Zellen wurden dann in 200 ml Protoplastenpuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 420 mM Saccharose, pH 8) aufgenommen, mit 0,5 g Lysozym versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer niedertourigen Zentrifugation (20 min, 6.000 x g, 4°C) wurden die Zellen in 30 ml Protoplastenpuffer und etwas DNase I resuspendiert und zwei- bis dreimal in der "French Pressure Cell Press" (Fa. Amicon, Silver Spring, USA) mit 1.000 psiG aufgeschlossen. Die Suspension wurde mit Protoplastenpuffer auf 200 ml aufgefüllt, und ganze Zellen wurden dann durch niedertourige Zentrifugationen (20 min, 6.000 x g, 4°C) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Membranen durch eine hochoourige Zentrifugation (1,5 h, 120.000 x g, 4°C, Ti50.2-Rotor, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA, Ultrazentrifuge Sorvall OTD 75B, Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) sedimentiert und anschließend zweimal durch hochoourige Zentrifugationen gewaschen. Wurde auch die Cytoplasmafraktion benötigt, so wurde der Überstand nach der ersten Ultrazentrifugation ebenfalls zweimal hochoourig zentrifugiert. Die gewaschenen Membranen wurden in 10 ml Membranpuffer (50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0,5 mM PMSF, 17% Glycerin, pH 7,5) aufgenommen und auf Eis gelagert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Standardmethoden

In aller Regel wurden Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) zur Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA mit Enzymen der Firmen MBI-Fermentas (St. Leon Rot, BRD) und Roche (Mannheim, BRD) nach den Herstellerangaben verwendet. Plasmide wurden aus *E. coli* nach der Methode von Holmes und Quickley (1981) und, sofern sehr reine Präparationen nötig waren, mittels des Qiagen Mini-Prep-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, BRD) isoliert. Chromosomale DNA aus *A. woodii* wurde wie von Rahlfs und Müller (1997) beschrieben isoliert. Die Analyse von DNA erfolgte durch Elektrophorese mit 0,7%igen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,114% Essigsäure, pH 8). Die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch die CaCl₂-Methode von Cohen *et al.* (1972) und Inoue *et al.* (1990). Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

Die Ermittlung von DNA-Sequenzen erfolgte zu Beginn der Arbeit nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) mit dem Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) und [$\alpha^{35}\text{S}$]-dATP. Später wurde DNA automatisch mit fluoreszenzmarkierter DNA an einem ABI PrismTM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems GmbH/Perkin Elmer, Washington, GB) sequenziert.

2.5.2 Aufreinigung von DNA mittels Glasmilch

Diese Methode wurde überwiegend zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen, aber auch zur Konzentrierung gelöster DNA genutzt. DNA aus Agarosegelen wurde ausgeschnitten, mit drei Volumen NaJ-Lösung (16,5 M NaJ, 90 mM Na₂SO₃) versetzt und solange bei 50°C inkubiert bis die Agarose aufgelöst war (5 - 10 min). Sollte bereits gelöste DNA aufkonzentriert werden, wurde die Inkubation bei 50°C nicht durchgeführt. Hiernach wurden 20 µl Glasmilch (Vogelstein und Gillespie, 1979) zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Die an die Glasmilch-gebundene DNA wurde abzentrifugiert (30 s, 21.000 x g, Hettich Mikro 2448-Zentrifuge, Fa. Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, BRD) und zweimal mit 500 µl „New Wash“-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7, 1 mM EDTA, 50% Ethanol, v:v) gewaschen. Zur Ablösung der DNA von der Glasmilch wurden die Sedimente nach dem Waschen in 20 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Glasmilch wurde durch vier Zentrifugationen (60 s, 21.000 x g, Hettich Mikro 2448-Zentrifuge, Fa. Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, BRD) aus dem Ansatz entfernt.

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et. al.*, 1986) wurde in 100 µl Ansätzen in einem Minicycler MJ der Fa. Biometra (Göttingen, BRD) mit den Komponenten des "Taq-PCR-Core-Kits" der Fa. Qiagen (Hilden, BRD) durchgeführt. Die Programme umfaßten eine fünfminütige Denaturierung der DNA bei 95°C, gefolgt von einer Inkubation bei 85°C für 2 min zur Zugabe der Taq-Polymerase und 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 30 s), Anlagerung (35 - 60°C, 1 min) und Synthese (72°C). Das Programm wurde mit einer Inkubation bei 72°C für 10 min abgeschlossen in der Abbruchfragmente aufgefüllt wurden. Bei Verwendung homologer Oligonukleotide wurde mit Anlagerungstemperaturen von 50 und 60°C gearbeitet. Bei Verwendung degenerierter Oligonukleotide wurde die Anlagerungstemperatur mit 35°C beginnend sukzessive erhöht, bis ein Produkt der gewünschten Größe erhalten wurde. In diesen Fällen wurde den Ansätzen auch Q-Lösung (Fa. Qiagen, Hilden, BRD) und MgCl₂ in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die Länge der Synthesezeit stützte sich auf die Angabe des Herstellers der Taq-Polymerase, daß diese ca. 1.000 Bp pro min amplifiziert.

2.5.4 Transfer von DNA auf Nylonmembranen

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden nach der Kapillarblot-Methode von Southern (1975) auf Nylonmembranen (Hybond N, Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) transferiert. DNA wurde zunächst in einem 0,7%igen Agarosegel mit den Maßen 14,5 cm x 11,5 cm x 1 cm (Breite x Länge x Höhe) aufgetrennt. Das Agarosegel wurde dann dreimal 10 min in 0,25 M HCl, zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 30 min in Neutralisierungspuffer (3 M NaCl, 1 M Tris, pH 7) geschwenkt. Ein auf Gelgröße zurecht geschnittenes Stück Nylonmembran (Hybond N, Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurde mit H₂O und 10 x SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Na₃Citrat) angefeuchtet. Zum Transfer wurden vier Lagen Whatman-Papier, das Agarosegel, die Membran, vier Lagen Whatman-Papier und ca. 10 cm Saugpapier übereinander geschichtet und beschwert. Die untere Lage Whatman-Papier war mit einem Pufferreservoir (10 x SSC) verbunden. Der Transfer erfolgte für 16 - 20 h und wurde durch Färbung des Agarosegels nach dem Transfer überprüft. Die DNA wurde auf den Membranen durch eine Inkubation für 2 h bei 80°C fixiert.

2.5.3 Transfer von Zellen auf Nylonmembranen zur Koloniehybridisierung

Zur Analyse großer Mengen rekombinanter Klone wurden diese nach der Methode von Buluwela *et al.* (1989) auf runde Nylonmembranen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB,

Uppsala, Schweden) übertragen. Die Analyse erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit einem [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP-markierten DNA-Fragment (siehe 2.5.3).

2.5.4 DNA-DNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur DNA-DNA-Hybridisierung wurden DNA-Fragmente eingesetzt, die mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP unter Verwendung des „random primed labelling Kit“ der Firma Life Technologies GmbH (Karlsruhe, BRD) markiert wurden. Freies [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP wurde durch eine Gelfiltration über eine NAP-5-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) abgetrennt. Die Vor- und Haupthybridisierung erfolgte in Hybridisierungsröhrchen (Länge 15 cm, Durchmesser 4 cm, Fa. Ochs, Göttingen, BRD) in einem Hybaid-Minihybridisierungs-ofen (Fa. Biometra, Göttingen, BRD) bei 35 - 42°C (heterologe DNA-Sonden) oder 60°C (homologe DNA-Sonden). Die Hybridisierungslösung setzte sich aus 20% Hybridisierungspuffer (250 mM Tris, 22,5 mM Na₂Pyrophosphat, 25 μM Ficoll400, 28 μM Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA, w:v), 20% Dextransulfat (50% in H₂O, w:v), 10% SDS (10% in H₂O, w:v) und 1 M NaCl zusammen. Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf eine Membran mit den Maßen 14,5 cm x 11,5 cm x 1 cm (Breite x Länge x Höhe) oder auf zwei Membranfilter. Die Membranen wurden zunächst in 20 ml Hybridisierungslösung für 4 h vorhybridisiert. Die Haupthybridisierung erfolgte nach der Zugabe von 250 μl der DNA-Sonde für mindestens 12 h. Die Membranen wurden hiernach 15 min mit 6x SSC-Puffer (900 mM NaCl, 90 mM Na₃Citrat) bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen. Signale wurden durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen (X-OMAT-AR-Röntgenfilme, Fa. Kodak, Stuttgart) detektiert. War hiernach die Hintergrundstrahlung zu hoch, wurde nochmals mit geringeren Salzkonzentrationen oder bei höheren Temperaturen gewaschen.

2.5.4 Heterologe Expression von Genen in Minizellen von *E. coli* DK6

Die Expression von Genen in Minizellen beruhte auf der Methode von Homma *et al.* (1985). Hierzu wurden die Plasmide zunächst in *E. coli* DK6 transformiert. Zur Isolierung der Minizellen wurden 5 ml einer ausgewachsenen Kultur in 250 ml LB mit 1% Glucose in 2-l-Schikanekolben für 18 - 20 h bei 37°C schüttelnd angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Das Sediment wurde in 1 ml SG-Puffer (0,15 M NaCl, 4,2 mM Na₂HPO₄, 2,2 mM KH₂PO₄, 0,01% Gelatine) resuspendiert, auf einen 20%igen Saccharose-Dichtegradienten geladen und für 15 min mit 3.400 x g im Sorvall SW27-Rotor (Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) zentrifugiert. Die Saccharose-Dichtegradienten besaßen ein Gesamtvolumen von 32 ml und wurden durch dreimaliges Einfrieren (20°C) und Auftauen einer 20%igen Saccharoselösung in SG-Puffer hergestellt. Die Minizell-haltige Fraktion wurde nach der Zentrifugation mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und mit 10 ml SG-Puffer versetzt. Die Minizellen wurden dann sedimentiert, in

1 ml SG-Puffer resuspendiert und ein zweites Mal auf einen Saccharose-Dichtegradienten geladen. Nach der zweiten Dichtegradientenzentrifugation wurden die Minizellen erneut sedimentiert und dann in 4 ml SG-Puffer aufgenommen. Nachdem die OD₆₀₀ der Zellsuspension bestimmt worden war, wurden die Minizellen wieder sedimentiert und in Methionin-Markierungspuffer (2,6 g "methionine assay medium", Fa. BD Bioscience, San Jose, USA, in 100 ml 42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8,6 mM NaCl, 18,9 mM NH₄Cl, pH 7,4) so resuspendiert, daß eine OD₆₀₀ von 1 erreicht wurde.

Zur Expression wurden 100 µl Minizellen zunächst mit Glucose in einer Endkonzentration von 1% und 2 µl Penicillin (0,1%; w:v) für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde zu den Ansätzen 1 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) und 2 µl IPTG (24 mg/ml H₂O) gegeben. Nach 30 min bei 35°C wurden die Zellen sedimentiert, einmal in TN-Puffer (50 mM Tris-HCl, 0,5% NaCl, pH 7,8) gewaschen und dann in einem Gemisch aus 50 µl TN-Puffer, 10 µl TDG-Puffer (0,4 M Tris, 6% SDS, 38% Glycerin, 0,004% Bromphenolblau, pH 6,8) und 2 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Nach der Denaturierung der Proben durch Kochen für 10 min erfolgte die weitere Analyse durch eine Auftrennung der Proteine im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel und durch Autoradiographie.

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

Die Expression von *malE*-Fusionsgenen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in *E. coli* DH5α in LB-Medium bei 37°C. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch IPTG in einer Endkonzentration von 0,3 mM induziert. Die Zellen wurden 4 h nach der Induktion geerntet und in der French-Press aufgebrochen. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte durch eine Affinitätschromatographie über eine Amylose-Matrix nach Angaben des Herstellers (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) in PD-10-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden).

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Standardmethoden

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Lowry (1951) in der modifizierten Form von Kresze (1983). Bei Bestimmung stark hydrophober Proteine wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll verwendet, bei dem die Denaturierung der Proteine in NaOH auf 2 h ausgedehnt und die Carbonat-Lösung zusätzlich mit 0,5 M NaOH versetzt wurde. Da die Zugabe des Folin-Reagenz in Gegenwart nichtionischer Detergenzien zur Fällung von Proteinen führen kann, wurden solche Proben mit der 10fachen Konzentration an SDS versetzt (Dulley und Grieve, 1974).

Die Proteinbestimmung an ganzen Zellen erfolgte nach Schmidt *et al.* (1963).

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden Zellultrans-Dialyseschläuche (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, BRD) mit einer Porengröße von 18 Å genutzt. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für 12 h gegen das 200fache Probenvolumen.

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden diese in Dialyseschläuche überführt und mit PEG6000 bei 4°C inkubiert bis die gewünschte Verringerung des Probenvolumens erreicht war. Zur Konzentrierung der Na⁺-F₁F₀-ATPase wurden Vivaspin 20-Röhrchen der Fa. Sartorius (Göttingen, BRD) genutzt.

Die Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen erfolgte bei 100 V für 12 h in einer S&S Biotrap-Kammer (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) nach den Herstellerangaben. Als Elutionspuffer diente 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025% SDS.

2.6.2 Deglycosylierung

Zur Überprüfung einer möglichen Glycosylierung des Filamentes der *A. woodii*-Flagellen wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden Filamente durch eine Behandlung mit Trifluormethansulfonat (TFMS), das O-glycosidische Bindungen spaltet, nach der Methode von Edge *et al.* (1981) deglycosyliert. 5 mg Protein wurden in 1 ml Anisol und 2 ml TFMS gegeben, 30 s mit N₂ durchgast und dann 2 h bei 25°C schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden abschließend dialysiert. Eine erfolgreiche Deglycosylierung war bei dieser Methode, am unterschiedlichen Laufverhalten von glycosyliertem und deglycosyliertem Protein im SDS Polyacrylamidgel zu erkennen.

Eine zweite Methode beruhte auf der Oxidation benachbarter Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen in Kohlenhydraten und eine anschließende kovalente Bindung von Digoxigenin an die Aldehydgruppen. Die Detektion erfolgte durch einen mit einer alkalischen Phosphatase verknüpften anti-Digoxigenin-Antikörper. Für diesen Test wurde der "DIG Glycan Detection Kit" (Fa. Roche, Mannheim, BRD) nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Transferrin und als Negativkontrolle das Maltosebindeprotein.

2.6.3 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde ein diskontinuierliches Verfahren verwendet, bei dem das freigesetzte Orthophosphat ermittelt wird (Heinonen und Lahti, 1981). Hierzu wurde die Probe mit 1 ml Testpuffer (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl₂, pH 7,5), 10 µl NaCl (2 M) und 140 µl H₂O_{bidest.} gemischt. Nach einer fünfminütigen Vorinkubation bei 30°C erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 50 µl 0,1 M ATP. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 200 µl Proben genommen und mit 40 µl 30% TCA versetzt. Zur Entfernung der gefällten Proteine wurden die Ansätze 10 min mit 21.000 x g zentrifugiert, und 200 µl des Überstandes wurden mit 1 ml AAM-Reagenz (50 ml Aceton, 25 ml 10 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O, 25 ml 2,5 M H₂SO₄) versetzt. Nach

einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze bei 405 nm gemessen und die Orthophosphat-Menge aus einer Eichgerade abgelesen, die parallel im Bereich von 0 - 200 nmol KH_2PO_4 aufgenommen wurde. Alle Tests wurden in einem Wasserbad MT-Lauda (Fa. Lauda, Königshofen, BRD) durchgeführt. 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.

2.6.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.6.4.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte nach Schägger und Jagow (1987). Die Gele wurden mit Silber (Blum *et al.*, 1987) oder Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (Weber und Osborne, 1969).

2.6.4.2 Blue-Native-PAGE

Die Auftrennung von Proteinkomplexen im nativen Zustand zur Ermittlung ihrer Untereinheitenzusammensetzung erfolgte durch Blue-Native-PAGE (Schägger, 1994). Es wurden Gradientengele mit 4 - 13% Acrylamid und Sammelgele mit 4% Acrylamid verwendet. Die Gelplatten besaßen die Maße 1,4 cm x 1,6 cm x 0,01 cm (Breite x Höhe x Dicke). In Abweichung vom Originalprotokoll wurde als Kathodenpuffer 7,5 mM Tris, 50 mM Tricin und als Anodenpuffer 50 mM Tris (pH 7) eingesetzt.

2.6.4.3 Native Gradienten-PAGE

Die Auftrennung von nativen Proteinkomplexen erfolgte in Gradientengelen (4 - 20%) mit den Maßen 1,4 cm x 1,6 x 0,01 cm (Breite x Höhe x Dicke). Die Gele wurden mit Hilfe eines an eine "Microperplex Peristaltic Pump" angeschlossenen Gradientenmischers gegossen. In die vordere Kammer des Gradientenmischers wurden 12 ml schwere Lösung (250 mM Tris, 0,25 mM MgCl_2 , 20 % Acrylamid, 1% Bisacrylamid, 8,6% Glycerin, 0,1% Triton X-100, pH 8,5) und die hintere Kammer 12 ml leichte Lösung (250 mM Tris, 0,25 mM MgCl_2 , 4 % Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 8,6% Glycerin, 0,1% Triton X-100, pH 8,5) gegeben. Kurz vor dem Gießen wurden in beide Kammern 60 μl APS und 12 μl TEMED gegeben. Das Sammelgel wurde mit der leichten Lösung gegossen. Der Gellauf erfolgte bei 120 V für mindestens 20 - 24 h.

2.6.5 Chloroform:Methanol-Extraktion von Membranproteinen

Zur Extraktion der Proteolipide aus gewaschenen Membranen von *A. woodii* wurden diese basierend auf einem Protokoll von Beechey *et al.* (1979) mit einem Chloroform:Methanol-Gemisch extrahiert. Hierzu wurden gewaschene Membranen (80 - 320 mg Membranprotein) in 8 ml 25 mM Tris-HCl (pH 8) resuspendiert und mit 20 Volumen eines Chloroform:Methanol-Gemisches (2:1, v:v) für 22 h auf Eis gerührt. Nicht lösliches Protein wurde durch eine Filtration über eine Glasfritte entfernt und das Gemisch nach Zugabe von 0,2 Volumen H₂O erneut für 22 h auf Eis gerührt. Die organische und anorganische Phase wurden in allen folgenden Schritten durch Zentrifugation (2.000 x g, 5 min, 4°C, Sorvall SS34-Rotor, Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) getrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit zwei Volumen Chloroform:Methanol:H₂O (3:47:48, v:v:v) gewaschen und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Zu dem trüben Gemisch wurde Methanol bis zur Aufklärung zugetropft, und die Proteine wurden im Rotationsverdampfer bei 37°C eingengt. Kam es dabei zur Ausfällung von Proteinen, so wurden diese durch Zugabe von Chloroform:Methanol (2:1, v:v) wieder in Lösung gebracht. Die eingengten Proteine wurden schließlich in 6 ml Chloroform:Methanol (2:1, v:v) aufgenommen und zur Abtrennung von Lipiden zweimal durch tropfenweise Zugabe von vier Volumen Diethylether und Inkubation bei -20°C für 14 h gefällt. Die Sedimentation der Proteine erfolgte durch Zentrifugation mit 2.000 x g für 2 h (Sorvall SS34-Rotor, Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) bei -20°C. Das Proteinsediment wurde in 2 ml Chloroform:Methanol (2:1, v:v) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Analyse der Proben durch SDS-PAGE wurde das Chloroform:Methanol-Gemisch zunächst unter einem N₂-Gasstrom abgedampft, und die Proteine wurden dann in Denaturierungspuffer (Schägger und von Jagow, 1987) resuspendiert.

2.6.6 Herstellung von Antiseren

Die Herstellung der Antiseren erfolgte in Kaninchen durch die Fa. Bioscience (Göttingen, BRD). Hierzu wurden 200 µg gereinigtes Protein für die erste Immunisierung und 100 µg Protein für die zweite Immunisierung nach einem Monat eingesetzt. Das Antiserum wurde nach zwei Monaten gewonnen. Die IgGs wurden vor der Verwendung aus den Antiseren über ProteinA-Sepharose (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt.

2.6.7 Aufreinigung von IgGs

Zur Aufreinigung von IgGs aus Antiseren kam eine ProteinA-Sepharose-Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml zum Einsatz. Als Säulenpuffer diente 20 mM Phosphatpuffer (pH 7). Die Säule wurde mit 2 ml Antiserum beladen und solange mit Säulenpuffer gespült, bis kein Protein mehr im Durchfluß nachweisbar war. Die Elution der gebundenen IgGs erfolgte mit 0,1 M Citrat (pH 3). Um eine Denaturierung der Immunglobuline zu verhindern, wurden Fraktionen von 800 µl aufgefangen und zur Neutralisierung sofort mit 200 µl 1 M K_2HPO_4 (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 $-20^\circ C$.

2.6.8 Western-Blot-Analyse

Zur immunologischen Analyse von Proteinen mit Antiseren wurden die Proteine durch eine "Semi dry transfer cell Transblot SD" Transferkammer (Fa. BioRad Laboratories, Hercules, USA) nach dem Semidry-Verfahren bei 15 V für 90 min auf eine Nitrocellulosemembran (ProtranBA 85, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel, BRD) 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) für 5 min angefärbt und nach Markierung der Proteinstandards mit PBST (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 0,05% Tween 20, pH 7) entfärbt. Zur Absättigung der Membranen mit Protein wurden diese dann 1 h in 0,1% Milchpulver (in PBST) bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. 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 1 h mit ProteinA-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% H_2O_2 , 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, BRD).

2.6.9 Reinigung der Na⁺-F₁F₀-ATPase

2.6.9.1 Solubilisierung

Zur Solubilisierung der Na⁺-F₁F₀-ATPase aus gewaschenen Membranen wurden diese mit Detergens (1 mg Dodecylmaltosid pro mg Protein) versetzt und unter Rühren 1 h bei 4°C inkubiert. Restliche Membranen wurden aus dem Ansatz durch Ultrazentrifugation (45 min, 120.000 x g, Ti 50.2-Rotor, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) entfernt. Der Überstand (Solubilisat) wurde zur nachfolgenden Gelfiltration eingesetzt.

Zur Reinigung der Na⁺-F₁F₀-ATPase wurden die gesamten gewaschene Membranen aus einer 17,5-l-Kultur (ca. 480 mg Protein, siehe 2.4) in 6 ml Membranpuffer resuspendiert und solubilisiert, um eine möglichst hochkonzentrierte Proteinlösung auf die Gelfiltrationssäule auftragen und damit eine zu starke Verdünnung der Na⁺-F₁F₀-ATPase verhindern zu können.

2.6.9.2 Gelfiltration

Zur Gelfiltration wurde als Säulenmaterial Sephacryl S-400 HR (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), das nach Angaben des Herstellers aufbereitet wurde, genutzt. Das Säulenmaterial wurde in einer C-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) mit einer Länge von 100 cm, einem Durchmesser von 2,6 cm und einem Bettvolumen von 420 ml verwendet. Als Säulenpuffer dienten 50 mM Imidazol, 2,5 mM MgSO₄, 50 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5. Alle Gelfiltrationsläufe erfolgten an einem Gradi-Frac-System (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) mit einer Flußrate von 0,1 - 1 ml/min. Auf die Säule wurden maximal 4 ml Solubilisat mit einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml aufgetragen

Die Säule wurde vor dem Probenauftrag mit zwei Volumen Säulenpuffer gespült. Die Proteine wurden mit einem Volumen Säulenpuffer eluiert und in 10-ml-Fractionen durch einen Fraktionssammler aufgefangen.

2.6.9.3 Dichtegradientenzentrifugation

Die Gradienten wurden in Polyallomerröhrchen (Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) mit Hilfe eines an eine "Microperplex Peristaltic Pump" (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) angeschlossenen Gradientenmischers folgendermaßen gegossen. 1 ml einer 30%igen Glycerin-Lösung in Säulenpuffer (50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5) wurde auf den Grund der Röhrchen gegeben und mit 30 ml eines Gradienten aus je 15 ml der hoch- und niedrigkonzentrierten Lösungen überschichtet. Auf den Gradienten wurde 1 ml Probe (150 µg Protein) aus der Gelfiltration gegeben. Die Dichtegradientenzentrifugationen wurden in einem

Vertikalrotor (Sorvall TV850, Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) mit einer Beschleunigungsrate von 1 in einer Sorvall OTD B75-Ultrazentrifuge (Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) mit 142.000 x g für 8 h bei 4°C durchgeführt. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation durch eine an eine "Microperplex Peristaltic Pump" (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) angeschlossene Kanüle vom Boden der Röhren in 1,5-ml-Fractionen abgesaugt.

2.6.9.4 Ionenaustauscher-Chromatographie

Die Ionenaustauscher-Chromatographie wurde an einem Gradi-Frac-System (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als Säulenmaterial wurden das schwache Anionenaustauschermaterial DEAE-Sepharose CL6B (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) und das starke Anionenaustauschermaterial Source 30S (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Die DEAE-Sepharose wurde in eine XK2-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) mit einem Bettvolumen von 9 ml gegossen. Das Anionenaustauschermaterial Source 30S lag in einer fertig gepackten Säule mit einem Bettvolumen von 6 ml (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) vor. Als Niedrigsalz- und Hochsalzpuffer wurden 0 bzw. 1 M NaCl in 50 mM Imidazol, 5 mM MgSO₄, 0,5 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,5 genutzt. Die Säulen wurden vor dem Probenauftrag mit drei Volumen Hochsalz- und drei Volumen Niedrigsalzpuffer gespült. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen Gradienten von 0 - 1 M NaCl über vier Säulenvolumen gefolgt von zwei Volumen Hochsalzpuffer. Die Flußrate betrug in allen Fällen 1 ml/min.

2.6.10 Reinigung von Flagellen

Die Aufreinigung ganzer Flagellen aus *A. woodii* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Aizawa *et al.* (1985) zur Reinigung von Haken-Basalkörper-Komplexen aus *E. coli*. Als Ausgangsmaterial dienten Sphäroplasten (siehe 2.3), die sofort nach der Ernte zweimal in Protoplastenpuffer gewaschen und dann auf Eis für 30 min mit 1% Triton X-100 solubilisiert wurden. Nicht lysierte Sphäroplasten wurden durch eine niedertourige Zentrifugation (8.000 x g, 20 min, 4°C, Sorvall GS3-Rotor, Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) aus dem Ansatz entfernt. Die Flagellen wurden dann durch eine hohtourige Zentrifugation (70.000 x g, 1 h, 4°C, Ti50.2-Rotor, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) sedimentiert, in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8) aufgenommen und über Nacht unter leichten Rühren bei 4°C gelöst. Zur weiteren Aufreinigung diente eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 10 ml CsCl-Lösung (50% CsCl in 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8) mit 1 ml Probe überschichtet und mit 70.000 x g für 22 h bei 4°C im TH641-Rotor (Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) in einer OTD B50-

Ultrazentrifuge (Fa. Kendro Laboratory Products, Newton, USA) mit einer Beschleunigungsrate von 1 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren zwei Proteinbanden im Gradienten sichtbar, die mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und für 12 h gegen 500 Volumen TE-Puffer dialysiert wurden. Die weitere Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Elektronenmikroskopie.

2.7 Elektronenmikroskopie

Die Negativkontrastierung wurde mit Uranylacetat nach Valentine *et al.* (1968) durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden an einem Phillips EM 301 Elektronenmikroskop (Fa. Phillips, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV.

Die Aufnahmen des Mot-Komplexes erfolgten nach der Gefrierbruchmethode (Golecki, 1988) mit logarithmischen *A. woodii*-Zellen, die in ein Trägermaterial mit 60% Glycerin eingebettet waren.

2.8 Chemikalien, Enzyme und Gase

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, BRD), ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, USA) und der Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD) bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie stammten von MBI-Fermentas Deutschland GmbH (St. Leon Rot, BRD) und Roche (Mannheim, BRD). Standardproteine für die Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden von der Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, BRD) und Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Schweden) bezogen. Acrylamid wurde von Gerbu (Gaiberg, BRD) und Bisacrylamid von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD) erhalten. Triton X-100 wurde von der Sigma Chemie GmbH und alle übrigen Detergenzien von Glycon Bioch. GmbH (Luckenwalde, BRD) bezogen. ATP und PMSF wurden ebenfalls bei der Sigma Chemie GmbH erworben. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, BRD) synthetisiert. Gase stammten von Messer Griesheim (Kassel, BRD).

3. Ergebnisse

3.1 Strukturelle und molekulare Charakterisierung des Flagellums aus *A. woodii*

Ziel dieser Arbeit war es, die Untereinheitenzusammensetzung der Na⁺-abhängigen Flagellen von *A. woodii* aufzuklären. Das Hauptinteresse galt dabei den Komponenten des Flagellenmotors, die direkt am Antrieb beteiligt sind. Hierzu wurde zwei Wege beschritten. Zum einen sollten Flagellengene kloniert werden, zum anderen sollte das Flagellum gereinigt und seine Struktur elektronenmikroskopisch analysiert werden.

3.1.1 Versuche zur Klonierung der *mot*-Gene aus *A. woodii*

Im Vordergrund der Versuche zur Klonierung von Flagellengen aus *A. woodii* standen die Gene der Stator- (*mot*-Gene) und Rotorkomponente (*fliG*) des Na⁺-abhängigen Flagellenmotors. Es wurde zunächst versucht, die Gene dieser Komponenten zum einen mittels PCR zu amplifizieren, zum anderen durch Hybridisierung chromosomaler DNA von *A. woodii* mit heterologen Sonden in Genbanken zu identifizieren.

3.1.1.1 Hybridisierung chromosomaler DNA aus *A. woodii* mit heterologen *mot*-Sonden

In Vorarbeiten waren bereits die *mot*-Gene aus *E. coli* (Dean *et al.*, 1984; Stader *et al.*, 1986), *B. subtilis* (Mirel *et al.*, 1992) und *Clostridium acetobutylicum* (Ullmann, pers Mitteilung), sowie das *motX*- und *motY*-Gen aus *V. parahaemolyticus* (McCarter, 1994a, b) als [³²P]-markierte Sonden verwendet worden, um die *mot*-Gene aus *A. woodii* zu klonieren. In keinem Fall kam es dabei allerdings in der Southern-Hybridisierung zu einer Bindung der heterologen Sonden an chromosomale DNA von *A. woodii* (Aufurth, 1996). Von Asai *et al.* (1997) wurden zu Beginn dieser Arbeit zwei Gene (*pomA*, *pomB*) kloniert, die für die Statorkomponenten des Na⁺-abhängigen Flagellums aus *V. alginolyticus* kodierten. Es sollte daher in dieser Arbeit noch einmal versucht werden, mit Hilfe der *pomAB*-Gene die *mot*-Gene aus *A. woodii* zu identifizieren. Hierzu wurde von der Arbeitsgruppe Homma ein Plasmid (pHK2) zur Verfügung gestellt, auf dem die *pomAB*-Gene als ein 2,7-kBp-*SacI*-Fragment im Vektor pSU21 (Bartolome *et al.*, 1991) vorlagen. Zur Southern-Hybridisierung wurde chromosomale DNA von *A. woodii* mit den in Abb. 4 aufgeführten Restriktionsendonukleasen geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem [³²P]-markiertem 2,7-kBp-*SacI*-Fragment aus pHK2. Wie schon mit den anderen Sonden wurde auch in diesem Fall keine Bindung der *pomAB*-Gene an chromosomale DNA von *A. woodii* erreicht (Abb. 4). Da in der Southern-Hybridisierung die *pomAB*-Sonde an das Plasmid pHK2 gebunden hatte, konnten methodische Fehler ausgeschlossen werden (Abb. 4). Die Ähnlichkeiten zwischen

den *mot*-Genen aus verschiedenen Bakterienarten waren offensichtlich zu gering, um eine Klonierung durch heterologe Sonden zu ermöglichen.

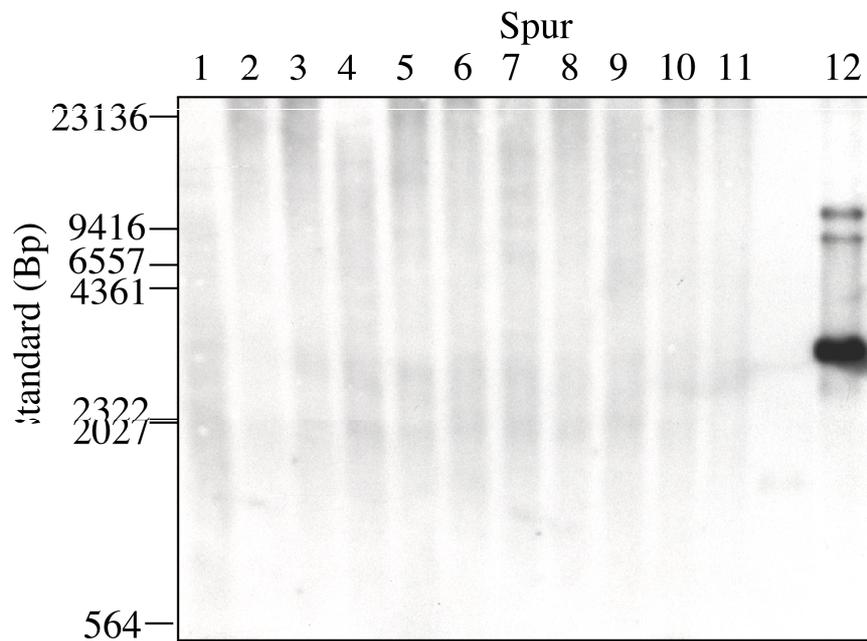


Abb. 4. Southern-Hybridisierung geschnittener chromosomaler DNA aus *A. woodii* mit der *pomAB*-Sonde. Chromosomale DNA von *A. woodii* wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem *SacI*-Fragment aus pHK2, das *pomA* und *pomB* aus *V. alginolyticus* enthielt. Spur 1: *ClaI*, Spur 2: *XhoI*, Spur 3: *KpnI*, Spur 4: *BstXI*, Spur 5: *PstI*, Spur 6: *EcoRI*, Spur 7: *EagI*, Spur 8: *SacI*, Spur 9: *EcoO190I*, Spur 10: *XbaI*, Spur 11: chromosomale DNA, Spur 12: pHK2

Es wurde daher als nächstes versucht, durch Sequenzvergleiche konservierte Bereiche in den Mot (Pom)-Proteinen zu identifizieren, die die Synthese von abgeleiteten Starteroligonukleotiden für eine Amplifikation der *mot*-Gene aus *A. woodii* mittels PCR erlaubten.

3.1.1.2 Versuche zur Amplifikation der *mot*-Gene und des *fliG*-Gens aus *A. woodii* mittels PCR

Zur Amplifikation der *mot*-Gene mittels PCR bestanden nur sehr begrenzte Möglichkeiten bei der Auswahl der Starteroligonukleotide. Zum einen besitzen diese Proteine nur eine geringe Ähnlichkeit untereinander. Beim Vergleich zwischen zwei MotA- oder MotB-Proteinen unterschiedlicher Organismen ergaben sich lediglich 20 - 30% identische Aminosäuren. Zum anderen führt der hydrophobe Charakter dieser Proteine und damit die große Anzahl an hydrophoben Aminosäuren zu einer sehr starken Degeneration abgeleiteter Oligonukleotide.

Durch den Vergleich verschiedener MotA- und MotB-Sequenzen (siehe Anhang) konnte dennoch ein Bereich in MotB identifiziert werden, der eine Konservierung in fünf von sechs Aminosäuren, aber eine 148fache Degenerierung aufwies. In MotA wurde eine Sequenz gewählt, die zwei identische und drei ähnliche von sechs Aminosäuren, sowie nur eine 48fache Degenerierung aufwies. Da die *mot*-Gene in allen bisher untersuchten Organismen in einem Operon in der Reihenfolge *motAB* organisiert sind, wurde von der gleichen Organisation der *mot*-Gene in *A. woodii* ausgegangen. Eine Amplifikation sollte also durch je ein Oligonukleotid aus MotA- und MotB-Sequenzen möglich sein. Um die Degenerierung weiter abzusenken, wurden aus jedem Bereich zwei Starteroligonukleotide hergestellt (mothin1 und 2 für *motA*, motrück1 und 2 für *motB*). Es wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von 900 - 1.200 Bp erwartet.

Mit den Oligonukleotidkombinationen mothin1/motrück1 und mothin2/motrück1 wurde kein Amplifikat erhalten. Mit der Oligonukleotidkombination mothin1/motrück2 wurden zwei DNA-Fragmente mit ca. 1.600 und 1.200 Bp, mit der Oligonukleotidkombination mothin2/motrück2 ein DNA-Fragment mit 1.200 Bp amplifiziert (Abb. 5). Aufgrund der Länge der DNA-Fragmente kam nur das 1.200-Bp-Fragment als richtiges Amplifikat in Frage. Nach der Klonierung dieses Fragmentes in pBSK⁺II und seiner Sequenzierung zeigte sich jedoch, daß die aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen nur Ähnlichkeiten zu einem Internalin aus *Listeria monocytogenes* aufwies. Auch die aus dem 1600-Bp-Fragment abgeleiteten Aminosäuresequenzen besaßen keine Ähnlichkeiten zu Mot-Proteinen, stattdessen wurde hier in Datenbankanalysen eine 68%ige Identität zu einer Glycyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus cereus* ermittelt.

Zur Amplifikation von *fliG* wurden ebenfalls zwei Starteroligonukleotide gewählt, die eine möglichst starke Konservierung und geringe Degenerierung aufwiesen. Die Auswahl war hier durch die stärkere Konservierung der FliG-Proteine (30 - 50% Identität bei nahe verwandten Organismen) erleichtert. Es wurde ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 420 Bp erwartet. Durch die PCR wurde ein vorherrschendes DNA-Fragment mit ca. 400 Bp neben vier schwächeren, größeren Fragmenten amplifiziert (Abb. 5). Die aus dem 400-Bp-Fragment abgeleitete Aminosäuresequenz besaß jedoch keine Ähnlichkeiten zu FliG-Proteinen. Das abgeleitete Protein war nur einer trans-2-Enoyl-ACP-Reduktase II aus *Streptococcus pneumoniae* ähnlich (58% Identität). Dieses Ergebnis mag durch die Tatsache begründet sein, daß in die Sequenzvergleiche zur Oligonukleotidkonstruktion keine FliG-Proteine aus Na⁺-abhängigen Flagellen einbezogen werden konnten, da keine bekannt waren. Es besteht also die Möglichkeit, daß die Na⁺-abhängigen FliG-Proteine starke Abweichungen in ihrer Aminosäuresequenz gegenüber H⁺-abhängigen aufweisen.

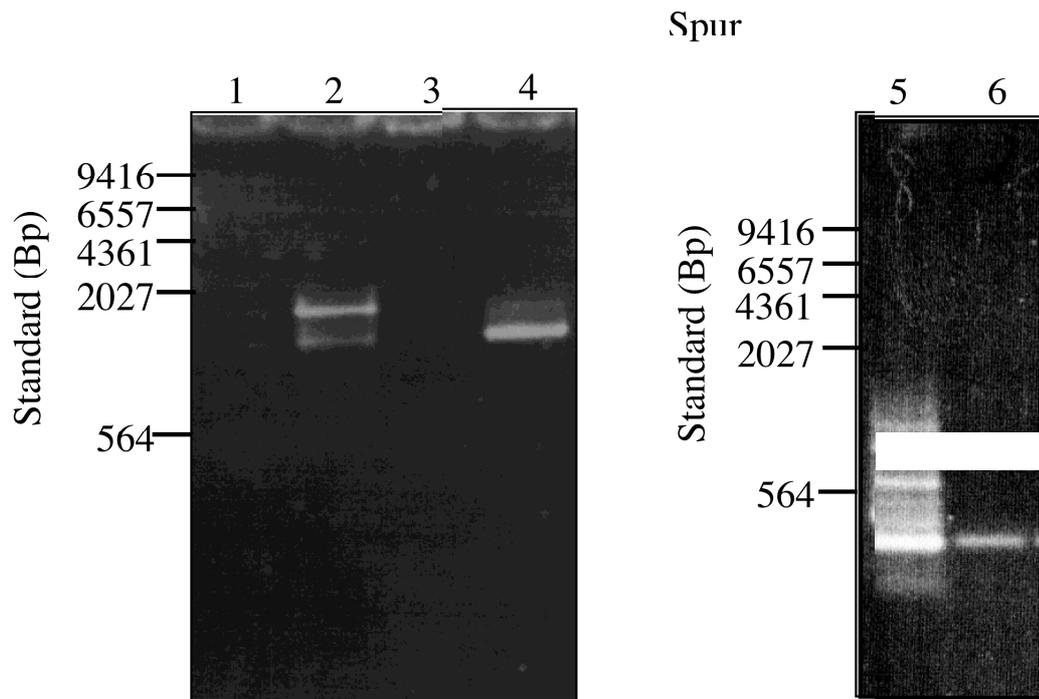


Abb. 5. Versuch zur Amplifikation von Bereichen der *mot*-Gene und des *fliG*-Gens aus *A. woodii* mittels PCR. Spur 1: *mothin1/motrück1*, Spur 2 *mothin1/motrück2*, Spur 3: *mothin2/motrück1*, Spur 4: *mothin2/motrück2*, Spur 5: *fliG1/fliG2*, Spur 6: aufgereinigte 420-Bp-Fragment aus Spur 5

Die Versuche, die Gene der Motorkomponenten direkt mittels PCR zu amplifizieren, waren also aufgrund ihrer geringen Konservierung und fehlender Vergleichsmöglichkeiten zu anderen Na^+ -abhängigen Organismen fehlgeschlagen. Es schien daher vielversprechender, als nächstes das Gen eines stärker konservierten Flagellenproteins, das nicht in die Ionentranslokation involviert ist, zu amplifizieren. Hierfür bot sich das Flagellin von *A. woodii* an, da hier zum einen bereits die aminoternale Sequenz des Proteins bekannt war (Aufurth *et al.*, 1998) und die Flagellengene in der Regel mit weiteren Flagellengenen gruppiert auf dem Chromosom vorliegen (Macnab, 1996; Ordal *et al.*, 1993).

3.1.2 Klonierung des Flagellings aus *A. woodii*

Da Flagellengene häufig gruppiert auf dem bakteriellen Chromosom vorliegen, sollte als nächstes versucht werden, das Flagellin zu klonieren, damit eine homologe Sonde zur Suche nach weiteren Flagellengenen zur Verfügung stand.

3.1.2.1 Amplifizierung des Flagellings mittels PCR

Zur Amplifikation des Flagellings mittels PCR wurden zum einen aus der bekannten aminoterminalen Aminosäuresequenz des Flagellins von *A. woodii* (Aufurth *et al.*, 1998), zum anderen aus konservierten Bereichen der amino- und carboxyterminalen Domänen von

Flagellinen anderer Organismen Oligonukleotide abgeleitet. Zwei Starteroligonukleotide wurden so aus der aminoterminalen (OS1, OS12) und zwei aus der carboxyterminalen Domäne (OS6, OS14) hergestellt. Alle Starteroligonukleotide besaßen am 5'-Ende eine *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle. Da das gereinigte Flagellin von *A. woodii* eine molekulare Masse von 50 kDa hat (Aufurth *et al.*, 1998), konnten für die vier möglichen Starteroligonukleotid-Kombinationen DNA-Fragmente mit ungefähren Größen von 1.200 Bp (OS1/OS6), 1.400 Bp (OS1/OS14), 1.100 Bp (OS6/OS12) und 1.300 Bp (OS12/OS14) erwartet werden.

Durch die Starteroligonukleotide OS1 und OS6 wurde ein ca. 1.100 Bp großes DNA-Fragment amplifiziert (Abb. 6). Mit den anderen Kombinationen von Starteroligonukleotiden wurden entweder keine Amplifikate erhalten, oder die DNA-Fragmente waren zu klein. Nach Beseitigung der T-Überhänge durch DNA-Polymerase und Klenow-Fragment wurde das durch OS1 und OS6 amplifizierte DNA-Fragment in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle von pBSK⁺II kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid pSA1.

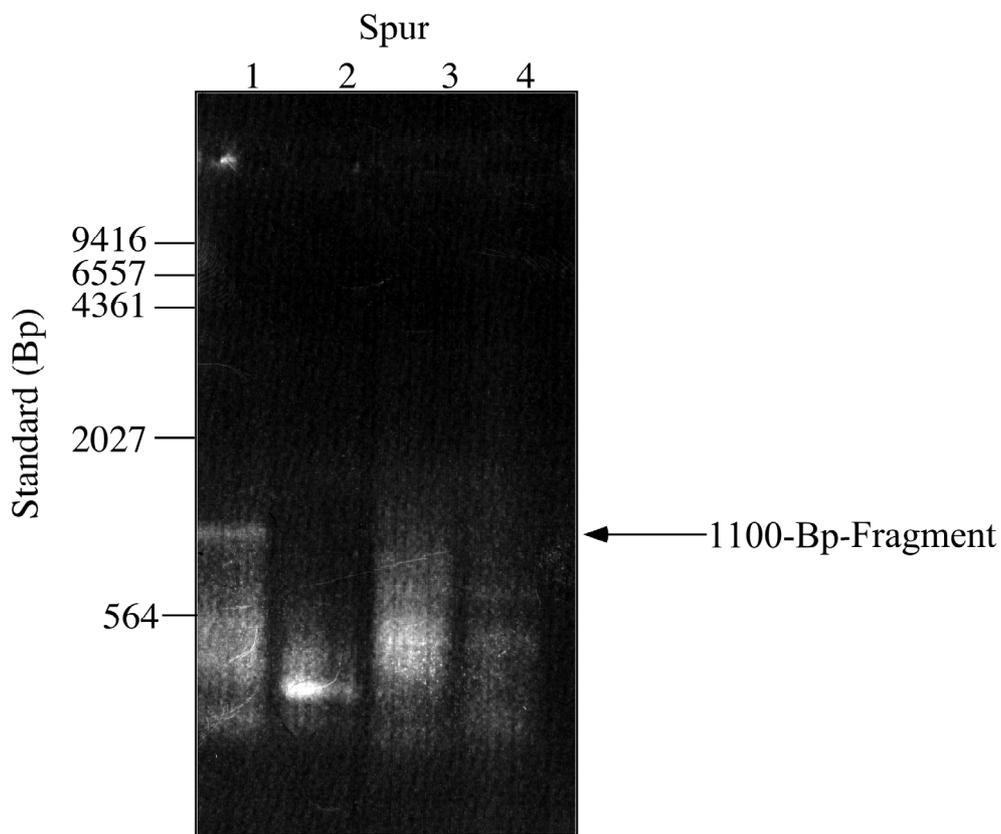


Abb. 6. Amplifikation eines Bereichs des Flagellings aus *A. woodii* mittels PCR. Es ist die Analyse der PCR-Ansätze im 0,7%igen Agarosegel gezeigt. Spur 1: OS1/OS6, Spur 2: OS12/OS14, Spur 3: OS1/OS14, Spur 4: OS6/OS12.

Die Sequenzanalyse ergab eine Größe des Fragmentes von 1.090 Bp und einen durchgehenden offenen Leserahmen. Das abgeleitete Protein war der aminoterminalen Domäne des *B. subtilis*-Flagellins ähnlich (71% Identität). Es war also gelungen, ein DNA-

Fragment zu amplifizieren, das offensichtlich für die aminoternale und zentrale Domäne des *A. woodii*-Flagellins kodierte. Es erschien daher vielversprechend, pSA1 als Sonde zur weiteren Klonierung des Flagellings aus chromosomaler DNA zu nutzen.

3.1.2.2 Klonierung von pSA6 aus chromosomaler DNA von *A. woodii*

Chromosomale DNA von *A. woodii* wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I, *Cla*I, *Nde*I, *Hind*III, *Bgl*III, *Eag*I und *Nsi*I geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde wurde das 1.090-Bp-*Eco*RI-Fragment aus pSA1 genutzt (Flagellin-Sonde). Nach der Hybridisierung mit der [³²P]-markierten Sonde und Autoradiographie wurden spezifische Signale detektiert (Abb. 7). In *Cla*I-geschnittener DNA wurden z. B. zwei Fragmente mit 3.000 und 1.200 Bp markiert, die sich zur Klonierung ohne eine vorherige Fraktionierung der geschnittenen DNA eigneten (Abb. 7).

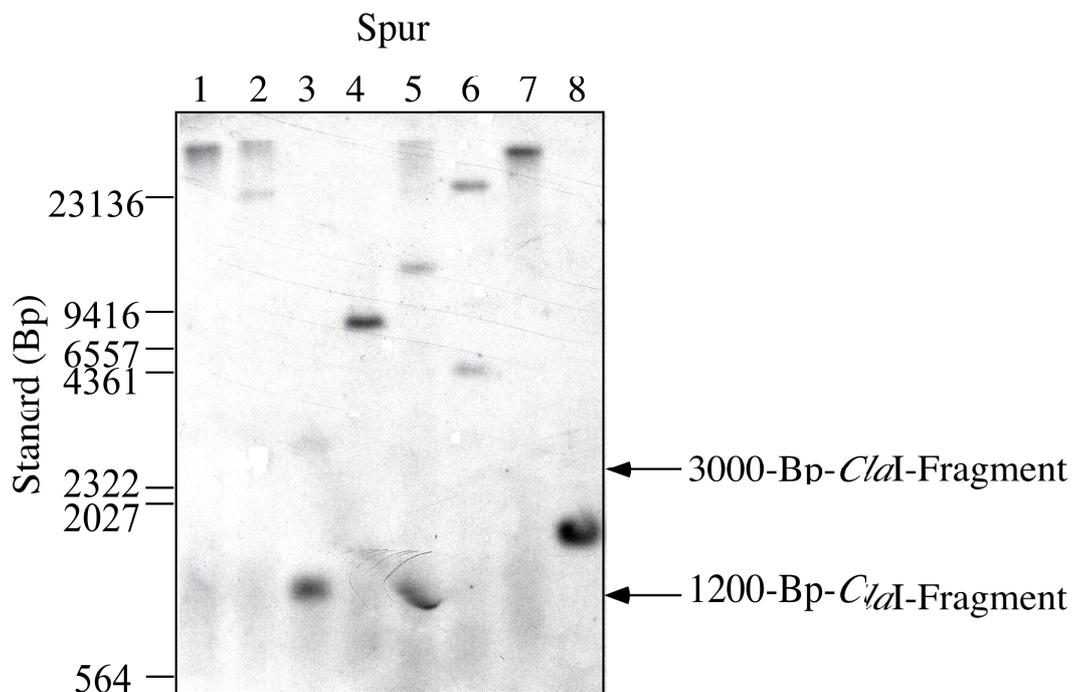


Abb. 7. Southern-Hybridisierung geschnittener chromosomaler DNA mit der Flagellin-Sonde. Chromosomale DNA wurde mit den unten angegebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten, im 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der Flagellin-Sonde hybridisiert. Spur 1: chromosomale DNA, Spur 2: *Xho*I, Spur 3: *Cla*I, Spur 4: *Nde*I, Spur 5: *Hind*III, Spur 6: *Bgl*III, Spur 7: *Eag*I, Spur 8: *Nsi*I.

Mit *Cla*I-geschnittene chromosomale DNA von *A. woodii* wurde in pBSK⁺II kloniert, in *E. coli* DH5 α transformiert und durch Koloniehybridisierung mit der Flagellin-Sonde analysiert.

Unter 3.000 getesteten Klonen wurde ein Klon identifiziert, der spezifisch mit der Sonde reagierte. Durch Restriktionsanalyse wurde eine Größe des *ClaI*-Fragmentes in pSA6 von ca. 3.000 Bp ermittelt. Durch die Sequenzierung des inserierten DNA-Fragmentes in pSA6 wurden Leserahmen am 5'- und 3'-Ende identifiziert, deren abgeleitete Proteine den Haken-assoziierten Proteinen (HAP) 1 (5'-Ende) und den Flagellinen (3'-Ende) ähnlich waren. Um eine vollständige Sequenzierung zu ermöglichen, war jedoch zunächst die Herstellung von Subklonen nötig. Hierfür schienen eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle ca. 800 Bp stromabwärts vom 5'-Ende und eine *SacI*-Restriktionsschnittstelle ca. 1.600 Bp stromaufwärts vom 3'-Ende geeignet zu sein. Durch Subklonierung der *ClaI-HindIII*- und der *ClaI-SacI*-Fragmente wurden vier Plasmide erhalten, die ein 847- und ein 1.977-Bp-*ClaI-HindIII*-Fragment (pSA6-1 und pSA6-2) bzw. ein 1.569- und ein 1.255-Bp-*ClaI-SacI*-Fragment (pSA6-3 und pSA6-4) enthielten (Abb. 13).

Die Sequenzanalyse ergab eine Länge von 2.824 Bp für das *ClaI*-Fragment. Die Identifikation von Genen erfolgte durch den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit in Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen. Insgesamt wurden sechs offene Leserahmen identifiziert (Abb. 8). Die Analyse der Nukleotidsequenzen und der abgeleiteten Genprodukte ist weiter unten beschrieben (s.3.1.3). Von den sechs offenen Leserahmen konnten drei bekannten Flagellengenen zugeordnet werden. Am 3'-Ende von pSA6 lag der 5'-terminale Bereich des Flagellings, so daß eine weitere Klonierung stromabwärts von pSA6 sinnvoll erschien. Um das vollständige Flagelligen und eventuell weitere stromabwärts gelegene Flagellengene zu erhalten, wurde daher das 1.977-Bp-*ClaI-HindIII*-Fragment als Sonde zur Identifizierung eines Anschlußklons genutzt.

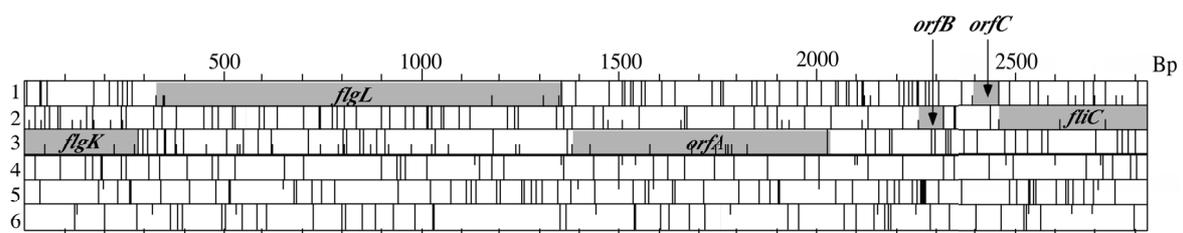


Abb. 8. Darstellung der offenen Leserahmen auf pSA6. Halbe vertikale Linien kennzeichnen ATG-Startcodons, durchgezogene Linien Stopcodons. Alle sechs Leseraster sind dargestellt. Die im Text genannten offenen Leserahmen sind bezeichnet und grau unterlegt.

3.1.2.3 Klonierung von pSA13

Zur Southern-Hybridisierung wurde chromosomale DNA von *A. woodii* mit den Restriktionsenzymen *BstXI*, *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *KpnI*, *NsiI*, *SacI*, *SallI*, *XmaI* und *XhoI* geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und durch einen Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Hybridisierung mit dem 1.977-Bp-*ClaI-HindIII*-

Fragment aus pSA6 und Autoradiographie wurden spezifische Signale erhalten (Abb. 9). In den meisten Fällen wurden DNA-Fragmente mit Längen von mehr als 10.000 Bp detektiert, die für eine Klonierung in Plasmide nicht geeignet erschienen. Nur in *HindIII*- und *BstXI*-geschnittener chromosomaler DNA wurden Fragmente identifiziert, die mit 5.000 und 4.700 Bp kleiner waren. Da das 5.000-Bp-*HindIII*-Fragment den größten Zuwachs an Sequenzinformationen versprach, sollte dies kloniert werden.

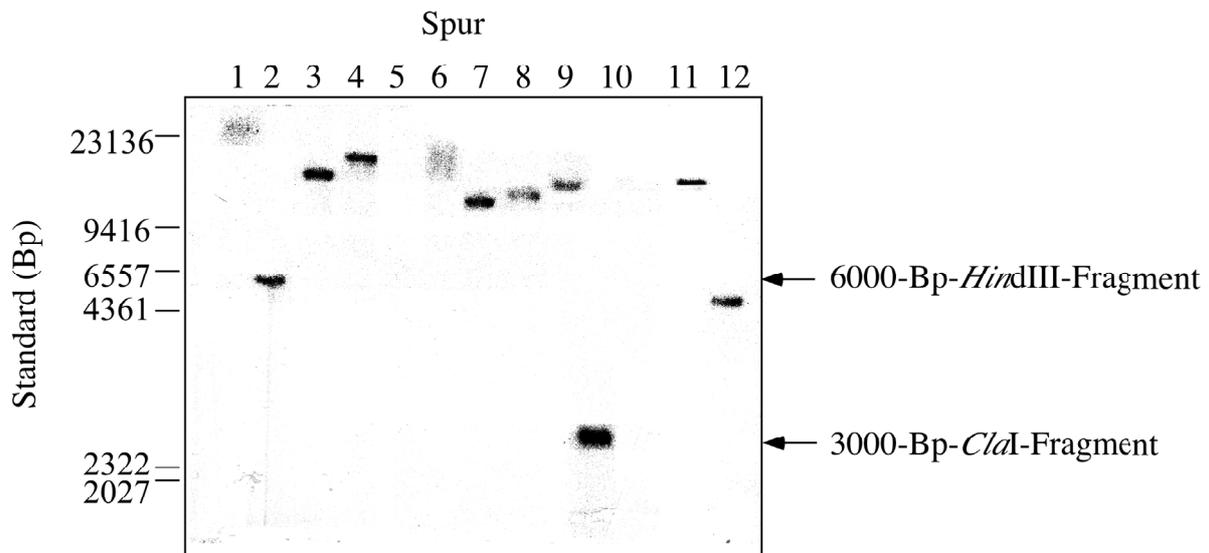


Abb. 9. Southern-Hybridisierung geschnittener chromosomaler DNA von *A. woodii* mit pSA6. Chromosomale DNA von *A. woodii* wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, im 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem [³²P]-markierten 1977-Bp-*ClaI*-*HindIII*-Fragment aus pSA6 hybridisiert. Spur 1: chromosomale DNA, Spur 2: *HindIII*, Spur 3: *NsiI*, Spur 4: *EcoRI*, Spur 5: *KpnI*, Spur 6: *XhoI*, Spur 7: *PstI*, Spur 8: *XmaI*, Spur 9: *Sall*, Spur 10: *ClaI*, Spur 11: *SacI*, Spur 12: *BstXI*.

Zur Klonierung des 5.000-Bp-*HindIII*-Fragmentes wurde *HindIII*-geschnittene chromosomale DNA von *A. woodii* in pBSK⁺II ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die erhaltenen Klone wurden mit dem 1977-Bp-*ClaI*-*HindIII*-Fragment aus pSA6 als Sonde durch Koloniehybridisierung analysiert. Nach Analyse von 5.000 Klonen wurde ein Klon erhalten, der mit der Sonde reagierte (pSA13) und der am 5'-Ende die aus pSA6 bekannte Sequenz des *flgL*-Gens stromabwärts der *HindIII*-Restriktionsschnittstelle enthielt. Für eine weitergehende Sequenzanalyse war jedoch zunächst wieder eine Subklonierung von pSA13 nötig. Für die Subklonierung von pSA13 schienen zwei *ClaI*- und zwei *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen stromabwärts der *ClaI*-Restriktionsschnittstellen in *fliC* geeignet zu sein. Von pSA13 wurden daher Subklone hergestellt, die ein *ClaI*-Fragment mit 1.281 Bp (pSA13-2) und 1.640 Bp (pSA13-4), sowie ein *EcoRI*-Fragment mit 1.037 Bp (pSA13-7) enthielten (Abb. 13).

Die Sequenzierung von pSA13 ergab eine Länge des *HindIII*-Fragmentes von 5.003 Bp. Es wurden insgesamt 12 offene Leserahmen identifiziert. Die 5'-terminalen 2.003 Bp von pSA13 waren bereits durch pSA6 bekannt (Abb. 10).

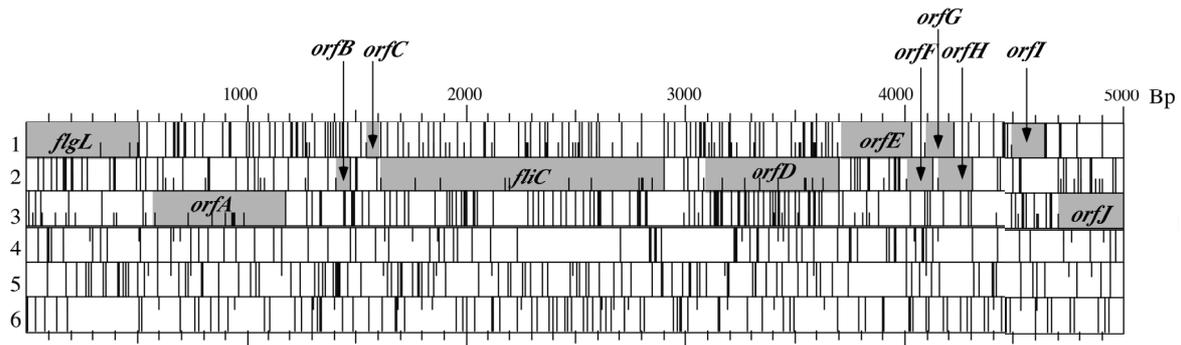


Abb. 10. Darstellung der offenen Leseraster auf pSA13. Halbe vertikale Linien kennzeichnen ATG-Startcodons, durchgezogene Linien Stopcodons. Alle sechs Leseraster sind dargestellt. Die im Text genannten offenen Leseraster sind bezeichnet und grau unterlegt.

Insgesamt wurde durch die Klonierung von pSA6 und pSA13 chromosomale DNA von *A. woodii* mit einer Gesamtlänge von 5.840 Bp erhalten, die 13 ORFs umfaßte (Abb. 11). Im folgenden ist die Analyse der Nukleotidsequenz und der abgeleiteten Genprodukte dargestellt. Die vollständige Nukleotidsequenz einschließlich ihrer Merkmale ist in Abb. 11 dargestellt.

```

flgK
I D S D G N T I L T G T F N E Y M T S E
ATCGATAGCGATGGGAATACGATTTTAACCGAACTTTTAATGAGTATATGACCAGTGAA 60

V A E V G T A V E L N T N F S K T A K N
GTAGCCGAAGTTGGAAGTTCGGTAGAGTTAAATACAAATTTTTCCAAAAGTCCAAAAAT 120

V F Q T I S D A R D S V A G V S L N E E
GTGTTTCAGACCATTTTCGGATGCCAGAGATTCAGTAGCGGGAGTATCGTTAAATGAAGAA 180

G V N L S A F Q K V Y N A A M R Y F N V
GGTGTCAACCTATCAGCATTTCAAAAAGTGTATAATGCTGCGATGCGGTATTTTAAACGTC 240

L D E N L D N I I N K M G V *
TTAGATGAAAACCTTAGATAATATTATCAATAAGATGGGTGTTTAAAGATTCTCTGTAATCT 300

flgL
M R I T Y R M M T S R
GGAACGTAATCAGGAAGGAAACATAAAAAAATGAGAATTACCTATAGAATGATGACGTCGC 360

Y S T N L N D L S V G L D K L N T Q V A
GATATTCAACAAATTTGAATGATTTATCCGTGGGACTAGACAAACTCAATACTCAAGTGG 420

T G R K F A R T S E D V S S A V R G Y Q
CAACAGGACGAAAATTTGCTCGTACTTCTGAAGATGTGTCTTCTGCCGTTAGAGGGTATC 480

I R R N L S K L E G Y Q D N I K H A D G
AGATTAGACGAAATTTATCGAAATTAGAAGGTTATCAAGATAATATTAACATGCCGATG 540

```

F L T N S E S T V G Q L E S S L A E A T
GTTTTTTAAACCAATTCTGAAAGTACTGTGGGCCAATTGGAATCCTCGCTAGCTGAAGCAA 600

D K I L Q G L N G T Q S E D T R S I I A
CCGATAAAATTTTACAAGGCTTGAATGGCACCCAAAGTGAAGATACCCGAAGCATTATTG 660

T E L R T I Q D Q V L E T L N T N V T G
CAACGGAGCTTCGTACGATTCAAGATCAGGTATTGGAGACGCTTAATACCAACGTAACCG 720

T Y L F G G S N D Q K P F A V V G G K L
GAACTTATTTATTTGGTGAAGTAATGATCAAAAACCGTTTTCGGGTTGTTCGGCGGTAAAC 780

Q Y N G K N L D D L K E G T P A E I E E
TTCAATATAATGGCAAAAATTTAGATGATTTAAAAGAAGGAACACCAGCAGAGATTGAAG 840

V E A L K R D S L Y V D I G L G V S F N
AGGTAGAAGCTTTAAAACGCGACTCTTTGTATGTCGATATTGGTTTAGGGGTATCTTTTA 900

Q I T G D V D R N S V F N Y S I P G I N
ACCAAATAACCGGGGATGTTGATCGAAATTCAGTTTTCAATTATTCTATTCCAGGGATTA 960

F V G N G T D S T V V S G E D I S N N L
ACTTTGTTCGAAATGGAAGTCAACTGTGGTTTCGGGAGAAGATATTTCTAATAATC 1020

Y D L L G R I A T E F E K P D G S Y S R
TTTATGATTTATTAGGAAGAATTGCAACTGAATTTGAGAAACCAGATGGGAGTTATTCCC 1080

D T V D S L F G L F Q G N S Q K T Y Q T
CGGATACGGTGGATAGTCTTTTTGGTTTGTTCAGGGCAATAGTCAAAAAACATATCAGA 1140

T T A I G A K T Q Y L E F M T N R Y E T
CGACTACTGCGATTGGTGCAAAAACACAATATCTGGAATTTATGACAAATCGTTACGAAA 1200

Q N F N L D K R Q T E V D G V D A A Y T
CTCAAAATTTCAATCTCGATAAAAGACAAACAGAAGTTGATGGTGTGATGCTGCCTATA 1260

Y I A F Q S Q K V A Y S A A L Q M G Q S
CCTATATTGCCTTCCAGAGTCAAAAAGTTGCTTATTCTGCGGCCCTTCAAATGGGACAAA 1320

V V Q Q S V F D Y M S *
GTGTGGTACAACAGTCGGTATTTGATTATATGTCATAACTTAAAAATTTAAAGATTGTTT 1380

orfA
M E P L I

ATGATCGCCCGTAAAGCATCGAAACGAATTTGGTTTGGAAAGAAAAATGGAACCGTTAATT 1440

T I E T I P I K L E Y V E K E P L A L S
ACCATCGAAACGATACCGATAAAACTGGAATATGTTGAAAAAGAACCGTTGGCGCTTTCA 1500

S V H E V E R N T N N I S H Q Q V K R D
TCGGTGCATGAGGTTGAGCGAAACACGAATAATATTAGTCATCAGCAAGTAAAACGTGAC 1560

P I K I A M Q E S F V P S S N Y N W E N
CCGATTTAAATGCTATGCAAGAGTCATTTGTACCGAGCTCCAATTATAATTGGGAAAAT 1620

S T Y T A T A K I G E D G N L K L N I Q
 TCAACCTATACAGCTACTGCTAAAATTGGAGAAGATGGAAATCTAAAACCTGAATATTCAG 1680

M E D G D S R A I R F T Q A N R S I D S
 ATGGAAGACGGAGATTCCCGGGCAATTCGTTTTACTCAGGCCAATCGCAGTATTGATTCA 1740

M A K K L D Y N D N M D M G S M Q L S I
 ATGGCGAAGAAATTGGATTATAACGATAATATGGATATGGGCAGCATGCAATTAAGTATC 1800

P I S G L P G G M P E T N N L N T E F T
 CCGATCAGTGGCTTGCCGGGAGGTATGCCGAAACCAATAATCTGAATACTGAGTTTACG 1860

P P D I E L V V T Q R P Q V I I K Y V G
 CCGCCAGATATTGAATTAGTGGTTACCCAGAGACCGCAAGTGATTATTAAGTATGTGGGT 1920

G P I Y V P P S A D P D Y T R P L G F E
 GGGCCGATCTATGTTCCCTCCGAGTGCCGATCCTGACTATACTCGGCCACTAGGTTTTGAA 1980

P Q Q T T Q V L S L F D E K V * >
 CCACAACAGACCACCCAAGTTCCTTTTCATTGTTTGACGAAAAAGTATAGAAAGCGGTAACG 2040

>>>>>>> <<<<<<<< <
 CCTTTTTTTTAGTTTTGAGGGAAAGCCAAATTATTTTGAAAATAGAAAACTACGCATATT 2100
 CATAAAGGTTTTGTATGATAGATGAAATTTAATTGTATGCTCTCGTTAGAAGGGCATTAAAC 2160
 CGCCTGCGAATTTATCTCAATTAATTTTAAATTTTTCAAAAAAGGGCTAAACTTCTAAAT 2220
 AAAACAACCGATAATATATTTAGCAACCCCATTAATGACGTTATTATTATCACTAAACAA 2280

σ^{28} -Promotor
 UP-Element -35 -10

AATAATTAAAAAAATTGAAGTTTCTTTAAAACTTTCTAAAGTAAATATAAGTTTAGACG 2340
ATATTAATAACCAGAGCGAAAGAACTTAAATAATTTGGCGGACCTTGCGTACGATGGAAA 2400
 fliC
 M
 GCCTAACAAAATTCCCCAGGCCGAGGGTTTTCGGTCAATAAAAAACGGAGGAAAATACAAT 2460

R I N H N I A A L N T Y N K L S A N T S
 GAGAATCAACCATAACATCGCAGCACTAAATACTTACAATAAGTTATCTGCAAAACACGTC 2520

A T S K S L E K L S S G L K I N R A G D
 GGCTACTTCTAAGTCATTAGAAAAATTATCTTCAGGCTTGAAAATTAACCGAGCAGGCGA 2580

N A A G L A I S E K M R G Q I S G L N T
 TAATGCTGCTGGCTTGGCCATTTTCAGAAAAATGCGTGGCCAGATTTTCAGGTTTAAATAC 2640

A S T N A N D S I S L I Q T A E G A L N
 TGCATCAACCAATGCAAACGACAGTATTTTCGTTAATTCAAACGGCAGAAGGCGCATTAAA 2700

E T H S I L Q R M R E L A V Q S S N D T
 TGAAACGCATTCCATTCTTCAAAGAATGAGAGAATTGGCAGTTCAATCTTCAAATGATAC 2760

N T D A D R G E I Q K E I N Q L T K E I
 AAACACTGATGCAGACCGTGGTGAAATTCAAAAAGAAATTAATCAATTGACAAAAGAAAT 2820

D R I S N D T E F N T Q K L L N G Y K A
 CGATAGAATTTCTAATGATACTGAGTTTAAATACCCAAAATTTGTTGAATGGCTATAAAGC 2880

E H L Q L S Y L I I D E I P I Y Q K Y Y
GGAACATTTGCAATTATCATATCTAATAATTGATGAAATACCAATTTATCAGAAATATTA 4080

E Y F E K N I D T I E M V E V I C N Q L
TGAATATTTTGAACAAAACATCGATAACAATTGAAATGGTTGAGGTTATATGTAATCAGTT 4140

K G L F D E T L S S A Y N Y M K N A I A
GAAAGTTTATTTGATGAAACGCTAAGTTCAGCCTATAATTATATGAAAAACGCGATTGC 4200

K I K S L S E E F Y K N P K A E T W S D
TAAATAAAGAGTTTATCAGAAGAATTTTATAAAAACCCAAAAGCTGAAACATGGAGTGA 4260

L A D M F E G V L W I I D T Q S R I D Q
CTTAGCTGACATGTTTGAAGGAGTTTTATGGATCATTGATACACAAAGTCGAATTGATCA 4320

I K N L K E I I N D Y S L W N E Y V Q L
AATCAAAAATTTGAAAGAAATTATTAATGATTATTCTTTATGGAATGAATATGTTTCAGTT 4380

V K K M M A I L P D L E V A M N N H D N
GGTAAAAAAAATGATGGCGATTTTACCTGATCTTGAAGTAGCAATGAATAATCATGATAA 4440

V L I G D L L L Y E M L P F V E E S V E
TGTTTTAATTGGTGATTTGCTTTTATATGAAATGTTGCCATTCGTAGAAGAATCTGTAGA 4500

orfE

M L A D N I V F

K I G F L I P D E G V D Y V S *
AAAAATTTGGCTTTTTAATCCCGGACGAGGGGTCGATTATGTTAGCTGACAATATCGTCT 4560

L K K E Y P Y I Y Q A I K S W E T K N E
TTTTGAAAAAGAATATCCGTATATTTACCAAGCTATTAAGAGCTGGGAAACAAAAAATG 4620

A P K F S I E K A N D G N S T L K Y K D
AGGCACCTAAATTTTCAATTGAAAAAGCGAACGATGGAAACAGTACTTTAAATATAAGG 4680

D K R I R A V F W V F W I V A F G R V P
ATGATAAAGAATTGGGGCGGTCTTTTGGGTTTTTTGGATTGTAGCGTTTGGTCGGGTGC 4740

S L L C R A F I P F R K P R G G R L F S
CCAGCTTATTATGCCGCGCTTTTATCCCGTTTAGGAAACCACGAGGTGGACGGCTTTTTA 4800

S K E R C E C E R R R R P P P S I Y L L
GCTCTAAGGAACGGTGTGAATGTGAACGACGTCGGCGCCCTCCCCCTCTATTTATCTTT 4860

S E L G F *
TGTCAGAGTTAGGGTTTTAGATTTTCATGGCAGTTTATCGTGGGTTCCGAGTGTTATATTT 4940
TTACGCCGGTCACGATGATCATCTTAGTGTATTTTTTAGCGTGTTACCCTAGGGCGGGCC 5000
GGGGGAGCTGTCCGCCATGTCACAAAGGTGGCTCCCGTCTAATTTCTCGGGTTCGATTAC 5060
GGTTCCTCCTGGTGGGTCGTGGGAGTTGTTGAGGGTGTCTTCTCCAGGGCCGCGATTAG 5120
GTCGATCCGTTTCCAGCGGGATTGGTCCCTAAGGTGAGGTGGATTAGGGGCTAGGTTTC 5180
AGTCGGCGTCCCAATTGTTTAATTGGGGAGTCCCCCTGGGCCGGTGTGAGCGTGCAGGGA 5240

σ^{70} -Promotor	
-35	-10
GATCACATTTTGGGACT <u>TTGTCAGT</u> GCCATCTGTATAAAAAAT <u>ATTAT</u> GAGCGTTCTGAAAA	5300
orfJ	
M D K V L V T G A	
ATGTTATAGAGAGTTACGATA <u>AAGGGAGA</u> ACTTTA <u>ATG</u> GATAAAGTACTTGTAAACAGGGGC	5360
D G F I G S H L V E E L V K R G K T V R	
AGATGGGTTTATTGGAAGTCATCTAGTAGAAGAAGTGGTAAAACGCGGAAAAACTGTCAG	5420
A F V Y Y N S F N S W G W L D S F S P K	
AGCTTTTGTATTATAAATCTTTCAATTCATGGGGATGGTTGGATTCTTTTTTCGCCAAA	5480
V L D E I E V I A G D I R D P N G I R T	
AGTGTTAGATGAGATAGAAGTTATTGCTGGTGATATTAGAGATCCCAACGGTATACGAAC	5540
A M K G I D E V Y H L A A L I A I P F S	
GGCGATGAAAGGTATTGATGAAGTCTACCATCTAGCTGCTTTGATTGCAATCCCATTTTC	5600
Y H S P D T Y V D T N I K G T L N V L Q	
TTATCATTCGCCAGATACCTATGTGGATACTAATATAAAAGGTACTGAATGTCTTGCA	5660
A A R D L E T P R I L V T S T S E V Y G	
GGCAGCCAGAGATTTGGAAACACCAAGAATCTTAGTAACATCGACTTCCGAAGTATATGG	5720
T A Q Y V P I D E K H P F Q G Q S P Y S	
AACAGCTCAATATGTGCCTATCGATGAAAAGCATCCGTTTCAAGGGCAGTCTCCCTACTC	5780
A T K I G A D R L A E S F Y R S	
AGCTACAAAAATAGGTGCAGATCGTCTAGCGGAATCTTTTTATCGAAGCTT	5840

Abb. 11. Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenzen der sequenzierten Genregion. Potentielle Promotoren sind doppelt unterstrichen, Ribosomenbindungsstellen einfach unterstrichen und Translationsstarts sind fett gedruckt. Durch gegenläufige Pfeile sind Haarnadelstrukturen gekennzeichnet. Es sind nur die Aminosäuresequenzen der in 3.1.3.3 besprochenen Gene dargestellt.

3.1.3 Analyse der Sequenzdaten

3.1.3.1 Identifizierung offener Leserahmen

Die offenen Leserahmen wurden mit Hilfe des Programms DNA-Strider 1.3 (Fa. CEA, Gif-sur-Yvette, Frankreich) identifiziert. Am 5'-Terminus lag ein unvollständiger Leserahmen mit einer Länge von 282 Bp, der den 3'-Terminus des *flgK*-Gens darstellt, das für ein HAP-1 kodiert. An *flgK* schloß sich ein kurzer nicht-kodierender DNA-Abschnitt mit 44 Bp und das *flgL*-Gen mit einer Länge von 1.026 Bp an, das für ein HAP-3 kodiert. Der GC-Gehalt von *flgL* beträgt 37,5 mol%, was dem für *A. woodii* ermittelten GC-Gehalt von 39 mol% (Sneath und Holt, 1986) entspricht. Der nächste Leserahmen mit einer Länge von 600 Bp folgte 67 Bp

stromabwärts vom *flgL*-Stopcodon. Sein abgeleitetes Protein wies keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen in Datenbankabgleichen auf und wurde daher vorläufig *orfA* genannt. *OrfA* besaß mit nur 30 mol% einen außerordentlich geringen GC-Gehalt, der den nicht-kodierenden Bereichen entsprach. Zwischen *orfA* und *fliC* lagen 310 Bp, in denen nur zwei kleine ORFs identifiziert (*orfB*: 63 Bp, *orfC*: 66 Bp) werden konnten, deren abgeleitete Proteine keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufwiesen. Der GC-Gehalt dieser Region betrug 30 mol% (Tab. 5). Hieran schloß sich das *fliC*-Gen mit einer Länge von 1.287 Bp und einem GC-Gehalt von 38,5 mol% an. Das Flagellin wird gefolgt von einem 177 Bp langen intergenen Bereich und einem offenen Leserahmen (*orfD*) mit einer Länge von 624 Bp, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz in Datenbankabgleichen keine ausgeprägten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufwies.

Tab. 5. Länge und GC-Gehalt der vollständigen offenen Leserahmen im sequenzierten DNA-Bereich.

Name	Länge (Bp)	GC-Gehalt (mol%)
<i>flgL</i>	1.026	37,5
<i>orfA</i>	600	30
<i>orfB</i>	63	29
<i>orfC</i>	66	28
<i>fliC</i>	1.287	38,5
<i>orfD</i>	624	28
<i>orfE</i>	342	40
<i>orfF</i>	87	32
<i>orfG</i>	135	28
<i>orfH</i>	156	33
<i>orfI</i>	36	30

Der *orfD* besaß mit nur 28 mol% einen außerordentlich geringen GC-Gehalt. Ein weiterer offener Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweist, (*orfE*) mit einer Größe von 342 Bp überlappt mit dem 3'-Ende von *orfB* um 8 Bp. *OrfE* weist aber mit 40 mol% einen GC-Gehalt auf, wie er für kodierende-Regionen in *A. woodii* typisch ist. Der *orfE* wird von einer sehr langen intergenen Region mit einer Länge von 434 Bp gefolgt, in der fünf kurze offene Leserahmen anzutreffen sind (*orfF*: 87 Bp, *orfG*: 135 Bp, *orfH*: 156 Bp, *orfI*: 36 Bp), die ebenfalls keine Ähnlichkeiten zu in Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen besitzen und im Durchschnitt einen GC-Gehalt von 31 mol% aufweisen. Am 3'-Ende des sequenzierten Bereiches schloß sich ein partieller offener Leserahmen mit einer Länge von 497 Bp an (*orfJ*), dessen abgeleitetes Protein der

UDP-Glucose-Epimerasen aus *Campylobacter jejuni* (61% Identität) und anderen *Bacteria* sehr ähnlich war.

3.1.3.2 Transkriptions- und Translationssignale

Mögliche Promotorsequenzen wurden nur stromaufwärts von *fliC* und *orfJ* identifiziert. Der mögliche *fliC*-Promotor war den Konsensussequenzen der σ^{28} -abhängigen Promotoren aus *B. subtilis* und *E. coli* (Tab. 6), die die Expression der späten Flagellengene regulieren, sehr ähnlich. Unmittelbar stromaufwärts von der -35 Region des *fliC*-Promotors fiel zudem eine AT-reiche Region auf, die eine große Übereinstimmung mit dem „upstream“ (UP)-Element des Flagellin (*hag*)-Promotors aus *B. subtilis* aufweist (Abb. 12). Für das UP-Element des *hag*-Promotors aus *B. subtilis* konnte eine aktivierende Wirkung auf die Expression des Flagellings nachgewiesen werden (Caramori und Galizzi, 1998). Stromaufwärts von *orfJ* wurde ein Sequenzbereich identifiziert, der den Konsensussequenzen der σ^{70} -abhängigen Promotoren von *E. coli* und *B. subtilis* entsprach (Tab. 6).

Tab. 6. Potentielle Promotorsequenzen von *fliC* und *orfJ* aus *A. woodii*.

Promotor	Organismus (Gen)	-35		-10
σ^{28}	<i>E. coli</i> ^a	TAAAGTTT	N ₁₁	GCCGATAA
σ^{28}	<i>B. subtilis</i> ^b	TAAA	N ₁₅	NCCGATAT
σ^{28}	<i>A. woodii</i> (<i>fliC</i>) ^c	TAAAGTAA	N ₁₁	GACGATAT
σ^{70}	<i>E. coli</i> ^b	TTGACA	N ₁₆₋₁₈	TATAAT
σ^{70}	<i>B. subtilis</i> ^d	TTGACA	N ₁₇₋₁₉	TATAAT
σ^{70}	<i>A. woodii</i> (<i>orfJ</i>) ^c	TTGTCA	N ₁₈	TATTAT

^aIde *et al.* (1999); ^bMacnab (1992); ^ckonservierte Nukleotide sind fett hervorgehoben, ^dGraves und Rabinowitz (1986)

10 - 40 Bp stromaufwärts der Stopcodons von *orfA* und *fliC* wurden außerdem Sequenzbereiche identifiziert, die Haarnadelstrukturen darstellen und somit an der Transkriptionstermination beteiligt sein könnten (Abb. 11).

Stromaufwärts der Startcodons von *flgL*, *orfA*, *fliC*, *orfD*, *orfE* und *orfJ* befanden sich Sequenzbereiche im Abstand von 4 - 12 Bp, die Übereinstimmungen mit der konservierten Ribosomenbindungsstelle aus *E. coli* (Shine und Dalgarno, 1974) und *B. subtilis* (Sakai *et al.*, 2001) aufwiesen (Tab. 7). Die größte Übereinstimmung wies dabei die Sequenz vor *fliC* mit einem Abstand von 8 Bp zum Startcodon und sechs von acht konservierten Nukleotiden auf.

Stromaufwärts von *orfB*, *orfC*, *orfF*, *orfG*, *orfH* und *orfI* wurden weder mögliche Promotorsequenzen noch Ribosomenbindungsstellen gefunden. Da sie zudem einen sehr geringen GC-Gehalt aufweisen, erscheint ihre Transkription in *A. woodii* unwahrscheinlich. Aufgrund der hier dargestellten Transkriptions- und Translationssignale ist aber zu vermuten, daß das *fliC*-Gen als monocistronische mRNA transkribiert wird, während die Gene *flgK*, *flgL*

und *orfA* zusammen mit bisher nicht identifizierten Genen weiter stromabwärts als polycistronische mRNA transkribiert werden.

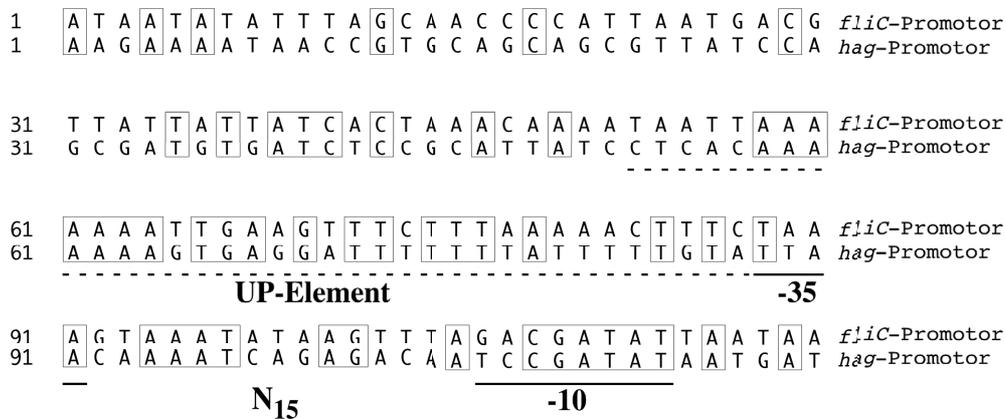


Abb. 12. Vergleich der Promotorregion der Flagellengene aus *B. subtilis* (*hag*) und *A. woodii* (*fliC*).

Der durch pSA6 und pSA13 klonierte Bereich des *A. woodii*-Chromosoms umfaßte also das Flagellengen und stromaufwärts von *fliC* weitere Flagellengene. Stromabwärts von *fliC* lagen keine Flagellengene, so daß weitere Klonierungen in Zukunft stromaufwärts von *flgL* erfolgen sollten. In Abb. 13 sind noch einmal die klonierten DNA-Fragmente sowie die Lage der Gene schematisch dargestellt.

Tab. 7. Potentielle Ribosomenbindungsstellen der klonierten Gene aus *A. woodii*.

Gen	Sequenz (5' ⇒ 3')
<i>E. coli</i> ^a	<u>AAGGAGGT</u>
<i>B. subtilis</i> ^b	<u>AAGGAGG</u>
<i>flgL</i>	<u>AAGGAACATAAAAAAATGAGAATT</u>
<i>orfA</i>	<u>TTGGAAGAAAAATGGAACCG</u>
<i>fliC</i>	<u>ACGGAGGAAAATACAATGAGAATC</u>
<i>orfD</i>	<u>AAGATAGGTGAAAAAATGAAGTTG</u>
<i>orfE</i>	<u>GAGGGGGTCGATTATGTTAGCT</u>
<i>orfJ</i>	<u>AAGGGAGAACTTTAATGGA</u>

^a Shine und Dalgarno (1974), ^b Sakai *et al.* (2001)

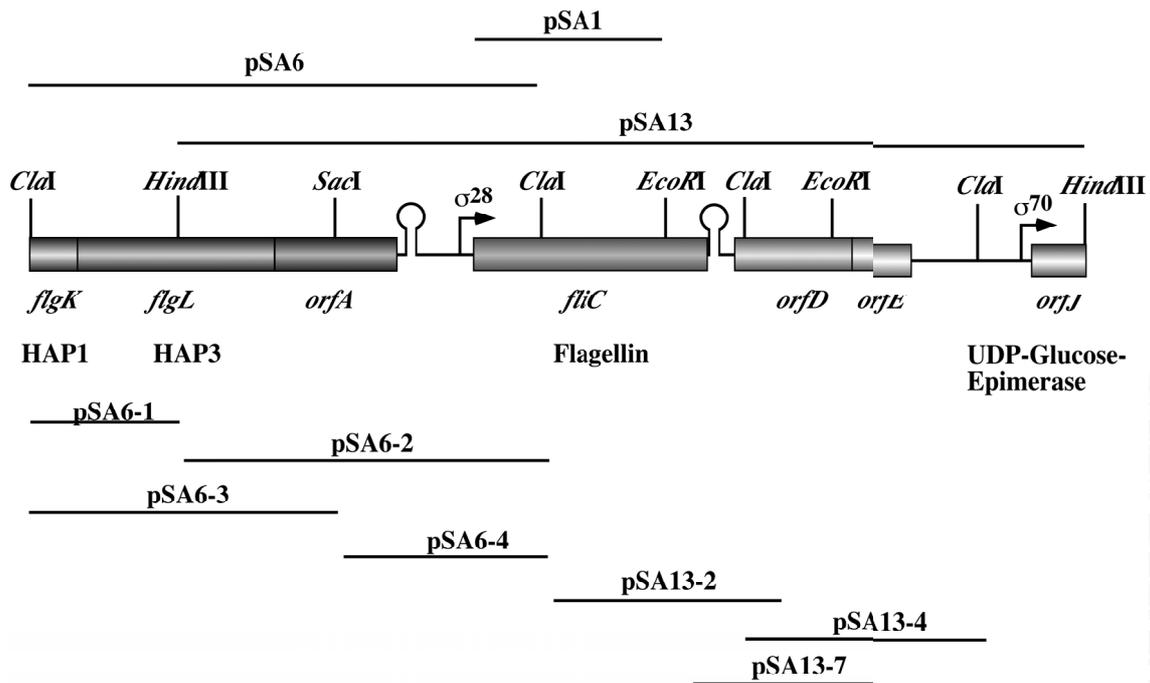


Abb. 13. Schematische Darstellung der klonierten Flagellengene aus *A. woodii*. In der oberen Hälfte sind die chromosomalen Klone und in der unteren Hälfte die Subklone zur Sequenzierung dargestellt.

3.1.3.3 Eigenschaften der abgeleiteten Genprodukte

Im folgenden sollen die wichtigsten Eigenschaften der abgeleiteten Genprodukte dargestellt werden. Alle Angaben beruhen dabei auf der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen durch die Programme DNA-Strider 1.3 (MW, pI, Hydrophobizität, Fa. CEA, Gif-sur-Yvette, Frankreich), "bestfit" (Sequenzvergleiche, GCG-Packet Version 9.1, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA) und "peptidestructure" (Sekundärstruktur, GCG-Packet Version 9.1, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA). Es wurden nur offene Leserahmen berücksichtigt, deren Expression wahrscheinlich ist. Die wichtigsten Eigenschaften der abgeleiteten Genprodukte, die auf pSA6 und pSA13, identifiziert wurden, sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Alle Gene kodieren für hydrophile Proteine.

Am 5'-Ende von pSA6 wurde ein partieller ORF identifiziert, dessen abgeleitetes Protein Ähnlichkeiten zum Carboxyterminus von HAP-1 aus verschiedenen Bakterien besitzt. Die größte Ähnlichkeit bestand mit 36% identischen Aminosäuren zu HAP-1 aus *Treponema pallidum*.

Tab. 8. Eigenschaften der abgeleiteten Genprodukte auf pSA6 und pSA13.

Genprodukt	Aminosäuren	molekulare Masse (kDa) ^a	pI
FlgL (HAP-3)	343	37,8	4,62
OrfA	225	25	5,1
FliC (Flagellin)	429	46	5,7
OrfD	208	24,4	4,26
OrfE	113	13,4	10,36

^a abgeleitet aus der DNA Sequenz

Das *flgL*-Gen kodiert für ein HAP-3 Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 37,8 kDa. 35 - 38% seiner Aminosäuren sind in *B. subtilis*, *E. coli* und *V. parahaemolyticus* konserviert (Tab. 6). Bei der Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung fällt auf, daß HAP-3 nur einen geringen Cystein- und Prolin-Gehalt aufweist (kein Cystein, ein Prolin), eine Eigenschaft, die als typisches Merkmal der axialen Flagellenproteine in *E. coli* beschrieben wurde (Homma *et al.*, 1990; Tab. 5). Die Sekundärstruktur scheint keine besonderen Merkmale aufzuweisen. Potentielle α -helikale und β -Faltblattstrukturen liegen im gesamten Protein verteilt vor. Damit entspricht auch das *A. woodii*-HAP-3 der bereits für das *E. coli*-HAP-3 postulierten Sonderrolle unter den axialen Flagellenproteinen, die in aller Regel α -helikale Termini und zentrale Domänen mit β -Faltblattstruktur besitzen (Homma *et al.*, 1990).

Der *orfA* kodiert für ein Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 25 kDa. 20% seiner Aminosäuren sind in einem hypothetischen Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* identisch. Der Vergleich zu *B. subtilis* zeigt allerdings, daß stromabwärts von *flgL* ebenfalls ein ORF (*yviE*) zu finden ist, der für ein hypothetisches Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von ca. 20 kDa kodiert. Aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *yviE* wurde eine Struktur postuliert, die eine aminoternale Domäne mit überwiegend α -helikalen Bereichen und eine carboxyterminale Domäne mit einer überwiegenden β -Faltblattstruktur aufweist (Soldo *et al.*, 1996). Für das Genprodukt aus *orfA* kann aus seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz eine ähnliche Struktur postuliert werden (Abb. 5), obwohl die Identität zwischen beiden Proteinen mit nur 18% sehr gering ist. Diese Struktur sollte aber eine Interaktion beider Proteine mit anderen Komponenten des Filamentes, die über α -helikale Strukturen im Kern des Filamentes erfolgen, ermöglichen (Namba *et al.*, 1989). Für diese Hypothese spricht, daß vor *orfA* keine Promotorsequenz identifiziert werden konnte. Dieses läßt die Expression von *orfA* auf einem Transkript zusammen mit *flgK* und *flgL* wahrscheinlich erscheinen. Da Flagellengene, die für ähnliche strukturelle Komponenten des Flagellums kodieren, häufig in Operonen kodiert sind, scheint eine Funktion von OrfA als Bestandteil des Filamentes möglich. Dagegen spricht allerdings, daß das Genprodukt von *orfA* ein Cystein enthält und mit 7,3 mol% einen für axiale Flagellenproteine ungewöhnlich hohen Prolin-Gehalt aufweist (Homma *et al.*, 1990).

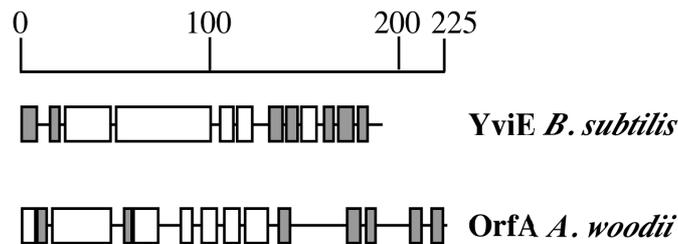


Abb. 14. Vergleich der hypothetische Sekundärstruktur von OrfA aus *A. woodii* und YviE aus *B. subtilis*. Leere Boxen kennzeichnen α -helikale Strukturen und gefüllte Boxen β -Faltblattstrukturen in der Sekundärstruktur. Die Sekundärstrukturen wurden aus der abgeleiteten Primärsequenz durch das Programm "peptidestructure" (GCG-Packet Version 9.1, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA) aufbauend auf dem Chou-Fasman Algorithmus ermittelt.

Das *fliC*-Gen kodiert für ein Flagellin mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 46 kDa, was etwas geringer ist als die experimentell bestimmte Größe von 50 kDa. Für das Flagellin von *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine Glycosylierung beschrieben, die ebenfalls zu einer größeren Differenz zwischen abgeleiteter und experimentell bestimmter molekulare Masse führte (Brimer und Montie, 1998). Für das *A. woodii*-Flagellin konnte weder durch eine Deglycosylierung mit TMFS noch durch eine Markierung mit Digoxigenin eine Glycosylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *fliC* stimmt völlig mit der experimentell bestimmten aminoterminalen Sequenz des gereinigten Flagellins (Aufurth *et al.*, 1998) überein. Die amino- und carboxyterminalen Domänen des Flagellins von *A. woodii* waren den Flagellinen anderer Bakterien sehr ähnlich (71 bzw. 79% Identität zu *B. subtilis*). Die Aminosäurezusammensetzung des Flagellins aus *A. woodii* ähnelt den axialen Flagellenproteinen aus *E. coli* (Homma *et al.*, 1990; Tab. 10).

Tab. 9. Ähnlichkeiten zwischen Flagellin und Haken-assoziierten Proteinen aus *A. woodii* und den entsprechenden Proteinen anderer *Bacteria*.

Protein	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Flagellin	67 ^a	54	58
HAP-1	39	39	37
HAP-3	37	36	35

^aDie angegebenen Werte geben die Anzahl der identischen Aminosäuren in Prozent an. Die Analyse erfolgte durch das Programm "bestfit" aus dem GCG-Packet (Version 9.1, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA).

OrfD kodiert für ein Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 24,4 kDa. Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen konnten nicht festgestellt werden.

Tab. 10. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von HAP-3, OrfA und FliC aus *A. woodii* mit den axialen Flagellenproteinen von *E. coli*.

Aminosäure	FlgL (HAP-3)	OrfA	FliC (Flagellin)	<i>E. coli</i> ^b
Ile	4,8 ^a	9,0	7,5	4,3
Leu	8,7	6,8	9,5	8,9
Val	6,3	5,1	6,1	7,5
Met	2,1	4,7	3,2	2,8
Phe	5,4	3,5	2,3	2,2
Trp	0	1,5	0	0,5
Tyr	7,3	4,5	1,8	2,4
Ala	3,6	3,1	7,8	11,1
Pro	1,0	7,3	0,4	3,0
Gly	4,4	3,2	3,5	8,1
Ser	6,9	5,5	8,1	7,7
Thr	8,6	6,0	9,6	8,9
Asn	6,9	6,4	9,6	7,4
Gln	7,8	6,1	6,8	7,1
Asp	7,6	5,5	5,1	6,2
Glu	6,5	7,7	6,0	3,9
Lys	5,1	6,1	6,2	4,5
Arg	6,6	6,2	4,8	3,4
His	0,4	1,1	1,8	0,5
Cys	0	0,4	0	0

^amol%; ^b Die Werte für *E. coli* stellen den Mittelwert aus allen axialen Proteinen dar (Homma *et al.*, 1990).

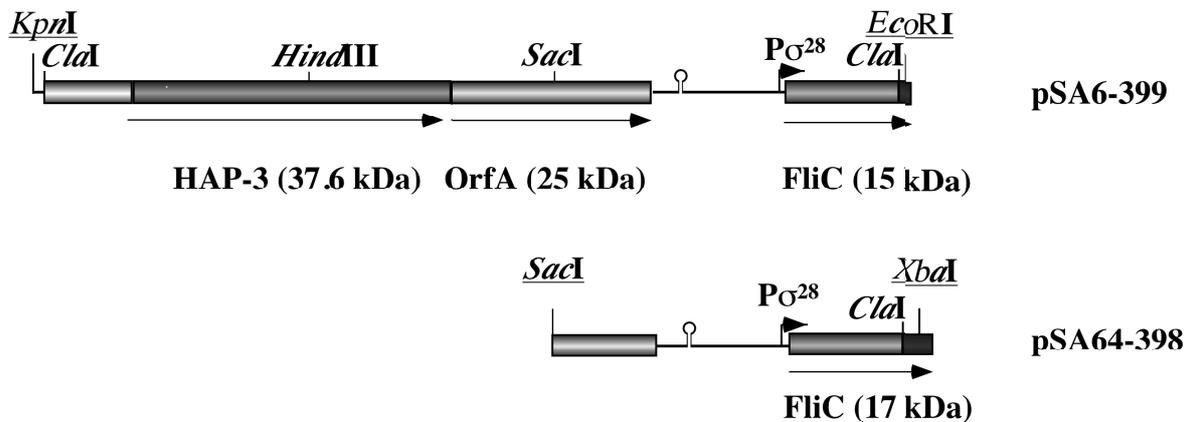
OrfE kodiert für ein Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 13,4 kDa. Auch hier wurden keine Ähnlichkeiten zu in Datenbanken hinterlegten Proteinen gefunden. Seine aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ermittelte Sekundärstruktur ist überwiegend α -helikal.

OrfJ ist den NADH-abhängigen Epimerasen und Dehydratasen sehr ähnlich. Die größte Übereinstimmung (64% identische Aminosäuren) besteht zu einer hypothetischen UDP-Glucose-4-Epimerase aus *Deinococcus radiodurans*, aber auch zur gut charakterisierten UDP-Glucose-4-Epimerase aus *E. coli* besteht eine hohe Ähnlichkeit (39% Identität). Da aber auch sehr große Ähnlichkeiten zu Epimerasen und Dehydratasen, die verschiedene Zucker als Substrate nutzen, gefunden wurden, kann aus Sequenzvergleichen nicht auf eine mögliche Substratspezifität geschlossen werden. Zudem hat die Strukturanalyse der UDP-4-Glucose-Epimerase und der dTDT-Glucose-Dehydratase aus *E. coli* ergeben, daß die aminoterminal Domäne die NAD-Bindung und nicht die Substratbindung vermittelt. Die Analyse der Sekundärstruktur zeigte eine überwiegende β -Faltblattstruktur, wie für eine Rossmann-Falte zu erwarten.

3.1.4 Expression von *orfA* in *E. coli*

Die Sequenzanalyse ergab Hinweise auf eine mögliche gemeinsame Transkription von *orfA*, *flgL* und *flgK*. Die strukturelle Analyse von OrfA läßt eine Funktion in der Filamentstruktur möglich erscheinen. Der im Vergleich zu kodierenden Regionen niedrige GC-Gehalt deutet allerdings darauf hin, daß *orfA* keine kodierende Nukleotidsequenz darstellt. Um die Frage zu beantworten, ob *orfA* tatsächlich kodierend ist, sollte er heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Da alle Gene auf pSA6 entgegen der Leserichtung des *lac*-Promotors lagen, war es zunächst nötig, für die Expression ein neues Plasmid herzustellen. Hierzu wurde aus pSA6 das gesamte Insert durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *KpnI* ausgeschnitten und in Leserichtung in pHSG399 kloniert, woraus das Plasmid pSA6-399 resultierte (Abb. 15). Dieses enthielt das partielle *flgL*-Gen ohne Ribosomenbindungsstelle, *flgK*, *orfA* und das partielle *fliC*-Gen in Leserichtung des *lac*-Promotors. Als Negativkontrolle wurde außerdem ein Plasmid hergestellt, das nur den 3'-terminalen Bereich von *orfA* trug. Hierzu wurde aus pSA6 ein *SacI*-*XbaI*-Fragment ausgeschnitten und in pHSG398 kloniert. Das hierdurch erhaltene Plasmid (pSA64-398) enthielt den 3'-terminalen Bereich von *orfA* (ohne dessen Ribosomenbindungsstelle) und das partielle *fliC*-Gen in Leserichtung des *lac*-Promotors. Die Expression sollte in Minizellen von *E. coli* DK6 erfolgen. *E. coli* DK6 wurde hierzu mit den Plasmiden pHSG399, pSA6-399 und pSA64-398 transformiert, und von jedem resultierenden Stamm wurden Minizellen isoliert. Die Expression in den Minizellen wurde durch die Zugabe von IPTG induziert und erfolgte in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin. Die gebildeten Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Expressionsstudie ergab, daß neben der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) drei weitere Proteine mit molekularen Massen von 15, 25 und 38 kDa von pSA6-399 kodiert wurden (Abb. 15). Durch den Vergleich der apparenten mit der vorhergesagten molekularen Masse kann das 38-kDa-Protein als HAP-3, das 25-kDa-Protein als OrfA und das 15-kDa-Protein als Flagellinfragment angesprochen werden. Durch die Analyse der Expression von pSA64-398 konnte dies bestätigt werden. In diesem Fall waren nur noch die Chloramphenicol-Acetyltransferase und ein 17-kDa-Protein zu detektieren. Das 17-kDa-Protein entsprach in seiner molekularen Masse wieder dem Flagellinfragment. Die größere Masse des Flagellinfragmentes war darauf zurückzuführen, daß das Stopcodon für das *fliC*-Fragment in pSA64-398 bedingt durch die Klonierung weiter stromabwärts lag.

A.



B.

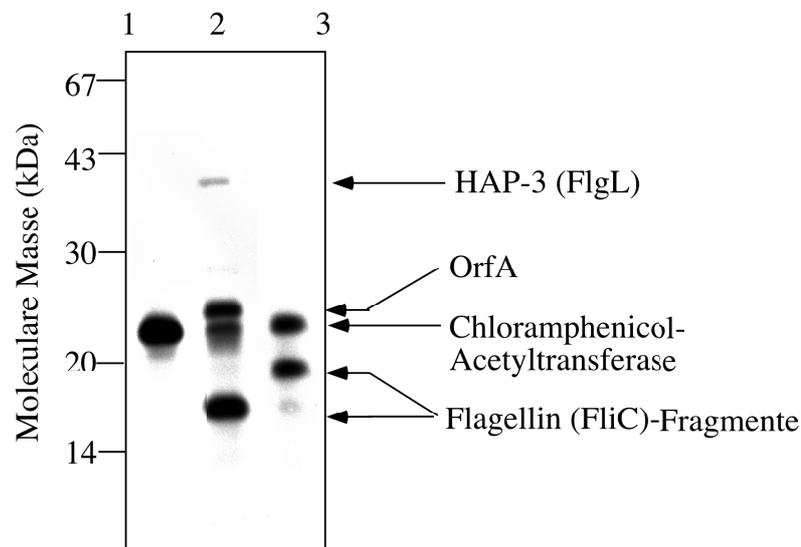


Abb. 15. Expression von *orfA*, *flgL* und *fliC* in *E. coli* DK6. In A. sind die beiden Klone pSA6-399 und pSA64-398 schematisch dargestellt. Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung genutzt wurden, sind unterstrichen. Am 3'-Terminus ist *fliC* translational an den Vektor fusioniert (schwarzer Bereich). In B ist das Ergebnis der Expression gezeigt. Die Expression erfolgte mit pHSG399 (Spur 1), pSA6-399 (Spur 2) und pSA64-398 (Spur 3) in Minizellen von *E. coli* DK6. Es ist das Ergebnis der Autoradiographie nach Analyse der Minizellen im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel gezeigt.

Auffallend bei der Analyse der Expression war, daß HAP-3 nur eine schwache und das FliC-Fragment eine relativ starke Markierung aufwies. Aufgrund des Methioningehaltes der Proteine wäre eine Signalstärke in der Reihenfolge OrfA (9 Met) > CAT, HAP-3 (6 Met) > FliC (3 Met) zu erwarten gewesen. Die abweichenden Signalstärken deuten auf regulatorische Mechanismen hin. Die *fliC*-Expression wird sicherlich durch die gut konservierte Ribosomenbindungsstelle, aber auch durch den σ^{28} -abhängigen Promotor und dessen UP-

Element gefördert. Dieses ist aufgrund der großen Anzahl an Flagellinmonomeren (ca. 20.000; Berry und Armitage, 1999) im Filament auch zu erwarten. *FlgL* wird dagegen wesentlich schlechter exprimiert als das *cat*-Gen. Dies korreliert mit der geringen Anzahl an HAP-3 im Flagellum (10 - 40 Kopien; Ikeda *et al.*, 1987) und mag auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen hindeuten.

Durch die Expression in *E. coli* ist gesichert, daß *orfA* für ein Protein kodiert. Für eine weitere Analyse und zur Bestätigung seiner Expression in *A. woodii* sind allerdings in Zukunft weitere Untersuchungen nötig. Hierfür würde die Herstellung eines Antiserums gegen das Protein eine gute Grundlage bilden, um die Expression von *orfA* in *A. woodii* zu analysieren und die Lokalisation des OrfA-Proteins im Flagellum zu ermitteln.

Zusammenfassend deuten die molekularbiologischen Daten also auf eine Konservierung der Flagellengenorganisation im Vergleich zu *B. subtilis* hin. Stromabwärts vom Flagellum wurden in *A. woodii* zwar keine Flagellengene identifiziert, aber stromaufwärts zeichnet sich eine fast identische Organisation ab. Dies dürfte vor allem die Klonierung der Rotorkomponente des Flagellums (FliG) erleichtern, da diese in *B. subtilis* im *fla/che*-Operon vorliegt. Diese Operon kodiert für einige Proteine, vor allem der Signaltransduktionskette der Chemotaxis, die eine sehr hohe Konservierung aufweisen und somit eine Identifizierung der entsprechenden Gene aus *A. woodii* durch einen heterologen Ansatz erleichtern dürfte. Da die *mot*-Gene in fast allen *Bacteria* inklusive *B. subtilis* vereinzelt auf dem Chromosom liegen, erscheint deren Klonierung schwieriger. Allerdings müßte zunächst ein DNA-Transfersystem für *A. woodii* etabliert werden.

Da über die Ultrastruktur der Na⁺-abhängigen Flagellen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nichts bekannt war, sollte neben der molekularbiologischen Charakterisierung eine strukturelle Charakterisierung durch Elektronenmikroskopie erfolgen. Hierzu war es zunächst nötig, die Na⁺-abhängigen Flagellen von *A. woodii* zu reinigen.

3.1.5 Reinigung von ganzen Flagellen aus *A. woodii*

Protokolle zur Reinigung oder Anreicherung von Flagellen oder Haken-Basalkörper-Komplexen beruhen auf einer Reinigung des Flagellums aufgrund seiner hohen molekularen Masse durch Gelfiltration, Dichtegradientenzentrifugation oder differentielle Zentrifugation. Um eine Reinigung von Flagellen allein durch ihre Größe zu erreichen, ist es essentiell, daß das Filament während der Reinigung intakt bleibt. In Vorarbeiten war daher die Stabilität des Filamentes gegenüber pH, Temperatur und Detergenzien untersucht worden. Das *A. woodii*-Filament denaturiert bei pH-Werten unter 2 und über 9, sowie bei Temperaturen ab 50°C (Aufurth, 1996). Detergenzien haben nur einen geringen Einfluß auf die Filamentstabilität. Hohe Triton X-100 Konzentrationen können zwar zu einer Fragmentierung des Filamentes

führen, diese sind allerdings weiterhin groß genug, um eine Sedimentierung durch eine niedertourige Zentrifugation (25.000 x g, 1 h) zu ermöglichen. Es wurde daher auch für *A. woodii* versucht, eine Reinigung von ganzen Flagellen durch eine Größenfraktionierung zu erreichen.

A. woodii wurde hierzu generell in 17,5-l-Kulturen angezogen. Als Ausgangsmaterial zur Solubilisierung der Flagellen wurden keine gewaschenen Membranen verwendet, da der French-Press Aufschluß der Zellen zu einer völligen Zerstörung des Filamentes führte. Es wurde statt dessen ein Protokoll zur Herstellung von Sphäroplasten aus *A. woodii* durch eine Penicillinbehandlung genutzt.

Der Erfolg der Solubilisierung wurde im Elektronenmikroskop überprüft und äußerte sich in der Zersetzung der Sphäroplasten. Im elektronenmikroskopischen Bild waren nach Behandlung mit Triton X-100 nur noch Zellhüllhälften, Flagellen und cytoplasmatische Bestandteile zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die cytoplasmatischen Komponenten wurden hiernach durch eine einfache differentielle Zentrifugation aus dem Solubilisat entfernt. Flagellen und Zellhüllhälften waren dabei im Sediment des zweiten Zentrifugationsschrittes vorhanden. Für die weitere Aufreinigung bestand hauptsächlich das Problem, die Flagellen von den Zellhüllhälften zu trennen. Bei der Reinigung des Filamentes war bereits aufgefallen, daß die Filamentpräparationen häufig von einem Protein mit einer molekularen Masse von 90 kDa verunreinigt waren, die auf die Anwesenheit von Zellhüllhälften zurückzuführen waren. Da das "surface-layer"-Protein von *A. woodii* den Hauptbestandteil der Zellhüllhälften ausmachen sollte und aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen die molekulare Masse des "surface-layer"-Proteins mit ca. 90 kDa angegeben worden war (Mayer *et al.*, 1977), wurde vermutet, daß es sich bei dem 90-kDa-Protein um das "surface-layer"-Protein von *A. woodii* handelt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde daher zunächst durch den Nachweis einer Abtrennung des 90-kDa-Proteins vom Flagellin (50 kDa) im SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Bei erfolgreicher Abtrennung wurden die Proben dann im Elektronenmikroskop auf ihre Reinheit hin überprüft.

Zur Auftrennung von Flagellen und Zellhüllhälften wurde zunächst eine Gelfiltration mit Sepharose CL-4B genutzt. Hierbei eluierten aber sowohl das 90-kDa-Protein als auch das Flagellin zusammen von der Säule. Als eine weitere Möglichkeit zur Größenfraktionierung wurde als nächstes eine differentielle Zentrifugation durchgeführt, bei der alle Zentrifugationsschritte mit weniger als 25.000 erfolgten. Auch hierdurch ließ sich keine Auftrennung erreichen. Erst durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Auftrennung erreicht, die sich zunächst durch die Anwesenheit von zwei Proteinbanden nach der Zentrifugation andeutete. Die Analyse der beiden Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte dann, daß sich in der oberen Bande überwiegend das 90-kDa-Protein und in der unteren Bande das Flagellin (50 kDa), sowie sechs weitere Proteine mit molekularen Massen von 63, 27, 23, 19, 17 und 7 kDa befanden (Abb. 16). Durch die elektronenmikroskopische Analyse

der Fraktionen konnte bestätigt werden, daß die obere Bande Zellhüllhälften und die untere Flagellen enthielt.

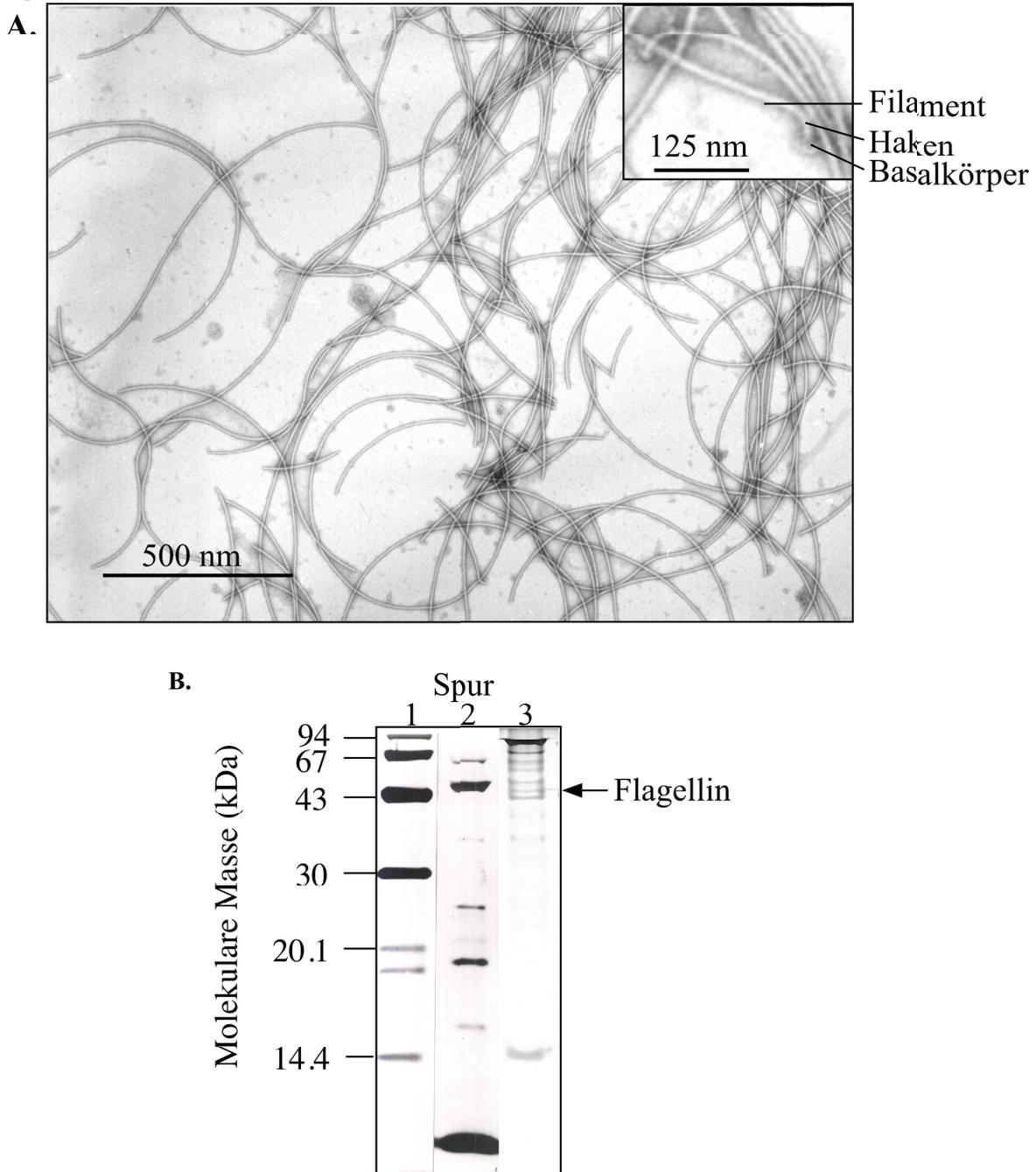


Abb. 16. Reinigung ganzer Flagellen von *A. woodii*. A Elektronenmikroskopische Aufnahme der Flagellenpräparation. Im Insert ist ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt. Die Negativkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat. B. 12%ige SDS-PAGE; Spur 1: molekularer Massenstandard, Spur 2: untere Bande des CsCl-Dichtegradienten (Flagellenpräparation), Spur 3: obere Bande des CsCl-Dichtegradienten. Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

Da die Flagellenpräparation im elektronenmikroskopischen Bild als sauber erschien, wurden die Proteine in der Flagellenpräparation durch aminoterminaler Sequenzierung weiter analysiert. Durch die aminoterminaler Sequenzierung ließ sich jedoch nur das 50-kDa-Protein

als Flagellin identifizieren (Tab. 11). Für das 19- und 17-kDa-Protein wurden aufgrund einer aminoterminalen Blockierung keine Sequenzen erhalten. Die 63-, 27-, 23- und 7-kDa-Proteine waren keinen bekannten Proteinen ähnlich. Dies war allerdings nicht verwunderlich, da die Konservierung in den aminoterminalen Sequenzen der Flagellenproteine mit Ausnahme des Flagellins allgemein zu gering ist, um eine Identifizierung durch Sequenzvergleiche zu ermöglichen (Kubori *et al.*, 1997). Eine Zuordnung dieser Proteine zu bestimmten Komponenten der Flagellen von *A. woodii* kann daher erst nach der Klonierung ihrer Gene erfolgen.

Tab. 11. Molekulare Masse und aminoterminalen Aminosäuresequenzen von Proteinen der Flagellen aus *A. woodii*.

molekulare Masse (kDa)	aminoterminalen Aminosäuresequenz
63	MKIQREHEKG
50	MRINHNIAAK
27	AINEQMLK
23	MTQEWQMLEQIIK
19	blockiert
17	blockiert
7	MTNEALGMIETK

Die gereinigten Flagellen erlaubten allerdings eine eingehendere elektronenmikroskopische Analyse des Haken-Basalkörper-Komplexes der Na⁺-abhängigen Flagellen von *A. woodii*.

3.1.6 Elektronenmikroskopische Analyse der Haken-Basalkörper-Strukturen

Da bisher lediglich die Strukturen der Haken-Basalkörper-Komplexe aus den H⁺-abhängigen Flagellen von *E. coli* (DePamphilis und Adler, 1971b), *S. typhimurium* (Aizawa *et al.*, 1985), *B. subtilis* (Kubori *et al.*, 1997) und *Caulobacter crescentus* (Johnson *et al.*, 1979) untersucht wurden, war es von Interesse, die Haken-Basalkörper-Komplexe des Na⁺-abhängigen Flagellums aus *A. woodii* näher zu betrachten. Die elektronenmikroskopische Analyse der Haken-Basalkörper-Komplexe aus *A. woodii* erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop nach Negativkontrastierung der Flagellenpräparationen mit Uranylacetat (Abb. 17).

Der Haken-Basalkörper-Komplex von *A. woodii* besteht aus einem Haken, mit einem Durchmesser von 16 nm, einem Stab (10 nm Durchmesser) und einem MS-Ring (25 nm Durchmesser). Der MS-Ring besteht aus zwei Elementen, einem oberen Ring (kleine Pfeilköpfe in A1/A2) und einem unteren Ring (große Pfeilköpfe in A1/A2). In Abb. 17A1 und B1 läßt sich eine periodische Ultrastruktur des oberen Elementes (Pfeil in A1/B1) erkennen. Über dem MS-Ring ließen sich zudem zwei weitere Strukturen am Stab erkennen (weißer Pfeilkopf und schwarzer Pfeil in A2-4/B2/B4/C5/D2/D4). Da diese Strukturen mit 11 - 12 nm

etwas breiter als der Stab sind, stellen sie möglicherweise weitere Ringstrukturen dar. An einigen Basalkörpern ließen sich auch unterhalb des MS-Rings Strukturen ausmachen (schwarze Pfeilköpfe und dünne Pfeile in C1-4/D1-4), die bis zu 10 nm in cytoplasmatischer Richtung vom MS-Ring reichten.

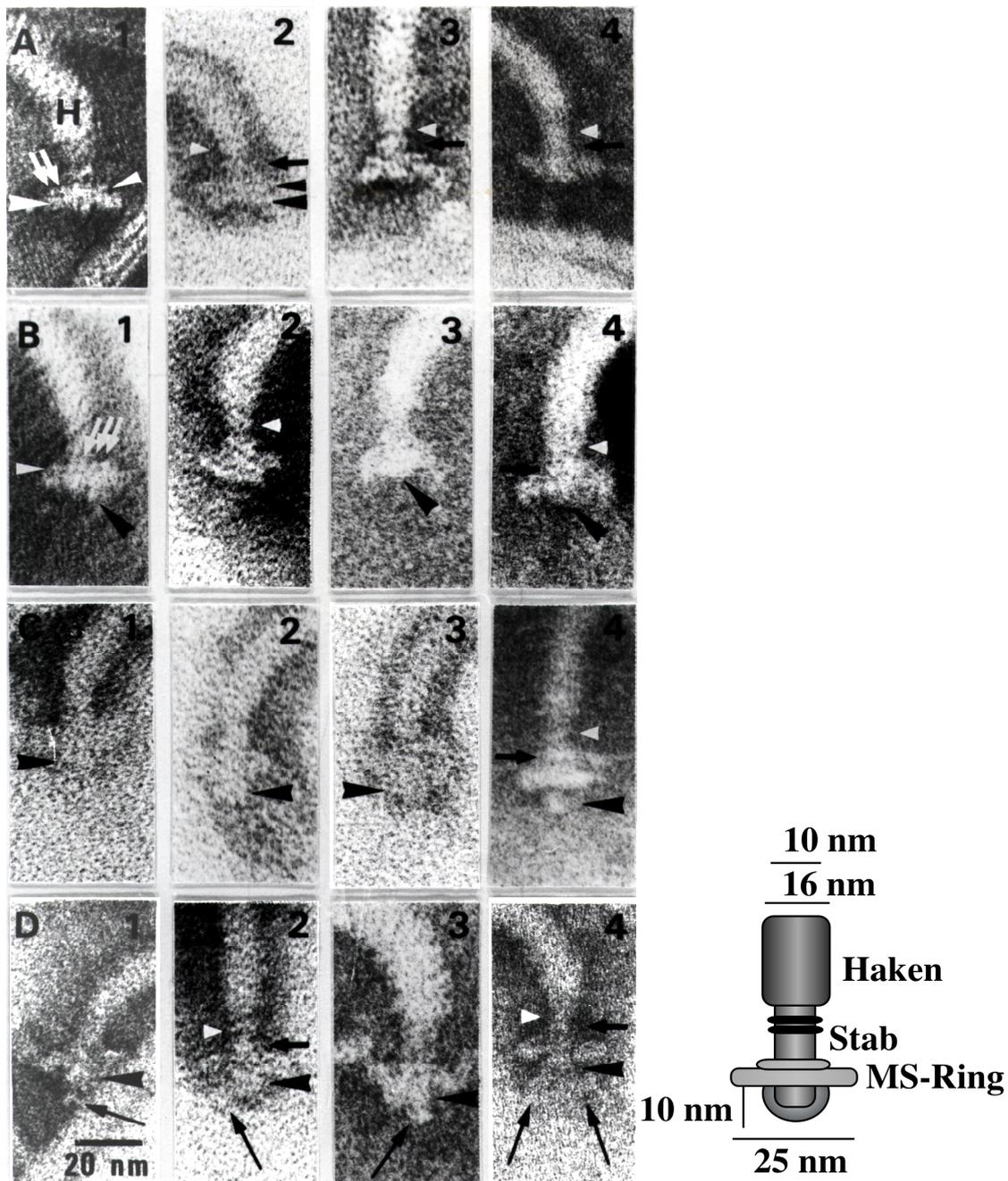


Abb. 17. Elektronenmikroskopische Analyse und schematische Darstellung von Haken-Basalkörper-Komplexen aus *A. woodii*. Es sind mit Uranylacetat negativ kontrastierte Flagellenpräparationen gezeigt. Genauere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Zusammenfassend entsprach die Struktur des Haken-Basalkörper-Komplexes von *A. woodii* der bekannten Struktur der Haken-Basalkörper-Komplexe der H⁺-abhängigen Flagellen aus *B. subtilis*. Zusätzlich ließen sich zwei Strukturen am oberen Ende des Stabes detektieren, die womöglich mit dem Durchtritt des Stabes durch die Zellwand oder den "surface-layer" in Verbindung stehen. Unterhalb des MS-Rings wurden Strukturen erkennbar, die entsprechend dem C-Ring der *E. coli*-Flagellen die Rotorkomponenten des Flagellenmotors enthalten können.

3.1.7 Elektronenmikroskopische Analyse von Mot-Komplexen aus *A. woodii*

In *E. coli* ist der MS-Ring durch einen Ring aus 9 - 12 Mot-Komplexen in der Cytoplasmamembran, die die Stator-Komponente des Flagellenmotors darstellen und wahrscheinlich auch für die H⁺-Translokation verantwortlich sind, umgeben (Khan *et al.*, 1988). Um die Frage zu klären, ob solche Partikelringe auch in Na⁺-abhängigen Flagellen anzutreffen sind, sollte die Cytoplasmamembran näher analysiert werden. Als geeignete Methode erschien hier die Analyse von Zellen im Transmissionselektronenmikroskop, die durch die Gefrierbruchmethode aufgebrochen wurden. Erschwert wurde diese Analyse durch die Tatsache, das *A. woodii* im Gegensatz zu *E. coli* lediglich ein Flagellum am Zellpol trägt. Für die Analyse wurden *A. woodii*-Zellen verwendet, die während der logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurden (OD₆₀₀ = 0,8). Nach dem Gefrierbruch ließen sich im Elektronenmikroskop deutlich Zellwand, Cytoplasmamembran und das Cytoplasma unterscheiden. In der Cytoplasmamembran wurden Partikelkomplexe detektiert (Abb. 18). Diese waren in die Cytoplasmamembran eingebettet und am Zellpol lokalisiert. Die Partikel (dünne Pfeile in Abb. 18) hatten einen Durchmesser von 5 nm und waren um eine zentrale Masse (dicker Pfeil in Abb. 18) mit einem Durchmesser von 25 nm gruppiert. In der Abb. 18 können nur sechs Partikel erkannt werden, bedingt durch die Lage des Rings am Zellpol. Hieraus kann man jedoch auf 9 - 10 Partikel im gesamten Ring schließen. Der Mot-Komplex des Na⁺-abhängigen Flagellums von *A. woodii* entspricht damit also in Größe und Struktur dem Mot-Komplex der H⁺-abhängigen Flagellen von *E. coli* und *S. typhimurium*.

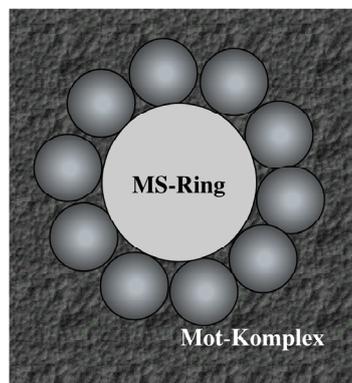
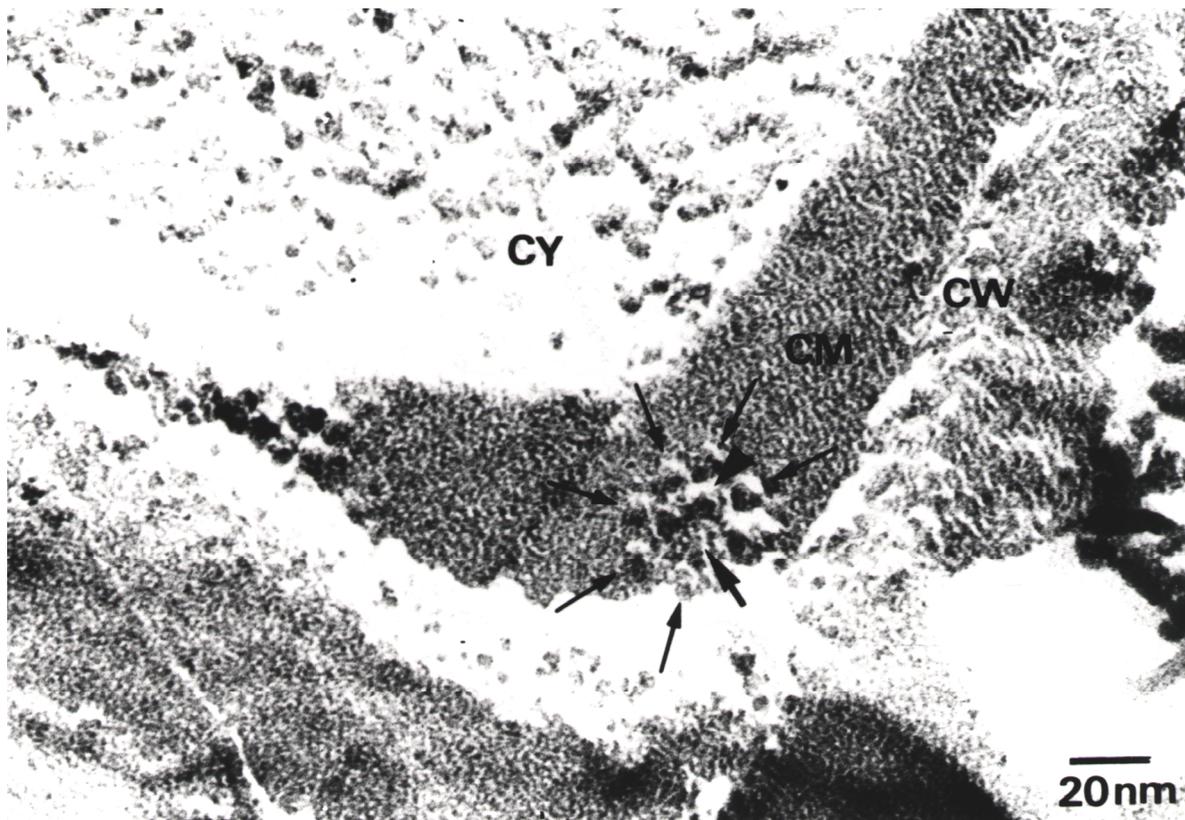


Abb. 18. Elektronenmikroskopische Aufnahme und schematische Darstellung eines Mot-Komplexes aus *A. woodii*. Schmale Pfeile deuten auf die Mot-Komplexe, dicke Pfeile markieren die zentrale Masse. CY: Cytoplasma, CM: Cytoplasmamembran, CW: Zellwand

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß das Na^+ -abhängige Flagellum von *A. woodii* in struktureller Hinsicht und in Bezug auf seine molekulare Organisation den H^+ -abhängigen Flagellen sehr ähnlich ist. Unterschiede in der Ionenspezifität müßen daher auf molekularer Ebene determiniert sein.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, besitzt *A. woodii* neben einem Na^+ -getriebenen Flagellum auch eine Na^+ - F_1F_0 -ATPase, die durch einen transmembranen elektrochemischen

Na⁺-Gradienten angetrieben wird (Heise *et al.*, 1992). Dieses Enzym wurde bereits molekularbiologisch charakterisiert (Rahlfs und Müller, 1997, 1999; Rahlfs *et al.*, 1999). Im folgenden stand daher die proteinchemische Charakterisierung der Na⁺-F₁F₀-ATPase im Vordergrund. Hierzu wurde zunächst die Untereinheitenzusammensetzung des Enzyms ermittelt.

3.2 Analyse der Untereinheitenzusammensetzung der Na⁺-F₁F₀-ATPase aus *A. woodii*

Die Na⁺-F₁F₀-ATPase aus *A. woodii* wurde bereits 1994 zum ersten Mal gereinigt (Reidlinger und Müller, 1994). Allerdings enthielt das Enzym nur sechs Untereinheiten was im Gegensatz zu den üblicherweise acht Untereinheiten in anderen bakteriellen F₁F₀-ATPasen steht. Nach der Entdeckung, daß die genetische Organisation der Na⁺-F₁F₀-ATPase aus *A. woodii* der anderer bakterieller F₁F₀-ATPasen vergleichbar ist, bestand die Vermutung, daß zwei der acht Untereinheiten bei der Reinigung verloren gegangen waren. Aus dem Vergleich der proteinchemischen und molekularen Daten ließ sich entnehmen, daß der ersten Präparation der Na⁺-F₁F₀-ATPase die Untereinheiten *a* und *b* fehlten. Die Interpretation dieser Daten wurde erschwert durch Untersuchungen an verwandten Organismen, in denen die für die Untereinheiten *a* und *b* kodierenden Gene ebenfalls gefunden worden waren, aber nicht deren Genprodukte (Das und Ljungdahl, 1997; Das *et al.*, 1997). In diesem Falle wurde postuliert, daß die Gene *atpB* und *atpF* zwar transkribiert, aber nicht translatiert wurden. Durch Northern-Blot-Studien war die Transkription des gesamten *atp*-Operons von *A. woodii* bereits nachgewiesen worden (Rahlfs *et al.*, 1999). Im nächsten Schritt sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Gene *atpB* und *atpF* auch translatiert werden. Die molekularen Daten zeigten zudem zum ersten Mal für eine F₁F₀-ATPase eine Duplikation des Gens für die Untereinheit *c* (*atpE*₂, *atpE*₃). Diese Untereinheiten sind völlig identisch und sollten im nativen Enzym nicht zu unterscheiden sein. Im folgenden werden diese Untereinheiten daher als Untereinheit *c*₂/*c*₃ bezeichnet. Zwei weitere Duplikationen und eine nachfolgende Fusion führte außerdem zur Bildung eines dritten *atpE*-Gens (*atpE*₁) im *atp*-Operon von *A. woodii*, das für eine *c*-Untereinheit mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 18 kDa kodiert (Untereinheit *c*₁). Auch dieses Protein konnte in der zuvor gereinigten Na⁺-F₁F₀-ATPase nicht nachgewiesen werden und wurde in die folgende Expressionsanalyse mit einbezogen.

Durch immunologische Studien sollte zunächst geklärt werden, ob die Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁ in *A. woodii* produziert werden. Hierzu war es nötig, Antiseren gegen die Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁ zu generieren. Als Positivkontrolle sollte zudem ein Antiserum gegen die Untereinheit β hergestellt werden, da ihre Präsenz in der Na⁺-F₁F₀-ATPase bereits bekannt war.

3.2.1 Herstellung von Antiseren gegen die Untereinheiten β , a , b und c_1

Für die Immunisierung sollten die Gene *atpB* (a), *atpE₁* (c_1), *atpD* (β) und *atpF* (b) zunächst in *E. coli* exprimiert und die Genprodukte gereinigt werden. Hierzu bot sich das pMal-System an, das eine Überexpression der Gene als *malE*-Fusionen und eine einfache Aufreinigung der Produkte durch Affinitätschromatographie über eine Amylose-Matrix ermöglicht.

Zur Herstellung der Fusionsgene wurden zunächst die Gene *atpD* und *atpF* durch PCR amplifiziert und über zwei in die Oligonukleotide integrierte *EcoRI*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen in pMalc2X kloniert (Abb. 19, pMal-*atpD*, pMal-*atpF*). Von *atpB* wurden lediglich die Basenpaare 433 - 633 in pMalc2X kloniert (Abb. 19, pMal-*atpB**), die für die letzten beiden α -Helices der Untereinheit a kodieren. Ein Überexpression des gesamten Gens erschien hier aufgrund der großen Hydrophobizität seines Produktes von vornherein aussichtslos. Das Gen *atpE₁* war bereits von Rahlfs (1999) in pMalc2X kloniert worden (pMalc1.4). Die korrekte Insertion der PCR-Fragmente im Leserahmen von *malE* wurde in allen Fällen durch Sequenzierung verifiziert.

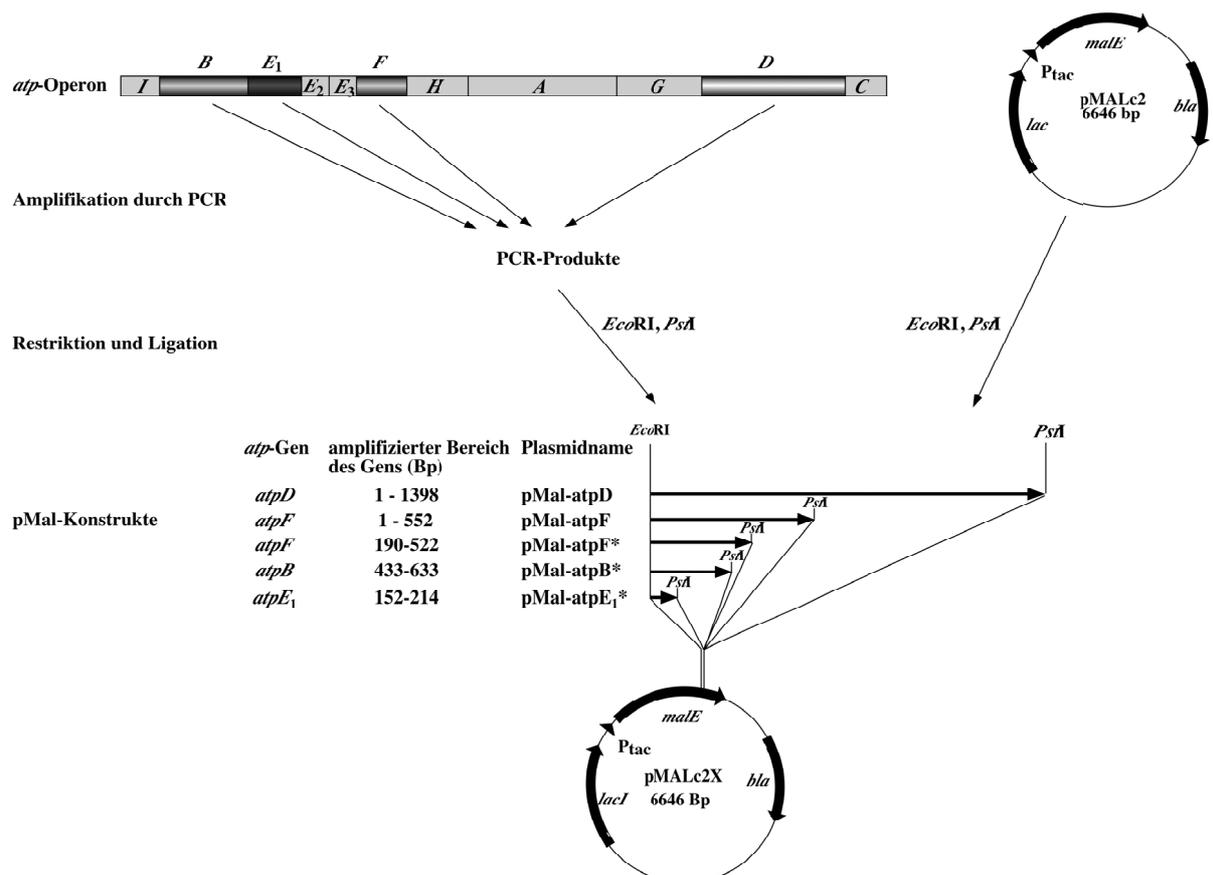


Abb. 19. Konstruktion der Plasmide zur Produktion der ATPase-Untereinheiten.

Zur Expression der Fusionsgene wurden zunächst Vorversuche mit 50-ml-Kulturen durchgeführt. Die Expression erfolgte in *E. coli* DH5 α auf LB Medium. Nach der Induktion

durch die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,3 mM bei einer $OD_{600} = 0,5$ wurde das Wachstum über 2 h verfolgt, und die Zellen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Kontrollexpressionen von pMalc2X und pMal-*atpD* verliefen wie erwartet. Nach der Induktion wuchsen die Kulturen mit gleichbleibender Wachstumsrate bis zu einer $OD_{600} = 3$ weiter (Abb. 20). Im denaturierenden Polyacrylamidgel ließen sich die überproduzierten Proteine MalE und MalE-AtpD eindeutig identifizieren (Abb. 23).

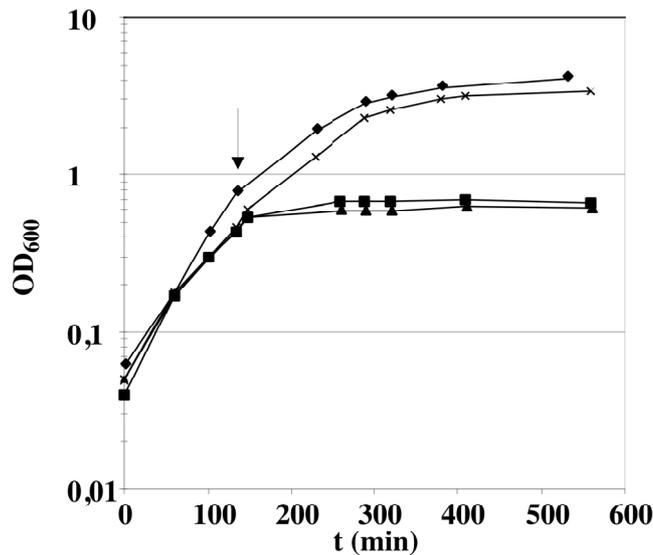


Abb. 20. Wachstum von *E. coli* DH5 α bei Produktion der ATPase-Untereinheiten c_1 , b und β . Die Anzuchten erfolgten in 25-ml-Kulturen in 100-ml-Erlenmeyerkolben. Die Kulturen wurden bei einer OD_{600} von ca. 0,5 mit IPTG induziert (Pfeil). pMalc2X: ◆, pMalc1.4: ■, pMal-*atpF*: ▲, pMal-*atpD*: ×.

Bei der Expression von pMal-*atpF* und pMalc1.4 kam es nach der Induktion zu einem kompletten Wachstumsstop. Im Polyacrylamidgel konnten keine Unterschiede im Proteinmuster zwischen nicht-induzierten und induzierten Proben erkannt werden. Eine Absenkung der IPTG-Konzentration auf 0,03 mM oder ein späterer Induktionszeitpunkt bei einer $OD_{600} = 1,0$ führten ebenfalls nicht zur Expression. Im Fall von pMalc1.4 wurde außerdem ein Medium erprobt, in dem NaCl durch KCl substituiert wurde. Weiterhin wurde die Wachstumstemperatur auf 18°C herabgesetzt. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Expression erreicht werden.

Da die erfolglose Produktion der Untereinheiten b und c_1 wahrscheinlich auf den hydrophoben Charakter der b - und c_1 -Untereinheit zurückzuführen war, wurde als nächstes versucht, nur hydrophile Fragmente dieser Proteine zu produzieren.

Von *atpF* wurden hierzu die Basenpaare 190 - 522, die für die cytoplasmatische Domäne kodieren, gewählt, und von *atpE₁* wurden die Basenpaare 152 - 214, die für die erste cytoplasmatische Schleife Untereinheit c_1 kodieren, kloniert. Dieser Bereich von *atpE₁* wurde zudem gewählt, weil seine abgeleitete Aminosäuresequenz nur eine verhältnismäßig geringe

erkennen, die allerdings wesentlich geringer war als die Kontrollexpressionen, was sicherlich auf den stark hydrophoben Charakter dieses Proteins zurückzuführen ist. Da bei der späteren Aufreinigung jedoch genügend Protein zur Immunisierung erhalten wurde, war dieses Ergebnis ausreichend.

Die Fusionsproteine wurden über Affinitätschromatographie gereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Da das c_1 -Fragment zu klein für eine Immunisierung war und somit ohnehin eine Kopplung an z. B. BSA erforderlich gewesen wäre, erschien es vorteilhaft, die gesamten Fusionsproteine zur Immunisierung zu nutzen. Da *A. woodii* kein Maltosebindeprotein besitzt und durch entsprechende Vorversuche immunologisch verwandte Proteine ausgeschlossen werden konnten, wurden alle Fusionsproteine direkt zur Immunisierung eingesetzt.

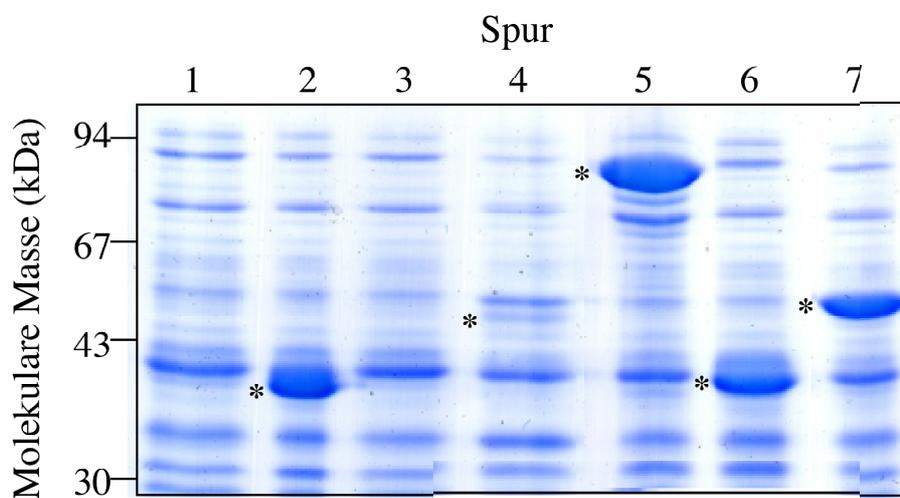


Abb. 23. Produktion der ATPase-Untereinheiten in *E. coli* DH5 α . *E. coli* DH5 α wurde in 250-ml-Kulturen angezogen, die Expression der Fusionsgene wurde durch IPTG (0,3 mM Endkonzentration) bei einer $OD_{600} = 0,5$ induziert, und die Zellen wurden 2 h später geerntet. Es ist die Analyse ganzer Zellen durch SDS-PAGE (10%) gezeigt. Die produzierten Proteine sind gekennzeichnet (*). Spur 1: pMalc2X, vor Induktion; Spur 2: pMalc2X, 2 h nach Induktion; Spur 3: pMal-*atpB**, vor Induktion; Spur 4: pMal-*atpB**, 2 h nach Induktion; Spur 5: pMal-*atpD*, 2 h nach Induktion; Spur 6: pMal-*atpE*₁*, 2 h nach Induktion; Spur 7: pMal-*atpF**, 2 h nach Induktion.

3.2.2 Immunologischer Nachweis der Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁ in *A. woodii*

Die Antiseren wurden zunächst genutzt, um die Produktion der Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁ in *A. woodii* und ihre Insertion in die Membran nachzuweisen. Hierzu wurde *A. woodii* in 17,5-l-Kulturen mit 20 mM Fruktose angezogen und bei einer $OD_{600} = 0,7 - 1,2$ geerntet. Aus den Zellen wurde ein Zellextrakt hergestellt, der dann in Cytoplasma- und Membranfraktion getrennt wurde. Die cytoplasmatischen und Membranproteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit den verschiedenen Antiseren analysiert.

Im Western-Blot zeigte sich, daß das gegen die Untereinheit *a* gerichtete Antiserum mit vier membranständigen (29, 27, 18 und 16 kDa) und fünf cytoplasmatischen Proteinen (72, 40, 29, 16 und 10 kDa) bei hohen Proteinmengen (100 µg) reagierte (Abb. 24). Bei einer niedrigen Proteinkonzentration von 50 µg reagierte das Antiserum nur mit einem membrangebundenen Protein mit einer molekularen Masse von 29 kDa. Daß es sich hierbei um die Untereinheit *a* handelte, erschien eher fraglich, da die abgeleitete molekulare Masse der Untereinheit *a* von *A. woodii* 24,5 kDa beträgt. Zudem wandern die Untereinheiten *a* der F₁F₀-ATPasen aus *E. coli* und *P. modestum* im SDS-Polyacrylamidgel jeweils bei molekularen Massen unterhalb ihrer abgeleiteten Masse (Gerike und Dimroth, 1993; Walker *et al.*, 1984). Wahrscheinlicher war daher, daß es sich bei dem 18- oder 16-kDa-Protein um die Untereinheit *a* handelte. Daß es sich bei dem 29-kDa-Protein um eine homodimere oder heterodimere Form der Untereinheit *a* handelte, konnte ausgeschlossen werden, da die Reaktion des Antiserums mit dem 29-kDa-Protein auch nach unterschiedlichen Denaturierungen zu beobachten war.

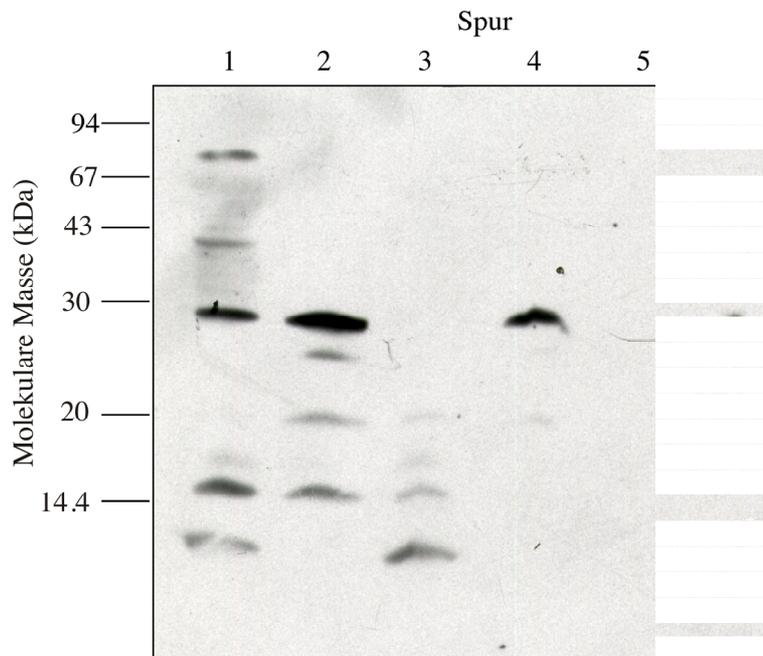


Abb. 24. Immunologischer Nachweis der Untereinheit *a* in der Cytoplasmamembran von *A. woodii*. Unterschiedliche Mengen an Cytoplasma- und Membranprotein wurden im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-*a*-Antiserum hybridisiert. Spur 1: Cytoplasma, 100 µg; Spur 2: Membranen, 100 µg; Spur 3: Cytoplasma, 75 µg; Spur 4: Membranen, 75 µg; Spur 5: Cytoplasma, 50 µg; Spur 6: Membranen, 50 µg. Die Mengenangaben beziehen sich auf den Proteingehalt.

Die Untereinheit *c*₁ ließ sich dagegen zweifelsfrei in *A. woodii* mit dem Antiserum nachweisen. Bei einer Proteinmenge von 50 µg reagierte das Antiserum nur mit einem 16-kDa-Protein in der Membranfraktion (Abb. 25), was in etwa der abgeleiteten molekularen

Masse für die c_1 -Untereinheit von 18,14 kDa entsprach. Die Untereinheiten β (Abb. 26) und b (Abb. 27) ließen sich ebenfalls eindeutig in *A. woodii* nachweisen.

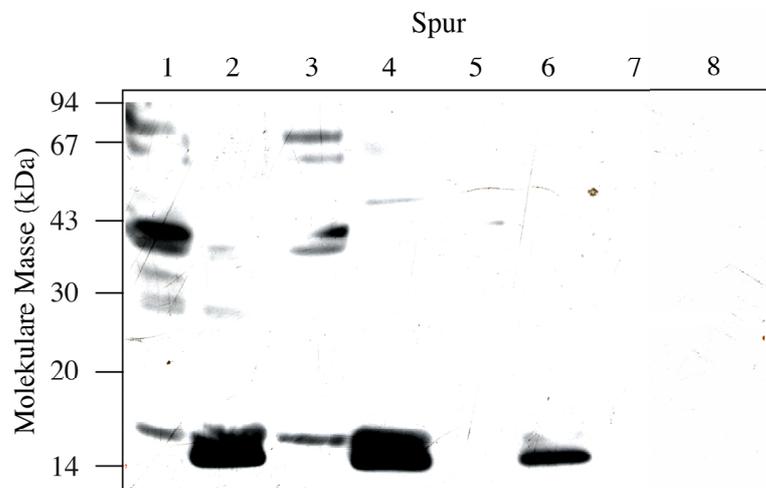


Abb. 25. Immunologischer Nachweis der Untereinheit c_1 in der Cytoplasmamembran von *A. woodii*. Cytoplasma- und Membranprotein wurden in unterschiedlichen Mengen im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti- c_1 -Antiserum hybridisiert. Folgende Proteinmengen wurden von den Zellfraktionen aufgetragen: Spur 1: Cytoplasma, 100 μ g; Spur 2: Membranen, 100 μ g; Spur 3: Cytoplasma, 75 μ g; Spur 4: Membranen, 75 μ g; Spur 5: Cytoplasma, 50 μ g; Spur 6: Membranen, 50 μ g; Spur 7: Cytoplasma, 25 μ g; Spur 8: Membranen, 25 μ g.

Das anti- β -Antiserum reagierte in der Membran- und Cytoplasmafraktion mit einem 51-kDa-Protein. Dies entsprach der abgeleiteten molekularen Masse für die Untereinheit β . Im Cytoplasma ließ sich wesentlich weniger Protein nachweisen als in der Cytoplasmamembran, was auf die Membranassoziation dieser Untereinheit hindeutet. Dasselbe galt für das anti- b -Antiserum. Hier wurde ein Protein in der Membran- und Cytoplasmafraktion mit einer molekularen Masse von 19 kDa detektiert. Dies entsprach in etwa der abgeleiteten molekularen Masse der Untereinheit b von 20,8 kDa. Der größte Teil des Proteins wurde ebenfalls in der Cytoplasmamembran detektiert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Untereinheiten b und c_1 in *A. woodii* produziert und in die Cytoplasmamembran inseriert werden. Der Nachweis der Untereinheit a war zu diesem Zeitpunkt noch fraglich, da die immunologische Analyse keine eindeutige Aussage erlaubte.

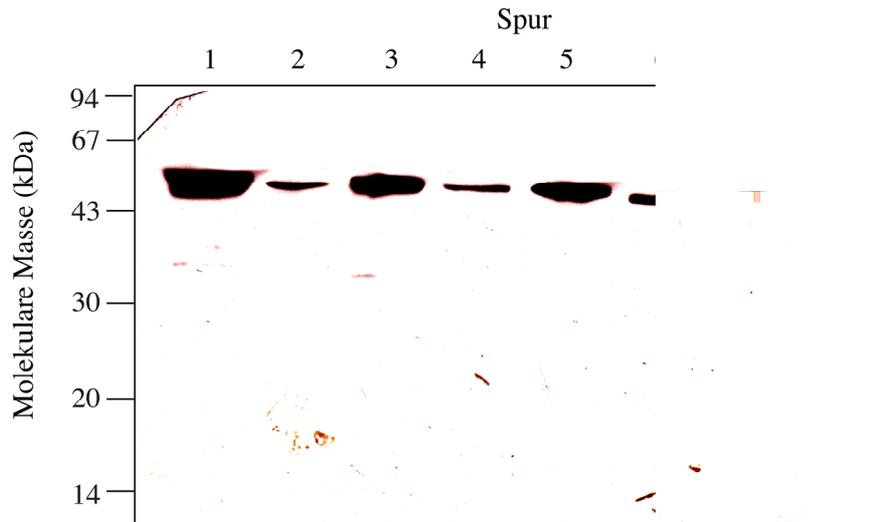


Abb. 26. Immunologischer Nachweis der Untereinheit β in der Cytoplasmamembran von *A. woodii*. Cytoplasma- und Membranprotein wurden in unterschiedlichen Mengen im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti- β -Antiserum hybridisiert. Folgende Proteinmengen der Zellfraktionen wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen: Spur 1: Membranen, 100 μg ; Spur 2: Cytoplasma, 100 μg ; Spur 3: Membranen, 75 μg ; Spur 4: Cytoplasma, 75 μg ; Spur 5: Membranen, 50 μg ; Spur 6: Cytoplasma, 50 μg ; Spur 7: Membranen, 25 μg ; Spur 8: Cytoplasma, 25 μg .

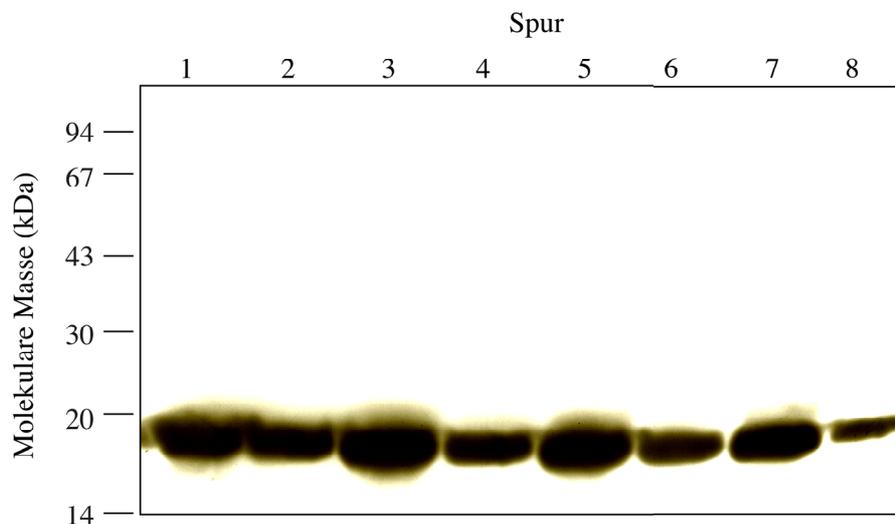


Abb. 27. Immunologischer Nachweis der Untereinheit b in der Cytoplasmamembran von *A. woodii*. Cytoplasma- und Membranprotein wurden in unterschiedlichen Mengen im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti- b -Antiserum hybridisiert. Es wurden folgende Proteinmengen der Zellfraktionen auf die SDS-PAGE aufgetragen: Spur 1: Membranen, 100 μg ; Spur 2: Cytoplasma, 100 μg ; Spur 3: Membranen, 75 μg ; Spur 4: Cytoplasma, 75 μg ; Spur 5: Membranen, 50 μg ; Spur 6: Cytoplasma, 50 μg ; Spur 7: Membranen, 25 μg ; Spur 8: Cytoplasma, 25 μg .

3.2.3 Zweidimensionale Auftrennung von Membranproteinkomplexen durch Blue-Native- und SDS-PAGE

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, daß die Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁ produziert werden, mußte überprüft werden, ob sie auch Bestandteil der Na⁺-F₁F₀-ATPase von *A. woodii* sind. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Reinigungsprozedur für das intakte Enzym vorlag, sollten Membranproteinkomplexe inklusive der Na⁺-F₁F₀-ATPase solubilisiert, durch Blue-Native-PAGE aufgetrennt und anschließend durch SDS-PAGE in der zweiten Dimension in ihre Untereinheiten aufgetrennt werden.

3.2.3.1 Solubilisierung der Na⁺-F₁F₀-ATPase

Da die Wahl eines geeigneten Detergens entscheidend für eine vollständige Solubilisierung von Membrankomplexen ist, wurden zunächst die Detergenzien Triton X-100, Dodecylmaltosid und Laurylmaltosid auf ihre Eignung zur Solubilisierung der Na⁺-F₁F₀-ATPase hin überprüft. Hierzu wurde die Membranfraktion zunächst mit Triton X-100, Laurylmaltosid und Dodecylmaltosid im Konzentrationsbereich von 1 - 48 g Detergens pro g Membranprotein solubilisiert. Die Solubilisate wurden dann durch Blue-Native-PAGE im 4 - 14%igen Gradientengel aufgetrennt (Abb. 28).

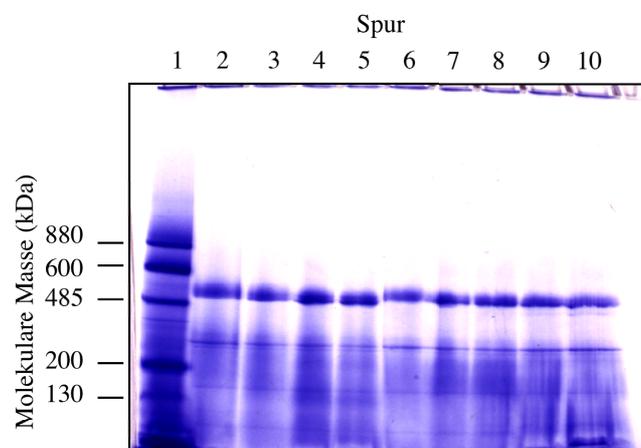


Abb. 28. Analyse solubilisierter Membranen von *A. woodii* durch Blue-Native-PAGE.

Die Membranfraktion von *A. woodii* wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Dodecylmaltosid und Triton X-100 solubilisiert und das Solubilisat in einen Gradientengel (4 - 14%) durch Blue-Native-PAGE aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt. Spur 1: Standardproteine; Spur 2: 1 g Dodecylmaltosid/g Protein; Spur 3: 2 g Dodecylmaltosid/g Protein; Spur 4: 4 g Dodecylmaltosid/g Protein; Spur 5: 8 g Dodecylmaltosid/g Protein; Spur 6: 1 g Triton X-100/g Protein; Spur 7: 3 g Triton X-100/g Protein; Spur 8: 6 g Triton X-100/g Protein; Spur 9: 12 g Triton X-100/g Protein; Spur 10: 24 g Triton X-100/g Protein.

Die Analyse dieser Solubilisate durch Blue-Native-PAGE, zeigte, daß unabhängig von dem Detergens und seiner Konzentration ein vorherrschender Komplex mit einer molekularen Masse von 590 kDa vorlag. Daneben wurden zwei weitere Komplexe mit molekularen Massen von 300 und 170 kDa gefunden (Abb. 28). Bereits bei 1 g Detergens pro g Membranprotein schien außerdem eine maximale Ausbeute an Membranprotein durch die Solubilisierung erreicht worden zu sein. In den mit Triton X-100 solubilisierten Proben schien der 590-kDa-Komplex eine etwas größere molekulare Masse zu haben als in den mit Dodecylmaltosid behandelten Solubilisaten. Um zu überprüfen ob dieser Unterschied im Laufverhalten auf den Verlust von Untereinheiten oder auf einen Einfluß des Detergens zurückzuführen war, wurden die Gelspuren aus der Blue-Native-PAGE ausgeschnitten und auf ein SDS-Polyacrylamidgel übertragen. In der Proteinzusammensetzung des 590-kDa-Komplexes aus den mit Triton X-100 und Dodecylmaltosid behandelten Membranen ließen sich im SDS-Polyacrylamidgel keine Unterschiede erkennen (Abb. 29). Es konnte also ausgeschlossen werden, daß Dodecylmaltosid zu einem Verlust von Untereinheiten führt. Da außerdem bereits Detergengkonzentrationen von 1 g/g Membranprotein für eine maximale Solubilisierung ausreichten, erfolgten alle weiteren Solubilisierungen mit 1 g Dodecylmaltosid pro g Membranprotein.

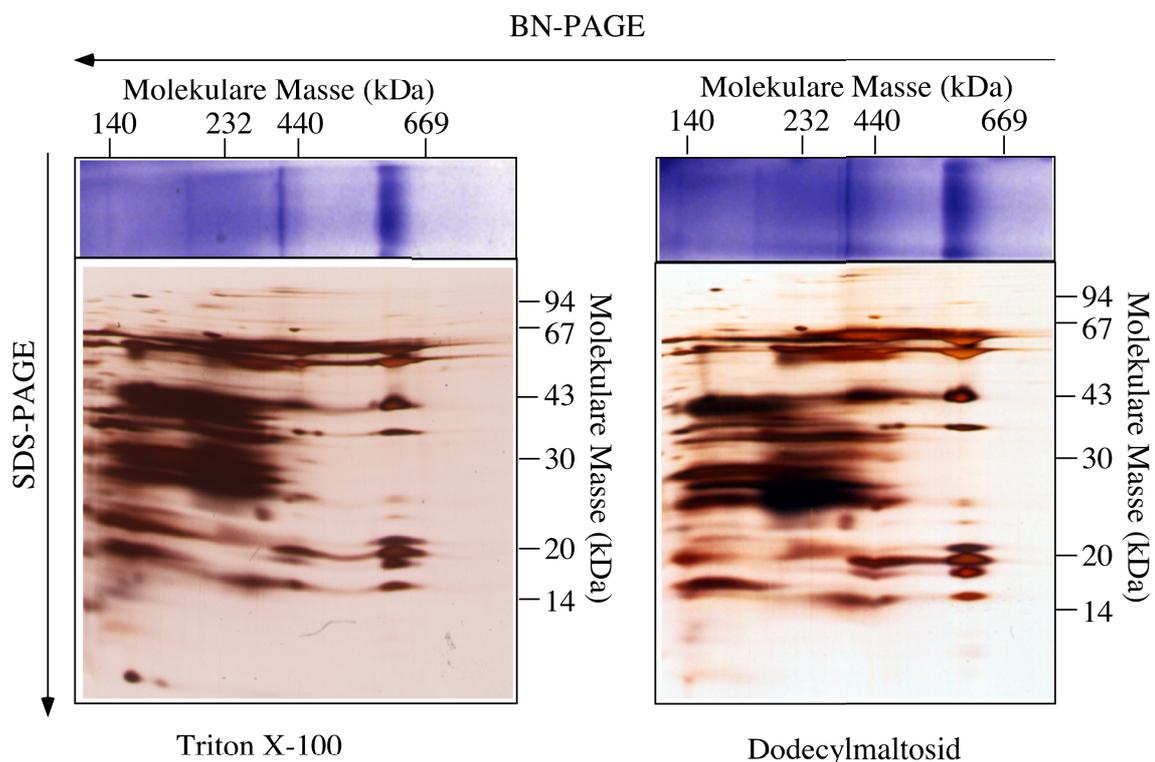


Abb. 29. Vergleich der Untereinheitenstruktur von Membrankomplexen bei Solubilisierung mit Triton X-100 (1g/g) und Dodecylmaltosid (1g/g). Solubilisierter Membranproteinkomplexe wurden durch Blue-Native-PAGE aufgetrennt, die ganzen Spuren ausgeschnitten und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgebracht. Die Gele wurden mit Silber gefärbt.

3.2.3.2 Identifizierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase in der Blue-Native-PAGE

Membranproteine von *A. woodii* wurden als nächstes mit Dodecylmaltosid solubilisiert, in der Blue-Native-PAGE aufgetrennt und mit dem anti- β -Antiserum hybridisiert. Wie aus Abb. 30 ersichtlich, reagierte das anti- β -Antiserum mit dem 590-kDa-Komplex. Eine positive Reaktion wurde auch mit dem anti-*b*-Antiserum erhalten (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber reagierten das anti-*a*- und anti-*c*₁-Antiserum nicht mit dem 590-kDa-Komplex. Diese beiden Antiseren waren nur gegen sehr kurze Schleifenregionen oder membranständige Bereiche gerichtet, so daß hier vermutet werden konnte, daß deren Epitope nicht an der Oberfläche des nativen Enzyms expo

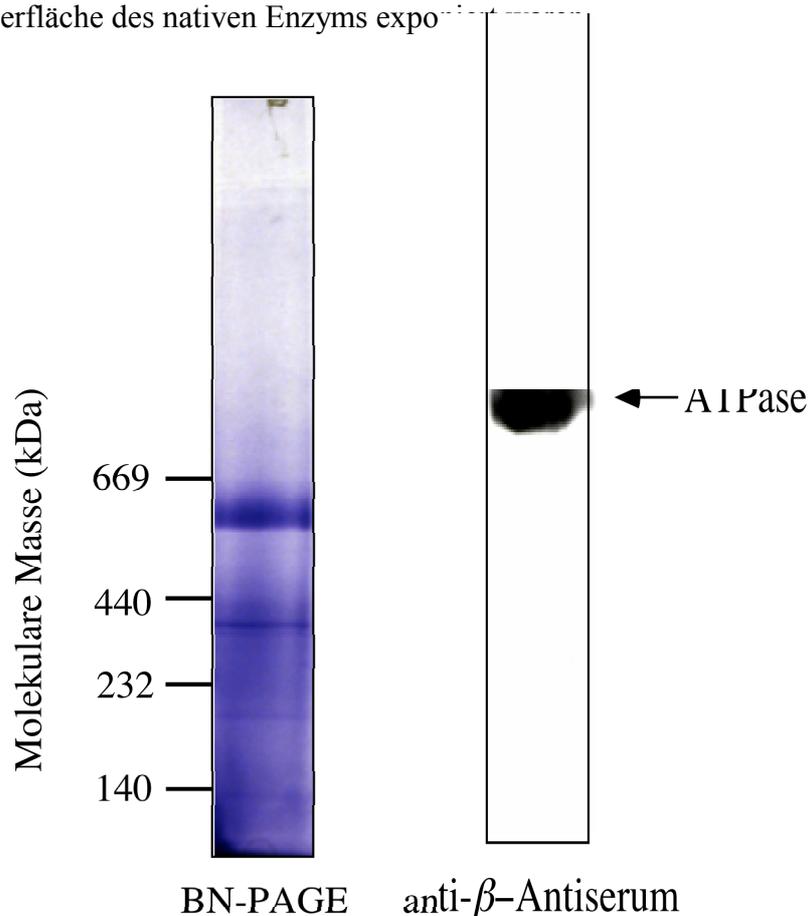


Abb. 30. Identifizierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase in der Blue-Native-PAGE durch Western-Blot-Analyse mit dem anti- β -Antiserum. Mit Dodecylmaltosid solubilisierte Membranproteinkomplexe wurden durch Blue-Native-PAGE aufgetrennt, die auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti- β -Antiserum analysiert.

Bei der weiteren Analyse der durch SDS-PAGE aufgetrennten Membranproteinkomplexe mit dem anti- β - und anti-*b*-Antiserum zeigte sich, daß diese mit einem 51- bzw. 19-kDa-Protein im 590-kDa-Komplex reagierten. Interessanterweise reagierten beide Antiseren auch mit Proteinen im 300-kDa-Komplex (Abb. 31). Es liegt also neben dem 590-kDa-Komplex ein zweiter Komplex vor, der Untereinheiten der Na^+ - F_1F_0 -ATPase enthält. Es besteht die Möglichkeit, daß das Coomassie Blau in der Blue-Native-PAGE zu einer Denaturierung der

Na^+ - F_1F_0 -ATPase führt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der Reinigung der F_1F_0 -ATPase aus Chloroplasten durch Blue-Native-PAGE gemacht (Neff und Dencher, 1999).

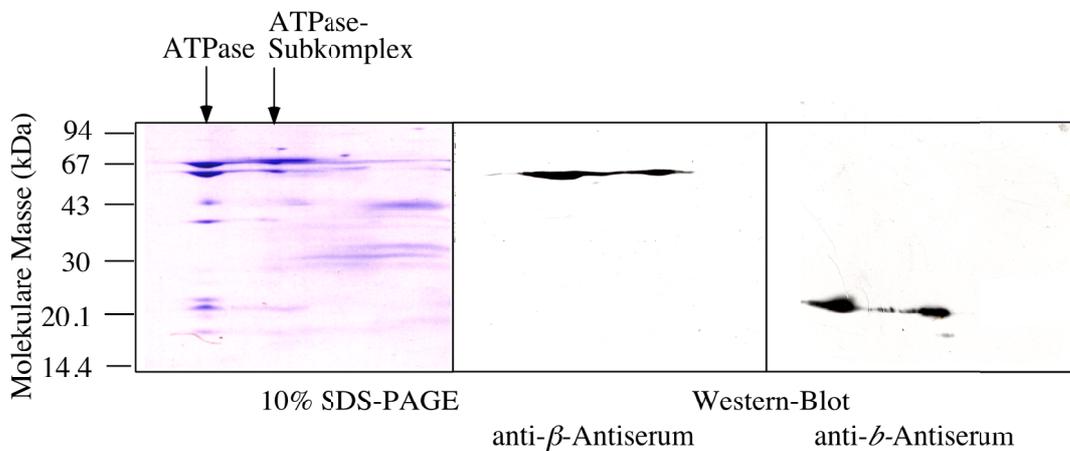


Abb. 31. Nachweis eines Subkomplexes der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii*. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Membranproteinkomplexe wurden im Western-Blot mit dem anti- β - und anti-*b*-Antiserum analysiert.

3.2.3.3 Untereinheitenzusammensetzung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase

Zur Bestimmung ihrer Untereinheitenzusammensetzung wurde die durch Blue-Native-PAGE isolierte Na^+ - F_1F_0 -ATPase in der präparativen SDS-PAGE aufgetrennt. Im Silber-gefärbten Polyacrylamidgel waren acht Proteine mit molekularen Massen von 58, 55, 43, 37, 21, 19, 18 und 16,5 kDa zu erkennen. Die Identität dieser Proteine konnte durch Ermittlung ihrer aminoterminalen Aminosäuresequenzen und dem Vergleich mit den molekularen Daten eindeutig festgestellt werden (Abb. 32). So entspricht das 58-kDa-Protein der Untereinheit α , das 55-kDa-Protein der Untereinheit β , das 37-kDa-Protein der Untereinheit γ , das 19-kDa-Protein der Untereinheit *b*, das 18-kDa-Protein der Untereinheit *a* und das 16,6-kDa-Protein der Untereinheit *e*. Bei der 43-kDa-Untereinheit handelt es sich um den *c*-Oligomer, der eine hohe Stabilität auch gegenüber Denaturierungstemperaturen von 100°C besitzt (Reidlinger und Müller, 1994).

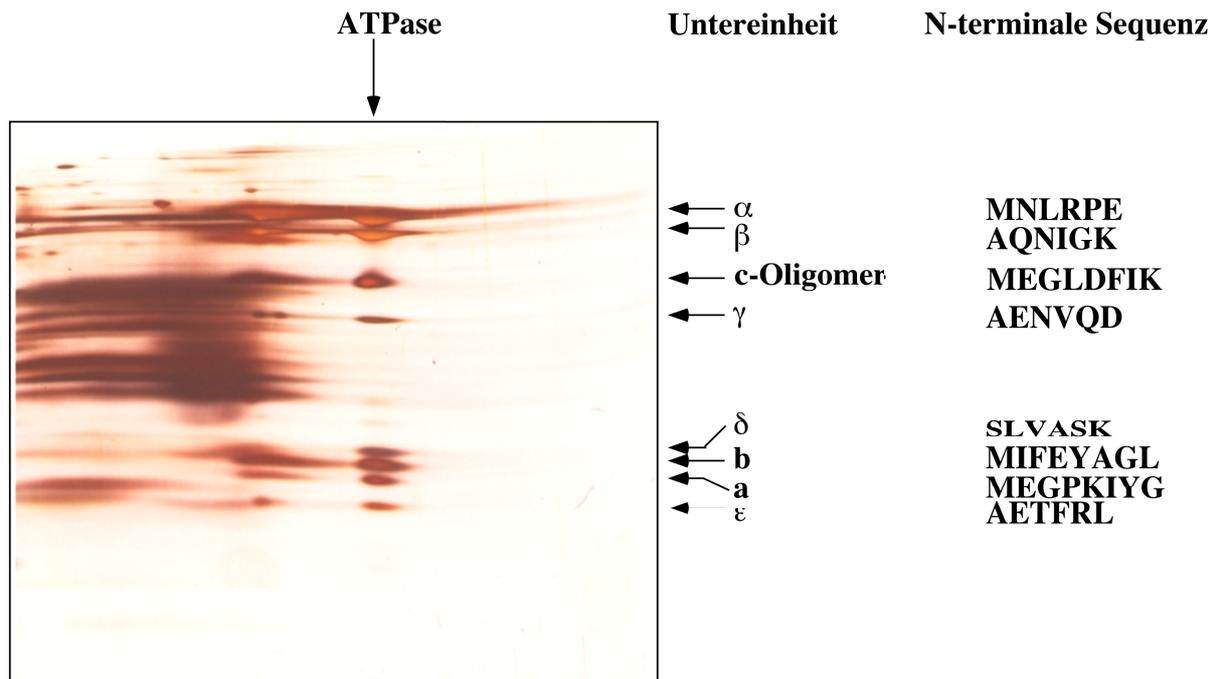


Abb. 32. Identifizierung der Untereinheiten der Na^+ - F_1F_0 -ATPase durch aminoterminaler Sequenzierung. Eine Spur aus der Blue-Native-PAGE wurde durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Für die aminoterminaler Sequenzierung der Proteine wurden insgesamt sechs Spuren übereinandergestapelt und im 3 mm dicken SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und durch Edman-Abbau aminoterminal sequenziert.

Der Vergleich der experimentell bestimmten aminoterminalen Aminosäuresequenzen mit den molekularen Daten erlaubte die Bestimmung der Translationsstarts. Die Untereinheiten a , c_2/c_3 , β , δ und ϵ besitzen jeweils ein ATG als Startcodon. Alternative Startcodons wurden für die Untereinheiten b (TTG), α (TTG) und γ (GTG) identifiziert. Für die Untereinheiten β , γ und ϵ ließen sich keine aminoterminalen Methionine nachweisen. Bis auf die Untereinheit b besaßen alle Proteine aminoterminaler Aminosäuresequenzen, die dem aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Translationsstart entsprachen. Die aminoterminaler Sequenz der Untereinheit b ergab, daß der Translationsstart dieser Untereinheit 45 Bp stromabwärts vom abgeleiteten Translationsstart lag (Tab. 12). Bei den Untereinheiten a , b und c_2/c_3 wurden formylierte und bei Untereinheit α ein deformyliertes Methionin nachgewiesen.

Tab. 12. Vergleich der experimentell bestimmten aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten der Na⁺-F₁F₀-ATPase von *A. woodii* und der Translationsstarts ihrer Gene.

Untereinheit	Sequenzen ^a
a	724
DNA	ACA <u>ATGAGGT</u> GAAAAACA ATG GAAGGCCCAAAATTTACGGG
Protein	M E G P K I Y G
b	3017
DNA	GAAAGGGGGATATACCCAT TTG ATATTTGAATATGCAGGTTTA
Protein	M I F E Y A G L
c₂/c₃	2001
DNA	TTAGGAGGAAAACATAATT ATG GAAGGTTTAGATTTTATTAAA
Protein	M E G L D F I K
α	
DNA•Protein	3682•AAAAAGAGGTGAGTAAAG TTG AATCTCCGACCAGAGGAAATA• M N L R P E E I
β	
DNA•Protein	6218•ACAAGGAGGTTAGTGGGA ATG GCCCAAAATATAGGGAAGGTTG TT• A Q N I G K V V
γ	
DNA•Protein	5212•GCGGAGGTGATTTTCGAG GTG GCGAGAGAATGTACAAGATATAAA A• A E N V Q D I K
δ	3123
DNA	TAAGGGAGGGGATGCGCA ATG AGTTTGTGCAAGTAAATACGCC
Protein	M S L V A S K R A
ε	7634
DNA	TTGAGGTGAGTTTTTA ATG GCTGAACTTTTCAGATTAAAAATC
Protein	A E T F R L K I

^aTranslationsstarts sind fett hervorgehoben und potentielle Ribosomenbindungsstellen sind unterstrichen. Die Numerierung bezieht sich auf die in der Datenbank (Genbank) hinterlegten Sequenzen.

Die Untereinheit *c*₁ ließ sich durch die aminoternale Sequenzierung nicht nachweisen. Da sie allerdings in der Cytoplasmamembran bereits nachgewiesen wurde, konnte man annehmen, daß sie in geringen Mengen im *c*-Oligomer vorlag.

3.2.4 Immunologischer Nachweis der Untereinheit *c*₁ im Na⁺-F₁F₀-ATPase-Komplex

Zum Nachweis der Untereinheit *c*₁ in der Na⁺-F₁F₀-ATPase wurde im folgenden ein immunologischer Weg beschritten. Hierzu war es zunächst nötig ein Antiserum gegen die Untereinheit *c*₂/*c*₃ herzustellen, um eine etwaige Reaktion des anti-*c*₁-Antiserums mit dem ähnlichen 8-kDa-Proteolipid ausschließen zu können.

3.2.4.1 Herstellung eines Antiserums gegen die Untereinheiten *c*₂/*c*₃

Zur Aufreinigung sollte die Untereinheit *c*₂/*c*₃ zunächst durch eine Chloroform:Methanol-Behandlung aus der Membranfraktion extrahiert werden. Hierbei nutzt man die Löslichkeit von Proteolipiden in Chloroform:Methanol-Gemischen aus. Durch die Extraktion der Membranfraktion mit Chloroform:Methanol-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung kommt es dabei zu einer Anreicherung stark hydrophober Proteine (Soto *et al.*, 1969). Die

Membranfraktion von *A. woodii* wurde daher mit Chloroform:Methanol-Gemischen extrahiert und das verbleibende Protein zweimal mit Diethylether gefällt. Aus der Membranfraktion wurde überwiegend ein Protein mit einer molekularen Masse von 7 kDa, sowie in geringeren Mengen zwei weitere Proteine mit molekularen Massen von 15 und 16 kDa extrahiert. Wurden große Proteinmengen zur Extraktion eingesetzt (160 mg) so wurde ein zweites vorherrschendes Protein mit einer molekularen Masse von 10 kDa und zwei Proteine in geringerer Menge mit 18 und 23 kDa extrahiert (Abb. 33).

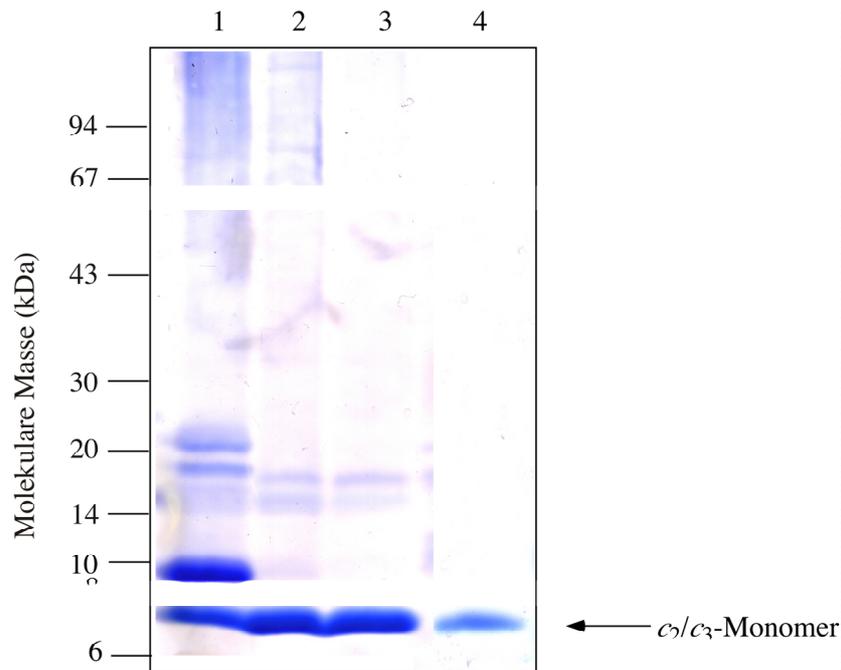


Abb. 33. Extraktion des c_2/c_3 -Monomers aus der Cytoplasmamembran durch Chloroform:Methanol. Zur Extraktion wurden 160 mg (Spur 1), 80 mg (Spur 2) und 30 mg (Spur 3) Membranprotein eingesetzt. Nach der Identifikation des c_2/c_3 -Monomers durch aminoterminaler Sequenzierung wurde dieses aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und durch Elektroelution isoliert (Spur 4).

Die aminoterminaler Sequenzierung der Proteine ergab, daß es sich bei dem 7-kDa-Protein um die Untereinheit c_2/c_3 handelt. Die aminoterminaler Aminosäuresequenz des 10-kDa-Proteins besaß Ähnlichkeiten zu Sequenzen von Proteinen, die am Aufbau von bakteriellen Mikrokompartmenten wie z. B. Carboxysomen beteiligt sind. Die restlichen vier Proteine ließen sich aufgrund ihrer geringen Konzentration in den Proben nicht sequenzieren. Zur weiteren Aufreinigung der Untereinheit c_2/c_3 wurde diese schließlich aus dem SDS-Polyacrylamidgel durch Elektroelution isoliert und zur Immunisierung eingesetzt.

Um die Qualität des anti- c_2/c_3 -Antiserums zu testen, wurden zunächst die Membran- und Cytoplasmakrafraction von *A. woodii* analysiert. Im Western-Blot reagierte das anti- c_2/c_3 -Antiserum ausschließlich mit dem Monomer der Untereinheit c_2/c_3 und dem c -Oligomer in der Membranfraktion (Abb. 34).

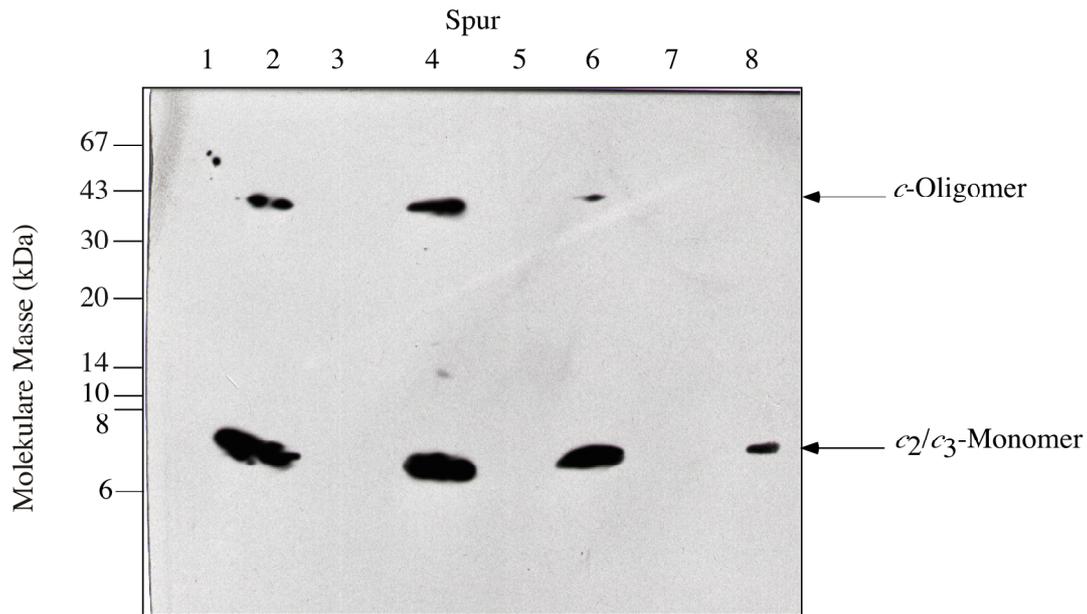


Abb. 34. Immunologischer Nachweis der Untereinheit c_2/c_3 in der Cytoplasmamembran von *A. woodii*. Cytoplasma und Membranproteine wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti- c_2/c_3 -Antiserum hybridisiert. Es wurden folgende Proteinmengen der Zellfraktionen aufgetragen: Spur 1: Cytoplasma, 40 µg; Spur 2: Membranen, 40 µg; Spur 3: Cytoplasma, 30 µg; Spur 4: Membranen, 30 µg; Spur 5: Cytoplasma, 20 µg; Spur 6: Membranen, 20 µg; Spur 7: Cytoplasma, 10 µg; Spur 8: Membranen, 10 µg.

3.2.4.2 Spezifität der anti- c_1 - und anti- c_2/c_3 -Antiseren

Trotz des Nachweises der Untereinheit c_1 in der Cytoplasmamembran von *A. woodii* bestand weiterhin die Möglichkeit, daß die Reaktion des anti- c_1 -Antiserums aus einer Bindung an einen möglichen Dimer der c_2/c_3 -Untereinheit resultierte. Das anti- c_2/c_3 -Antiserum bot nun die Möglichkeit dieses auszuschließen. Hierzu wurden die aus der Cytoplasmamembran durch Chloroform:Methanol extrahierten Proteine nach einer SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit beiden Antiseren hybridisiert. Es wurden diese Proben verwendet, da zum einen die c_2/c_3 -Untereinheit in diesen Proben direkt durch eine aminoterminal Sequenzierung nachgewiesen worden war und zum anderen die Untereinheit c_1 aufgrund seiner ähnlich hohen Hydrophobizität wie die Untereinheit c_2/c_3 ebenfalls in diesen vorhanden sein sollte, wenn auch in geringerer Menge. Das anti- c_2/c_3 -Antiserum reagierte mit dem Monomer der Untereinheit c_2/c_3 und einem 16-kDa-Protein. Das anti- c_1 -Antiserum reagierte nur mit dem 16-kDa-Protein (Abb. 35). Dies zeigte, daß das anti- c_1 -Antiserum mit der Untereinheit c_1 und nicht etwa mit einem möglichen Dimer der c_2/c_3 -Untereinheit reagiert. Die Reaktion des anti- c_2/c_3 -Antiserums mit der Untereinheit c_1 war auf die generell hohe Konservierung zwischen beiden Proteinen zurückzuführen.

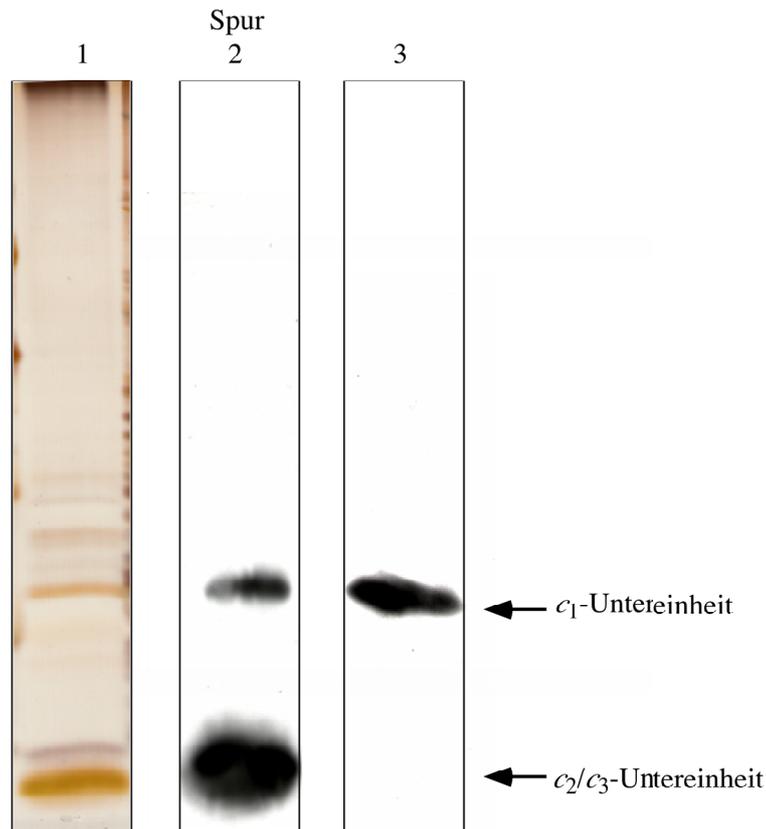


Abb. 35. Immunologische Identifizierung der Untereinheiten c_1 und c_2/c_3 in Chloroform:Methanol-Extrakten. Mit Chloroform:Methanol extrahierte Membranproteine wurden nach ihrer Auftrennung im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti- c_2/c_3 -Antiserum und dem anti- c_1 -Antiserum hybridisiert. Spur 1: SDS-PAGE, Spur 2: Western-Blot, anti- c_2/c_3 -Antiserum; Spur 3: Western-Blot, anti- c_1 -Antiserum.

3.2.4.3 Immunologischer Nachweis der Untereinheit c_1 im nativen ATPase-Komplex durch Blue-Native-PAGE

Bereits die Analyse der Membran- und Cytoplasmafraktionen von *A. woodii* mit den Antiseren gegen die Untereinheiten c_1 und c_2/c_3 bot Hinweise, daß die c_1 -Untereinheit im c -Oligomer der Na^+ - F_1F_0 -ATPase vorlag. Die anti- c_1 - und anti- c_2/c_3 -Antiseren reagierten in der Membranfraktion von *A. woodii* mit der monomeren Form beider Untereinheiten und auch mit dem c -Oligomer (Abb. 36).

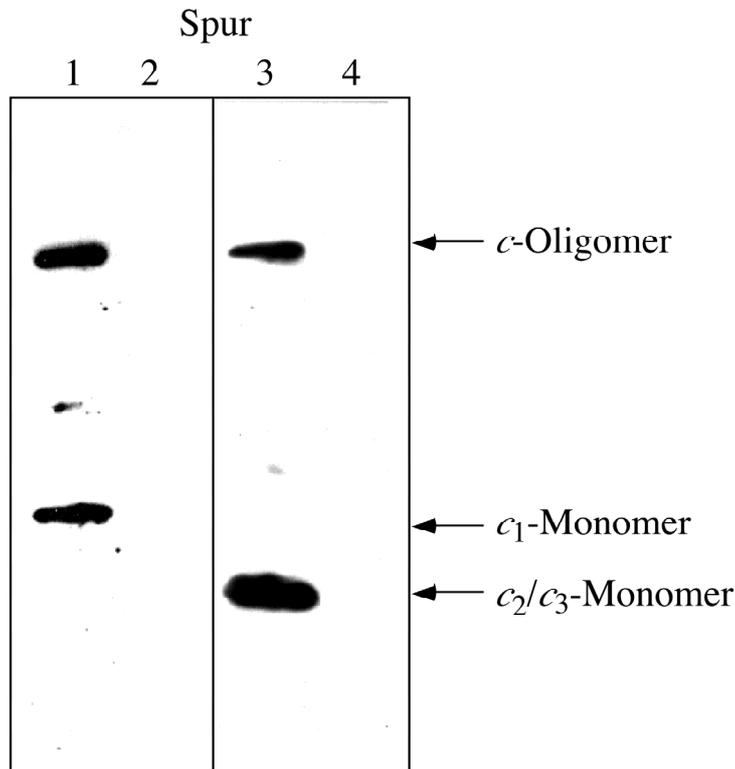


Abb. 36 Immunologischer Nachweis der Untereinheiten c_1 und c_2/c_3 in der Cytoplasmamembran von *A. woodii*. Membranen- und Cytoplasmafraktion von *A. woodii* wurden durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit anti- c_1 - und anti- c_2/c_3 -Antiserum analysiert. Spur 1: Membranen, anti- c_1 -Antiserum; Spur 2: Cytoplasma, anti- c_1 -Antiserum; Spur 3: Membran, anti- c_2/c_3 -Antiserum; Spur 4: Cytoplasma, anti- c_2/c_3 -Antiserum.

Zum Nachweis der Untereinheit c_1 im c -Oligomer der nativen ATPase wurde diese aus der Blue-Native-PAGE ausgeschnitten und denaturiert. Die Denaturierung erfolgte zum einen durch Inkubation bei 100°C für 5 min und zum anderen durch eine Inkubation bei 120°C für 3 min. Die Denaturierung bei 120°C wurde gewählt, da bereits durch die Arbeiten von Reidlinger und Müller (1994) bekannt war, daß sich das c -Oligomer nicht durch kochen in SDS-Puffer, sondern durch autoklavieren in seine Monomere überführen läßt. Die Analyse der Proben erfolgte durch eine Auftrennung der Untereinheiten in einer 10%igen SDS-PAGE, gefolgt von einer Western-Blot-Analyse mit den anti- c_1 - und anti- c_2/c_3 -Antiseren.

Wie erwartet wurde das c -Oligomer durch die Inkubation bei 120°C in seine Monomere überführt. An seiner Stelle ließen sich im Silber-gefärbten Gel zwei Proteine mit molekularen Massen von 7 und 16 kDa nachweisen. Das anti- c_2/c_3 -Antiserum reagierte mit dem c -Oligomer in den gekochten und mit dem Monomer der Untereinheit c_2/c_3 in den autoklavierten Proben. Das anti- c_1 -Antiserum reagierte mit dem c -Oligomer in den gekochten und mit dem 16-kDa-Protein in den autoklavierten Proben (Abb. 37). Hiermit war also der Beweis erbracht, daß die Untereinheit c_1 Bestandteil des c -Oligomers der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* ist. Dies ist der erste Nachweis eines 16-kDa-Proteolipids in einer Na^+ - F_1F_0 -

ATPase. Die geringere Färbungsintensität der Untereinheit c_1 im Vergleich zur Untereinheit c_2/c_3 deutet auf einen geringeren Anteil der c_1 -Untereinheit hin. Da sich die Untereinheit c_1 jedoch mit Coomassie Brilliant Blue bisher gar nicht anfärben ließ, war eine genaue Bestimmung der Stöchiometrie und eine aminoterminal Sequenzierung nicht möglich.

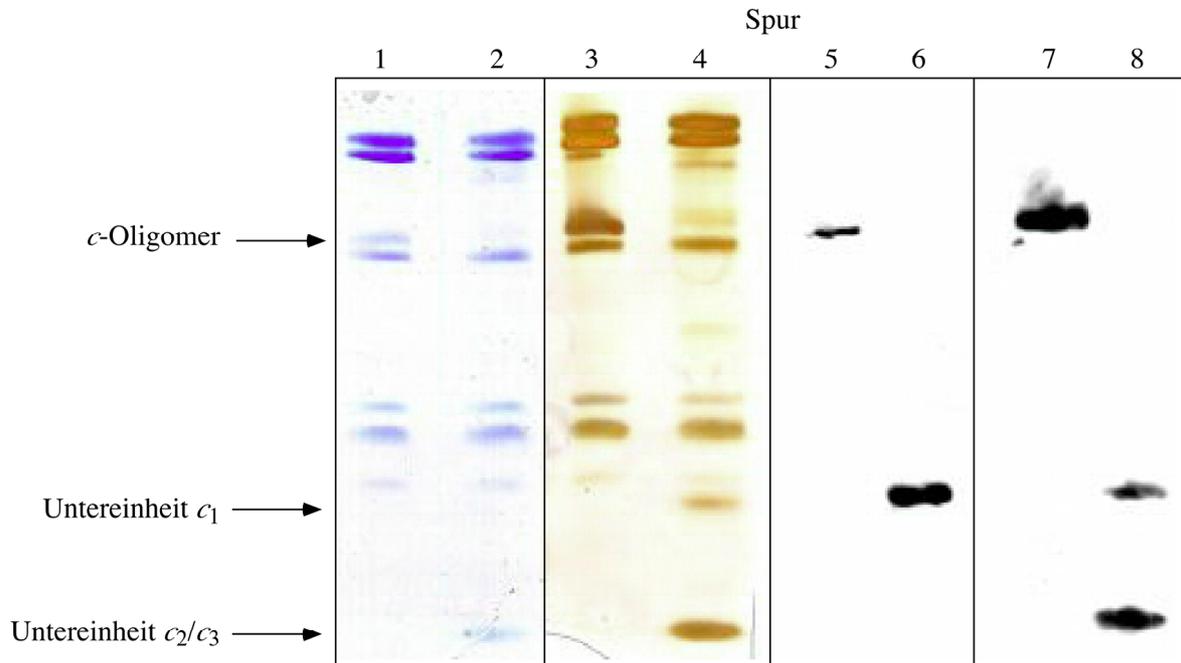


Abb. 37. Immunologischer Nachweis der Untereinheiten c_1 und c_2/c_3 in der nativen ATPase. Die ATPase wurde aus der Blue-Native-PAGE ausgeschnitten, durch Inkubation bei 100 bzw. 120°C denaturiert und durch 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Färbung und Western-Blots mit den anti- c_1 - und anti- c_2/c_3 -Antisera. Spur 1: 100°C, SDS-PAGE, Coomassie-Färbung; Spur 2: 120°C, SDS-PAGE, Coomassie-Färbung; Spur 3: 100°C, SDS-PAGE, Silber-Färbung; Spur 4: 120°C, SDS-PAGE, Silber-Färbung; Spur 5: 100°C, Western-Blot, anti- c_1 -Antiserum; Spur 6: 120°C, Western-Blot, anti- c_1 -Antiserum; Spur 7: 100°C, Western-Blot, anti- c_2/c_3 -Antiserum; Spur 8: 120°C, Western-Blot, anti- c_2/c_3 -Antiserum.

3.3 Vergleichende Analyse der Synthese von Untereinheit c_1 in Abhängigkeit des Substrates und der Na^+ -Konzentration

Nachdem der Nachweis der Untereinheit c_1 in der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* erbracht worden war, stellte sich die Frage nach der Funktion dieser Untereinheit. Von Schmidt *et al.* (1998) war gezeigt worden, daß die Anzahl an c -Monomeren im c -Oligomer der F_1F_0 -ATPase von *E. coli* in Abhängigkeit vom Substrat variiert. Bei Wachstum durch Vergärung von Glucose waren mehr c -Monomere im Oligomer vorhanden als bei Wachstum auf Succinat. Da die Anzahl an translozierten H^+ mit der Anzahl an ionentranslozierenden Carboxylaten korreliert, bedeutet dies eine Verringerung der H^+/ATP -Stöchiometrie bei Wachstum auf Succinat. Dies bietet der Zelle den Vorteil, daß sie im Zuge der Gärung, wenn

die F_1F_0 -ATPase zum Aufbau eines transmembranen H^+ -Gradienten genutzt wird, weniger ATP hydrolysieren muß, um ein Potential aufzubauen. Ein ähnlicher Effekt ließe sich in *A. woodii* durch die Variation der Anzahl von c_1 -Monomeren im c -Oligomer erreichen. Von Reidlinger (1994) wurde bereits eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Na^+ - F_1F_0 -ATPase in der Cytoplasmamembran vom Substrat nachgewiesen. Dies könnte bedeuten, daß *A. woodii* auf Substraten, die nur eine geringe Netto-ATP-Synthese (z. B. 1 mol ATP/mol Methanol) oder gar keine ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung erlauben (z. B. $H_2 + CO_2$), die Anzahl der c_1 -Untereinheiten pro c -Oligomer absenkt. Bei Wachstum auf Fruktose ist dagegen eine ATP-Synthese auch durch Substratkettenphosphorylierung möglich, und die Na^+ - F_1F_0 -ATPase kann in diesem Falle als Na^+ -Pumpe wirken. Die höhere Anzahl der c_1 -Untereinheiten hätte eine Verringerung der ionentranslozierenden Carboxylate und damit eine geringere Na^+/ATP -Stöchiometrie zur Folge. Es wurde daher im folgenden die Produktion der Untereinheit c_1 bei Wachstum von *A. woodii* auf Methanol und $H_2 + CO_2$ betrachtet.

A. woodii wurde auf 60 mM Methanol, 20 mM Fruktose oder $H_2 + CO_2$ in 100-ml-Serumflaschen angezogen. Die Zellen wurden während der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, d. h. bei Wachstum auf Methanol und $H_2 + CO_2$ bei einer $OD_{600} = 0,4$ und bei Wachstum auf Fruktose bei einer $OD_{600} = 0,9$. Zunächst wurden Zellextrakte der Kulturen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blots mit dem anti- c_1 -Antiserum analysiert. Unabhängig vom Substrat ließ sich in allen Kulturen die Untereinheit c_1 und das c -Oligomer nachweisen. In Zellen von *A. woodii* wurde die Untereinheit c_1 bei Anzucht auf Methanol stärker produziert als in Zellen, die auf $H_2 + CO_2$ oder Fruktose angezogen wurden (Abb. 38). Es bestand hierbei natürlich die Möglichkeit, daß das *atp*-Operon bei Wachstum mit Methanol generell stärker exprimiert wird. Die Zellextrakte wurden daher auch mit dem anti- β -Antiserum analysiert, da diese Untereinheit aufgrund ihrer Funktion in ihrer Stöchiometrie nicht variieren sollte. Die Analyse der Zellextrakte mit dem anti- β -Antiserum zeigte, daß auch die β -Untereinheit bei Anzucht auf Methanol in größerer Menge vorliegt (Abb. 38). Das gesamte *atp*-Operon wird also bei Wachstum auf Methanol in *A. woodii* stärker exprimiert. Dies korreliert mit der erhöhten spezifischen Aktivität der Na^+ - F_1F_0 -ATPase in der Cytoplasmamembran von *A. woodii* bei Anzucht auf Methanol (Reidlinger, 1994).

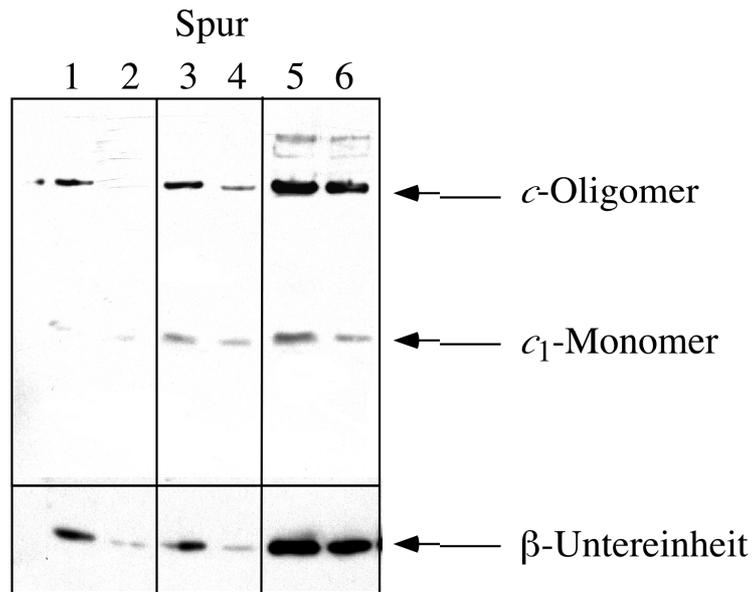


Abb. 38. Synthese der Untereinheiten β und c_1 in *A. woodii* bei Wachstum mit Fruktose, Methanol oder $H_2 + CO_2$ als Substrat. *A. woodii* wurde in 50-ml-Kulturen mit 20 mM Fruktose, 60 mM Methanol oder $H_2 + CO_2$ angezogen. Die Zellen wurden geerntet und ihre Proteine auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden sie mit anti- c_1 -Antiserum und anti- β -Antiserum hybridisiert. Spur 1: Fruktose, 75 μ g Protein; Spur 2: Fruktose, 50 μ g Protein; Spur 3: $H_2 + CO_2$, 75 μ g Protein; Spur 4: $H_2 + CO_2$, 50 μ g Protein; Spur 5: Methanol, 75 μ g Protein; Spur 6: Methanol, 50 μ g Protein.

Da bei diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden konnte, daß Untereinheit c_1 zwar produziert, aber nicht in die ATPase eingebaut wird, wurde als nächstes die Untereinheitenzusammensetzung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* bei Wachstum mit verschiedenen Substraten verglichen. Hierzu wurde *A. woodii* in 17,5-l-Kulturen mit 20 mM Fruktose, 200 mM Formiat oder 60 mM Methanol angezogen. Eine Großanzucht mit $H_2 + CO_2$ war leider nicht möglich. Stattdessen wurde Formiat als zusätzliches Substrat gewählt, da dieses das erste Umsetzungsprodukt des Acetyl-CoA Weges darstellt. Bei Wachstum auf Formiat sollte daher ein ähnliches Expressionsmuster wie bei Anzucht auf $H_2 + CO_2$ zu beobachten sein. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase wurde zunächst aus der Membranfraktion durch Blue-Native-PAGE isoliert, aus dem Gel ausgeschnitten, bei 100 oder 120°C denaturiert und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Unabhängig vom Substrat ließ sich die Untereinheit c_1 nach der Denaturierung des c -Oligomers in der Na^+ - F_1F_0 -ATPase nachweisen (Abb. 39). Die stärkere Markierung der c_1 -Untereinheit in der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus Zellen, die auf Methanol oder Formiat angezogenen wurden, ist dabei nicht auf einen höheren Anteil der Untereinheit c_1 in diesen ATPasen zurückzuführen. Die Färbung des SDS-Polyacrylamidgels zeigte, daß alle Untereinheiten der Na^+ - F_1F_0 -ATPase bei Wachstum auf Methanol oder Formiat in größeren Mengen vorlagen als bei Anzucht auf Fruktose. Auch hierdurch wurde also bestätigt, daß das *atp*-Operon in *A. woodii* zumindest bei Wachstum auf Methanol stärker exprimiert wird als bei Wachstum auf Fruktose.

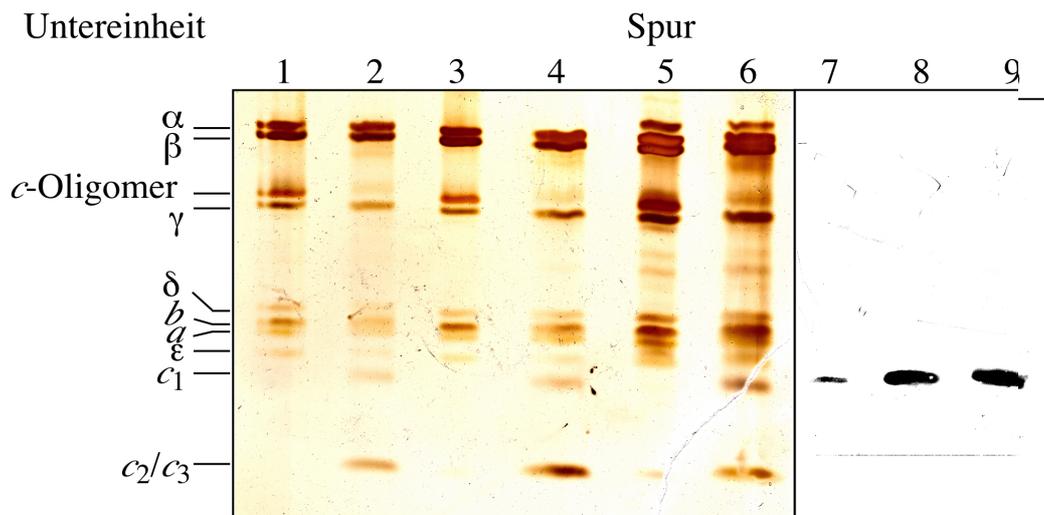


Abb. 39. Nachweis der Untereinheit c_1 in der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* bei Anzucht auf Formiat, Methanol oder Fruktose. *A. woodii* wurde auf 20 mM Fruktose, 200 mM Formiat oder 60 mM Methanol angezogen. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase wurde durch Blue-Native-PAGE aus der Membranfraktion präpariert und im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Denaturierung erfolgte bei 100° und 120°C. Die bei 120°C denaturierten Proben wurden zudem auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit dem anti- c_1 -Antiserum analysiert. Spur 1: SDS-PAGE, Fruktose, 100°C; Spur 2: SDS-PAGE, Fruktose, 120°C; Spur 3: SDS-PAGE, Formiat, 100°C; Spur 4: SDS-PAGE, Formiat, 120°C; Spur 5: SDS-PAGE, Methanol, 100°C; Spur 6: SDS-PAGE, Methanol, 120°C; Spur 7: Western-Blot, Fruktose, 120°C; Spur 8: Western-Blot, Formiat, 120°C; Spur 9: Western-Blot, Methanol, 120°C.

Bei Wachstum auf Methanol kommt es also entgegen den Erwartungen zu keiner Verringerung der *atpE*₁-Expression. Vielmehr scheint das gesamte *atp*-Operon stärker exprimiert zu werden.

Bei Wachstum auf Fruktose in Abwesenheit von NaCl erzeugt *A. woodii* ATP nur durch Substratkettenphosphorylierung. Daß unter diesen Bedingungen die ATPase in der Membran vorliegt, wurde bereits von Reidlinger (1994) nachgewiesen. Es sollte nun überprüft werden, ob bei einem Mangel an Na^+ eventuell eine Veränderung in der Menge der produzierten Untereinheit c_1 nachzuweisen ist. Hierzu wurde *A. woodii* zunächst durch mehrfaches Überimpfen auf Na^+ -freies Medium mit 20 mM Fruktose als Substrat an Na^+ verarmt. Aus dieser Kultur wurde dann parallel auf Na^+ -haltige und Na^+ -freie Medien überimpft. Die Zellernte erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer $\text{OD}_{600} = 1,2$. Es wurden ganze Zellen durch Western-Blots mit dem anti- c_1 -Antiserum analysiert. Die Analyse der Zellextrakte mit dem anti- c_1 - und anti- β -Antiserum ergaben keine Hinweise auf eine differentielle Expression des *atp*-Operons in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration (Abb. 40).

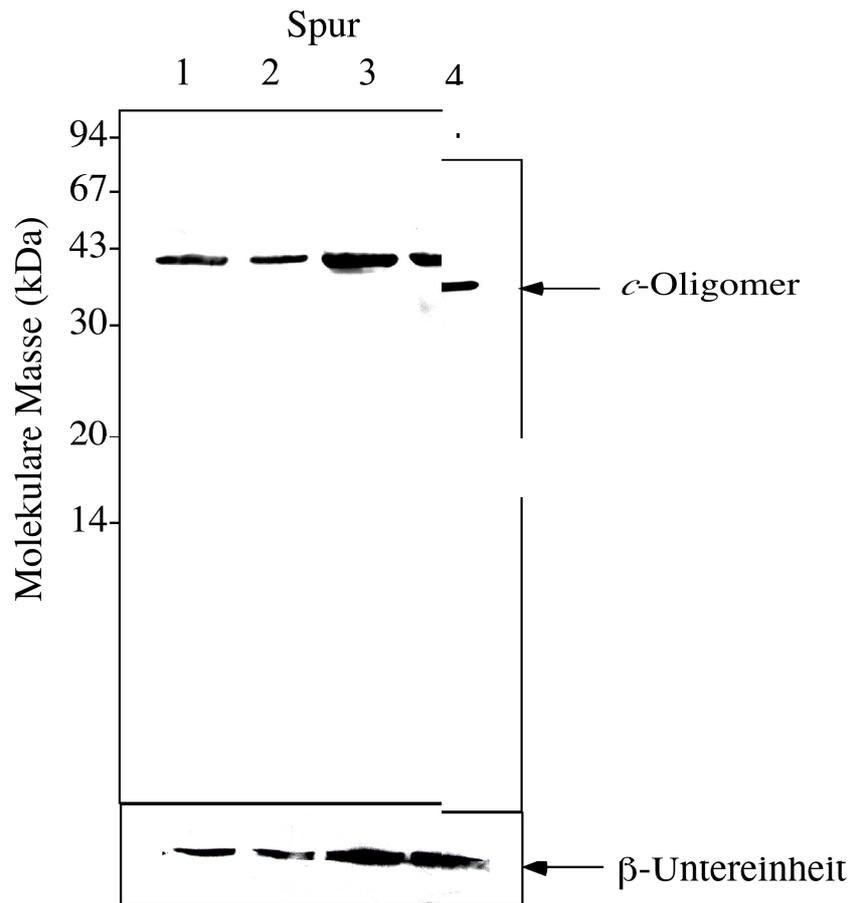


Abb. 30. Produktion der Untereinheiten β und c_1 in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration. *A. woodii* wurde in 50-ml-Kulturen mit 0 und 20 mM NaCl angezogen, bei einer $\text{OD}_{600} = 1,2$ geerntet und ganze Zellen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Western-Blot mit dem anti- c_1 -Antiserum. Spur 1: 0 mM NaCl, 50 μg Protein; Spur 2: 20 mM NaCl, 50 μg Protein; Spur 3: 0 mM NaCl, 75 μg Protein; Spur 4: 20 mM NaCl, 75 μg Protein.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Untereinheit c_1 unabhängig vom Substrat und der NaCl-Konzentration in *A. woodii* gebildet wird. Die Expressionsstärke im Vergleich zu anderen Untereinheiten der ATPase ist konstant. Vielmehr scheint aber das gesamte *atp*-Operon in *A. woodii* bei Wachstum auf Methanol und Formiat stärker exprimiert zu werden als bei Wachstum auf Fruktose. Für einen weiterführenden Vergleich der Stöchiometrie der c_1 -Untereinheit bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ist allerdings eine Reinigung des Enzyms nötig. Dies würde den Vergleich identischer Mengen der ATPase erlauben, was durch die Blue-Native-PAGE nicht möglich ist. Eine Reinigung des Enzyms ist außerdem für eine erneute Charakterisierung der intakten ATPase in Bezug auf die Na^+/ATP -Stöchiometrie nötig. Es wurde daher zum Abschluß dieser Arbeit ein Verfahren zur Reinigung der ATPase aus *A. woodii* entwickelt, bei dem die komplette Struktur der ATPase erhalten bleibt.

3.4 Reinigung der ATPase

Durch die Blue-Native-PAGE wurde gezeigt, daß die Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus neun Untereinheiten besteht, während durch die frühere Anreicherung nur sechs Untereinheiten nachgewiesen wurden (Reidlinger und Müller, 1994). Diese Reinigung umfaßte eine Solubilisierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus gewaschenen Membranen mit 0,15% Triton X-100 eine fraktionierte PEG-Fällung und eine Gelfiltration. Ein Verlust der Untereinheiten während der Solubilisierung mit Triton X-100 konnte durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bereits ausgeschlossen werden. Auffällig an dem vorherigen Reinigungsverfahren war jedoch, daß nach der Gelfiltration keine aktive Na^+ - F_1F_0 -ATPase erhalten wurde. Die Aktivität konnte jedoch durch Zugabe von Lipiden rekonstituiert werden. Der Gelfiltration war dabei eine PEG-Fällung vorausgegangen nach der das Sediment in einem Desoxycholat-haltigem Puffer gelöst werden mußte. Bei der Bestimmung der ATPase-Aktivität an gewaschenen Membranen von *A. woodii* in Gegenwart von Desoxycholat während dieser Arbeit zeigte sich, daß Desoxycholat zu einem drastischen Abfall der Aktivität führt. Es lag also die Vermutung nahe, daß die Untereinheiten *a*, *b* und *c*₁ bei diesem Schritt verloren gegangen waren.

Bei der folgenden Reinigung wurde daher keine PEG-Fällung durchgeführt. Auch eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat schien nicht geeignet, da dabei eine Fraktionierung lediglich in Gegenwart von Desoxycholat erfolgt. Durch eigene Arbeiten konnte bestätigt werden, daß es ohne Desoxycholat zu keiner Fraktionierung des Solubilisates durch eine Ammoniumsulfat-Fällung kam, daß aber in Gegenwart von Desoxycholat die Na^+ - F_1F_0 -ATPase vollständig inaktiviert wurde (Daten nicht gezeigt). Da die Analyse der Membranproteinkomplexe von *A. woodii* ergeben hatte, daß die Na^+ - F_1F_0 -ATPase mit einer molekularen Masse von 590 kDa den bei weitem größten Proteinkomplex in der Cytoplasmamembran darstellt, wurde versucht, die Na^+ - F_1F_0 -ATPase nur durch eine Größenfraktionierung des aus der Cytoplasmamembran solubilierten Enzyms mittels Gelfiltration und Dichtegradientenzentrifugationen zu reinigen.

3.4.1 Solubilisierung der ATPase

Zur Ermittlung einer optimalen Detergenkonzentration zur Solubilisierung der ATPase aus der Membranfraktion wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen an Dodecylmaltosid und Triton X-100 getestet. Beide Detergenzien wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 5 g Detergens pro g Protein eingesetzt. Die Solubilisierung der Membranfraktion mit Triton X-100 führte zu einer Stimulierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase um bis zu 180% (0,5 g Triton X-100/g Protein, Abb. 41). Bei Verwendung von Dodecylmaltosid wurde dagegen nur eine maximale Erhöhung der ATPase-Aktivität auf 114% mit 1 g Dodecylmaltosid pro g Protein erhalten (Abb. 41). Die starke Erhöhung der Volumenaktivität in den mit Triton X-100 behandelten Solubilisaten deutet auf eine bereits von Reidlinger (1994) beschriebene

aktivierende Wirkung dieses Detergens auf die ATPase-Aktivität hin. Da diese aktivierende Wirkung allerdings auch durch eine Entkopplung des Enzyms, also durch eine teilweise Ablösung hydrophober Untereinheiten erklärt werden kann, schien es ratsam, zur weiteren Solubilisierung Dodecylmaltosid zu verwenden. Hierfür sprachen auch die vorherigen Experimente zur Untereinheitenzusammensetzung der ATPase, in denen die intakte Na^+ - F_1F_0 -ATPase mit 1 g Dodecylmaltosid pro g Protein aus der Cytoplasmamembran solubiliert wurde.

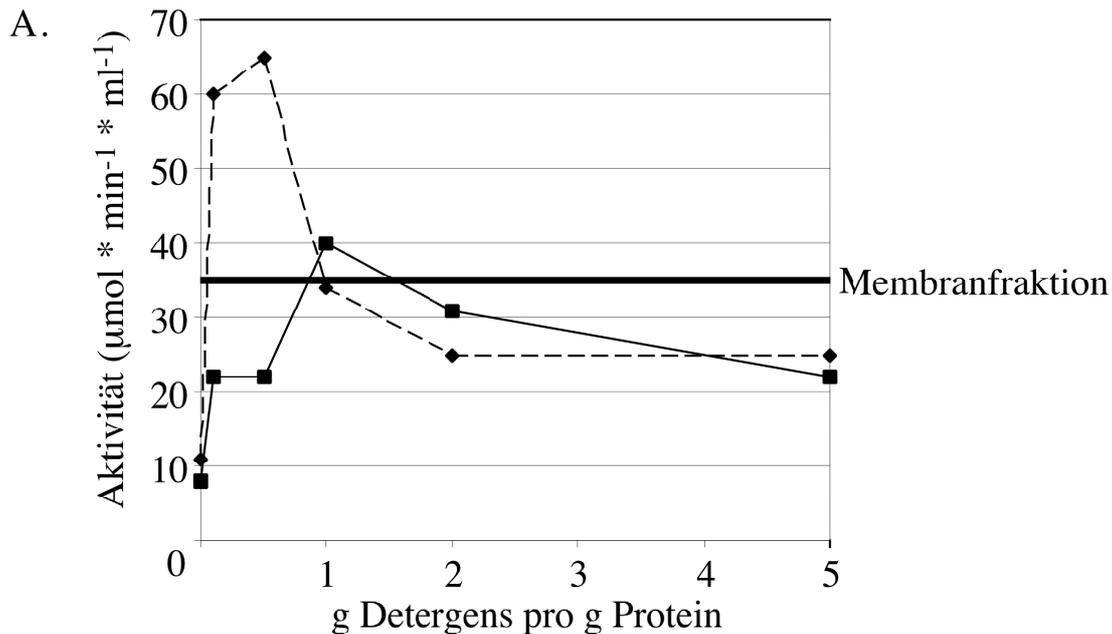


Abb. 41. Solubilisierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase mit Triton X-100 und Dodecylmaltosid. Die Membranfraktion (10 mg Protein/ml) wurde mit den angegebenen Konzentrationen an Detergens versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Restliche Membranen wurden durch eine Zentrifugation für 45 min entfernt, und aus dem Überstand wurde die Aktivität der ATPase bestimmt. Zur Bestimmung der ATP-Hydrolyse wurden 5 µl Probe eingesetzt. Es ist die Abhängigkeit der Volumenaktivität in den Solubilisaten von der Detergenkonzentration gezeigt. Die Volumenaktivität der Membranfraktion ist gekennzeichnet. ◆, Triton X-100; ■, Dodecylmaltosid.

Die Solubilisierung der ATPase erfolgte daher durch eine Inkubation von gewaschenen Membranen mit Dodecylmaltosid (siehe 2.6.9.1). Es wurde hierbei eine erste Anreicherung der spezifischen Aktivität um einen Faktor 2 erreicht, das heißt die spezifische Aktivität stieg von $0,5 - 0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in den gewaschenen Membranen auf $1,5 - 2,0 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ im Solubilisat an (Tab. 13).

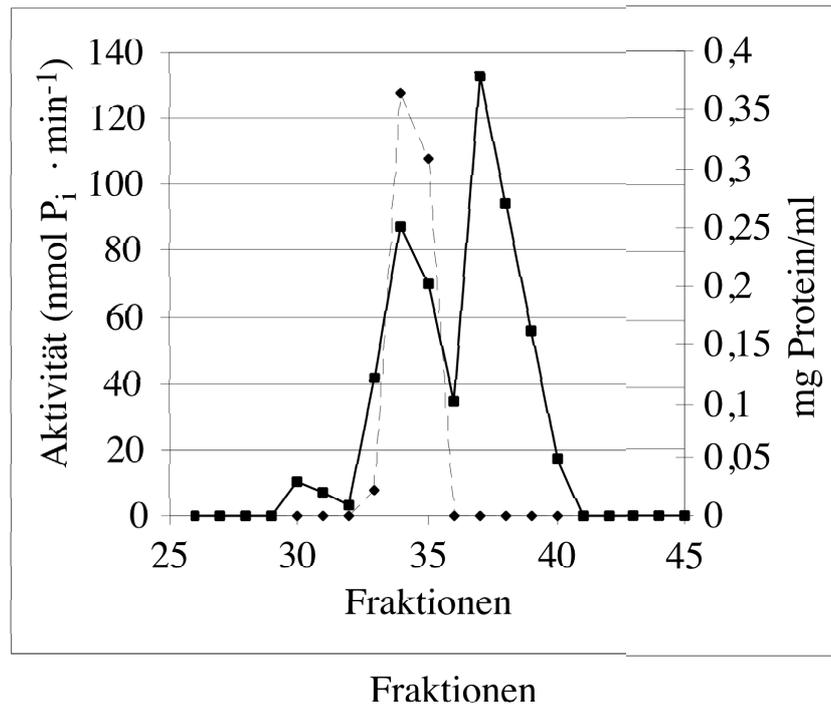
3.4.2 Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte über Sephacryl S-400 in Gegenwart von 0,1% Triton X-100, da ohne Detergens bzw. bei Detergensenkonzentrationen unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (cmc) keine Auftrennung erzielt wurde. Dies hatte zur Folge, daß die Absorption bei 280 nm aufgrund der Eigenabsorption von Triton X-100 bei dieser Wellenlänge nicht zur Bestimmung der Proteinmengen herangezogen werden konnte. Zur Verfolgung der Elution wurde daher von allen Fraktionen die Absorption bei 750 nm bei der Proteinbestimmung nach Lowry in Gegenwart von 1% SDS (Dulley und Grieve, 1975) herangezogen. Die Elution der ATPase-Aktivität wurde durch die Absorption der Fraktionen bei 405 nm im unter 2.6.3 beschriebenen Phosphat-Test verfolgt.

Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase ließ sich aufgrund ihrer Aktivität und ihres Proteinprofils in der SDS-PAGE in den Fraktionen 33 - 35 nachweisen. In der SDS- und nativen PAGE zeigte sich eine deutliche Abtrennung der ATPase von weiteren solubilisierten Proteinen (Abb. 44). In den Fraktionen 33 - 35 ließen sich neben den Untereinheiten der Na^+ - F_1F_0 -ATPase zwei weitere Proteine mit molekularen Massen von 60 und 66 kDa nachweisen. Durch eine Absenkung der Flußrate von 1 auf 0,1 ml/min sowie durch Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen (0 - 150 mM NaCl) im Gelfiltrationspuffer ließ sich keine weitere Abtrennung der kontaminierenden Proteine erreichen. Die Aktivität der Na^+ - F_1F_0 -ATPase betrug nach der Gelfiltration 5 - 7 U, was einer Anreicherung um einen Faktor 10 -14 gegenüber den Membranen entspricht. Die Ausbeute betrug allerdings nur 16%. Ein Großteil der Aktivität ging also während der Gelfiltration verloren. Entscheidend war hier aber, daß im Gegensatz zu den vorherigen Reinigungsversuchen durch Reidlinger (1994) keine Inaktivierung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase zu beobachten war.

Im nativen Polyacrylamidgel ließ sich bereits nach der Gelfiltration nur noch die Na^+ - F_1F_0 -ATPase mit einer molekularen Masse von ca. 600 kDa erkennen (Abb. 44). Nur durch Überfärben der Gele mit Silber ließ sich eine geringe Menge eines Proteins bei ca. 60 kDa erkennen. Die Gelfiltration scheint also bereits auszureichen, um eine intakte und reine Na^+ - F_1F_0 -ATPase zu erhalten.

A.



B.

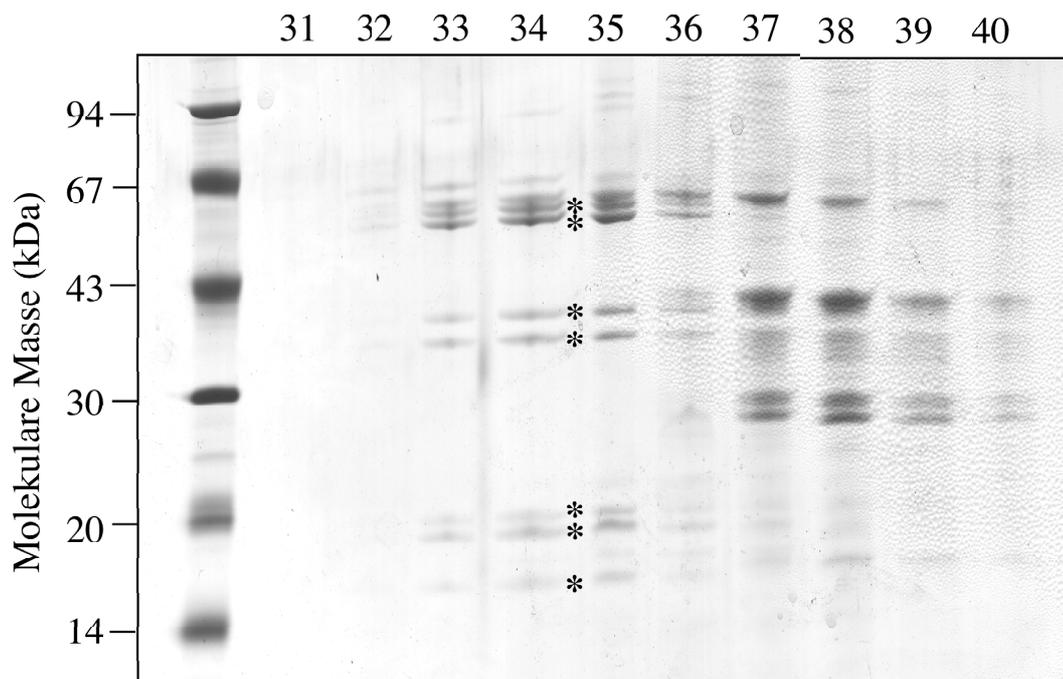


Abb. 42. Anreicherung der Na⁺-F₁F₀-ATPase durch Gelfiltration auf Sephacryl S-400.
 A. Elutionsprofil der Proteine (■) und der ATPase-Aktivität (◆), B. SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen 31 bis 40. Es wurden jeweils gleiche Volumina (50 µl) der Fraktionen 31 - 40 im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die Sterne kennzeichnen von oben nach unten die Untereinheiten der Na⁺-F₁F₀-ATPase: α, β, c-Oligomer, γ, δ, b/a, ε.

3.4.3 Glycerin-Dichtegradienten-Zentrifugation

Eine Abtrennung der kontaminierenden 60- und 66-kDa-Proteine ließ sich durch eine Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation im Bereich von 10 - 30% Glycerin erreichen. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase war dabei in den Fraktionen 7 - 10 zu finden. Die kontaminierenden Proteine dagegen bei höheren Dichten in den ersten vier Fraktionen (Abb. 43). Eine weitere Anreicherung der Aktivität wurde durch diesen Schritt allerdings nicht erreicht.

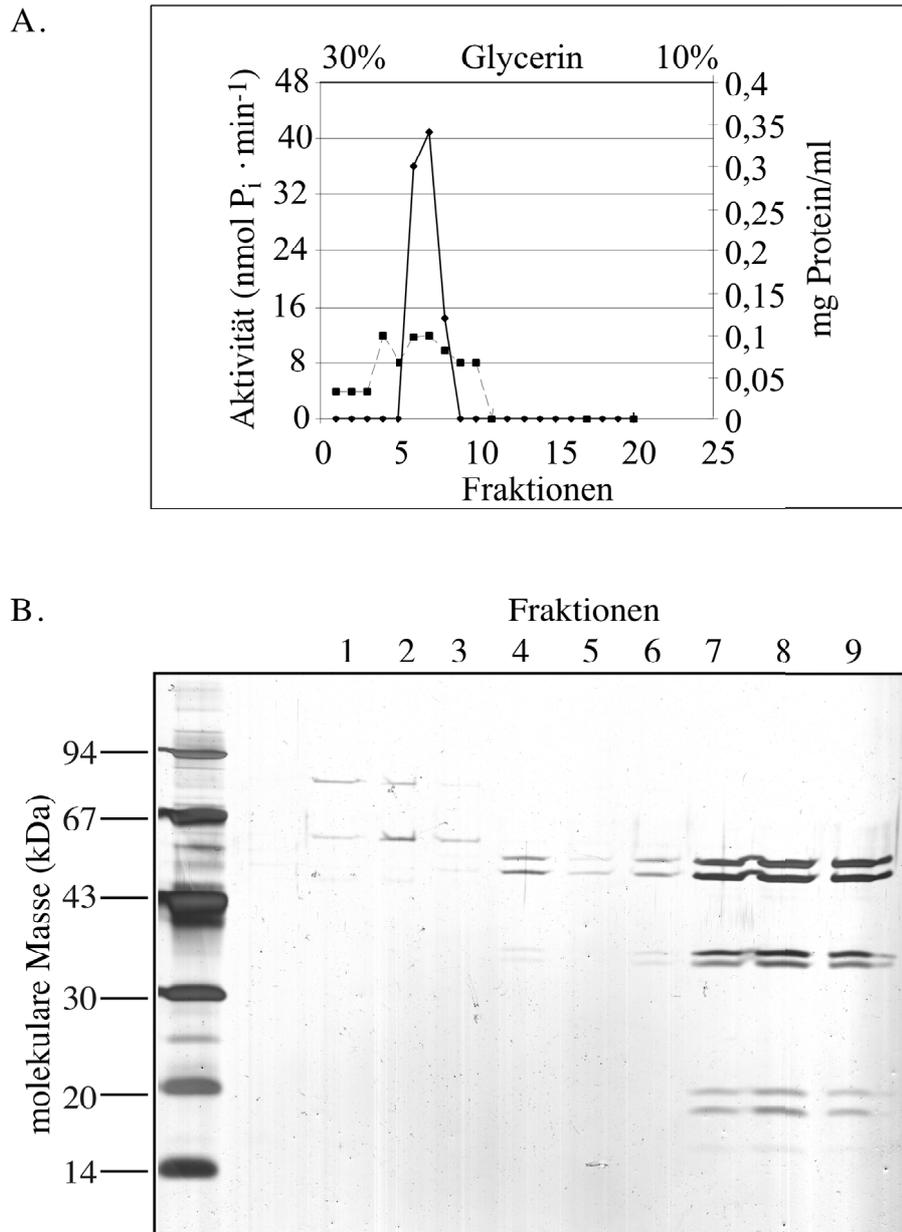


Abb. 43. Aufreinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase durch eine Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation. A. Proteingehalt (■) und ATPase-Aktivität (◆) der Gradientenfraktionen, B. 10%ige SDS-PAGE der Fraktionen 1 - 11. Gleiche Volumina (50 μl) der Fraktionen 1 - 11 wurden im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. In der Fraktion 7 - 9 sind von oben nach unten die Untereinheiten α , β , c -Oligomer, γ , δ , b/a und ϵ zu erkennen.

3.4.4 Zusammenfassung der Reinigung

Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *A. woodii* wurde durch die Solubilisation mit 1 g Dodecylmaltosid pro g Protein, die Gelfiltration über Sephacryl S-400 und eine Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation 10fach angereichert; die Ausbeute betrug 10%. In Tab. 13 ist die Reinigung zusammenfassend dargestellt.

Tab. 13 Anreicherung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *A. woodii*.

	Protein (mg)	Volumen (ml)	Aktivität ($\mu\text{mol P}_i \cdot \text{min}^{-1}$)	Ausbeute (%)	spez. Aktivität ($\mu\text{mol P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Anreicherung
Membranen	480	4	240	-	0,5	-
Solubilisat	120	3	180	75	1,5	3
Sephacryl S-400	8	27	40	16	5	10
Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation	2	81	10	5	5	10

Die Reinheit der Na^+ - F_1F_0 -ATPase wurde im nativen Gradientengel (4 - 20% Acrylamid) analysiert. Im Solubilisat waren neben der ATPase fünf weitere Proteinkomplexe mit molekularen Massen von 232 - 440 kDa zu erkennen. Bereits durch die Gelfiltration wurden diese vollständig von der Na^+ - F_1F_0 -ATPase abgetrennt (Abb. 44).

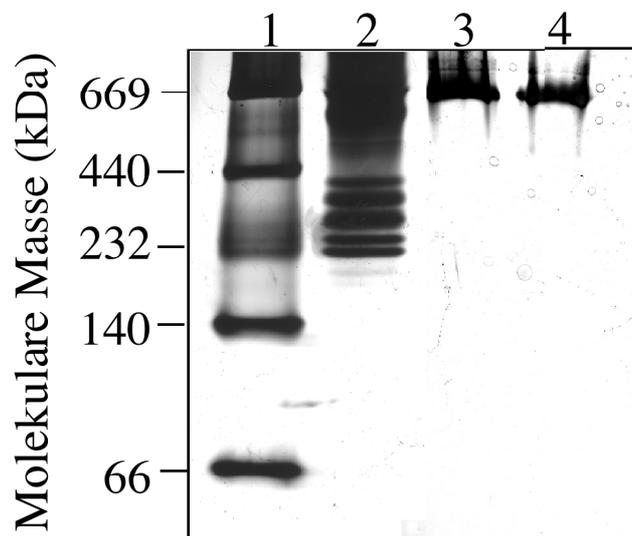


Abb. 44. Analyse der Aufreinigung im nativen Gradientengel. Auf ein 4 - 20%iges natives Gradientengel wurden hierzu molekularer Massenstandard (Spur 1), 20 μg Protein aus dem Solubilisat (Spur 2) und je 6 μg der Na^+ - F_1F_0 -ATPase nach der Gelfiltration (Spur 3) und dem Glycerin-Dichtegradienten (Spur 4). Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

Die molekulare Masse der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* wurde mittels Gelfiltration durch den Vergleich mit den Elutionsvolumina von 11 Standardproteinen bekannter Masse bestimmt. Die Elutionsvolumina der Standardproteine mit einer molekularen Masse von 67 – 670 kDa ergaben eine lineare Beziehung zum Logarithmus ihrer Massen (Abb. 45). Der Vergleich mit dem Elutionsvolumina der Na^+ - F_1F_0 -ATPase ergab eine molekulare Masse von 600 kDa für Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii*.

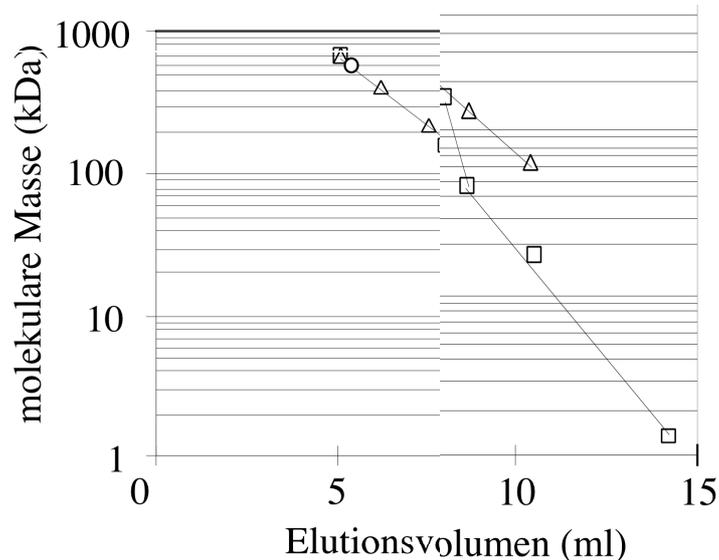


Abb. 45. Eichkurven zur Bestimmung der molekularen Massen der Na^+ - F_1F_0 -ATPase. Es sind die Elutionsvolumina der Standardproteine und der ATPase (O) gegen den Logarithmus ihrer molekularen Masse aufgetragen. Als Standard wurden der BioRad size exclusion standard (□, Fa. BioRad Laboratories, Hercules, USA) und der High molecular weight Marker Kit (Δ, Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) verwendet.

Von besonderem Interesse war die Untereinheitenzusammensetzung der gereinigten Na^+ - F_1F_0 -ATPase. Im Silber-gefärbten 10%igen SDS-Polyacrylamidgel waren acht Proteine zu erkennen (Abb. 46). Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen der Blue-Native-PAGE konnten die Untereinheiten α , β , der c -Oligomer, γ , δ , b und ϵ identifiziert werden. Hier lag allerdings der Verdacht nahe, daß die Untereinheit a zusammen mit der b -Untereinheit im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel wandert. Um eine bessere Auftrennung zu erzielen, wurde die Untereinheitenzusammensetzung der ATPase daher auch in Gelen mit höheren Polyacrylamidkonzentrationen analysiert. Im 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel wurde schließlich eine Auftrennung der Untereinheiten b und a erreicht (Abb. 46). Die Frage ob die Untereinheit c_1 auch Bestandteil der gereinigten ATPase ist, sollte durch eine Western-Blot-Analyse geklärt werden. Hierzu wurde die im 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennte Na^+ - F_1F_0 -ATPase mit dem anti- c_1 -Antiserum analysiert. Die c_1 -Untereinheit konnte hierbei im c -Oligomer detektiert werden (Abb. 46).

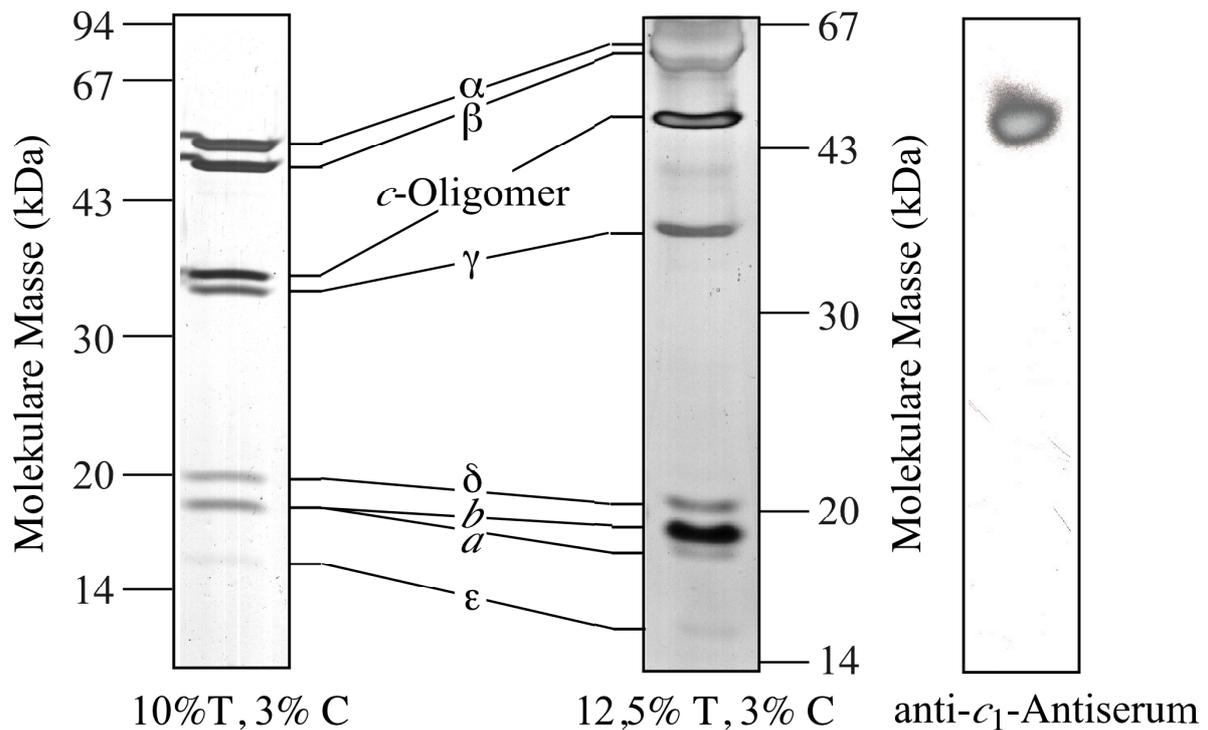


Abb. 46. Analyse der Untereinhenzuzusammensetzung der gereinigten $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ aus *A. woodii* durch SDS-PAGE. Die $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ wurde, wie im Text beschrieben durch eine Solubilisierung, Gelfiltration und Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und im 10 und 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Polyacrylamidgele wurden mit Silber gefärbt. Die im 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennte $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ wurde zum Nachweis der Untereinheit c_1 außerdem im Western-Blot mit dem anti- c_1 -Antiserum analysiert.

Bei der Analyse der gereinigten $\text{Na}^+\text{-F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ fiel auf, daß einige Untereinheiten im denaturierenden Polyacrylamidgel in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration unterschiedliche molekulare Massen besaßen (Tab. 14). Generell wanderten die hydrophoben Untereinheiten in Gelen mit höherer Acrylamidkonzentration bei höheren molekulare Massen. Vor allem die durch SDS-PAGE ermittelte molekulare Masse des c -Oligomers besaß eine außerordentliche Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration. Diese variierte zwischen 37 und 48 kDa in der 10%igen bzw. 12,5%igen SDS-PAGE (Abb. 46).

Tab. 14. Molekulare Massen der Untereinheiten der Na^+ - F_1F_0 -ATPase im SDS-Polyacrylamidgel.

Untereinheit	10%T, 3%C ^a	12,5%T, 3%C
α	56 ^b	57
β	55	53
<i>c</i> -Oligomer	37	48
γ	36,5	38
δ	17	20
<i>b</i>	16	19,5
<i>a</i>	16	19
ϵ	13	14

^aDie Angabe der Acrylamidkonzentration und der Quervernetzung ist nach der Definition von Schägger und Jagow (1987) angegeben. ^bDie molekularen Massen sind in kDa angegeben.

4. Diskussion

4.1 Struktur der F_O-Domäne

Die F_O-Domäne der bakteriellen F₁F_O-ATPase besteht aus den drei Untereinheiten *a*, *b* und *c*, die in *E. coli* in einer Stöchiometrie von 1 : 2 : 9 - 12 vorliegen (Foster und Fillingame, 1982). In den F₁F_O-ATPasen der homoacetogenen Bakterien konnte bisher lediglich die Untereinheit *c* nachgewiesen werden. Sowohl in *A. woodii* als auch in *M. thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* wurden die Untereinheiten *a* und *b* nicht in der gereinigten F₁F_O-ATPase detektiert, obwohl offene Leserahmen für diese Untereinheiten in allen drei Organismen vorhanden sind (Das und Ljungdahl, 1997; Das *et al.*, 1997; Reidlinger und Müller, 1994; Rahlfs *et al.*, 1999). In dieser Arbeit gelang es nun, durch die Analyse der Na⁺-F₁F_O-ATPase aus *A. woodii* mittels Blue-Native- und SDS-PAGE die Untereinheiten *a* und *b* im ATPase-Komplex nachzuweisen. Da die abgeleiteten Primärsequenzen der Untereinheiten der Na⁺-F₁F_O-ATPase von *A. woodii* große Ähnlichkeiten zu den F₁F_O-ATPasen aus *E. coli* und *P. modestum* besitzen (Rahlfs, 1999), kann man von einer ähnlichen Struktur der Na⁺- und H⁺-abhängigen F₁F_O-ATPasen ausgehen. Der Unterschied in der Ionenspezifität sollte deswegen nur auf einige wenige Aminosäureaustausche zurückzuführen sein. Die Struktur der F_O-Domäne und ihrer einzelnen Untereinheiten soll daher im folgenden dargestellt werden.

4.1.1 Struktur und Funktion der Untereinheit *a*

Die Untereinheit *a* stellt die größte Untereinheit der membranständigen F_O-Domäne der F₁F_O-ATPase dar. Sie liegt nur in einer Kopie im Komplex vor (Foster und Fillingame, 1982). Die Topologie der Untereinheit *a* konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Erste Untersuchungen zur Topologie der Untereinheit *a* durch die Analyse von PhoA-Fusionen ergaben eine Anzahl von acht transmembranen Helices, die allerdings mit zum Teil nur 10 - 15 Aminosäuren zu kurz waren, um eine Membran mit 30 Å Durchmesser zu durchspannen (Lewis *et al.*, 1990; Bjorbaeck *et al.*, 1990). Durch Bindungsstudien mit Antikörpern wurde ein Modell der *a*-Untereinheit mit sechs transmembranen Helices postuliert (Yamada *et al.*, 1996; Jäger *et al.*, 1998). Aufbauend auf Bindungsstudien mit fluoreszierenden Maleimid-Derivaten wurde ein alternatives Modell mit fünf transmembranen Helices formuliert (Valiyaveetil und Fillingame, 1998; Long *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1999). Beide Untersuchungen wiesen eine cytoplasmatische Lokalisation des Carboxyterminus und eine ähnliche Verteilung der vier carboxyterminalen transmembranen Helices nach. Für den Aminoterminus zeigten die immunologischen Untersuchungen jedoch eine cytoplasmatische Lokalisation sowie zwei transmembrane Helices

(Jäger *et al.*, 1998), während die Maleimid-Markierungen eine periplasmatische Lokalisation mit lediglich einer weiteren transmembranen Helix ergaben (Valiyaveetil und Fillingame, 1998).

Die *a*-Untereinheit ist von einem mechanistischen Standpunkt aus dem Stator der F_1F_0 -ATPase zuzurechnen. Sie bildet einen stabilen Komplex mit der *b*-Untereinheit und ist mit dem *c*-Ring zusammen für die Ionentranslokation verantwortlich. Sie ist direkt an der Protonentranslokation beteiligt (Cain und Simoni, 1986,1988; Eya *et al.*, 1988). Vor allem die Aminosäuren Histidin-245, Glutamat-219 und Arginin-210 (*E. coli a*-Untereinheit) erregten zunächst Aufmerksamkeit, da der Austausch dieser Aminosäuren zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der F_1F_0 -ATPase bei intakter Struktur führte (Cain und Simoni, 1986; Lightowers *et al.*, 1987, 1988). Später zeigte sich dann aber, daß zumindest Glutamat-219 und Histidin-245 nicht in allen *a*-Untereinheiten verschiedener Organismen konserviert sind. Zudem ließen sich Suppressormutanten identifizieren (Hartzog und Cain, 1994), und einige Aminosäuresubstitutionen in den Positionen 219 und 245 der *a*-Untereinheit aus *E. coli* zeigten eine geringe ATPase-Aktivität und ermöglichten *E. coli* ein Wachstum auf Succinat (also durch oxidative Phosphorylierung), was eine essentielle Bedeutung dieser Aminosäuren ausschließt (Cain und Simoni, 1988; Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Insgesamt ließ sich nur für Arginin-210 der *a*-Untereinheit aus *E. coli* eine essentielle Bedeutung für die ATP-gekoppelte Protonentranslokation nachweisen (Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Eine direkte Beteiligung von Arginin-210 an der Protonenbindung wurde aber ausgeschlossen, da eine Substitution von Arginin-210 gegen Alanin keinen Einfluß auf die passive Protonentranslokation durch die F_0 -Domäne hatte (Valiyaveetil und Fillingame, 1997).

Hinweise auf eine direkte Beteiligung der *a*-Untereinheit an der Ionentranslokation wurde auch durch die Mutationsanalyse des Proteins der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *P. modestum* erhalten. Dabei wurden Mutanten identifiziert, die mindestens drei Substitutionen in den Aminosäuren Lysin-220, Valin-264 und Isoleucin-278 aufwiesen, welche zu Na^+ -unabhängigen Wachstum und zu einer Hemmung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase durch Na^+ führten (Kaim und Dimroth, 1998). Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, daß die Ionenspezifität der ATPasen auch durch strukturelle Determinanten in der *a*-Untereinheit festgelegt wird. Alle Aminosäuren, die einen Einfluß auf die Ionentranslokation haben, sind im carboxyterminalen Bereich in zwei transmembranen Helices der Untereinheit *a* lokalisiert. Die Bedeutung der carboxyterminalen Helices für die Ionentranslokation zeigt sich auch durch die hohe Konservierung ihrer Primärsequenzen in verschiedenen Organismen (Deckers-Hebestreit und Altendorf, 1996). Eine besonders hohe Konservierung in den zwei carboxyterminalen Helices besteht dabei zwischen den *a*-Untereinheiten von F_1F_0 -ATPasen gleicher Ionenspezifität (Rahlf's und Müller, 1997).

4.1.2 Struktur und Funktion der Untereinheit *b*

Die *b*-Untereinheit liegt mit zwei Kopien im Enzymkomplex vor. Sie besteht aus zwei Domänen, einer ausgedehnten carboxyterminalen Domäne mit einer großen Anzahl geladener Aminosäuren sowie einer kurzen hydrophoben Domäne am Aminoterminus. Die hydrophobe Domäne besteht in *E. coli* aus zwei α -Helices (Dmitriev *et al.*, 1999a). Bereits von Hoppe *et al.* (1984) wurde gezeigt, daß dieser Bereich in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Quervernetzungsexperimente ließen außerdem vermuten, daß die hydrophobe Domäne an der Dimerisierung der beiden *b*-Untereinheiten in der F_1F_0 -ATPase beteiligt ist (Dmitriev *et al.*, 1999a).

Die lösliche Domäne der Untereinheit *b* aus *E. coli* besteht zu 80% aus α -Helices und zu 14% aus β -Schleifen (Greie *et al.*, 2000). Letzteres impliziert eine sehr flexible Struktur der *b*-Untereinheit. Die cytoplasmatische Domäne läßt sich auf Grund ihrer Interaktion mit anderen Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase in drei Bereiche gliedern. Direkt an die transmembrane Helix schließt sich ein Bereich an, der mit der Untereinheit *a* interagiert (McLachlin *et al.*, 2000). Der zentrale Bereich der cytoplasmatischen Domäne ist für die Dimerisierung der Untereinheit in der F_1F_0 -ATPase verantwortlich (Rodgers *et al.*, 1997; Revington *et al.*, 1999). Der carboxyterminale Bereich der *b*-Untereinheit zeigt in Quervernetzungsexperimenten dagegen eine deutliche Interaktion mit der Untereinheit δ der F_1 -Domäne (Rodgers *et al.*, 1997; McLachlin *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Untersuchungen wurde vermutet, daß die Untereinheit *b* eine flexible Verbindung zwischen der F_0 - und der F_1 -Domäne darstellt. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch elektronenmikroskopische Analysen, durch die die Existenz eines zweiten Stils zwischen der F_1 - und F_0 -Domäne an der Peripherie der F_1F_0 -ATPase gezeigt wurde (Wilkins und Capaldi, 1998)

4.1.3 Struktur und Funktion der Untereinheit *c*

Die Untereinheit *c* ist die am besten untersuchte Untereinheit der F_0 -Domäne. Sie besitzt zwei stark hydrophobe Bereiche, die durch eine hydrophile Region verbunden sind. Erkenntnisse über die Struktur der monomeren Untereinheit *c* beruhen überwiegend auf NMR-Studien an gereinigten Untereinheiten in Chloroform:Methanol-Gemischen und SDS-Mizellen. Hierbei wurden für die *c*-Untereinheiten aus *E. coli* (Fillingame, 1992; Girvin *et al.*, 1998) und *P. modestum* (Matthey *et al.*, 1999) abweichende Strukturen ermittelt, die zu zwei unterschiedlichen Modellvorstellungen über den Mechanismus der Ionentranslokation führten (siehe unten). Durch beide Studien wurde belegt, daß die beiden hydrophoben Bereiche transmembrane Helices bilden, die miteinander durch eine polare cytoplasmatische Schleife verbunden sind. Die *E. coli* *c*-Untereinheit faltet sich in einem Chloroform:Methanol-Gemisch in Form einer Haarnadelschleife

mit zwei α -helikalen Bereichen, die dicht gegeneinander gepackt sind. Das für die Protonentranslokation essentielle Aspartat-61 ist in der Mitte der zweiten Helix zu finden, was seine Lokalisation in der Mitte der Cytoplasmamembran wahrscheinlich macht (Abb. 47; Fillingame, 1992; Girvin *et al.*, 1998). Zur Organisation der Monomere im *E. coli* *c*-Ring liegen bisher unterschiedliche Ergebnisse vor. Durch Quervernetzungsexperimente mit *c*-Monomeren sowie mit genetischen Fusionen der *c*-Monomere zu Di- und Trimeren wurde ein Modell entworfen, in dem die carboxyterminale Helix an der Außenseite des *c*-Rings liegt. Aspartat-61 ist im protonierten Zustand zur aminoterminalen Helix hin orientiert (Dmitriev *et al.*, 1999b). Im alkalischen (pH = 8) ist die carboxyterminale Helix um 140° im Uhrzeigersinn gedreht, so daß das Aspartat-61 in unprotoniertem Zustand mit dem Arginin-210 der Untereinheit *a* interagieren kann (Abb. 48; Rastogi und Girvin, 2000).

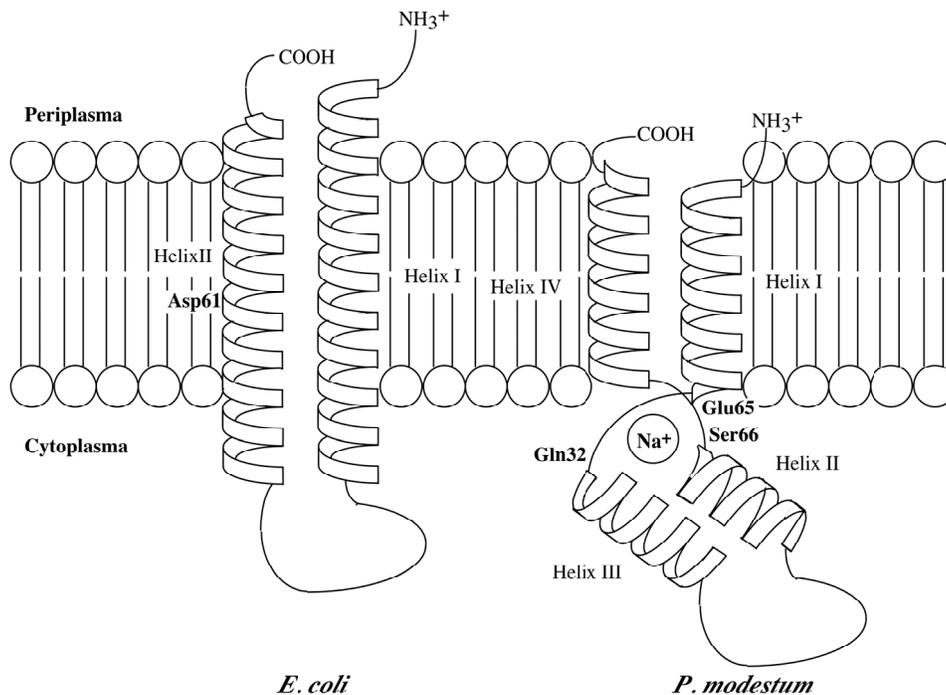


Abb. 47. Struktur der *c*-Untereinheiten der F_1F_0 -ATPasen aus *P. modestum* und *E. coli*. Die Strukturen wurden für *E. coli* nach Girvin *et al.* (1998) und für *P. modestum* nach Matthey *et al.* (1999) dargestellt.

Durch die Analyse des *c*-Rings mittels Tryptophan-Substitutionen wurde allerdings auch ein alternatives Modell vorgeschlagen, bei dem die aminoterminalen Helix am äußeren Rand und die carboxyterminale Helix im Kern des Rings liegt (Groth und Walker, 1997; Groth *et al.*, 1998). Das Aspartat-61 ist in diesem Modell zur Cytoplasmamembran gerichtet, so daß eine Interaktion mit der *a*-Untereinheit möglich ist (Abb. 48). Die Kristallstruktur des $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon_1c_{10}$ -Subkomplexes der F_1F_0 -ATPase aus Hefemitochondrien unterstützt allerdings das erste Modell (Stock *et al.*, 1999).

Die NMR-Analyse des *c*-Monomers der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *P. modestum* in SDS-Mizellen ergab im Gegensatz zu *E. coli* vier α -helikale Bereiche. An beiden Enden wurden α -Helices mit einer Länge von ca. 20 Aminosäuren identifiziert, die vermutlich in die Membran integriert sind. Diese α -Helices werden von kurzen Bereichen (3 - 6 Aminosäuren) gefolgt, die keine geordnete Sekundärstruktur aufweisen, und zwei weiteren α -Helices, die über eine polare Schleife verbunden sind (Abb. 47; Matthey *et al.*, 1999).

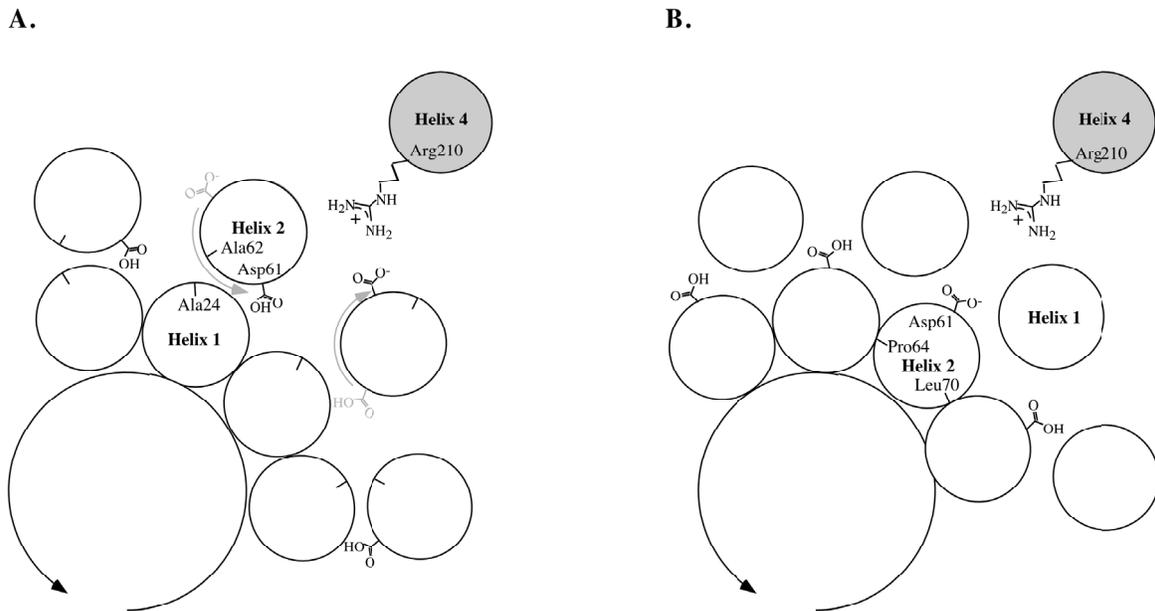


Abb. 48. Vergleich von zwei möglichen *c*-Oligomer Strukturen. Das Modell A basiert auf den Daten von Fillingame *et al.* (2000) und das Modell B auf den Daten von Groth und Walker (1997). Es ist jeweils nur ein Ausschnitt aus vier *c*-Monomeren und die Helix 4 der Untereinheit *a* gezeigt. In A ist die Rotation der carboxyterminalen Helix in grau angedeutet.

Erste Untersuchungen zur Stöchiometrie der ATPase-Untereinheiten von *E. coli* durch ^{35}S - und ^{14}C -Markierungen ergaben eine Anzahl von 10 ± 1 *c*-Untereinheiten pro F_1F_0 -ATPase (Foster und Fillingame, 1982), die eine ringförmige Struktur bilden (Schneider und Altendorf, 1987). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch eine erstaunliche Variabilität der Anzahl an *c*-Untereinheiten in F_1F_0 -ATPasen unterschiedlicher Organismen. Die Analyse der Struktur des *c*-Rings der F_1F_0 -ATPase von *E. coli* unter Ausnutzung von Disulfidbrücken und genetischen Fusionen ergab 12 Kopien der *c*-Untereinheit pro Ring (Jones und Fillingame, 1998; Jones *et al.*, 1998). Abweichend hiervon ergab die Analyse von 2D-Kristallen des *c*-Rings der Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *P. modestum* durch Rasterkraftmikroskopie (RKM) elf *c*-Monomere pro Ring (Matthey und Dimroth, 2000). In eukaryontischen F_1F_0 -ATPasen wurden in jüngster Zeit außerdem weitere abweichende Stöchiometrien ermittelt. Die RKM-Analyse von 2D-Kristallen

des *c*-Rings der F₁F₀-ATPase aus Chloroplasten ergab 14 *c*-Monomere (Seelert *et al.*, 2000). Demgegenüber ergab die Analyse der Struktur eines Subkomplexes ($\alpha_3\beta_3\gamma_1\varepsilon_1c_{10}$) der F₁F₀-ATPase aus Hefemitochondrien mit einer Auflösung von 3,6 Å zehn Monomere pro *c*-Ring (Stock *et al.*, 1999). Erschwert werden Aussagen über die Anzahl der *c*-Untereinheiten außerdem durch die Beobachtung, daß zumindest in *E. coli* die Anzahl der *c*-Untereinheiten im *c*-Oligomer in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen variieren kann (Schemidt *et al.*, 1995, 1998). Durch die Beobachtung, daß sich die ATP-Synthese und die Protonentranslokation durch eine kovalente Bindung von DCCD an die *c*-Untereinheit inhibieren läßt, wurde schon recht früh eine Beteiligung der Untereinheit *c* am Ionentransfer vermutet. Als Bindungsstelle wurde in der *E. coli* *c*-Untereinheit die Aminosäure Aspartat-61 identifiziert (Hoppe *et al.*, 1980). Da in derselben Position aller bekannten *c*-Untereinheiten der F₁F₀-ATPasen ebenfalls ein Aspartat oder Glutamat zu finden ist, wurde vermutet, daß ein Carboxylat in dieser Position direkt am Ionentransfer beteiligt ist. Interessant war dabei, daß bereits die Bindung eines DCCD-Moleküls für eine Inhibition ausreichte (Hermolin und Fillingame, 1989). In den *c*-Untereinheiten der Na⁺-F₁F₀-ATPasen aus *P. modestum* und *A. woodii* wurden ebenfalls DCCD-reaktive Carboxylate (Glutamat-65 in *P. modestum*, Glutamat-62 in der *A. woodii* Untereinheit *c*₂/*c*₃) nachgewiesen, die essentiell für die Na⁺-Translokation sind (Kluge und Dimroth, 1993b; Spruth *et al.*, 1994; Rahlfs und Müller, 1997). Zhang und Fillingame (1995a) gelang es, durch den Austausch von Aminosäuren der *E. coli* *c*-Untereinheit gegen Aminosäuren der *P. modestum* *c*-Untereinheit eine weitere Aminosäure zu identifizieren (Serin-66 in *P. modestum*, entspricht Threonin-63 in *A. woodii* *c*₂/*c*₃), die zusammen mit einer Aspartat-61-Glutamat-Substitution eine Li⁺-Bindung durch die H⁺-abhängige F₁F₀-ATPase aus *E. coli* ermöglichte. Da Na⁺ zum Teil durch Li⁺ als Kopplungssion ersetzt werden kann, waren hiermit zum ersten Mal zwei Aminosäuren identifiziert, die direkt an der Na⁺-Bindung beteiligt sind. Durch den Sequenzvergleich der *c*-Untereinheiten aus *A. woodii* und *P. modestum* wurden zwei weitere Aminosäuren gefunden (Prolin-25 und Glutamin-29 in *A. woodii* Untereinheit *c*₂/*c*₃, Prolin-28 und Glutamin-32 in *P. modestum*), die an einer Na⁺-Komplexierung beteiligt sein könnten (Rahlfs und Müller, 1997). Durch Mutationsanalyse der *c*-Untereinheit aus *P. modestum* wurde bestätigt, daß zumindest Glutamin-32 ebenfalls an der Na⁺- und Li⁺-Bindung beteiligt ist (Kaim *et al.*, 1997). Alle für die Na⁺-Bindung essentiellen Aminosäuren sind zumindest in der *c*-Untereinheit aus *P. modestum* an der cytoplasmatischen Seite des *c*-Rings lokalisiert (Matthey *et al.*, 1999).

4.1.4 Protein-Protein-Interaktionen in der F_O-Domäne

Da zur Struktur der F_O-Domäne bisher keine hochauflösenden Analysen vorliegen, sind Aussagen über die Interaktionen der *a*-, *b*- und *c*-Untereinheiten lediglich durch die Ergebnisse von Quervernetzungsexperimenten und elektronenmikroskopischen Analysen möglich. Von Cox *et al.* (1984,1986) wurde zunächst ein Modell der F_O-Domäne vorgeschlagen, in dem die *a*- und *b*-Untereinheiten im Zentrum des *c*-Rings liegen. Von Schneider und Altendorf (1987) wurde ein alternatives Modell postuliert, in dem die *a*- und *b*-Untereinheiten an der Peripherie des *c*-Rings liegen. Durch elektronenmikroskopische Studien konnte das letztere Modell bestätigt werden (Birkenhäger *et al.* 1995; Singh *et al.*, 1996; Takeyasu *et al.*, 1996), allerdings wurde hierdurch kein Aufschluß über die Interaktionen zwischen den Untereinheiten erhalten. Durch Quervernetzungsexperimente wurden allerdings Kontakte zwischen der *b*-Untereinheit und der *a*- und \bar{c} -Untereinheit nachgewiesen (Rodgers *et al.*, 1997; McLachlin *et al.*, 1998). Zwischen der carboxyterminalen Helix der Untereinheit *c* und den carboxyterminalen zwei Helices der Untereinheit *a* wurde ebenfalls eine räumliche Nähe nachgewiesen (Jiang und Fillingame, 1998; Hatch *et al.*, 1995), die eine Interaktion der stark konservierten Aminosäuren Aspartat-61 in Untereinheit *c* und Arginin-210 in der *a*-Untereinheit sehr wahrscheinlich macht. Eine Interaktion zwischen der polaren Schleife der Untereinheit *c* und den Untereinheiten ϵ und γ der F₁-Domäne wurde durch Mutationsanalysen (Fraga und Fillingame, 1991; Mosher *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1989; Fraga *et al.*, 1994), Quervernetzungsexperimente (Zhang und Fillingame, 1995b; Watts *et al.*, 1995, 1996; Hermolin *et al.*, 1999) und durch die Identifizierung von Suppressormutanten (Zhang *et al.*, 1994) nachgewiesen. Birkenhäger *et al.* (1999) gelang es durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Schleifenregion der Untereinheit *c* aus *E. coli* zu zeigen, daß eine gleichzeitige Bindung der F₁-Domäne und der Antikörper an die *c*-Untereinheit die ATP-abhängige Protonentranslokation nicht beeinträchtigt. Dieses läßt vermuten, daß die Interaktion zwischen der Untereinheit *c* und der F₁-Domäne nicht über alle Monomere des *c*-Rings erfolgt. Von Hermolin *et al.* (1999) wurde ein Modell zur Interaktion zwischen den Untereinheiten ϵ und *c* aufgestellt, bei dem die Untereinheit ϵ durch die Aminosäuren 26 - 33, die die Schleife eines antiparallelen β -Faltblattes bilden, Kontakt mit den polaren Schleifen von zwei benachbarten *c*-Untereinheiten ausbildet.

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Untereinheitenzusammensetzung der Na⁺-F₁F_O-ATPase aus *A. woodii* und der Ähnlichkeiten ihrer Primärsequenzen zu den Untereinheiten der F₁F_O-ATPase aus *E. coli* (Rahlfs und Müller, 1997, 1999; Forster *et al.*, 1995; Rahlfs *et al.*, 1999), kann ein hypothetisches Modell der Na⁺-F₁F_O-ATPase von *A. woodii* entworfen werden. Abweichend von der F₁F_O-ATPase aus *E. coli* besitzt die Na⁺-F₁F_O-ATPase von *A. woodii* jedoch einen Heterooligomer aus drei *c*-Untereinheiten (*c*₁, *c*₂ und *c*₃) (Abb. 49).

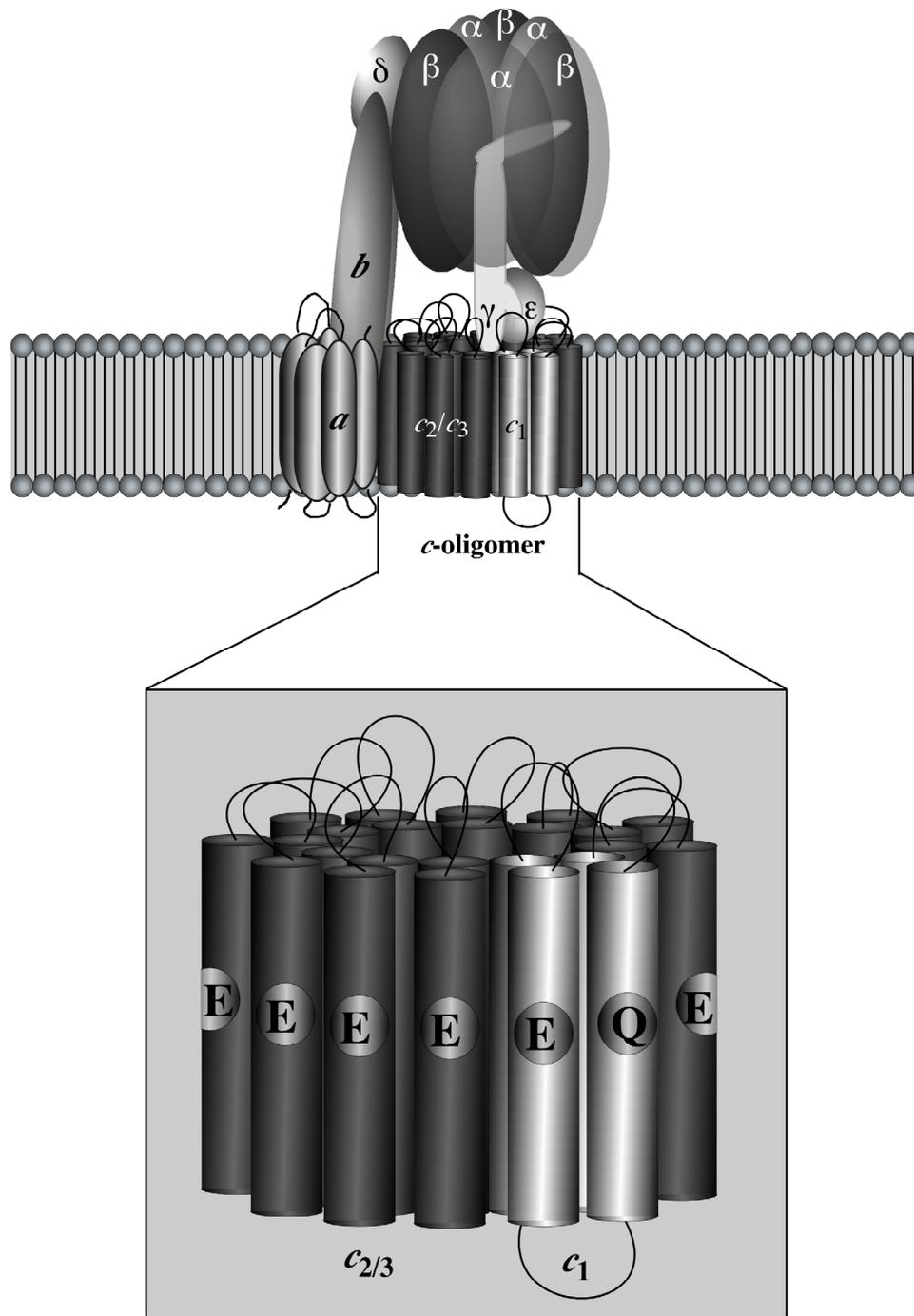


Abb. 49. Hypothetische Struktur der Na⁺-F₁F₀-ATPase von *A. woodii* und ihres c-Oligomers. Die Struktur wurde aus den von *E. coli* bekannten Strukturen der F₁F₀-ATPase abgeleitet (siehe Text).

4.2 Struktur und Funktion der Proteolipide

Ein außergewöhnliches Merkmal der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* stellt das 16-kDa-Proteolipid (Untereinheit c_1) dar. Die 16-kDa-Proteolipide waren bisher lediglich aus den V_1V_0 -ATPasen der *Eucarya* und A_1A_0 -ATPasen der *Archaea* bekannt. Zudem besitzt die c_1 -Untereinheit in ihrer vierten Helix kein protonentranslozierendes Carboxylat. Es stellt sich also die Frage nach der Funktion und nach der evolutiven Entstehung der Untereinheit c_1 .

4.2.1 Vergleich der Proteolipidstrukturen in den F_1F_0 -, A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen

Die ATPasen werden aufgrund ihrer Verbreitung und ihrer Untereinheitenzusammensetzung in die drei Klassen F_1F_0 , V_1V_0 und A_1A_0 eingeteilt. Die F_1F_0 -ATPasen sind in den *Bacteria* und den Mitochondrien und Chloroplasten der *Eucarya* anzutreffen, die A_1A_0 -ATPasen in den *Archaea* und die V_1V_0 -ATPasen in den intrazellulären Membransystemen der *Eucarya*. Lange Zeit wurde angenommen, daß die F_1F_0 - und A_1A_0 -ATPasen 8-kDa-Proteolipide und die V_1V_0 -ATPasen 16-kDa-Proteolipide besitzen. Diese Beobachtung wurde mit der Unfähigkeit der V_1V_0 -ATPasen zur ATP-Synthese in Verbindung gebracht (Nelson und Taiz, 1989). Neuere Untersuchungen haben jedoch eine größere Vielfalt der ATPasen in Bezug auf die Verteilung der ATPase-Klassen auf die drei Reiche und die Größe der Proteolipide in den drei ATPase-Klassen ergeben.

Die F_1F_0 -ATPasen, wie schon in der Einleitung dargestellt, haben sowohl in den *Bacteria* als auch den *Eucarya* fast ausschließlich 8-kDa-Proteolipide mit zwei transmembranen Helices. Das protonentranslozierende Carboxylat (Aspartat oder Glutamat) liegt in allen Proteolipiden in der zweiten Helix. Die Ausnahme stellt die Untereinheit c_1 aus *A. woodii* dar. Dieses 16-kDa-Proteolipid besitzt vier transmembrane Helices, aber nur ein Na^+ -translozierendes Carboxylat in der zweiten Helix. Das Glutamat in der vierten Helix ist durch ein Glutamin substituiert. Zudem besitzt dieses Proteolipid einen verlängerten aminoterminalen Bereich, der denen anderer Proteolipide nicht ähnelt. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* stellt die bisher einzige F_1F_0 -ATPase dar, die ein Heterooligomer aus 8- und 16-kDa-Proteolipiden besitzt.

Die V_1V_0 -ATPasen der *Eucarya* enthalten Proteolipide mit einer molekularen Masse von 16-kDa, da die den 8-kDa-Proteolipiden der F_1F_0 -ATPasen sehr ähnlich sind (Mandel *et al.*, 1988), und in Analogie zu diesen auch als c -Untereinheit bezeichnet werden (Nelson und Harvey, 1999). Sie besitzen vier transmembrane Helices und ein konserviertes protonentranslozierendes Carboxylat in der vierten Helix. In der zweiten Helix ist diese dagegen nicht vorhanden. Die Proteolipide bilden ein ringförmiges Hexamer in der V_0 -Domäne, entsprechend dem c -Ring in der F_0 -Domäne (John *et al.*, 1997; Forgac, 1999). Durch spektroskopische Methoden und Mutationsanalysen wurde eine Exposition von Bereichen der Helices zwei, drei und vier des 16-kDa-Proteolipids aus *Nephrops norvegicus* zur Lipidschicht und der ersten Helix zum Kern des

c-Oligomern nachgewiesen (Jones *et al.*, 1995). Die Markierung des protonentranslozierenden Carboxylates (Glutamat-140 in *N. norvegicus*) mit fluoreszierenden DCCD-Derivaten zeigte eine Exposition von Glutamat-140 zur Lipid-Doppelschicht (Pali *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2000). In einigen Organismen, z. B. *Caenorhabditis elegans*, wurden mehrere Isoformen von 16-kDa-Proteolipiden identifiziert, die gewebespezifisch produziert werden (Oka *et al.*, 1997). Da cDNA-Sequenzen aus einer Reihe von Tier- und Pflanzenzellen bekannt sind, die möglicherweise für *c*-Untereinheiten von V_1V_0 -ATPasen kodieren, wird im Moment angenommen, daß alle V_1V_0 -ATPasen aus mehrzelligen Organismen über mehrere Proteolipide verfügen, die dem beschriebenen 16-kDa-Typ ähnlich sind (Oka *et al.*, 1997). Überraschenderweise wurden aber auch in dem einzelligen Organismus *Saccharomyces cerevisiae* drei Gene identifiziert, die für Proteolipide (*c/Vma3p*, *c'/Vma11p* und *c''/Vma16p*) kodieren (Apperson *et al.*, 1990; Hirata *et al.*, 1997). Die Untereinheit *c'* entspricht in ihrer Struktur derjenigen von *c*. Die *c''*-Untereinheit besitzt im Gegensatz zur Untereinheit *c* das protonentranslozierende Carboxylat nicht in der vierten, sondern in der zweiten Helix, und zudem einen verlängerten aminoterminalen Bereich (Hirata *et al.*, 1997). Damit besitzt es ähnliche strukturelle Merkmale, wie das 16-kDa-Proteolipid aus *A. woodii*. Aus dem menschlichen Genom wurde ebenfalls ein Gen (*Atp6f*) kloniert, das für ein *c''*-Proteolipid kodiert (Nishigori *et al.*, 1998). Mutationsstudien zeigten, daß die Untereinheiten *c'* und *c''* für die Funktion der V_1V_0 -ATPase unerlässlich sind (Hirata *et al.*, 1997). Eine Substitution der Untereinheit *c* durch die Untereinheit *c'* oder *c''* ist nicht möglich, so daß eine unterschiedliche, aber essentielle Rolle aller drei Proteolipid-Untereinheiten in der V_1V_0 -ATPase wahrscheinlich ist (Umemoto *et al.*, 1991; Hirata *et al.*, 1997). Immunologische und biochemische Experimente zeigten, daß alle drei Proteolipide im Proteolipid-Oligomer enthalten sind. Die Untereinheiten *c'* und *c''* lagen mit einer Kopie im *c*-Oligomer vor. Die Kopienzahl der Untereinheit *c* konnte nicht genau bestimmt werden, allerdings war sie höher als die der Untereinheiten *c'* und *c''* (Powell *et al.*, 2000). Da für die V_1V_0 -ATPasen sechs 16-kDa-Proteolipide pro Oligomer postuliert wurden (John *et al.*, 1997), erscheinen vier *c*-Untereinheiten und je eine *c'*- und *c''*-Untereinheit wahrscheinlich. In den Bakterien *Caloramator fervidus* (früher *Clostridium fervidus*), *Enterococcus hirae* und *Thermus thermophilus* wurden ebenfalls V_1V_0 -ATPasen nachgewiesen (Speelmans *et al.*, 1994; Takase *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1990). Diese besitzen im Gegensatz zu den *Eucarya* nur jeweils ein Proteolipid (Takase *et al.*, 1994; Ubbink-Kok *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2000). Die Proteolipide aus *E. hirae* (*NtpL*) und *C. fervidus* haben eine molekulare Masse von 16 kDa, und das Proteolipid aus *E. hirae* entspricht dem *c*- bzw. *c'*-Typ der V_1V_0 -ATPasen. Die Klonierung des *atp*-Operons aus *T. thermophilus* offenbarte die Existenz eines offenen Leserahmens für ein 8-kDa-Proteolipid (*vatL*). Dieses für die V_1V_0 -ATPasen ungewöhnliche Proteolipid geht mit der Fähigkeit der V_1V_0 -ATPase aus *T. thermophilus* zur ATP-Synthese einher (Yokoyama *et al.*, 1998, 2000), ein Charakteristikum, das

ursprünglich zur Unterscheidung von V_1V_0 - und A_1A_0 -ATPasen geführt hat (Schäfer und Meyering-Vos, 1992). Da sich diese V_1V_0 -ATPase zudem nicht durch Bafilomycin A, einem typischen Inhibitor der V_1V_0 -ATPasen, hemmen läßt und einige ihrer Untereinheiten größere Ähnlichkeiten zu A_1A_0 -ATPasen als zu V_1V_0 -ATPasen aufwiesen (Yokoyama *et al.*, 2000), erscheint es sinnvoller diese den A_1A_0 -ATPasen zuzuordnen. Die V_1V_0 -ATPasen besitzen also zwei strukturell unterschiedliche Klassen von Proteolipiden, 16-kDa-Proteolipide mit einem protonentranslozierenden Carboxylat in der vierten Helix (c und c') und 16-kDa-Proteolipide mit einem protonentranslozierenden Carboxylat in der vierten Helix und einem verlängerten Aminoterminus (c'') (Abb. 50).

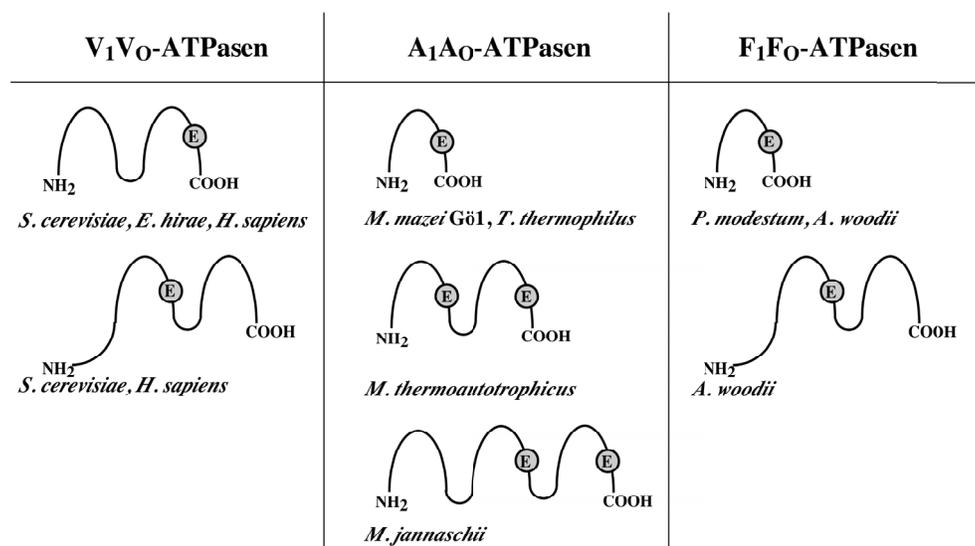


Abb. 50. Schematische Darstellung der Proteolipidstrukturen in V_1V_0 -, A_1A_0 - und F_1F_0 -ATPasen.

Die Proteolipide der A_1A_0 -ATPasen (AtpK) entsprechen in den meisten bekannten Fällen den 8-kDa-Untereinheiten der F_1F_0 -ATPasen. Durch Sequenzanalysen und Reinigung der A_1A_0 -ATPasen wurden 8-kDa-Proteolipide in den methanogenen *Archaea* *Methanosarcina mazei* Gö1 (Ruppert *et al.*, 1998), *Methanobolus tindarius* (Scheel und Schäfer, 1990) und *Methanosarcina barkeri* (Inatomi *et al.*, 1989), aber auch in *Sulfolobus acidocaldarius* (Lübben und Schäfer, 1989) und *Halobacterium salinarum* (Kunio *et al.*, 1996) gefunden. Die Analyse der Genome von *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996; Ruppert *et al.*, 1999) und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Smith *et al.*, 1997; Ruppert *et al.*, 2001) offenbarte jedoch auch in den *Archaea* die Präsenz multipler Proteolipide mit abgeleiteten molekularen Massen von 21 bzw. 16 kDa. Das 16-kDa-Proteolipid aus *M. thermoautotrophicus* besitzt vier transmembrane Helices mit ionentranslozierenden Carboxylaten in der zweiten und vierten Helix (Ruppert *et al.*, 2001). Das

21-kDa-Proteolipid aus *M. jannaschii* umfaßt sechs transmembrane Helices mit ionentranslozierenden Carboxylaten in der vierten und sechsten Helix. In der zweiten Helix ist das Glutamat gegen ein Glutamin ausgetauscht (Ruppert *et al.*, 1999).

4.2.2 Evolution der Proteolipide

Bei der Betrachtung der drei ATPase-Klassen fällt sofort die starke Konservierung der α -, β - (A und B in V_1V_O - und A_1A_O -ATPasen) und c -Untereinheiten auf, während die übrigen Untereinheiten nur geringe Ähnlichkeiten aufweisen. Die Konservierung dieser Untereinheiten spiegelt ihre große Bedeutung für die Funktionsweise (ATP-Synthese/Hydrolyse, Ionentranslokation) der ATPase wider, die eine erhöhte Konservierung im Verlaufe der Evolution nötig machte. Diese eignen sich daher besonders als molekulare Marker zur Verfolgung der evolutiven Entwicklung der ATPasen.

Die Ähnlichkeit der katalytischen Untereinheiten (α/B , β/A) deutete bereits früh auf einen gemeinsamen Vorläufer aller drei ATPase-Klassen hin. Die Trennung der beiden katalytischen Untereinheiten aus einer Untereinheit erfolgte bereits in dieser Ur-ATPase. Die phylogenetische Analyse der katalytischen Untereinheiten zeigt deutlich eine erste Auftrennung der Vorläufer-ATPase in die F_1F_O -ATPase der *Bacteria* und eine V/A -ATPase auf, die sich später zu den V_1V_O -ATPasen der *Eucarya* und den A_1A_O -ATPasen der *Archaea* entwickelte (Olendzenski *et al.*, 1998). Die Präsenz der F_1F_O -ATPasen in den Chloroplasten und Mitochondrien der *Eucarya* wird dabei durch die Endosymbiontentheorie erklärt. Unterstützt wird diese Hypothese durch die große Ähnlichkeit der katalytischen Untereinheiten der F_1F_O -ATPasen aus Cyanobakterien und Chloroplasten sowie durch die extragene Verdopplung der b -Untereinheit in den F_1F_O -ATPasen der Cyanobakterien und Chloroplasten (Nelson und Taiz, 1989; Blair *et al.*, 1996). Die Verbreitung von V_1V_O -ATPasen in den *Bacteria* oder die Existenz eines F_1F_O -*atp*-Operons in dem Archaeon *Methanosarcina barkeri* ist nur durch einen horizontalen Gentransfer zu erklären (Olendzenski *et al.*, 1998). Die große Ähnlichkeit der A/B-Untereinheiten aus *E. hirae* und *T. thermophilus* zu den A/B-Untereinheiten der A_1A_O -ATPasen läßt dabei einen Transfer von den *Archaea* zu den *Bacteria* wahrscheinlich erscheinen (Olendzenski *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 2000).

Die Proteolipide weisen im Gegensatz zu den katalytischen Untereinheiten eine höhere Variabilität auf. Dieses spiegelt sich in den unterschiedlichen Größen der Proteolipide und in der unterschiedlichen Anzahl und Verteilung der ionentranslozierenden Carboxylate wider. Die phylogenetische Analyse der 8-kDa-Proteolipide der F_1F_O -ATPasen, der c - und c' -Proteolipide der V_1V_O -ATPasen und der Proteolipide der A_1A_O -ATPasen bestätigte ein Bild der ATPase-Evolution, das bereits durch die Analyse der katalytischen Untereinheiten gewonnen wurde (Blair *et al.*, 1996; Hilario und Gogarten, 1998). Generell wird auch für die Proteolipide die Existenz

eines Vorläuferproteins in der Ur-ATPase angenommen, das wahrscheinlich vom 8-kDa-Typus war (Nelson und Taiz, 1989; Blair *et al.*, 1996). Auch in der V/A-ATPase war ein 8-kDa-Proteolipid vorhanden. Erst nach der Auftrennung der A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen kam es in den letzteren durch Genverdopplungen und Genfusionen zur Ausbildung der 16-kDa-Proteolipide (Mandel *et al.*, 1988; Nelson und Taiz, 1989). Dieses 16-kDa-Proteolipid besaß zunächst zwei ionentranslozierende Carboxylate. Erst durch zwei unabhängige Mutationsereignisse in der zweiten und vierten Helix kam es dann zur Ausbildung der *c*- und *c'*-Proteolipide einerseits und der *c''*-Proteolipide andererseits (Abb. 51; Finbow und Harrison, 1997). Die Primärsequenzen der Proteolipide der bakteriellen V_1V_0 -ATPasen aus *E. hirae* und *T. thermophilus* sind den Proteolipiden der A_1A_0 -ATPasen ähnlicher als denen der V_1V_0 -ATPasen (Abb. 52; Hilario und Gogarten, 1998; Yokoyama *et al.*, 2000). Die Präsenz der beiden V_1V_0 -ATPasen in den *Bacteria* wurde daher durch einen horizontalen Gentransfer von den *Archaea* zu den *Bacteria* erklärt (Hilario und Gogarten, 1998). Wie bereits oben erwähnt erscheint es aufgrund molekularer und biochemischer Daten sinnvoller, zumindest die *T. thermophilus* ATPase den A_1A_0 -ATPasen zuzuordnen.

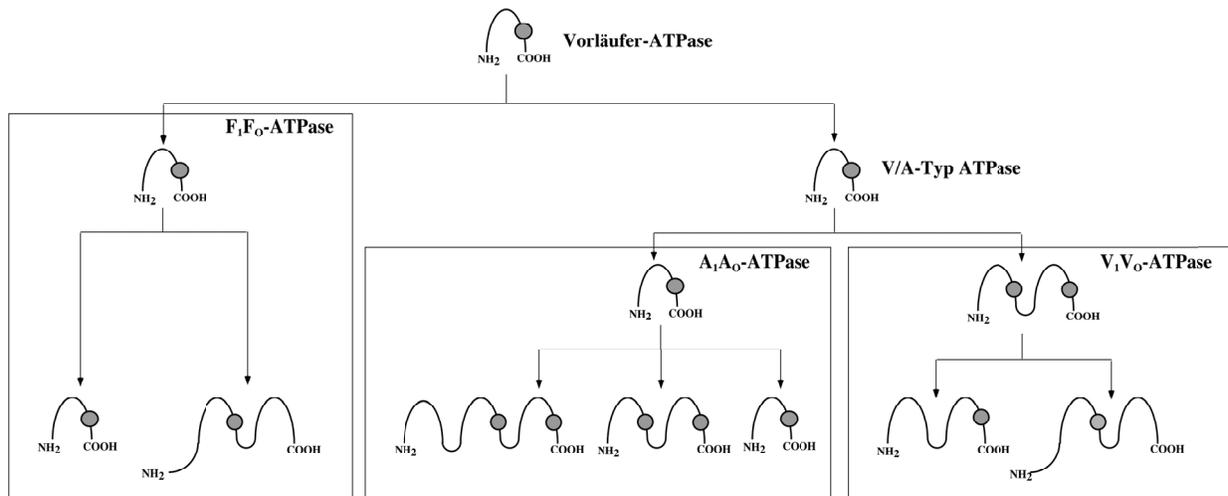


Abb. 51. Entwicklung der Proteolipidstrukturen in F_1F_0 -, A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen. Das ionentranslozierende Carboxylat ist als Kreis markiert.

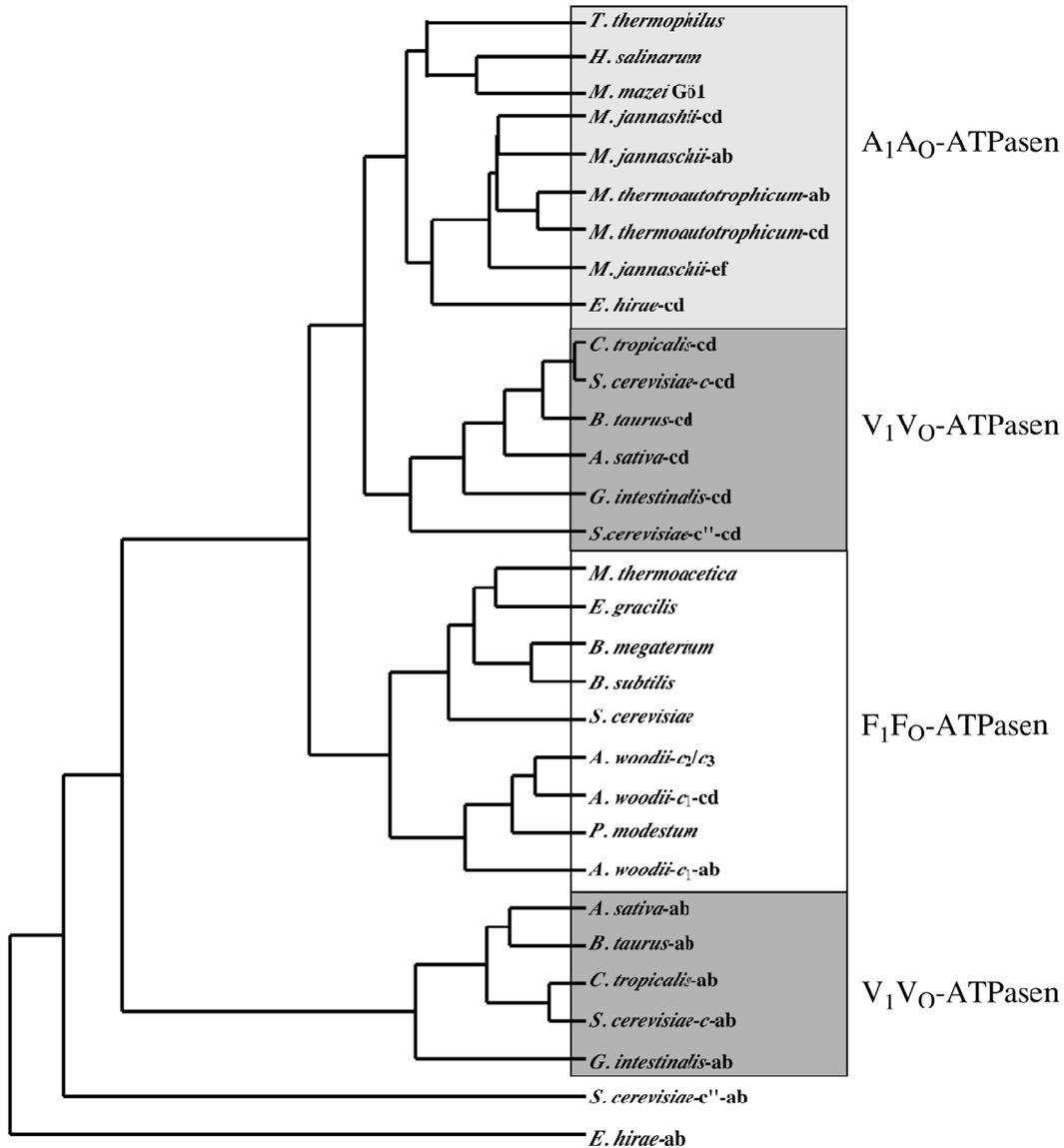


Abb. 52. Evolution der Proteolipide. Der Stammbaum wurde mit den Programmen Megalign und Geneworks durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen nach dem Clustal-Algorithmus erstellt. Von duplizierten und triplizierten Proteolipiden wurde die vordere (ab) und hintere (cd) bzw. das hintere Drittel (ef) getrennt berücksichtigt. Die Zugehörigkeit der einzelnen ATPasen zu den drei Klassen wurde aufgrund der veröffentlichten Daten getroffen. V₁V₀-ATPasen: *G. intestinalis*, *Giardia intestinalis*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *T. thermophilus*, *Thermus thermophilus*; *E. hirae*, *Enterococcus hirae*; *C. tropicalis*, *Candida tropicalis*; *A. sativa*, *Avena sativa*; *B. taurus*, *Bos taurus*; A₁A₀-ATPasen: *M. mazei* Gö1, *Methanosarcina mazei* Gö1; *H. salinarum*, *Halobacterium salinarum*; *M. jannaschii*, *Methanococcus jannaschii*; *M. thermoautotrophicus*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*; F₁F₀-ATPasen; *A. woodii*, *Acetobacterium woodii*; *P. modestum*, *Propionigenium modestum*; *M. thermoacetica*, *Moorella thermoacetica*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *B. megaterium*, *Bacillus megaterium*; *E. gracilis*, *Euglena gracilis*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*.

In den A_1A_0 -ATPasen blieb das 8-kDa-Proteolipid zunächst im Gegensatz zu den V_1V_0 -ATPasen erhalten. Vergleicht man die Proteolipidsequenzen von *M. jannaschii* und *M. thermoautotrophicus* mit denen der V_1V_0 -ATPasen, so erkennt man, daß die Entstehung duplizierter und triplizierter Proteolipide in den *Archaea* durch Genvervielfachungen und Fusionen von Genen erfolgte, die für die 8-kDa-Proteolipide der A_1A_0 -ATPasen kodieren, und nicht etwa durch einen horizontalen Gentransfer von den V_1V_0 -ATPasen (Hilario und Gogarten, 1998).

Das 16-kDa-Proteolipid aus *A. woodii* zeigt auf molekularer Ebene keinerlei Ähnlichkeit zu den 16-kDa-Proteolipiden der V_1V_0 -ATPasen. Statt dessen befindet es sich in einer Gruppe mit den 8-kDa-Proteolipiden der F_1F_0 -ATPasen. Die phylogenetische Analyse zeigt deutlich, daß die Ausbildung dieses Proteolipids eine eigenständige Entwicklung in *A. woodii* darstellt, die auf eine Verdopplung und Fusion der Gene der 8-kDa-Proteolipide c_2/c_3 zurückzuführen ist (Abb. 52). Ein horizontaler Gentransfer von den methanogenen *Archaea* oder *Eucarya* kann ausgeschlossen werden. Auch eine Ausbildung der 16-kDa-Proteolipide vor der Auftrennung der Ur-ATPase in die drei ATPase-Klassen erscheint unwahrscheinlich. Der evolutive Vorteil dieser Genvervielfachung in *A. woodii* kann durch die hohe Kopienzahl dieser Untereinheit in der F_1F_0 -ATPase erklärt werden, die eine erhöhte Expression nötig macht. In *E. coli* (nur eine Kopie von *atpE*) wurde dagegen eine erhöhte Translation von *atpE* für die höhere Kopienzahl verantwortlich gemacht, so daß hier eine andere Strategie verwirklicht wurde (McCarthy *et al.*, 1985)

4.2.3 Zur Struktur und Funktion des Untereinheit c -Oligomers der ATPasen

Die Funktion der ATPasen besteht zum einen in der ATP-Synthese und zum anderen in der Bildung von transmembranen Ionengradienten. Für beide Funktionen ist das ionentranslozierende Carboxylat des Proteolipids unerlässlich. Vergleicht man die Struktur der Proteolipid-Oligomere in den drei ATPase-Klassen, so fällt auf, daß in den V_1V_0 -ATPasen nur sechs bis sieben in den A_1A_0 - und F_1F_0 -ATPasen aber zehn bis vierzehn ionentranslozierende Carboxylate vorliegen. Diese Annahme beruht auf den Strukturuntersuchungen zum Proteolipid-Oligomer, die zeigten, daß die F_1F_0 -ATPase der Chloroplasten vierzehn 16-kDa-Proteolipide (Seelert *et al.*, 2000) und die F_1F_0 -ATPasen zehn bis zwölf 8-kDa-Proteolipide (Foster und Fillingame, 1982; Stock *et al.*, 1999) mit je einem ionentranslozierenden Carboxylat enthalten. Für die V_1V_0 -ATPasen wurden sechs 16-kDa-Proteolipide postuliert (Forgac, 1999). Durch kinetische Studien wurden außerdem sechs (± 1) Na^+ -Bindungsstellen in der V_1V_0 -ATPase von *E. hirae* nachgewiesen (Murata *et al.*, 2000). Zu den A_1A_0 -ATPasen liegen zwar keine entsprechenden Untersuchungen vor, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den ATPasen, wurden aber auch für diese zwölf 8-kDa-Proteolipide pro Oligomer (sechs 16-kDa-Proteolipide in *M. thermoautotrophicus*) und damit

zwölf ionentranslozierende Carboxylate postuliert (Schäfer *et al.*, 1999; Ruppert *et al.*, 2001). Die geringere Anzahl an ionentranslozierenden Carboxylaten in den V_1V_O -ATPasen wurde mit deren Unfähigkeit, ATP zu synthetisieren in Verbindung gebracht (Nelson und Taiz, 1989; Cross und Taiz, 1990). Im Proteolipid-Oligomer von *A. woodii* liegt zumindest ein 16-kDa-Proteolipid mit nur einem ionentranslozierenden Carboxylat vor. Die Na^+ - F_1F_O -ATPase von *A. woodii* synthetisiert also ATP (Reidlinger und Müller, 1994), obwohl sie im Vergleich zu anderen F_1F_O -ATPasen eine geringere Anzahl an ionentranslozierenden Carboxylaten besitzt. Damit stellt sich natürlich die Frage, wie viel ionentranslozierende Carboxylate zur ATP-Synthese benötigt werden.

Zur Synthese eines ATP-Moleküls wird ein Phosphorylierungspotential (ΔG_p) von ca. 50 - 70 kJ/mol benötigt. Bei einem physiologischen elektrochemischen Ionenpotential von -180 mV, kann dieses Potential durch die Translokation von drei bis vier Ionen aufgebracht werden. Bei drei Nukleotidbindungsstellen und sechs bis sieben ionentranslozierenden Carboxylaten ergibt sich für die V_1V_O -ATPasen ein $\text{H}^+(\text{Na}^+)/\text{ATP}$ -Verhältnis von 2 - 2,3. Auch experimentell wurden $\text{H}^+(\text{Na}^+)/\text{ATP}$ -Stöchiometrien von ca. zwei für die V_1V_O -ATPasen ermittelt (Johnson *et al.*, 1982; Schmidt *et al.*, 1993) was zu gering ist, um ATP-Synthese zu treiben. Für die F_1F_O -ATPasen ergeben sich $\text{H}^+(\text{Na}^+)/\text{ATP}$ -Stöchiometrien von drei bis vier, was den experimentell ermittelten Stöchiometrien für die F_1F_O -ATPasen entspricht (Kashket, 1982; Sholtz *et al.*, 1983) und eine ATP-Synthese ermöglicht. Für die A_1A_O -ATPasen gilt im Prinzip das gleich wie für die F_1F_O -ATPasen, mit der Ausnahme von *M. jannaschii*. Das 21-kDa-Proteolipid von *M. jannaschii* enthält lediglich zwei ionentranslozierende Carboxylate und somit sind hier nur acht Carboxylate pro *c*-Oligomer vorhanden (Ruppert *et al.*, 1999). Von einem thermodynamischen Standpunkt aus sind also mindestens acht ionentranslozierende Carboxylate pro *c*-Oligomer nötig. Nimmt man auch für den *c*-Oligomer von *A. woodii* an, daß er insgesamt 24 transmembrane Helices umfaßt, so ergibt sich daraus, daß maximal drei bis vier c_1 -Untereinheiten vorliegen dürfen, um eine ATP-Synthese zu erlauben.

Die Substitution des ionentranslozierenden Carboxylates stellt auch ein mechanistisches Problem dar, da alle Modellvorstellungen zum Rotationsmechanismus der F_1F_O -ATPasen eine elektrostatische Interaktion zwischen dem ionentranslozierenden Carboxylat und dem hochkonservierten Arginin der Untereinheit *a* voraussetzen (Elston *et al.*, 1998; Dimroth *et al.*, 1999). Jones *et al.* (2000) konnten für *E. coli* zeigen, daß bereits die Substitution von nur drei der zwölf protonentranslozierenden Carboxylate ausreicht, um die ATPase zu inaktivieren. Interessanterweise ist der Effekt einer Aspartat-61-Asparagin-Substitution auf die passive H^+ -Translokation durch die F_O -Domäne aus *E. coli* weniger ausgeprägt als eine Aspartat-61-Glycin-Substitution (Dmitriev *et al.*, 1995). Das triplizierte 21-kDa-Proteolipid von *M. jannaschii* besitzt an Stelle des ionentranslozierenden Carboxylates (Glutamat in *M. jannaschii*) in der

zweiten Helix ein Glutamin (Ruppert *et al.*, 1999). Da *M. jannaschii* ATP nur durch eine Ionengradienten-getriebene Phosphorylierung synthetisieren kann und in seiner Genomsequenz nur die Gene für eine A_1A_0 -ATPase identifiziert werden konnten, wird vermutet, daß sie auch zur ATP Synthese befähigt ist. Ob sie H^+ oder Na^+ als Kopplungsignale nutzt ist allerdings noch nicht bekannt (Müller *et al.*, 1999). Das 16-kDa-Proteolipid aus *A. woodii* besitzt ebenfalls ein Glutamin in der Position des Na^+ -translozierenden Carboxylates in der zweiten Helix. Sollte auch die *M. jannaschii*-ATPase Na^+ -abhängig sein, so läge natürlich die Vermutung nahe, daß ein Glutamin (oder Asparagin) an der Position des ionentranslozierenden Carboxylates weiterhin eine Komplexierung von Na^+ und eine ATP-Synthese erlaubt. Um dies zu bestätigen, wären in Zukunft Mutationsstudien an der Untereinheit c_1 von *A. woodii* nötig.

4.3. Genetische Organisation und Expression der Flagellengene

Die Organisation der Flagellengene wurde bisher am detailliertesten für *E. coli* und *S. typhimurium* beschrieben. Die Flagellengene von *E. coli* und *S. typhimurium* liegen in vier chromosomalen Regionen (Silverman und Simon, 1973) in insgesamt 15 Operonen (Berry und Armitage, 1999) vor. Die Region I umfaßt hauptsächlich Gene, die für strukturelle Proteine des Flagellums kodieren, die Region II beinhaltet Operone, die für die Komponenten des Chemotaxis-Apparates, des Mot-Komplexes und regulatorischer Proteine kodieren. Die Regionen IIIa und IIIb umfassen Gene, die für Strukturproteine des Filamentes (z. B. Flagellin), aber auch für regulatorische Komponenten kodieren (Macnab, 1992). In den Gram-positiven Organismen wurde die Organisation der Flagellengene bisher lediglich in *B. subtilis* genauer analysiert. Die Flagellengene sind in fünf chromosomalen Regionen zu finden. Die *fla/che*-Region (Ordal *et al.*, 1983) umfaßt die Gene der regulatorischen Komponenten, der Chemotaxisproteine sowie der strukturellen Komponenten des Haken-Basalkörper-Komplexes und des C-Rings. Alle Gene dieser Region liegen in einem 25 kbp großen Operon (Zuberi *et al.*, 1990). Interessanterweise entspricht die Reihenfolge der Gene im *fla/che*-Operon der Genabfolge von drei Operonen der Regionen I und III von *E. coli* und *S. typhimurium* (Ordal *et al.*, 1993). Die *mot*-Gene sind in *B. subtilis* im Gegensatz zu *E. coli* und *S. typhimurium* in einer eigenständigen Region zu finden (Mirel *et al.*, 1992). Zwei weitere Regionen umfassen einzelne Gene, die für Komponenten des Chemotaxis-Systems kodieren (Ordal *et al.*, 1993). Die Gene der Komponenten des Filamentes (Flagellin, HAP) liegen in einer Region auf dem Chromosom, der *hag*-Region. Das Flagellin (*hag*) wird als monocistronische mRNA transkribiert (Mirel *et al.*, 1989). Stromaufwärts vom Flagellin werden die Haken-assoziierten Proteine HAP-1 und -3, das regulatorische Protein FlgM sowie drei offene Leserahmen (*yviB*, *yviC*, *yviE*) in einem Operon kodiert. Über die Funktion der Genprodukte von *yviB*, *yviC* und *yviE* ist allerdings bisher nichts bekannt (Mirel *et al.*, 1994; Abb. 53). Aufgrund der abgeleiteten überwiegend α -helikalen Struktur der *yviB*-, *yviC*-

und *yviE*-Genprodukte wurde eine strukturelle Funktion im Filament angenommen (Mirel *et al.*, 1994). In *A. woodii* sind die Gene der Filamentkomponenten ähnlich organisiert. Das Flagellin wird wahrscheinlich als monocistronische mRNA transkribiert, da stromaufwärts ein Promotor und stromabwärts eine potentielle Haarnadelstruktur lokalisiert ist. Die Haken-assoziierten Proteine werden in *A. woodii* ebenfalls durch Gene stromaufwärts vom Flagellin (*fliC*) kodiert. Zwischen dem *flgL*- und *fliC*-Gen ist ein offener Leserahmen (*orfA*) vorhanden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeiten zu Flagellenproteinen zeigt. Seine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur läßt aber eine Funktion als Strukturprotein des Filamentes möglich erscheinen. Die Abwesenheit von Promotoren vor *flgL* und *orfA* sowie eine potentielle Haarnadelstruktur stromabwärts von *orfA* deuten auf eine gemeinsame Transkription dieser Gene hin.

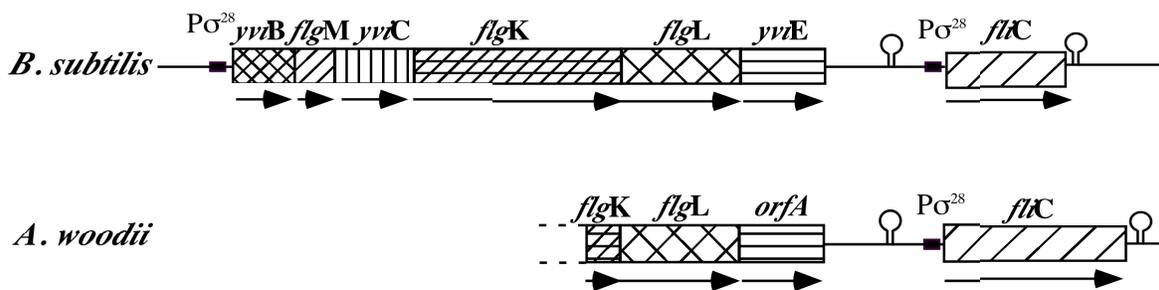


Abb. 53. Vergleich der *hag*-Regionen von *A. woodii* und *B. subtilis*. Für ähnliche Proteine kodierende Gene sind mit identischen Mustern versehen. $P_{\sigma^{28}}$, σ^{28} -abhängiger Promotor.

Die Kopienzahl des Flagellins im Filament (ca. 20000; Berry und Armitage, 1999) macht zusätzliche Mechanismen zur Verstärkung der Expression der Flagellinegene nötig. Solch hohe Kopienzahlen können durch eine Erhöhung der Frequenz der Transkriptionsinitiation erreicht werden. Dafür verantwortlich sind drei Promotorelemente. Die -10 und -35 Regionen werden durch die σ -Untereinheit der RNA-Polymerase gebunden (Burgess *et al.*, 1969; Record *et al.*, 1996). Die Stärke der Bindung hängt dabei besonders vom Abstand der beiden Elemente und von ihrer Sequenz ab. Die σ^{28} -abhängigen (oder σ^D in *B. subtilis*) Promotoren der Flagelline weisen in der Regel eine sehr hohe Konservierung auf (Macnab, 1992). Auch der Promotor des *fliC*-Gens aus *A. woodii* besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu den σ^{28} -abhängigen Promotoren von *E. coli* und *B. subtilis*. σ^{28} -Faktoren gehören zur Familie der σ^{70} -Faktoren, zeigen jedoch deutliche Unterschiede in einigen Regionen (Lonetto *et al.*, 1992), die zu unterschiedlichen Mechanismen der Promotorerkennung und -bindung führen (Schaubach und Dombroski, 1999). Daß diese Unterschiede eine höhere Expression bewirken, erscheint aber eher unwahrscheinlich, da Gene

von σ^{28} -abhängigen Promotoren transkribiert werden, deren Produkte eine sehr unterschiedliche Kopienzahl aufweisen. Ein weiteres Element stellt das stromaufwärts von der -35 Region gelegene "upstream" (UP)-Element dar. Schon früh wurde erkannt, daß in dieser Region bei einigen Promotoren ausgedehnte A- und T-reiche Regionen zu finden waren (Rosenberg und Court, 1979). Diese Regionen sind für eine effiziente Transkription und zwar unabhängig von Transkriptionsaktivatoren nötig (Banner *et al.*, 1983; Leirimo und Gourse, 1991). Am besten untersucht ist der *rrnB* P1-Promotor, dessen UP-Element eine 30fache Verstärkung der Transkription ermöglicht (Rao *et al.*, 1994). Die aktivierende Wirkung des UP-Elementes wird durch eine Interaktion mit der carboxyterminalen Domäne der α -Untereinheiten der RNA-Polymerase vermittelt, die den Initiationskomplex bei der Transkription stabilisiert (Ross *et al.*, 1993; Blatter *et al.*, 1994; Gourse *et al.*, 2000). Beide α -Untereinheiten binden dabei an jeweils eine Hälfte des UP-Elementes (Estrem *et al.*, 1999). Stromaufwärts vom *hag*-Gen aus *B. subtilis* konnte ein solches UP-Element nachgewiesen werden. Der Transfer der -35 bis -69 Region stimuliert sowohl die Expression von σ^{28} - als auch von σ^{70} -abhängigen Promotoren (Caramori und Galizzi, 1997; Fredrick *et al.*, 1995). Der Vergleich zwischen den Regionen stromaufwärts vom *hag*-Gen aus *B. subtilis* und dem *fliC*-Gen von *A. woodii* zeigt eine hohe Ähnlichkeit in diesem Bereich auf. Auch der Promotor des *fliC*-Gens aus *A. woodii* weist stromaufwärts von der -35 Region einen ausgedehnten A- und T-reichen Bereich auf, der große Ähnlichkeiten (54% identische Nukleotide zu 28% in weiter stromaufwärts gelegenen Bereichen) zum UP-Element von *B. subtilis* aufweist. Es läßt sich also auch für *A. woodii* vermuten, daß eine erhöhte Expression des *fliC*-Gens durch zusätzliche Kontakte zwischen der α -Untereinheit der RNA-Polymerase und einem UP-Element erreicht wird.

4.4 Struktur der bakteriellen Flagellen

Das bakterielle Flagellum besteht aus den drei Komponenten Filament, Haken und Basalkörper. In jüngster Zeit wurde ein zusätzliches Strukturmerkmal im Flagellum von *E. coli* entdeckt, das zur Beschreibung einer vierten Komponente unterhalb des Basalkörpers in *E. coli* führte, des C-Rings (auch cytoplasmatischer Ring oder "switch"-Komplex; Driks und DeRosier, 1990; Khan *et al.*, 1991, 1992a). Insgesamt sind in *E. coli* die Proteinprodukte von mehr als 40 Genen an Aufbau, Struktur und Antrieb der Flagellen beteiligt. Allerdings konnte bisher nur 15 Proteinen eine Funktion als strukturelle Komponente zugewiesen werden (Macnab, 1996).

4.4.1 Struktur des Filamentes

Das Filament setzt sich aus mindestens vier verschiedenen Proteinkomponenten zusammen. Das HAP-2 Protein schließt das Filament am zelldistalen Ende ab (Ikeda *et al.*, 1987; Vonderviszt *et*

al., 1998). Es liegt als Pentamer vor und wird als erste der Filamentkomponenten durch den Stab und Haken exportiert (Yonekura *et al.*, 2000). Das Flagellin bildet die Hauptkomponente des Filamentes. In der Regel setzen sich die Filamente der bakteriellen Flagellen im Gegensatz zu denen der *Archaea* lediglich aus einer Art von Flagellinmonomeren zusammen. In einigen Fällen sind jedoch auch verschiedene Flagelline in einem Filament vorhanden, die in distinkten Regionen oder verteilt über das gesamte Filament vorliegen. Bei *Helicobacter pylori* bildet ein 57-kDa-Flagellin den Bereich direkt im Anschluß an den Haken, während ein zweites Flagellin mit einer molekularen Masse von 56 kDa den Rest des Filamentes bildet (Kostrzynska *et al.*, 1991). Im *Campylobacter coli*-Filament liegen dagegen zwei Flagelline im gesamten Filament verteilt vor (Logan *et al.*, 1989). Die strukturelle Analyse der Filamente von *E. coli* und *S. typhimurium* zeigte, daß die Flagelline 11 Protofilamente bilden, die einen helikalen Zylinder formen (Namba *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1995; Mimori-Kiyosue *et al.*, 1995). In Abhängigkeit von physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen sowie mechanischen Kräften kann das Filament in unterschiedlichen helikalen Formen vorliegen (Kamiya und Asakura, 1976, 1977; Hotani, 1982; Macnab und Ornston 1977). Die unterschiedlichen Formen werden durch zwei Konformationen des Flagellins ausgebildet. Befinden sich alle Flagellinmonomere in der R-Konformation, so sind die Protofilamente rechtsherum gedreht und bilden eine geradliniges Filament. In der L-Konformation sind die Protofilamente linksherum gedreht und bilden ebenfalls ein geradliniges Filament, bei dem der Abstand zwischen den Protofilamenten jedoch größer ist (Trachtenberg und DeRosier, 1991). Die helikale Struktur des Filamentes wird durch unterschiedliche Konformationszustände der Flagelline in einem Filament erreicht, wobei die Flagelline eines Protofilamentes jedoch immer die gleiche Konformation aufweisen. In Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen der L- und R-Konformation können insgesamt 12 unterschiedliche Strukturen gebildet werden (Kamiya *et al.*, 1982; Trachtenberg und Hammel, 1992). Die Analyse der Struktur des Flagellins von *E. coli* in Lösung und in polymerisierter Form im Filament durch Kryoelektronenmikroskopie und durch spektroskopische Methoden zeigte, daß das Flagellin aus drei strukturellen Domänen (D1 - D3 vom Kern des Filamentes nach außen), sowie aus einer in Lösung ungefalteten Domäne (D0) besteht, die erst nach der Polymerisation eine überwiegend α -helikale Struktur annimmt (Namba *et al.*, 1989; Vonderviszt *et al.*, 1990; Mimori-Kiyosue *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1998). Durch die D0- und D1-Domänen werden Kontakte zwischen den Flagellinmonomeren im Kern des Filamentes hergestellt (Mimori-Kiyosue *et al.*, 1995; Namba *et al.*, 1989). Wegen ihrer hohen Flexibilität wurde vermutet, daß sie neben der Polymerisation auch für die Konformationsänderungen verantwortlich sind (Honda *et al.*, 1998). Die D2- und D3-Domänen bestehen überwiegend aus β -Faltblättern. Die D2-Domäne stellt dabei eine Verbindung zwischen der D1- und D3-Domäne her, wobei letztere zum Medium exponiert ist (Namba *et al.*, 1989; Mimori-Kiyosue *et al.*, 1995). Die Funktionen der Flagellin-

Domänen spiegeln sich in ihren Primärsequenzen wider. Aufgrund von Sequenzvergleichen läßt sich die Primärsequenz in drei Bereiche, je einen hochkonservierten amino- und carboxyterminalen und einen hochvariablen zentralen Bereich einteilen. Die äußersten Bereiche der Amino- und Carboxytermini tragen zu gleichen Teilen zur D0-Domäne bei. Die D1-Domäne besteht daran anschließend aus Aminosäuren der aminoterminalen, aber auch einem kurzen Bereich der carboxyterminalen Domäne. Der zentrale Bereich bildet schließlich die beiden Domänen D2 und D3. Der Vergleich des *A. woodii*-Flagellins mit anderen Flagellinen zeigt zunächst einmal eine hohe Konservierung in den amino- und carboxyterminalen Bereichen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen auf (siehe Anhang). Die computergestützte Analyse der Primärsequenz zeigt auch für das Flagellin aus *A. woodii* einen hohen Anteil an α -helikalen Sekundärstrukturen in den Amino- und Carboxytermini an, sowie einen hohen Anteil an β -Faltblättern im zentralen Bereich, so daß eine dem *E. coli*-Filament ähnliche Struktur angenommen werden kann.

Den Übergang vom Filament zum Haken bilden die Haken-assoziierten Proteine (HAP)-1 und -3 (Homma und Iino, 1985; Ikeda *et al.*, 1987). Über ihre Funktion ist bisher nur wenig bekannt. Mutationen in den Genen *flgL* und *flgK*, die für HAP-1 und HAP-3 kodieren, führen zu einem *fla*⁻ Phänotyp. Dieser Phänotyp ist wahrscheinlich einfach in der Tatsache begründet, daß die HAP-Proteine die Basis der Flagellinpolymerisation darstellen. Durch Mutationsanalysen wurde außerdem ein stabilisierender Effekt von HAP-3 auf die Filamentstruktur bei hoher Viskosität des Mediums nachgewiesen (Fahrner *et al.*, 1994). Die Struktur der HAP-Proteine ist bisher ebenfalls nicht genauer untersucht worden. Beim Vergleich der Primärsequenzen von HAP-Proteinen fällt zunächst einmal auf, daß die konservierten Bereiche wie im Flagellin fast völlig auf die Amino- und Carboxytermini beschränkt sind (siehe Anhang), auch wenn die Ähnlichkeiten wesentlich niedriger sind. Generell läßt sich eine gewisse Ähnlichkeit zwischen allen Proteinen, die den axialen Teil der Flagellen bilden (Stab, Haken, HAP, Filament) feststellen. Gestützt auf Sequenzanalysen wurde außerdem vermutet, daß die terminalen Bereiche der axialen Strukturproteine überwiegend aus α -Helices bestehen (Homma *et al.*, 1990). Für das HAP-3 scheint dieses jedoch nicht zuzutreffen. Die Analyse von HAP-3 aus *A. woodii* und auch aus *B. subtilis* zeigt, daß dieses Protein wahrscheinlich zu gleichen Teilen aus α -Helices und β -Faltblattstrukturen besteht, die gleichmäßig über das gesamte Protein verteilt sind.

In *B. subtilis* und *A. woodii* befindet sich stromabwärts vom für HAP-3 kodierenden Gen *flgL* ein weiterer offener Leserahmen (*yviE* in *B. subtilis*; *orfA* in *A. woodii*). In dieser Arbeit wurde eine Expression von *orfA* aus *A. woodii* in *E. coli* nachgewiesen, so daß eine kodierende Funktion dieses ORFs wahrscheinlich ist. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen beider ORFs deutet zwar auf keine Ähnlichkeiten zwischen ihnen hin, die strukturelle Analyse der Primärsequenzen zeigt jedoch einen hohen Anteil von α -helikalen Strukturen im

aminoterminalen Bereich an, über die eine Polymerisation im Kern des Filamentes erfolgen könnte. Diese Proteine wurden allerdings bisher noch nicht in Flagellen nachgewiesen.

4.4.2 Struktur des Haken-Basalkörper-Komplexes

Die Definition des Haken-Basalkörpers beruht auf der Tatsache, daß sich dieser nach dem Abscheren des Filamentes als eine Einheit aus der Cytoplasmamembran solubilisieren läßt. Er umfaßt den Haken, den Stab und die um ihn gruppierten Ringe. Der Haken bildet wie das Filament eine rechtsgängige Helix. Die aminoterminalen Bereiche der Haken-Proteine (FlgE) sind in Lösung ungeordnet und bilden erst nach der Polymerisation im Haken α -Helices aus (Vonderviszt *et al.*, 1995). Die zum Medium exponierte Domäne besitzt überwiegend β -Faltblattstruktur. Der durch die gesamte Zellhülle reichende Stab besteht in *E. coli* aus mindestens vier Proteinen. FlgG bildet mit 25 Kopien die Hauptkomponente des Stabes, während FlgB, FlgC und FlgF nur mit 6 - 7 Kopien vorliegen (Jones *et al.*, 1990). In *B. subtilis* wurden bisher nur drei Stabproteine identifiziert (Kubori *et al.*, 1997). Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz wurde für sie eine dem Flagellin und dem Haken-Protein ähnliche Struktur angenommen (Homma *et al.*, 1990). Um den Stab sind in Abhängigkeit vom Aufbau der Zellhülle Ringstrukturen gruppiert, die die Position des Flagellums stabilisieren. In *E. coli* sind im Elektronenmikroskop vier Ringstrukturen zu erkennen, die allerdings nur durch drei Proteine gebildet werden. Ungefähr 27 FliF-Proteine bilden den MS-Ring (Jones und Macnab, 1990; Ueno *et al.*, 1992), 24 Kopien des FlgI (FlaM)-Proteins bilden den P-Ring und 28 Kopien des FlgH (FlaY)-Proteins den L-Ring (Jones und Macnab, 1990; Jones *et al.*, 1987). In *B. subtilis* läßt sich im elektronenmikroskopischen Bild dagegen nur der MS-Ring erkennen (DePamphilis und Adler, 1971b). Bei einigen Gram-negativen Bakterien ist der L-Ring zusätzlich von einer Basalscheibe umgeben (Schuster und Baeuerlein, 1989; Engelhardt *et al.*, 1993), bzw. von einer weiteren Ringstruktur überdeckt (Coulton und Murray, 1984; Johnson *et al.*, 1979; Ferris *et al.*, 1984;).

Der Haken-Basalkörper aus *A. woodii* entspricht in seiner Struktur und seinen Ausmaßen dem Haken-Basalkörper-Komplex aus *B. subtilis*. Der Haken mit einem Durchmesser von 20 nm geht in einen Stab (\varnothing 10 nm) über, an dessen Ende sich eine ringförmige Struktur (\varnothing 20 nm) befindet, der MS-Ring. Im elektronenmikroskopischen Bild läßt sich deutlich die Unterteilung des MS-Rings in zwei Domänen erkennen. Im Haken-Basalkörper-Komplex von *B. subtilis* wurden acht Proteine identifiziert. Eine Zuordnung der Untereinheiten durch den Vergleich der aminoterminalen Aminosäuresequenzen mit Flagellenproteinen anderer Organismen gelang nicht. Erst durch den Vergleich mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der aus *B. subtilis* bekannten Flagellengene ließen sich die Untereinheiten einwandfrei zuordnen (Kubori *et al.*, 1997). Der Haken-Basalkörper-Komplex setzt sich in *A. woodii* aus mindestens sechs Proteinen

zusammen. Die Identität dieser Proteine konnte allerdings auch nach Sequenzanalysen und Datenbankvergleichen nicht geklärt werden.

4.4.3 Struktur des Flagellenmotors

Die bisher beschriebenen Proteine des Flagellums stellen lediglich strukturelle Komponenten dar, die durch den Flagellenmotor in Rotation versetzt werden. Der Flagellenmotor besteht aus zwei Komponenten, dem Stator und Rotor. Der Rotor befindet sich unterhalb des MS-Rings und ist Bestandteil des C-Rings. Der C-Ring wurde in *E. coli* zunächst als glocken- oder kugelförmige Struktur identifiziert (Driks und DeRosier, 1990). Durch molekularbiologische und elektronenmikroskopische Methoden konnte dieses Bild in den letzten Jahren verfeinert werden (Francis *et al.*, 1994; Katayama *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999; Lux *et al.*, 2000). Die Analyse der H⁺-abhängigen Flagellen von *E. coli* und *S. typhimurium* ergab, daß der C-Ring aus den drei Komponenten FliG, FliM und FliN besteht (Francis *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1996a, 1996b; Khan *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2000). FliG liegt direkt unterhalb des MS-Rings (Francis *et al.*, 1992, 1994) und kann über seine carboxyterminale Domäne mit dem Mot-Komplex in Wechselwirkung treten (Zhou und Blair, 1997; Lloyd und Blair, 1997; Garza *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). FliM bindet an eine Komponente der Signaltransduktionskette der Chemotaxis, das phosphorylierte CheY (Toker und Macnab, 1997; Bren und Eisenbach, 1998; Lee *et al.*, 2001). Die Bindung von phosphoryliertem CheY führt zu einer Richtungsänderung der Flagellenrotation, die wiederum in eine Taumelbewegung des Bakteriums mündet. FliG stellt die Rotorkomponente des Flagellenmotors dar, die durch eine nicht näher bekannte Interaktion mit dem Mot-Komplex die Rotation des Flagellums hervorruft. Jeweils ein MotA- und MotB-Protein bilden einen Mot-Komplex, von dem 8 - 12 Kopien um den Haken-Basalkörper-Komplex in der Cytoplasmamembran gruppiert sind (Coulton und Murray, 1978; Khan *et al.*, 1988, 1992b). Die Mot-Komplexe bilden unabhängig voneinander arbeitende Ionenkanäle (Blair und Berg, 1988, 1990), die über die periplasmatische Domäne von MotB an die Peptidoglycanschicht der Zellhülle gebunden sind (De Mot und Vanderleyden, 1994). Im Mot-Komplex konnte bisher nur eine Aminosäure (in MotB) identifiziert werden, die an der Protonentranslokation beteiligt sein könnte. Suppressormutanten deuten aber auf eine Interaktion mit FliG hin (Lloyd *et al.*, 1996). In *B. subtilis* konnten durch Sequenzvergleiche Gene identifiziert werden, deren abgeleitete Produkte MotA, MotB und FliG sehr ähnlich sind (Mirel *et al.*, 1992; Albertini *et al.*, 1991). Daher wird eine ähnliche Struktur des Flagellenmotors in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vermutet.

Der Flagellenmotor der Na⁺-abhängigen Flagellen wurde erst in jüngster Zeit eingehender untersucht. Die Analyse der Ultrastruktur des Na⁺-abhängigen Flagellums von *A. woodii* läßt eine

ähnliche Organisation wie in H^+ -abhängigen Flagellen vermuten. Unterhalb des MS-Rings wurden Strukturen identifiziert, die der Struktur des C-Rings aus *E. coli* ähneln. Außerdem wurden Partikelringe an den Zellpolen nachgewiesen, die in Struktur und Größe den Mot-Komplexen aus *E. coli* ähneln. Die Ionenspezifität der Flagellenmotoren wird also nicht durch eine unterschiedliche Ultrastruktur determiniert, sondern wie in den ATPasen durch Unterschiede auf molekularer Ebene. In *V. alginolyticus* (Asai *et al.*, 1997), *V. parahaemolyticus* (Kim und McCarter, 2000) und *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000) wurden zwei Gene (*pomA*, *pomB*) identifiziert, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu den MotA- und MotB-Proteinen der H^+ -abhängigen Flagellen aufweist. Die Klonierung erfolgte durch die Komplementation einer mittels Transposonmutagenese erhaltenen unbeweglichen Mutante mit intaktem Flagellum. Die Sequenzvergleiche zeigten eine Identität der Aminosäuren von PomA zu MotA aus *R. sphaeroides* von 33% und von PomB zu MotB von 25% (Asai *et al.*, 1997). Aus *V. parahaemolyticus* (Kim und McCarter, 2000) und *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000) wurden auch Gene kloniert, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten zu FliG-Proteinen besitzen.

Der Arbeitsgruppe Homma gelang es zum ersten Mal, PomA und PomB als Heterodimer aus *V. alginolyticus* zu reinigen (Sato und Homma, 2000). Durch Rekonstitution von PomA und PomB in Liposomen und Anlegen eines K^+ -Diffusionspotentials konnte ein $^{22}Na^+$ -Eintritt in die Proteoliposomen nachgewiesen werden. Dieser Na^+ -Eintritt wurde durch Li^+ -Ionen und durch Phenamil gehemmt, wodurch ein eindeutiger Beweis erbracht wurde, daß PomAB einen Na^+ -Kanal bildet (Sato und Homma, 2000). Von Asai *et al.* (1999) wurden erste Versuche zur Herstellung eines Hybrid-Flagellenmotors unternommen. Hierzu wurden die *motA*- und *motB*-Gene aus *R. sphaeroides* in *pomA*- und *pomB*-Mutanten von *V. alginolyticus* exprimiert. Die *pomA*-Mutante wurde durch die Expression von *motA* zu einem geringen Grad komplementiert, allerdings war der Flagellenmotor weiterhin Na^+ -abhängig. Die Expression von *motB* in einer *pomB*-Mutante oder zusammen mit *motA* in einer *pomAB*-Mutante führte zu unbeweglichen Zellen (Asai *et al.*, 1999). Auch durch die Herstellung von chimären Proteinen aus MotB und PomB (MomB) gelang es nicht, einen H^+ -abhängigen Flagellenmotor in *V. alginolyticus* zu etablieren. Allerdings wurden hierbei Zellen erhalten, die mit Li^+ eine größere Beweglichkeit als mit Na^+ aufwiesen und zudem Phenamil-resistent waren (Asai *et al.*, 2000). Diese Arbeiten zeigten, daß die Mot-Komplexe alleine nicht die Ionenspezifität des Flagellenmotors determinieren. Von Gosink und Häse (2000) wurde daher eine *fliG⁻pomAB motXY*-Mutante von *V. cholerae* mit den *motAB*-Genen aus *E. coli* und einem chimären *fliG*-Gen, das für ein Protein bestehend aus der carboxyterminalen Domäne des *E. coli* FliG-Proteins und der aminoterminalen Domäne des *V. cholerae* FliG-Proteins kodierte, komplementiert. Diese Komplementation führte

zu einer $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -abhängigen Beweglichkeit von *V. cholerae*. Die Ionenspezifität wird also durch Aminosäuren in den Mot-Proteinen und der carboxyterminalen Domäne von FliG bestimmt.

4.5 Vergleich der Rotationsmechanismen von Flagellen und ATPasen

Die strukturelle Analyse der bakteriellen Flagellen und der F_1F_0 -ATPasen ist wie bereits beschrieben, sehr weit fortgeschritten. Der Mechanismus der Rotation und sein Antrieb, die Iontentranslokation, sind dagegen wesentlich schlechter charakterisiert. Die Rotation der bakteriellen Flagellen ist unumstritten. Unabhängig vom genutzten Ion wurden Modellvorstellungen formuliert, die in allen Fällen davon ausgehen, daß der Flagellenmotor aus einer Rotor- und Stator-Komponente besteht. Die Rotorkomponente ist mit dem Haken-Basalkörper verbunden und wird von der Stator-Komponente, die den Iontentransfer vermittelt, umgeben. Durch die Strukturanalyse der Flagellen ist es mittlerweile gelungen, den Mot-Komplex dem Stator und das FliG-Protein dem Rotor zuzuordnen. Die bisherigen Modellvorstellungen zur Kopplung von Ionenfluß und Flagellenrotation lassen sich in drei Modelle zusammenfassen. Das erste Modell postuliert eine cyclische Sequenz von Konformationsänderungen im Stator, die durch den Ionenfluß induziert werden (Oosawa und Masai, 1983; Läuger, 1988). Die Konformationsänderungen führen zu transienten Interaktionen zwischen Rotor und Stator, die die Rotation hervorrufen (Abb. 54A). Ein zweites Modell postuliert zwei halbe, gegeneinander versetzte Ionenkanäle im Stator, die vom Periplasma zur Mitte des Stators und von der Mitte zum Cytoplasma reichen (Abb. 54B; Meister *et al.*, 1989). Der Stator ist zudem über eine elastische Verbindung an der Zellhülle fixiert. In der Mitte des Rotors liegen Ionenbindungsstellen, die von den Ionen über die beiden Kanäle erreicht werden können. Treten Ionen vom Periplasma in einen Ionenkanal ein, wandern sie zur Mitte des Stators und binden an die Ionenbindungsstelle am Rotor. Ein weiterer Transfer des Ions zum Cytoplasma ist erst möglich nach einer Rotationsbewegung des Rotors zum zweiten Ionenkanal. Diese Rotation kann durch thermische Fluktuationen und elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Die Struktur des Flagellenmotors ist dabei so ausgebildet, daß die Rotation nur in eine Richtung erfolgen kann (Meister *et al.*, 1989). Ein drittes Modell geht von schräg über die Außenseite des Rotors verlaufenden Reihen alternierender positiv und negativ geladenen Aminosäuren aus (Abb. 54C; Läuger, 1977, 1988; Berry, 1993; Walz und Caplan, 2000). Zudem werden Ionenkanäle im Stator postuliert, die vom Periplasma zum Cytoplasma reichen und zum Rotor hin offen sind. Wandert ein H^+ oder Na^+ durch den Ionenkanal bewirkt es eine Anziehung der negativ geladenen Aminosäuren auf dem Rotor. Da alle negativ geladenen Aminosäuren in einer Reihe diagonal von der cytoplasmatischen zur periplasmatischen Seite des Rotors verlaufen, führt diese Wechselwirkung zur Rotation.

Alle Modelle lassen sich mit den Daten zur Struktur des Flagellenmotors vereinbaren, auch wenn bisher keine Hinweise auf Konformationsänderungen im Stator oder auf eine Ionenbindungsstelle am Rotor existieren. Problematischer erscheinen die ersten beiden Modelle allerdings in Bezug auf die Reversibilität des Flagellenmotors. Eine Umkehr der Rotationsrichtung ohne eine Änderung der Polarität des Membranpotentials läßt sich in ihnen nur durch sehr ausgedehnte Konformationsänderungen im Stator erklären (Läger, 1988; Meister *et al.*, 1989). Im dritten Modell kann eine Änderung der Rotationsrichtung dagegen durch unterschiedliche Protonierungszustände von Aminosäuren im Rotor und Stator erklärt werden (Berry, 1993).

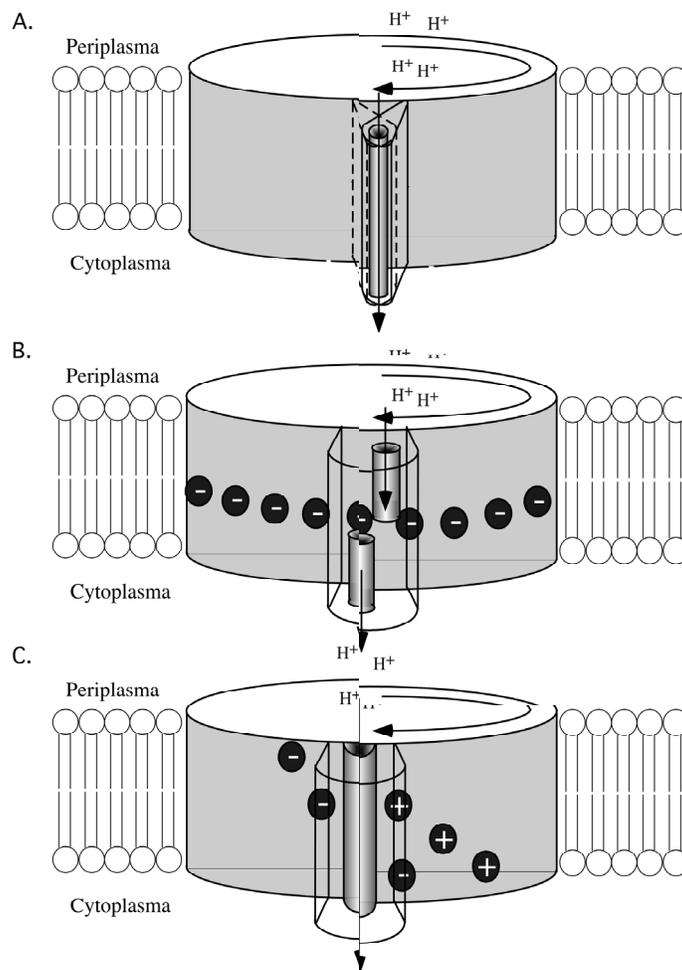


Abb. 54. Flagellenrotation nach A. Läger (1988), B. Meister *et al.* (1989) und C. Läger (1977). Der Rotor ist grau unterlegt. Es ist nur ein Statorelement dargestellt. Zur Beschreibung der Modelle siehe Text.

Die Modelle zur Rotation der F_1F_0 -ATPase gehen von einer ähnlichen Struktur des Motors wie im bakteriellen Flagellum aus. Auch hier wird eine Stator-Komponente postuliert, die die Ionen transferiert und mit einer Rotorkomponente in Wechselwirkung treten kann. Von Vik und Antonio (1994) wurde zuerst ein Modell zur ATPase-Rotation in *E. coli* entwickelt, das zwei halbe gegeneinander versetzte Ionenkanäle in der Untereinheit *a* postuliert, die von Arginin-210 zum Periplasma und von Glutamat-219 zum Cytoplasma reichen. Durch die Interaktion eines deprotonierten Aspartat-61 der Untereinheit *c* mit Arginin-210 der *a*-Untereinheit wird eine Rotation des *c*-Rings in Bezug auf die *a*-Untereinheit hervorgerufen. Aufgrund der oben beschriebenen, weit fortgeschrittenen Strukturanalyse und des Nachweises der Rotation der γ - und ϵ -Untereinheit wurde dieses Modell von Elston *et al.* (1998) erweitert (Abb. 55a). Die Struktur der F_1F_0 -ATPase läßt sich danach in eine Stator-Komponente, bestehend aus den Untereinheiten $\alpha_2\delta\alpha_3\beta_3$, und eine Rotorkomponente aus $c_{12}\gamma\epsilon$ unterteilen. Auch in diesem Modell wurden zwei gegeneinander versetzte halbe Ionenkanäle in der Untereinheit *a* postuliert, die vom Cytoplasma und Periplasma bis zum Aspartat-61 der *c*-Untereinheit in der Mitte der Cytoplasmamembran reichen. Von der *c*-Untereinheit stehen zwei Untereinheiten in Kontakt mit der *a*-Untereinheit und zehn Untereinheiten mit der Cytoplasmamembran. Dringt ein H^+ in den periplasmatischen Kanal ein, angetrieben durch das transmembrane elektrochemische Protonenpotential, bindet es an das Aspartat-61 und ermöglicht dieser nun ungeladenen Aminosäure in die Lipid-Doppelschicht einzutreten. Die benachbarte *c*-Untereinheit gibt aufgrund der geringeren H^+ -Konzentration im Cytoplasma ein H^+ in den cytoplasmatischen Ionenkanal ab und das geladene Aspartat-61 wird aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Arginin-210 der *a*-Untereinheit zum periplasmatischen Kanal bewegt. Dieses Modell steht im Einklang mit den Strukturdaten zur *E. coli* *c*- und *a*-Untereinheit. Die NMR-Analyse der *E. coli* *c*-Untereinheit zeigte eine Positionierung des Aspartat-61 in der Mitte der zweiten Helix, was seine Lokalisation in der Mitte der Cytoplasmamembran wahrscheinlich machte (Girvin *et al.*, 1998). Das protonierte Aspartat-61 weist dabei in das Zentrum von vier α -Helices zweier benachbarter *c*-Untereinheiten. Von Rastogi und Girvin (2000) wurde gezeigt, daß die carboxyterminale Helix als Folge der Deprotonierung von Aspartat-61 eine Rotation um 140°C im Uhrzeigersinn ausführt. Diese Rotation führt zu einer Lage des geladenen Aspartat-61 an der Außenseite des *c*-Oligomers, so daß eine Interaktion von Arginin-210 und Aspartat-61 möglich ist. Zudem wurden eine Reihe geladener Aminosäuren in der Untereinheit *a* gefunden, die einen Ionenkanal vom Periplasma bis zur Mitte der Cytoplasmamembran bilden können (Rastogi und Girvin, 2000). Ein Ionenkanal zum Cytoplasma konnte allerdings noch nicht identifiziert werden.

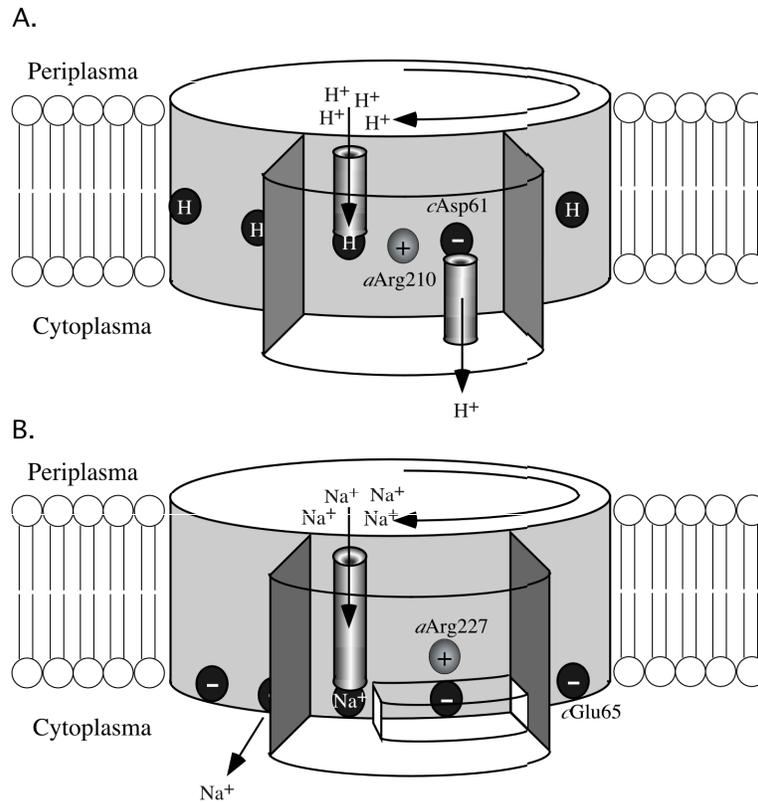


Abb. 55. Modelle zur Kopplung von Ionentransport und ATPase-Rotation nach A. Elston *et al.* (1998) und B. Dimroth *et al.* (1999). Die hydrophoben Barrieren in der Untereinheit *a* sind dunkelgrau dargestellt. In B ist zusätzlich der hydrophile Streifen dargestellt.

Von Dimroth *et al.* (1999) wurde ein alternatives Modell zur Ionentranslokation in der F_1F_0 -ATPase aus *P. modestum* beschrieben (Abb. 55b). Im Unterschied zum *E. coli*-Modell wird hier nur ein Ionenkanal in der *a*-Untereinheit postuliert, der vom Periplasma zur Na^+ -Bindungsstelle an der cytoplasmatischen Seite der *c*-Untereinheiten reicht. Die Na^+ -Bindungsstellen stehen in Kontakt mit dem Cytoplasma und können Na^+ aus dem Cytoplasma binden und an dieses abgeben. Aufgrund der geringen Na^+ -Konzentration in der Zelle haben sie allerdings überwiegend kein Na^+ gebunden. Der gesamte Kontaktbereich zwischen den Untereinheiten *a* und *c* ist zudem hydrophob, bis auf einen hydrophilen Streifen, durch den die freien Ionenbindungsstelle aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem konservierten Arginin der Untereinheit *a* zum Ionenkanal vordringen können. Dort binden sie ein Ion, getrieben durch den transmembranen elektrochemischen Na^+ -Gradienten und können sich nun im ungeladenen Zustand durch die hydrophoben Bereiche zum Cytoplasma weiterbewegen. Diese Modell wird unterstützt durch die NMR-Analyse der *P. modestum* *c*-Untereinheit in SDS-Mizellen, die zeigte, daß sich die Na^+ -Bindungsstelle zwischen den Helices III und IV befindet. Da die terminalen Helices in der

Cytoplasmamembran liegen, wurde eine Lokalisation der Na^+ -Bindungsstelle an der cytoplasmatischen Seite der Untereinheit *c* postuliert (Matthey *et al.*, 1999; Abb. 55). Auch physiologische Untersuchungen bestätigen dieses Modell (Kaim *et al.*, 1998). Zudem konnten Murata *et al.* (2000) eine zum Cytoplasma exponierte Na^+ -Bindungsstelle in der Na^+ -abhängigen V_1V_0 -ATPase von *E. hirae* nachweisen. Die Frage, welches der beiden Modelle korrekt ist, oder ob sich in Na^+ - und H^+ -abhängigen F_1F_0 -ATPasen zwei unterschiedliche Mechanismen der Kopplung von Rotation und Ionentranslokation entwickelt haben, bleibt also ungeklärt. Zur Klärung dieser Frage sind Untersuchungen an weiteren ATPasen nötig.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Struktur und molekularen Organisation des Flagellums von *A. woodii* ergaben eine große Übereinstimmung mit dem bekannten H^+ -abhängigen Flagellum von *B. subtilis*. Für eine generelle Aussage zur Struktur ist allerdings zunächst die Klonierung weiterer Flagellengene nötig. Da die bisher bekannten Gene auf eine recht große Konservierung im Vergleich zu *B. subtilis* hinweisen, erscheint die Klonierung weiterer hochkonservierter Gene durch eine Amplifikation mittels PCR möglich, wie in dieser Arbeit für das Flagellin gezeigt. Ein Problem stellen dabei allerdings die Gene der Statorkomponenten *motA* und *motB* dar, da sie nur wenig konserviert sind und auch nicht zusammen mit anderen Flagellengenen auf dem Chromosom vorliegen. Um diese zu klonieren, erscheint es unumgänglich, auch für *A. woodii* in Zukunft Systeme zum DNA-Transfer und zur genetische Manipulationen zu entwickeln.

Die in dieser Arbeit durchgeführte proteinchemische Charakterisierung der F_1F_0 -ATPase, zusammen mit den vorherigen elektronenmikroskopischen und molekularbiologischen Untersuchungen (Reidlinger *et al.*, 1994, Rahlfs *et al.*, 1999) zeigen, daß die Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *A. woodii* eine zu den H^+ -abhängigen F_1F_0 -ATPasen identische Untereinheitenzusammensetzung hat. Einzigartig ist die Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* allerdings in Bezug auf die Struktur ihres *c*-Oligomers, das als Heterooligomer aus 8- und 16-kDa-Proteolipiden vorliegt. Der nächste Schritt zur Charakterisierung des Enzyms wäre eine erneute Rekonstitution der gereinigten und intakten Na^+ - F_1F_0 -ATPase in Liposomen und die Bestimmung der Na^+/ATP -Stöchiometrie. Hierbei sollte sich durch Abweichungen von bekannten F_1F_0 -ATPasen bereits ein Einfluß des 16-kDa-Proteolipids auf die Funktion der Na^+ - F_1F_0 -ATPase abzeichnen. Interessant wäre auch die Produktion und funktionelle Charakterisierung von Enzymen mit unterschiedlichen Mengen an *c*₁- und *c*₂/*c*₃-Monomeren. Daraus könnten Rückschlüsse auf die Funktion des 16-kDa-Proteolipids gezogen werden. Da es für *A. woodii* kein geeignetes System gibt, ist hierzu zunächst die Entwicklung eines Expressionssystem für die

Na^+ - F_1F_0 -ATPase aus *A. woodii* nötig, um eine genetische Manipulation zu ermöglichen. Durch die Einführung von Aminosäuresubstitutionen und die Analyse ihres Einflusses auf die ATPase-Aktivität sollte es außerdem jetzt möglich sein, weitere Determinanten der Ionenspezifität in den Untereinheiten *a* und *c* zu bestimmen, die Aufschluß über den Mechanismus der Ionentranslokation und ihre Kopplung an die Rotation ergeben.

5. Zusammenfassung

1. Aus chromosomaler DNA von *A. woodii* wurde durch heterologe Starteroligonukleotide ein Bereich des Flagellings mittels PCR amplifiziert. Durch die Verwendung dieses DNA-Fragmentes als Sonde wurden weitere 6 kBp an chromosomaler DNA von *A. woodii* kloniert, sequenziert und analysiert.
2. Innerhalb dieses klonierten DNA-Abschnittes wurden zwei partielle und fünf vollständige offene Leserahmen lokalisiert, die jeweils über eine Shine-Dalgarno-Sequenz verfügten und größer als 300 Bp waren. Durch Sequenzvergleiche ließ sich das Flagelligen (*fliC*) identifizieren. Stromaufwärts von *fliC* wurden offene Leserahmen (*flgL*, *flgK*) gefunden, die für die Haken-assoziierten Proteine 1 und 3 des *A. woodii*-Flagellums kodieren, sowie ein Leserahmen (*orfA*) dessen abgeleitetes Produkt keine Ähnlichkeit keinem bekannten Protein ähnlich ist. Durch die Expression von *orfA* in Minizellen von *E. coli* DK6 wurde aber gezeigt, daß *orfA* für ein Protein kodiert. Stromabwärts vom Flagelligen wurden keine Flagellengene identifiziert. Die abgeleiteten Produkte, der hier lokalisierten ORFs *orfB* und *orfC* zeigten keine Ähnlichkeiten zu in Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen. Am 3'-Ende des klonierten DNA-Abschnittes war ein partieller ORF (*orfD*) vorhanden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz große Ähnlichkeiten zu dNTP-Zucker modifizierenden Enzymen aufwies.
3. Aus Sphäroplasten von *A. woodii* wurden durch Solubilisierung, differentielle Zentrifugation und eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ganze Flagellen inklusive des Haken-Basalkörper-Komplexes gereinigt. Durch die Analyse der Präparation in der SDS-PAGE wurden neben dem Flagellin sechs weitere Proteine als Bestandteil der Flagellen identifiziert.
4. Durch die elektronenmikroskopische Analyse der Haken-Basalkörper-Komplexe der Na⁺-abhängigen Flagellen von *A. woodii* konnte gezeigt werden, daß diese aus einem Haken, Stab und einem MS-Ring aufgebaut sind. Unterhalb des MS-Rings waren weitere Strukturen vorhanden. Diese Struktur entspricht den aus den H⁺-abhängigen Flagellen der Gram-positiven Organismen bekannten Strukturen. Durch die Gefrierbruchmethode konnten in der Cytoplasmamembran von *A. woodii* im elektronenmikroskopischen Bild Partikelringe nachgewiesen werden. Diese entsprechen in Struktur und Größe den Mot-Komplexen der H⁺-abhängigen Flagellen aus *E. coli*.

5. Zur Analyse der Untereinheitenzusammensetzung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* wurden Antiseren gegen die Untereinheiten *a*, *b*, *c*₁, *c*₂/*c*₃ und β generiert. Hierzu wurden die Untereinheiten *a*, *b*, *c*₁ und β als MalE-Fusionen in *E. coli* produziert und gereinigt. Die Untereinheit *c*₂/*c*₃ wurde durch Chloroform:Methanol-Extraktion aus der Cytoplasmamembran von *A. woodii* angereichert und durch Elektroelution aus einer SDS-PAGE gereinigt.
6. Durch die Analyse der Cytoplasma- und Membranfraktion mit den fünf Antiseren ließen sich die Untereinheiten *a*, *b*, *c*₁, *c*₂/*c*₃ und α in der Cytoplasmamembran nachweisen.
7. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* wurde durch Blue-Native-PAGE aus der Membranfraktion isoliert. Durch die Auftrennung der ATPase in ihre Untereinheiten und deren aminoterminalen Sequenzierung wurden die Untereinheiten *a*, *b*, *c*₂/*c*₃, α , β , γ , δ und ϵ identifiziert.
8. Durch immunologische Methoden wurde die Untereinheit *c*₁, das in F_1F_0 -ATPasen einmalige 16-kDa-Proteolipid, als Untereinheit der Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* erkannt. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase von *A. woodii* ist die erste F_1F_0 -ATPase mit einem Heterooligomer aus 8- und 16-kDa-Proteolipiden.
9. Die Untereinheit *c*₁ wurde in *A. woodii* unabhängig vom Substrat und der Na^+ -Konzentration produziert. Allerdings wurden Hinweise auf eine erhöhte Expression des gesamten *atp*-Operons in Methanol-gezogenen-Zellen erhalten.
10. Ein Verfahren zur Reinigung der Na^+ - F_1F_0 -ATPase unter Erhalt ihrer Untereinheitenstruktur wurde entwickelt. Die Na^+ - F_1F_0 -ATPase wurde aus der Membranfraktion von *A. woodii* solubilisiert und durch Gelfiltration über Sephacryl S-400 und eine Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Das gereinigte Enzym besaß alle neun Untereinheiten. Die spezifische Aktivität der gereinigten ATPase betrug 7 U mg Protein⁻¹ und seine molekulare Masse 600 kDa.

6. Literatur

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter und J. E. Walker** (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621 - 628.
- Abram, D., J. R. Mitchen, H. Koffler und A. E. Vatter** (1970) Differentiation within the bacterial flagellum and isolation of the proximal hook. *J. Bacteriol.* 101: 250 - 261.
- Adachi, K., R. Yasuda, H. Noji, H. Ito, Y. Harada, M. Yoshida und K. Kinosita** (2000) Stepping rotation of F₁-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7243 - 7247.
- Adler, J. und B. Templeton** (1967) The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 46: 175 - 184.
- Aizawa, S.-I., G. E. Dean, C.J. Jones, R. M. Macnab und S. Yamaguchi** (1985) Purification and characterization of flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 161: 836-49.
- Albertini, A. M., T. Caramori, W. D. Crabb, F. Scoffone und A. Galizzi** (1991) The *flaA* locus of *Bacillus subtilis* is part of a large operon coding for flagellar structures, motility functions, and an ATPase-like polypeptide. *J. Bacteriol.* 173: 3573 - 3579.
- Altendorf, K. und W. Zitzmann** (1975) Identification of the DCCD-reactive protein of the energy transducing adenosinetriphosphatase complex from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 59: 268 - 272.
- Amann, R., W. Ludwig, W. Laubinger, P. Dimroth und K. H. Schleifer** (1988) Cloning and sequencing of the gene encoding the beta subunit of the sodium ion translocating ATP synthase of *Propionigenium modestum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 253 - 260.
- Andersson, L. O., H. Borg und M. Mikaelsson** (1972) Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gel of graded porosity. *FEBS Lett.* 20: 199-202.
- Apperson, M., R. E. Jensen, K. Suda, C. Witte und M. P. Yaffe.** (1990) A yeast protein, homologous to the proteolipid of chromaffin granule proton-ATPase, is important for cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 574 - 579.
- Arai, H., G. Terres, S. Pink und M. Forgac** (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 263: 8796 - 8801.
- Armitage, J. P. und R. M. Macnab** (1987) Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169: 514 - 518.
- Asai, Y., S. Kojima, H. Kato, N. Nishioka, I. Kawagishi und M. Homma** (1997) Putative channel component for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J. Bacteriol.* 179: 5104 - 5110.
- Asai, Y., I. Kawagishi, R. E. Sockett und M. Homma** (1999) Hybrid motor with H⁺- and Na⁺-driven components can rotate *Vibrio* polar flagella by using sodium ions. *J. Bacteriol.* 181: 6332 - 6338.

- Asai, Y., I. Kawagishi, R. E. Sockett und M. Homma** (2000) Coupling ion specificity of chimeras between H⁺- and Na⁺-driven motor proteins, MotB and PomB, in *Vibrio* flagella. *EMBO J.* 19: 3639 - 3648
- Atsumi, T., S. Sugiyama, E. J. Cragoe und Y. Imae** (1990) Specific inhibitor of the Na⁺-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* strains by the amiloride analog phenamil. *J. Bacteriol.* 172: 1634 - 1639.
- Atsumi, T., L. L. McCarter und Y. Imae** (1992a) Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature* 355: 182 - 184.
- Atsumi, T., Y. Maekawa, H. Tokuda und Y. Imae** (1992b) Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na⁺-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* but allows cell growth. *FEBS Lett.* 314: 114 - 116.
- Aufurth, S.** (1996) Isolierung und biochemische Charakterisierung von Filamenten und Haken-Basalkörper-Komplexen aus *Acetobacterium woodii* und Versuche zur Klonierung des Flagellin-Gens und der *mot*-Gene. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- Aufurth, S., M. Madkour, F. Mayer und V. Müller** (1998) Structure of the Na⁺-driven flagellum from the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *FEBS Lett.* 434: 325-328.
- Balch, W. E., S. Schoberth, R.S . Tanner und R. W. Wolfe** (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing carbon dioxide-reducing bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 355-361.
- Baltscheffsky, M., A. Schultz und H. Baltscheffsky H** (1999) H⁺-PPases: a tightly membrane-bound family. *FEBS Lett.* 457: 527 - 533.
- Banner, C. D., C. P. Moran und R. Losick** (1983) Deletion analysis of a complex promoter for a developmentally regulated gene from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 168: 351 - 365.
- Baronofsky, J. J., W. J. A. Schreurs und E. R. Kashket** (1984) Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1134 - 1139.
- Bartolome, B., Y. Jubete, E. Martinez und F. de la Cruz** (1991) Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* 102: 75 - 78.
- Becher, B. und V. Müller** (1994) $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ drives the synthesis of ATP via an $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ -translocating F₁F₀-ATPase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Bacteriol.* 176: 2543 - 2550.
- Becher, B., V. Müller und G. Gottschalk** (1992) N⁵-methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an Na⁺-translocating membrane protein. *J. Bacteriol.* 174: 7656 - 7660.
- Beechey, R. B., Linnett, P. E. and R. H. Fillingame** (1979) Isolation of carbodiimide-binding proteins from mitochondria and *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 55: 426-434
- Berg, H. C. und R. A. Anderson** (1973) Bacteria swim by rotating their filaments. *Nature* 245: 380 - 382.

- Berg, H. C. und D. A. Brown** (1972) Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* 239: 500 - 504.
- Berry, R. M.** (1993) Torque and switching in the bacterial flagellar motor. An electrostatic model. *Biophys. J.* 64: 961 - 973.
- Berry, R. M. und J. P. Armitage** (1999) The bacterial flagella motor. *Adv. Microb. Physiol.* 41: 291 - 337.
- Birkenhäger, R., M. Hoppert, G. Deckers-Hebestreit, F. Mayer und K. Altendorf** (1995) The F_0 complex of the *Escherichia coli* ATP synthase: investigation by electron microscopic imaging and immunoelectron microscopy. *Eur. J. Biochem.* 230: 58 - 67.
- Birkenhäger, R., J.-C. Greie, K. Altendorf und G. Deckers-Hebestreit** (1999) F_0 complex of the *Escherichia coli* ATP synthase. Not all monomers of subunit *c* oligomer are involved in F_1 interaction. *Eur. J. Biochem.* 264: 385 - 396.
- Bjorbaeck, C., V. Foersom und O. Michelsen** (1990). The transmembrane topology of the *a* subunit from the ATPase in *Escherichia coli* by PhoA protein fusions. *FEBS Lett.* 260: 31-34.
- Blair, A., L. Ngo, J. Park, I. T. Paulsen und M. H. Saier** (1996) Phylogenetic analyses of the homologous transmembrane channel-forming proteins of the F_0F_1 -ATPases of bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Microbiology* 142: 17 - 32.
- Blair, D. F. und H. C. Berg** (1988) Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science* 242: 1678 - 1681.
- Blair, D. F. und H. C. Berg** (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell.* 60: 439 - 449.
- Blair, D. F. und H. C. Berg** (1991) Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *J. Mol. Biol.* 221: 1433 - 1442.
- Blair, D. F., D. Y. Kim und H. C. Berg** (1991) Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 4049 - 4055.
- Blatter, E. E., W. Ross, H. Tang, R. L. Gourse und R. H. Ebright** (1994) Domain organization of RNA polymerase α subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* 8: 889 - 896.
- Blum, H., H. Beier und H. J. Gross** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Böttcher, B. und P. Gräber** (2000) The structure of the H^+ -ATP synthase from chloroplasts and its subcomplexes as revealed by electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1458: 404 - 416.
- Boyer, P. D.** (1993) The binding change mechanism for ATP synthase - some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 215 - 250.
- Bren, A. und M. Eisenbach** (1998) The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J. Mol. Biol.* 278: 507 - 514.
- Brimer, C. D. und T. C. Montie** (1998) Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J. Bacteriol.* 180: 3029 - 3217.

- Bryant, M. P.** (1972) Commentary on the Hungate-technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328.
- Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. X. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, W. P. Sadow, M. C. Hanna, M. C. Cotton, K. M. Roberts, A. M. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, H.-P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese und J. C. Venter** (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058 - 1073.
- Buckel, W. und R. Semmler** (1983) Purification, characterisation and reconstitution of glutacoyl-CoA decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 136: 427 - 434.
- Buluwela, L., A. Forster, T. Boehm und T. H. Rabbitts** (1989) A rapid procedure for colony screening using nylon filters. *Nucleic Acids Res.* 17: 23-24.
- Burgess, R. R., A. A Travers, J. J. Dunn und E. K. Bautz** (1969) Factor stimulation transcription by RNA polymerase. *Nature* 221: 43 - 46.
- Cain, B. D. und R. D. Simoni** (1986) Impaired proton conductivity resulting from mutations in the *a* subunit of F₁F₀ ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261: 10043-10050.
- Cain, B. D. und R. D. Simoni** (1988) Interaction between Glu-219 and His-245 within the *a* subunit of F₁F₀-ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263: 6606 - 6612.
- Caramori, T. und A. Galizzi** (1998) The UP element of the promoter for the flagellin gene, *hag*, stimulates transcription from both SigD- and SigA-dependent promoters in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 258: 385 - 388.
- Caramori, T., D. Barilla, C. Nessi, L. Sacchi und A. Galizzi** (1996) Role of FlgM in sigma D-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178: 3113 - 3118.
- Chun, A. C., Y. Zhou, C. M. Wong, H. F. Kung, K. T. Jeang und D. Y. Jin** (2000) Coiled-coil motif as a structural basis for the interaction of HTLV type 1 tax with cellular cofactors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 1689 - 1694.
- Chun, S. Y. und J. S. Parkinson** (1988) Bacterial motility: Membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* 239: 276 - 278.
- Clarke, D. J., F. M. Fuller und J. G. Morris** (1979) The proton-translocation adenosine triphosphatase of the obligately anaerobic *Clostridium pasteurianum*. 1. ATP phosphohydrolase activity. *Eur. J. Biochem.* 98: 597 - 612.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang und L. Hsu** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1099-1106.
- Coulton, J. W. und R. G. Murray** (1978) Cell envelope associations of *Aquaspirillum serpens* flagella. *J. Bacteriol.* 136: 1037 - 1049.

- Cox, G. B., D. A. Jans, A. L. Fimmel, F. Gibson und L. Hatch** (1984) Hypothesis. The mechanism of ATP synthase. Conformational change by rotation of the β -subunit. *Biochim. Biophys. Acta* 768: 201 - 208.
- Cox, G. B., A. L. Fimmel, F. Gibson und L. Hatch** (1986) The mechanism of ATP synthase: a reassessment of the functions of the *b* and *a* subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 849: 62 - 69.
- Cross, R. L. und L. Taiz** (1990) Gene duplication as a means for altering H^+ /ATP ratios during the evolution of F_0F_1 ATPases and synthases. *FEBS Lett.* 259: 227 - 229.
- Dangel, W., H. Schulz, G. Dieckert, H. König und G. Fuchs** (1987) Occurrence of corrinoid-containing membrane proteins in anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 148: 52 - 56.
- Das, A. und L. G. Ljungdahl** (1997) Composition and primary sequence of the F_1F_0 ATP synthase from the obligately anaerobic bacterium *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 179: 3746 - 3755.
- Das, A., D. M. Ivey und L. G. Ljungdahl** (1997) Purification and reconstitution into proteoliposomes of the F_1F_0 ATP synthase from the obligately anaerobic gram-positive bacterium *Clostridium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* 179: 1714 - 1720.
- De Mot, R. und J. Vanderleyden** (1994) The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* 12: 333 - 334.
- Dean, G. E., R. M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura und C. Burks** (1984) Gene sequence and predicted amino acid sequence of the *motA* protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159: 991 - 999.
- Deckers-Hebestreit, G. und K. Altendorf** (1996). The F_0F_1 -type ATP synthase of bacteria: structure and function of the F_0 complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 791-824.
- DePamphilis, M. L. und J. Adler** (1971a) Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 105: 396 - 407.
- DePamphilis, M. L. und J. Adler** (1971b) Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 105: 396-407.
- Dibrov, P. A., V. A. Kostryko, R. L. Lazarova, V. P. Skulachev und I. A. Smirnova** (1986) The sodium cycle. I. Na^+ -dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* 850: 449 - 457.
- Dimroth P.** (1980) A new sodium-transport system energized by the decarboxylation of oxaloacetate. *FEBS Lett.* 122: 234 - 236.
- Dimroth, P., H. Wang, M. Grabe und G. Oster** (1999) Energy transduction in the sodium F -ATPase of *Propionigenium modestum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4924 - 4929.
- Dmitriev, O. Y., K. Altendorf und R. H. Fillingame** (1995) Reconstitution of the F_0 complex of *Escherichia coli* ATP synthase from isolated subunits. Varying the number of essential

carboxylates by co-incorporation of wild-type and mutant subunit *c* after purification in organic solvent. *Eur. J. Biochem.* 233: 478 - 483.

Dmitriev, O. Y., P. C. Jones, W. Jiang und R. H. Fillingame (1999a). Structure of the membrane domain of subunit *b* of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 274: 15598-15604.

Dmitriev, O. Y., P. C. Jones und R. H. Fillingame (1999b) Structure of the *c* oligomer in the F₁F₀ ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7785 - 7790.

Driks, A. und D. DeRosier (1990) Additional structures associated with the flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* 211: 669 - 672.

Dulley, J. R. und P. A. Grieve (1975) A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64: 136-141.

Duncan, T. M., V. V Bulygin, Y. Zhou, M. L. Hutcheon und R. L. Cross (1995) Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10964 - 10968.

Edge, A. S., C. R. Faltynek, L. Hof, L. E. Reichert und P. Weber (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 118: 131 - 137.

Elston, T., H. Wang und G. Oster (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391: 510 - 513.

Engelhardt, H., S. C. Schuster und E. Baeuerlein (1993) An archimedean spiral: the basal disk of the *Wolinella* flagellar motor. *Science* 262: 1046 - 1048.

Esser, U., L. R. Krumholz und R. D. Simoni (1990) Nucleotide sequence of the F₀ subunits of the sodium dependent F₁F₀ ATPase of *Propionigenium modestum*. *Nucleic Acids Res.* 18: 5887.

Estrem, S. T., W. Ross, T. Gaal, Z. W. S. Chen, W. Niu, R. H. Ebright und R. L. Gourse (1999) Bacterial promotor architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Genes Dev.* 13: 2134 - 2147.

Eya, S., T. Noumi, M. Maeda und M. Futai (1988) Intrinsic membrane sector (F₀) of H⁺-ATPase (F₀F₁) from *Escherichia coli*. Mutations in the *a* subunit give F₀ with impaired proton translocation and F₁ binding. *J. Biol. Chem.* 263: 10056 - 10062.

Fahrner, K. A., S. M. Block, S. Krishnaswamy, J. S. Parkinson und H. C. Berg (1994) A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 238: 173 - 186.

Fan, F., K. Ohnishi, N. R. Francis und R. M. Macnab (1997) The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located at the flagellar basal body. *Mol. Microbiol.* 26: 1035 - 1046.

Ferris, F. G., T. J. Beveridge, M. L. Marceau-Day und A. D. Larson (1984) Structure and cell envelope associations of flagellar basal complexes of *Vibrio cholerae* and *Campylobacter fetus*. *Can. J. Microbiol.* 30: 322 - 333.

- Fillingame, R.H.** (1975) Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component of the adenosine 5'-triphosphate energy-transducing system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124: 870 - 883.
- Fillingame, R. H.** (1992) Subunit *c* of the F₁F₀ ATP synthase: structure and role in transmembrane energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1101:240 - 243.
- Fillingame, R. H., W. Jiang, O. Y. Dmitriev und P. C. Jones** (2000) Structural interpretations of F₀ rotary function in the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1458: 387 - 403.
- Finbow, M. E. und M. A. Harrison** (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* 324: 697 - 712.
- Finbow, M. E., S. F. Goodwin, L. Meagher, N. J. Lane, J. Keen, J. B. Findlay und K. Kaiser** (1994) Evidence that the 16 kDa proteolipid (subunit *c*) of the vacuolar H⁺-ATPase and ductin from gap junctions are the same polypeptide in *Drosophila* and *Manduca*: molecular cloning of the Vha16k gene from *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 107:1817 - 1824.
- Forgac, M.** (1999) Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274: 12951 – 12954.
- Forster, A., R. Daniel und V. Müller** (1995) The Na⁺-translocating ATPase of *Acetobacterium woodii* is a F₁F₀-type enzyme as deduced from the primary structure of its β, γ and ε subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 393 - 397.
- Foster, D. L. und R. H. Fillingame** (1982) Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATPase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 257: 2009-2015.
- Fraga, D. und R. H. Fillingame** (1991) Essential residues in the polar loop region of subunit *c* of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase defined by random oligonucleotide-primed mutagenesis. *J. Bacteriol.* 173: 2639 - 2643.
- Fraga, D., J. Hermolin, M. Oldenburg, M. J. Miller und R. H. Fillingame** (1994) Arginine 41 of subunit *c* of *Escherichia coli* H⁺-ATP synthase is essential in binding and coupling of F₁ to F₀. *J. Biol. Chem.* 269: 7532 - 7537.
- Francis, N.R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier und R. M. Macnab** (1992) Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1035 - 1046.
- Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas und D. J. DeRosier** (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* 235: 1261- 1270.
- Fredrick, K., T. Caramori, Y. F. Chen, A. Galizzi und J. D. Helmann** (1995) Promotor architecture in the flagellar regulon of *B. subtilis*: high-level expression of flagellin by the σ^D RNA polymerase requires an upstream promotor element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2582 - 2586.
- Garza, A.G., L. W. Harris-Haller, R. A. Stoebner und M. D. Manson** (1995) Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1970 - 1974.

- Garza, A. G., P. A. Bronstein, P. A. Valdez, L. W. Harris-Haller und M. D. Manson** (1996) Extragenic suppression of *motA* missense mutations of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 6116 - 6122.
- Gerike, U. und P. Dimroth** (1993) N-terminal amino acid sequences of the subunits of the Na⁺-translocating F₁F₀ ATPase from *Propionigenium modestum*. *FEBS Lett.* 316: 89 - 92.
- Gibbons, C., M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie und J. E. Walker** (2000) The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Struc. Biol.* 7: 1055 - 1061.
- Gillespie, G. A., S. Somlo, G. G. Germino, D. Weinstat-Saslow und S. T. Reeders** (1991) CpG island in the region of an autosomal dominant polycystic kidney disease locus defines the 5' end of a gene encoding a putative proton channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4289 - 4293.
- Girvin, M. E., V. K. Rastogi, F. Abildgaard, J. L. Markley und R. H. Fillingame** (1998). Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit *c* of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry* 37: 8817 - 8824.
- Glagolev, A. N. und V. P. Skulachev** (1978) The proton pump is a molecular engine of motile bacteria. *Nature* 272: 280 - 282.
- Golecki, J. R.** (1988) Analysis of the structure and development of bacterial membranes (outer, cytoplasmic and intracytoplasmic membranes). In: *Methods in Microbiology* (Mayer, F., Hrsg.), pp. 61 – 77, 20, Academic Press, London, UK.
- Gosink, K. K. und C. C. Häse** (2000) Requirements for conversion of the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio cholerae* to the H⁺-driven motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 4234 - 4240.
- Gößner, A., S. L. Daniel und H. L. Drake** (1994) Acetogenesis coupled to the oxidation of aromatic aldehyde groups. *Arch. Microbiol.* 161: 126 - 131.
- Gottwald, M., J. R. Andreasen, J. LeGall und L. G. Ljungdahl** (1975) Presence of cytochrome and menaquinone in *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 122: 325 - 328.
- Götz, R. und R. Schmitt** (1987) *Rhizobium meliloti* swims by unidirectional, intermittent rotation of right-handed flagellar helices. *J. Bacteriol.* 169: 3146 - 3150.
- Gourse, R. L., W. Ross und T. Gaal** (2000) UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promotor recognition. *Mol. Microbiol.* 37: 687 - 695.
- Graves, M. C. und J. C. Rabinowitz** (1986) *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium perfringens* ferredoxin gene. *J. Biol. Chem.* 261: 11409 – 11415.
- Greie, J.-C., G. Deckers-Hebestreit und K. Altendorf** (2000). Secondary structure composition of reconstituted subunit *b* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 267: 3040-3048.
- Groth, G. und E. Pohl** (2001) The structure of the chloroplast F₁-ATPase at 3.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 276: 1345 - 1352.

- Groth, G. und J. E. Walker** (1997) Model of the *c*-subunit oligomer in the membrane domain of F-ATPases. *FEBS Lett.* 410: 117 - 123.
- Groth, G., Y. Tilg und K. Schirwitz** (1998) Molecular architecture of the *c*-subunit oligomer in the membrane domain of F-ATPases probed by tryptophan scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 281: 49 - 59.
- Hama, H., T. Shimamoto, M. Tsuda und T. Tsuchiya** (1987) Properties of a Na⁺-coupled serine-threonine transport system in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 905: 231 - 239.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harrison, M., B. Powell, M. E. Finbow und J. B. C. Findlay** (2000) Identification of lipid-accessible sites on the *Nephrops* 16-kDa proteolipid incorporated into a hybrid vacuolar H⁺-ATPase: site-directed labeling with n-(1-pyrenyl)cyclohexylcarbodiimide and fluorescence quenching analysis. *Biochemistry* 39: 7531 – 7537.
- Hartzog, P. E. und B. D. Cain.** (1994) Second-site suppressor mutations at glycine 218 and histidine 245 in the *a* subunit of F₁F₀ ATP synthase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 32313 - 32317.
- Hasebe, M., H. Hanada, Y. Moriyama, M. Maeda und M. Futai** (1992) Vacuolar type H⁺-ATPase genes: presence of four genes including pseudogenes for the 16-kDa proteolipid subunit in the human genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 856 - 863.
- Hatch, L. P., G. B. Cox und S. M. Howitt** (1995) The essential arginine residue at position 210 in the *a* subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity. *J. Biol. Chem.* 270: 29407 - 29412.
- Hausrath, A. C., G. Grüber, B. W. Matthews und R. A. Capaldi** (1999) Structural features of the σ of the *Escherichia coli* F₁ ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13697 - 13702.
- Hayashi, M., Y. Nakayama und T. Unemoto** (1996) Existence of Na⁺-translocating NADH-quinone reductase in *Haemophilus influenzae*. *FEBS Lett.* 381: 174 - 176.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman und O. White** (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406: 477 - 483.
- Heinonen, J. E. und R. J. Lahti** (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphate. *Anal. Biochem.* 113: 313-317.
- Heise, R., V. Müller und G. Gottschalk** (1989) Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* 171: 5473 - 5478.

- Heise, R., J. Reidlinger, V. Müller und G. Gottschalk** (1991) A sodium-stimulated ATP synthase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. FEBS Lett. 295: 119 - 122.
- Heise, R., V. Müller und G. Gottschalk** (1992) Presence of a sodium-translocating ATPase in membrane vesicles of the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. Eur. J. Biochem. 206: 553 - 557.
- Heise, R., V. Müller und G. Gottschalk** (1993) Acetogenesis and ATP synthesis in *Acetobacterium woodii* are coupled via a transmembrane primary sodium ion gradient. FEMS Microbiol. Lett. 112: 261 - 268.
- Hermolin, J. und R. H. Fillingame** (1989) H⁺-ATPase activity of *Escherichia coli* F₁F₀ is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit *c*) of the F₀ complex. J. Biol. Chem. 264: 3896 - 3903.
- Hermolin, J., O. Y. Dmitriev, Y. Zhang und R. H. Fillingame** (1999) Defining the domain of binding of F₁ subunit ϵ with the polar loop of F₀ subunit *c* in the *Escherichia coli* ATP synthase. J. Biol. Chem. 274: 17011 - 17016.
- Hilario, E. und J. P. Gogarten** (1998) The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. J. Mol. Evol. 46: 703 - 715.
- Hilpert, W. und P. Dimroth** (1984) Reconstitution of Na⁺ transport from purified methylmalonyl-CoA decarboxylase and phospholipid vesicles. Eur. J. Biochem. 138: 579 - 583.
- Hirata, R., L. A. Graham, A. Takatsuki, T. H. Stevens und Y. Anraku** (1997) *VMA11* and *VMA16* encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H⁺-ATPase. J. Biol. Chem. 272: 4795 - 4803.
- Hirota, N. und Y. Imae** (1981) Flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* are powered by an electrochemical potential gradient of Na⁺. FEBS Lett. 132: 278 - 280.
- Hirota, N. und Y. Imae** (1983) Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1. J. Biol. Chem. 258: 10577 - 10581.
- Hisabori, T., A. Kondoh und M. Yoshida** (1999) The γ subunit in chloroplast F₁-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. FEBS Lett. 463: 35 - 38.
- Holmes, D. S. und M. Quigley** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197.
- Homma M. und T. Iino** (1985) Locations of hook-associated proteins in flagellar structure of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 162: 183 - 189.
- Homma, M., K. Kutsukake und T. Iino** (1985) Structural genes for flagellar hook-associated proteins in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 163: 464 - 471.
- Homma, M., D. J. DeRosier und R. M Macnab** (1990) Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. J. Mol. Biol. 213: 819 - 832.
- Honda, S., H. Uedaira, F. Vonderviszt, S.-I. Kidokoro und K. Namba** (1999) Folding energetics of a multidomain protein, flagellin. 293: 719 - 732.

- Hoppe, J. und W. Sebald** (1984) The proton conducting F_0 -part of bacterial ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 768: 1 - 27.
- Hoppe, J., H.U. Schairer und W. Sebald** (1980) The proteolipid of a mutant ATPase from *Escherichia coli* defective in H^+ -conduction contains a glycine instead of the carbodiimide-reactive aspartyl residue. *FEBS Lett.* 109: 107 - 111.
- Hoppe, J., J. Brunner und B. B Jorgensen** (1984) Structure of the membrane-embedded F_0 part of the F_1F_0 ATP synthase from *Escherichia coli* with 3-(trifluoromethyl)-3-(m-[125 I]iodophenyl)diazirin. *Biochemistry* 23: 5610-5616.
- Hugenholtz, J. und L. G. Ljungdahl** (1990) Metabolism and energy generation in homoacetogenic clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* 7: 383 - 389.
- Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon und J. E. Karlinsey** (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262: 1277 - 1280.
- Hungate, R. E.** (1969) A role tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology* (Norris, J.R. und D.W. Ribbons, Hrsg.), pp. 117-132, 3B, Academic Press, London, GB.
- Hunte, C., J. Koepke, C. Lange, T. Rossmanith und H. Michel** (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc_1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure Fold. Des.* 8: 669 - 684.
- Ide, N., T. Ikebe und K. Kutsukake** (1999) Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Genes Genet. Syst.* 74: 113 - 116.
- Ikeda, T., M. Homma, T. Iino, S. Asakura und R. Kamiya** (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J. Bacteriol.* 169: 1168 - 1173.
- Inatomi, K. I., M. Maeda und M. Futai** (1989) Dicyclohexylcarbodiimide-binding protein is a subunit of the *Methanosarcina barkeri* ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 1585 - 1590. *J. Bacteriol.* 179: 7135 - 7155.
- Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Irikura, V.M., M. Kihara, S. Yamaguchi, H. Sockett und R. M. Macnab** (1993) *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation and switching of the flagellar motor. *J. Bacteriol.* 171: 3247 - 3257.
- Ivey, D. M. und L. G. Ljungdahl** (1986) Purification and characterization of the F_1 -ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 165: 252 - 257.
- Iwata, S., J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy und B. K. Jap** (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* 281: 64 - 71.
- Jäger, H., R. Birkenhäger, W.-D. Stalz, K. Altendorf und G. Deckers-Hebestreit** (1988) Topology of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 251: 122-132.

- Jiang, W. und R. H. Fillingame** (1998) Interacting helical faces of subunit *a* and *c* in the F₁F₀ ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6607 - 6612.
- John, S. A., D. Saner, J. D. Pitts, A. Holzenburg, M. E. Finbow und R. Lal** (1997) Atomic force microscopy of arthropod gap junctions. J. Struct. Biol. 120: 22 - 31.
- Johnson, R. C., M. P. Walsh, B. Ely und L. Shapiro** (1979) Flagellar hook and basal complex of *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 138: 984 - 989.
- Johnson, R. G., Beers, M. F. und A. Scarpa** (1982) H⁺ ATPase of chromaffin granules. Kinetics, regulation, and stoichiometry. J. Biol. Chem. 257: 10701 - 10707.
- Jones, C. J., M. Homma und R. M. Macnab** (1987) Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 1489 - 1492.
- Jones, C. J., R. M. Macnab, H. Okina und S.-I. Aizawa** (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal body) complex of *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 212: 377 - 387.
- Jones, P. C. und R. H. Fillingame** (1998) Genetic fusions of subunit *c* in the F₀ sector of H⁺-transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. J. Biol. Chem. 273: 29701 - 29705.
- Jones, P. C., M. A. Harrison, Y.-I. Kim, M. E. Finbow und J. B. C. Findlay** (1995) The first putative transmembrane helix of the 16 kDa proteolipid lines a pore in the V₀ sector of the vacuolar H⁺-ATPase. Biochem. J. 312: 739 - 747.
- Jones P. C., W. Jiang und R. H. Fillingame** (1998). Arrangement of the multicopy H⁺-translocating subunit *c* in the membrane sector of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. J. Biol. Chem. 273: 17178 - 17185.
- Jones P. C., J. Hermolin, W. Jiang und R. H. Fillingame** (2000) Insights into the rotary catalytic mechanism of F₀F₁ ATP synthase from cross-linking of subunits *b* and *c* in the *Escherichia coli* enzyme. J. Biol. Chem. 275: 31340 - 31346.
- Joys, T. M.** (1988) The flagellar filament protein. Can. J. Microbiol. 34: 452 - 458.
- Kaim, G. und P. Dimroth** (1993) Formation of a functionally active sodium-translocating hybrid F₁F₀ ATPase in *Escherichia coli* by homologous recombination. Eur. J. Biochem. 218: 937 - 944.
- Kaim, G. und P. Dimroth** (1994) Construction, expression and characterization of a plasmid-encoded Na⁺-specific ATPase hybrid consisting of *Propionigenium modestum* F₀-ATPase and *Escherichia coli* F₁-ATPase. Eur. J. Biochem. 222: 615 - 623.
- Kaim, G. und P. Dimroth** (1998). A triple mutation in the *a* subunit of the *Escherichia coli*/*Propionigenium modestum* F₁F₀ ATPase hybrid causes a switch from Na⁺ stimulation to Na⁺ inhibition. Biochemistry 37: 4626 - 4636.
- Kaim, G., W. Ludwig, P. Dimroth und K. H. Schleifer** (1990) Sequence of subunits *a* and *b* of the sodium ion translocating adenosine triphosphate synthase of *Propionigenium modestum*. Nucleic Acids Res. 18: 6697.

- Kaim, G., F. Wehrle, U. Gericke und P. Dimroth** (1997). Molecular basis for the coupling ion selectivity of F_1F_0 ATP synthase: probing the liganding groups for Na^+ and Li^+ in the *c* subunit of the ATP synthase from *Propionigenium modestum*. *Biochemistry* 36: 9185 - 9194.
- Kaim, G., U. Matthey und P. Dimroth** (1998) Mode of interaction of the single *a* subunit with the multimeric *c* subunits during the translocation of the coupling ions by F_1F_0 ATPases. *EMBO J.* 17: 688 - 695.
- Kamiya, R., H. Hotani und S. Asakura** (1982) Polymorphic transition in bacterial flagella. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 35: 53 - 76.
- Karlinsey, J. E., S. Tanaka, V. Bettenworth, S. Yamaguchi, W. Boos, S.-I. Aizawa und K. T. Hughes** (2000) Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol. Microbiol.* 37: 1220 - 1231.
- Kashket, E. R.** (1982) Stoichiometry of the H^+ -ATPase of growing and resting, aerobic *Escherichia coli*. *Biochemistry* 21: 5534 - 5548.
- Katayama, E., T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba und S.-I. Aizawa** (1996) Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereophotogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J. Mol. Biol.* 255: 458 - 475.
- Kawagishi, I., Y. Maekawa, T. Atsumi, M. Homma und Y. Imae** (1995) Isolation of the polar and lateral flagellum-deficient mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy source. *J. Bacteriol.* 177: 5158 - 5160.
- Khan, I. H., T. S. Reese und S. Khan** (1992a) The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5956 - 5960.
- Khan, S. und H. C. Berg** (1983) Isotope and thermal effects in chemiosmotic coupling to the flagellar motor of *Streptococcus*. *Cell* 32: 913 - 919.
- Khan, S., M. Dapice und T. S. Reese** (1988) Effects of *mot* gene expression on the structure of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 202: 575-584.
- Khan, S., I. H. Khan und T. S. Reese** (1991) New structural features of the flagellar base in *Salmonella typhimurium* revealed by rapid -freeze electron microscopy. *J. Bacteriol.* 173: 2888 - 2896.
- Khan, S., D. M. Ivey und T. A. Krulwich** (1992b) Membrane ultrastructure of alkaliphilic *Bacillus* species studied by rapid-freeze electron microscopy. *J. Bacteriol.* 174: 5123-5126.
- Khan, S., R. Zhao und T. S. Reese** (1998) Architectural features of the *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch revealed by disrupted C-rings. *J. Struct. Biol.* 122: 311 - 309.
- Khan, S., D. Pierce und R. D. Vale** (2000) Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy. *Curr. Biol.* 10: 927 - 930.
- Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi und R. M. Macnab** (2001) Intergenic Suppression between the Flagellar MS Ring Protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a Membrane Component of Its Export Apparatus. *J. Bacteriol.* 183: 1655 - 1662.

- Kim, Y. K. und L. L. McCarter** (2000) Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 182: 3693 - 3704.
- Kluge, C. und P. Dimroth** (1993a) Kinetics of inactivation of the F₁F₀ ATPase of *Propionigenium modestum* by dicyclohexylcarbodiimide in relationship to H⁺ and Na⁺ concentration: probing the binding site for the coupling ions. Biochemistry 32: 10378 - 10386.
- Kluge, C. und P. Dimroth** (1993b) Specific protection by Na⁺ or Li⁺ of the F₁F₀-ATPase of *Propionigenium modestum* from the reaction with dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem. 268: 14557 - 14560.
- Kojima, S., T. Atsumi, K. Muramoto, S. Kudo, I. Kawagishi und M. Homma** (1997) *Vibrio alginolyticus* mutants resistant to phenamil, a specific inhibitor of the sodium-driven flagellar motor. J. Mol. Biol. 265: 310 - 318.
- Kojima, S., K. Yamamoto, I. Kawagishi und M. Homma** (1999a) The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na⁺ motive force. J. Bacteriol. 181: 1927 - 1930.
- Kojima, S., Y. Asai, T. Atsumi, I. Kawagishi und M. Homma** (1999b) Na⁺-driven flagellar motor resistant to phenamil, an amiloride analog, caused by mutations in putative channel components. J. Mol. Biol. 285: 1537 - 1547.
- Komeda, Y., M. Silverman und M. Simon** (1978) Identification of the structural gene for the hook subunit protein of *Escherichia coli* flagella. J. Bacteriol. 133: 364 - 371.
- Kostrzynska, M., J. D. Betts, J. W. Austin und T. J. Trust** (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. J. Bacteriol. 173: 937 - 946.
- Kresze, G.-B.** (1983) Methods for protein determination. In: Methods of enzymatic analysis. (Bermeyer, H. U., Hrsg.), 2, pp. 84 - 99, , 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, BRD.
- Krumholz, L. R., U. Esser und R. D. Simoni** (1992) Characterization of the genes coding for the F₁F₀ subunits of the sodium dependent ATPase of *Propionigenium modestum*. FEMS Microbiol Lett. 70: 37 - 41.
- Kubori, T., M. Okumura, N. Kobayashi, D. Nakamura, M. Iwakura und S.-I. Aizawa** (1997) Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 24: 399-410.
- Kunio, I., W. Satoshi, S. Kenichiro und M. Yasuo** (1996) DCCD binding proteolipid from extremely halophilic Archaeon *Halobacterium salinarum*: Archaeal proteolipid have both characteristics from F-type ATPase and V-type ATPase. Genbank Nr. D86915.
- Larsen, S. H., R. W. Reader, E. N. Kort, W. W. Tso und J. Adler** (1974a) Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. Nature 249: 74 - 77.
- Larsen, S. H., J. Adler, J. J. Gargus und R. W. Hogg** (1974b) Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1239 - 1243.

- Laubinger, W. und P. Dimroth** (1987) Characterization of the Na⁺-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F₁F₀ type. Eur. J. Biochem. 168: 475 - 480.
- Laubinger, W. und P. Dimroth** (1988) Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. Biochemistry 27: 7531 - 7537.
- Läuger, P.** (1977) Ion transport and rotation of bacterial flagella. Nature. 268: 360 - 362.
- Läuger, P.** (1988) Torque and rotation rate of the bacterial flagellar motor. Biophys. J. 53: 53 - 65.
- LaVallie, E. R. und M. L. Stahl** (1989) Cloning of the flagellin gene from *Bacillus subtilis* and complementation studies of an *in vitro*-derived deletion mutation. J. Bacteriol. 171: 3085 - 3094.
- Lee, S. Y., H. S. Cho, J. G. Pelton, D. Yan, R. K. Henderson, D. S. King, L. Huang, S. Kustu, E. A. Berry und D. E. Wemmer (2001) Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. Nat. Struct. Biol. 8: 52 - 56.
- Leirmo, S. und R. L. Gourse** (1991) Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription. I. Kinetic analysis of the roles of the upstream activator region and supercoiling on transcription of the *rrnB* P1 promoter *in vitro*. J. Mol. Biol. 220: 555 - 568.
- Lewis, M. J., J. A. Chang und R. D. Simoni** (1990) A topological analysis of subunit *a* from *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase predicts eight transmembrane segments. J. Biol. Chem. 265: 10541-10550.
- Lightowers, R. N., S. M. Howitt, L. Hatch, F. Gibson und G. B. Cox** (1987) The proton pore in the *Escherichia coli* F₀F₁-ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the *a*-subunit. Biochim. Biophys. Acta 894: 399-406.
- Lightowers, R. N., S. M. Howitt, L. Hatch, F. Gibson und G. B. Cox** (1988) The proton pore in the *Escherichia coli* F₀F₁-ATPase: substitution of glutamate by glutamine at position 219 of the *a*-subunit prevents F₀-mediated proton permeability. Biochim. Biophys. Acta 933: 241-248.
- Lloyd, S. A. und D. F. Blair** (1997) Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 266: 733 - 744.
- Lloyd, S. A., H. Tang, X. Wang, S. Billings und D. F. Blair** (1996) Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence for a direct role for FliG but not FliM or FliN. J. Bacteriol. 178: 223 - 231.
- Lloyd, S. A., F. G. Whitby, D. F. Blair und C. P. Hill** (1999) Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. Nature 400: 472 - 475.
- Logan, S. M., T. J. Trust und P. Guerry** (1989). Evidence for posttranslational modification and gene duplication in *Campylobacter flagellin*. J. Bacteriol. 171: 3031 - 3038.
- Lonetto, M., M. Gribskov und C. A. Gross** (1992) The σ^{70} family: conservation and evolutionary relationships. J. Bacteriol. 174: 3843 - 3849.
- Long, J. C., S. Wang und S. B. Vik** (1998). Membrane topology of subunit *a* of the F₁F₀ ATP synthase as determined by labeling of unique cystein residues. J. Biol. Chem. 273: 16235-16240.
- Lowry, O. H., N. L. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall** (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Lübben, M. und G. Schäfer** (1989) Chemiosmotic energy conversion of the archaebacterial thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: oxidative phosphorylation and the presence of an F₀-related N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid. *J. Bacteriol.* 171: 6106 - 6116.
- Lücken, U., E. P. Gogol und R. A. Capaldi** (1990) Structure of the ATP synthase complex (ECF₁F₀) of *Escherichia coli* from cryoelectron microscopy. *Biochemistry* 29: 5339 -5243.
- Ludwig, W., G. Kaim, W. Laubinger, P. Dimroth, J. Hoppe und K. H. Schleifer** (1990) Sequence of subunit *c* of the sodium ion translocating adenosine triphosphate synthase of *Propionigenium modestum*. *Eur. J. Biochem.* 193: 395 - 399.
- Lux, R., N. Kar und S. Khan** (2000) Overproduced *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch complexes. 298: 577 -583.
- Macnab, R. M.** (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26: 131-158.
- Macnab, R. M.** (1996) Flagella and Motility. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger, Hrsg.), pp. 123 - 145, 2. Auflage, ASM Press, Washington, DC.
- Macnab, R. M. und D. E. Koshland** (1972) The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2509 - 2512.
- Maloney, P. und T. H. Wilson** (1985) The evolution of ion pumps. *BioScience* 35: 43 - 48.
- Mandel, M., Y. Moriyama, J. D. Hulmes, Y. C Pan, H. Nelson und N. Nelson** (1988) cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5521 - 5524.
- Manson, M. D., P. Tedesco, H. C. Berg, F. M. Harold und C. van der Drift** (1977) A proton motive force drives bacterial flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3060 - 3064.
- Marquez-Magana, L. M. und M. J. Chamberlin** (1994) Characterization of the *sigD* transcription unit of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 176: 2427 - 2434.
- Matsura, S., J. Shioi und Y. Imae** (1977) Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial protonmotive force. *FEBS Lett.* 82: 187 - 190.
- Matthews, M. A., H. L. Tang und D. F. Blair** (1998) Domain analysis of the FliM protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 5580 - 5590.
- Matthey, U., G. Kaim, D. Braun, K. Wüthrich und P. Dimroth** (1999) NMR studies of subunit *c* of the ATP synthase from *Propionigenium modestum* in dodecylsulphate micelles. *Eur. J. Biochem.* 261: 459 - 467.
- Mayer, F., R. Lurz und S. Schoberth** (1977) Electron microscopic investigation of the hydrogen-oxidizing acetate-forming anaerobic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 115: 207 - 213.

- McCarter, L. L.** (1994a) MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* 176: 5988 - 5998.
- McCarter, L. L.** (1994b) MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* 176: 4219 - 4225.
- McCarthy, J. E.** (1990) Post-transcriptional control in the polycistronic operon environment: studies of the *atp* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4: 1233 - 1240.
- McCarthy, J. E., H. U. Schairer und W. Sebald** (1985) Translational initiation frequency of *atp* genes from *Escherichia coli*: identification of an intercistronic sequence that enhances translation. *EMBO J.* 4: 519 - 526.
- McLachlin D. T., J. A. Bestard und S. D. Dunn** (1998). The *b* and δ subunits of the *Escherichia coli* ATP synthase interact *via* residues in their C-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 273: 15162-15168.
- McLachlin, D. T., A. M. Coveny, S. M. Clark und S. D. Dunn** (2000). Site-directed cross-linking of *b* to the α , β and *a* subunits of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 275: 17571-17577.
- Meister, M., S. R. Caplan und H. C. Berg** (1989) Dynamics of a tightly coupled mechanism for flagellar rotation. Bacterial motility, chemiosmotic coupling, protonmotive force. *Biophys. J.* 55: 905 - 914.
- Miller, J. B. und D. E. Koshland** (1977) Sensory electrophysiology of bacteria: relationship of the membrane potential to motility and chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4752 - 4756.
- Miller, M. J., D. Fraga, C. R. Paule und R. H. Fillingame** (1989) Mutations in the conserved proline 43 residue of the *uncE* protein (subunit *c*) of *Escherichia coli* F₁F₀-ATPase alter the coupling of F₁ to F₀. *J. Biol. Chem.* 264: 305 - 311.
- Mimori-Kiyosue, Y., I. Yamashita, K. Murata, Y. Fujoyoshi, K. Yonekura, C. Toyoshima und K. Namba** (1995) The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* 249: 69 - 87.
- Mimori-Kiyosue, Y., I. Yamashita, Y. Fujiyoshi, S. Yamaguchi und K. Namba** (1998) Role of the outermost subdomain of *Salmonella* flagellin in the filament structure revealed by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* 284: 521 - 530.
- Minamino, T. und R. M. Macnab** (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* 181: 1388 - 1394.
- Minamino, T. und R. M. Macnab** (2000) FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol. Microbiol.* 37: 1494 - 1503.

- Mirel, D. B., V. M. Lustre und M. J. Chamberlin** (1992) An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the sigma D form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 174: 4197 - 4204.
- Mirel, D. B., P. Lauer und M. J. Chamberlin** (1994) Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a sigma D-dependent operon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 4492 - 4500.
- Mitchell, P.** (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144 - 148.
- Morgan, D. G., C. Owen, L. A. Melanson und D. J. DeRosier** (1995) Structure of bacterial flagella filament at 11 Å resolution: packing of the α -helices. *J. Mol. Biol.* 249: 88 - 110.
- Mosher, M. E., L. K. White, J. Hermolin und R. H. Fillingame** (1985) H⁺-ATPase of *Escherichia coli*. An *uncE* mutation impairing coupling between F₁ and F₀ but not F₀-mediated H⁺ translocation. *J. Biol. Chem.* 260: 4807 - 4814.
- Müller V. und S. Bowien** (1995) Differential effects of sodium ions on motility in the homoacetogenic bacteria *Acetobacterium woodii* and *Sporomusa sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 164: 363 - 369.
- Müller, V., C. Winner und G. Gottschalk** (1988) Electron-transport-driven sodium extrusion during methanogenesis from formaldehyde and molecular hydrogen by *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* 178: 519 - 525.
- Müller, V., C. Ruppert und T. Lemker** (1999) Structure and function of the A₁A₀-ATPases from methanogenic archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31: 15 - 27.
- Müller V., S. Aurfurth und S. Rahlfs** (2001) The Na⁺ cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na⁺-translocating F₁F₀-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. *Biochim Biophys Acta* 1505: 108 - 120.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor, USA, Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- Muramoto, K., S. Sugiyama, E. J. Cragoe und Y. Imae** (1994) Successive inactivation of the force-generating units of sodium-driven bacterial flagellar motors by a photoreactive amiloride analog. *J. Biol. Chem.* 269: 3374 - 3380.
- Namba, K., I. Yamashita und F. Vonderviszt** (1989) Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* 342: 648 - 654.
- Neff, D. und N. A. Dencher** (1999) Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast F₀F₁-ATP synthase, CF₀ and CF₁ by blue native electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 569 - 575.

- Nelson, N. und I. Taiz** (1989) The evolution of H⁺-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* 14: 113 - 116.
- Nelson, N. und W. R. Harvey** (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol. Rev.* 79: 361 – 386.
- Nishigori, H., S. Yamada, H. Tomura, A. A. Fernald, M. M. Le Beau, T. Takeuchi und J. Takeda** (1998) Identification and characterization of the gene encoding a second proteolipid subunit of human vacuolar H⁺-ATPase (ATP6F). *Genomics* 50: 222 – 228.
- Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida und K. Kinosita** (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* 386: 299 - 302.
- Noumi, T., C. Beltra, H. Nelson, and N. Nelson** (1991) Mutational analysis of yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1938 – 1942.
- Oka, T., R. Yamamoto und M. Futai** (1997) Three *vha* genes encode proteolipids of *Caenorhabditis elegans* vacuolar-type ATPase. Gene structures and preferential expression in an H-shaped excretory cell and rectal cells. *J. Biol. Chem.* 272: 24387 – 24392.
- Olendzenski, L., E. Hilario und J. P. Gogarten** (1998) Horizontal gene transfer and fusing lines of descent: the Archaeobacteria - a chimera ? In: *Horizontal gene transfer* (Syvanen, M. und C. I. Kado, Hrsg.) pp. 349 - 362, Chapman & Hall, New York, USA.
- Ordal, G. W., D. O. Nettleton und J. A. Hoch** (1983) Genetics of *Bacillus subtilis* chemotaxis: isolation and mapping of mutations and cloning of chemotaxis genes. *J. Bacteriol.* 154: 1088 – 1097.
- Ordal, G. W., L. Marquez-Magana und M. J. Chamberlin** (1993) Motility and chemotaxis. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics (Sonensheim, A. L., J. A. Hoch und R. Losick, Hrsg.), pp. 765 – 784, American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Ostermeier, C., S. Iwata, B. Ludwig und H. Michel** (1995) Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase. *Nat. Struct. Biol.* 2: 842 - 846.
- Pali, T., M. E. Finbow und D. Marsh** (1999) Membrane assembly of the 16-kDa proteolipid channel from *Nephrops norvegicus* studied by relaxation enhancements in spin-label ESR. *Biochemistry* 38:14311 - 14319.
- Pänke, O., K. Gumbiowski, W. Junge und S. Engelbrecht** (2000) F-ATPase: specific observation of the rotating *c* subunit oligomer of EF₀F₁. *FEBS Lett.* 472: 34 - 38.
- Park, C., J. Y. Moon, P. Cokic und D. A. Webster** (1996) Na⁺-translocating cytochrome bo terminal oxidase from *Vitreoscilla*: some parameters of its Na⁺ pumping and orientation in synthetic vesicles. *Biochemistry.* 35: 11895 - 11900.

- Pitard, B., P. Richard, M. Dunach, G. Girault und J. L. Rigaud** (1996) ATP synthesis by the F_0F_1 ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3 reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin. 1. Factors defining the optimal reconstitution of ATP synthases with bacteriorhodopsin. Eur. J. Biochem. 235: 769 - 778.
- Powell, B., L. A. Graham und T. H. Stevens** (2000) Molecular characterization of the yeast vacuolar H^+ -ATPase proton pore. J. Biol. Chem. 275: 23654 - 23660.
- Ragsdale, S. W.** (1991) Enzymology of the acetyl-CoA-pathway of CO_2 fixation. Cri. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 261 - 300.
- Rahlfs, S.** (1998) Klonierung und molekularbiologische Analyse der Gene der Na^+ -translozierenden F_1F_0 -ATPase aus *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Rahlfs, S. und V. Müller** (1997) Sequence of subunit *c* of the Na^+ -translocating F_1F_0 ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for determinants of Na^+ specificity as revealed by sequence comparisons. FEBS Lett. 404: 269-271.
- Rahlfs, S. und V. Müller** (1999) Sequence of subunit *a* of the Na^+ -translocating F_1F_0 -ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for residues involved in Na^+ -binding. FEBS Lett. 453: 35 - 40.
- Rahlfs, S., S. Aufurth und V. Müller** (1999) The Na^+ - F_1F_0 -ATPase operon from *Acetobacterium woodii*. Operon structure and presence of multiple copies of *atpE* which encode proteolipids of 8- and 18-kDa. J. Biol. Chem. 274: 33999 - 34004.
- Rao, L., W. Ross, J. A. Appleman, T. Gaal, S. Leirmo, P. Schlax und R. L. Gourse** (1994) Factor independent activation of *rrnB* P1. An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. J. Mol. Biol. 235: 1421 - 1435.
- Rastogi, V. K. und M. E. Girvin** (2000) Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase. Nature 402: 263 -268.
- Ravid, S. und M. Eisenbach** (1984) Minimal requirements for rotation of bacterial flagella. J. Bacteriol. 158: 1208 - 1210.
- Record, M. T., W. S. Reznikoff, M. L. Craig, K. L. McQuade und P. J. Schlax** (1996) *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology (Neidhardt, F. C., R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low und B. Magasanik, Hrsg.) pp. 792 - 820, 2. Auflage, American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Reidlinger, J.** (1994) Reinigung und Charakterisierung einer Na^+ -translozierenden F_1F_0 -ATPase aus *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, BRD.
- Reidlinger, J. und V. Müller** (1994) Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as Na^+ -translocating F_1F_0 -type enzyme. Eur. J. Biochem. 356: 275 - 283.

- Reidlinger, J., F. Mayer und V. Müller** (1994) The molecular structure of the Na⁺-translocating F₁F₀-ATPase of *Acetobacterium woodii*, as revealed by electron microscopy, resembles that of Na⁺-translocating ATPases. *FEBS Lett.* 356: 17 - 20.
- Revington, M., D. T. McLachlin, G. S. Shaw und S. D. Dunn** (1999). The dimerization domain of the *b* subunit of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274: 31094-31101.
- Rodgers, A. J. W, S. Wilkens, R. Aggeler, M. B. Morris, S. M. Howitt und R. A. Capaldi** (1997) The subunit α -subunit *b* domain of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 31058-31064.
- Rosenberg, M. und D. Court** (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319 - 353.
- Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zhou, A. Ishihama, K. Severinov und R. L. Gourse** (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262: 1407 - 1413.
- Ruppert, C., S. Wimmers, T. Lemker und V. Müller** (1998) The A₁A₀ 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.
- Ruppert, C., H. Kavermann, S. Wimmers, R. Schmid, J. Kellermann, F. Lottspeich, H. Huber, K. O. Stetter und V. Müller** (1999) The proteolipid of the A₁A₀ ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. *J. Biol. Chem.* 274: 25281 - 25284.
- Ruppert, C., R. Schmid, R. Hedderich und V. Müller** (2001) Selective extraction of subunit D of the Na⁺-translocating methyltransferase and subunit *c* of the A₁A₀ 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.
- Sabbert, D., S. Engelbrecht und W. Junge** (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* 381: 623 - 625.
- Sakai, H., C. Imamura, Y. Osada, R. Saito, T. Washio und M. Tomita** (2001) Correlation between Shine-Dalgarno sequence conservation and codon usage of bacterial genes. *J. Mol. Evol.* 52: 164 - 170.
- Sambongi, Y., Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada und M. Futai** (1999) Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* 286: 1722 - 1724.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA.

- Sanger, F., S. Nicklein und A. R. Coulson** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
- Sato, K. und M. Homma** (2000) Functional reconstitution of the Na⁺-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem. 275: 5718 - 5722.
- Schäfer, G. und M. Meyering-Vos** (1992) The plasma membrane ATPase of archaebacteria. A chimeric energy converter. Ann. NY Acad. Sci. 671: 293 - 309.
- Schäfer, G., M. Engelhard und V. Müller** (1999) Bioenergetics of the Archaea. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 570 - 620.
- Schägger, H.** (1994) Native gel electrophoresis. In: A practical guide to membrane protein purification (von Jagow, G. and H. Schägger, Hrsg.) pp. 81-106, Academic Press, San Diego, USA
- Schägger, H. und G. von Jagow** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.
- Schaubach, O. L. und A. J. Dombroski** (1999) Transcription initiation at the flagellin promotor by RNA polymerase carrying σ^{28} from *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 274: 8757 - 8763.
- Scheel, E. und G. Schäfer** (1990) Chemiosmotic energy conversion and the membrane ATPase of *Methanoblobus tindarius*. Eur. J. Biochem. 187: 727 - 735.
- Schmidt, R. A., D. K. W. Hsu, G. Deckers-Hebestreit, K. Altendorf und W. S. A Brusilow** (1995) The effects of an *atpE* ribosome-binding site mutation on the stoichiometry of the *c* subunit in the F₁F₀ ATPase of *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 323: 423 – 428.
- Schmidt, R. A., J. Qu, J. R. Williams und W. S. A. Brusilow** (1998). Effects of carbon source on expression of F₀ genes and on the stoichiometry of the *c* subunit in the F₁F₀ ATPase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180: 3205 – 3208.
- Schmidt, A. L. und D. P. Briskin** (1993) Energy transduction in tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue: H⁺/substrate stoichiometries for the H⁺-ATPase and H⁺-PPase. Arch. Biochem. Biophys. 301: 165 - 173.
- Schmidt, K., S. Liaanen-Jensen und H. G. Schlegel** (1963) Die Carotinoide der Thiorhodaceae. Arch. Microbiol. 138: 117-126.
- Schneider E. und K. Altendorf** (1987) Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F₁F₀): purification and reconstitution of F₀ complexes and biochemical and functional characterization of their subunits. Microbiol. Rev. 51: 477- 497.
- Schneppe, B., G. Deckers-Hebestreit und K. Altendorf** (1991) Detection and localization of the *i* protein in *Escherichia coli* cells using antibodies. FEBS Lett. 292: 145 - 147.

- Schuster, S. C. und E. Baeuerlein** (1989) Basal body associated disks as new structural elements of the flagella apparatus of *Wollinella succinogenes*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370: 9580-9583.
- Schuster, S. C. und S. Khan** (1994) The bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 509 - 539.
- Seelert, H., A. Poetsch, N. A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg und D. J. Müller** (2000). Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* 405: 418 - 419.
- Sharp, L. L., J. Zhou und D. F. Blair** (1995a) Features of MotA proton channel structure revealed by tryptophan-scanning mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7946 - 7950.
- Sharp, L. L., J. Zhou und D. F. Blair** (1995b) Tryptophan-scanning mutagenesis of MotB, an integral membrane protein essential for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34: 9166 - 9171.
- Shine, J. und L. Dalgarno** (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1342 - 1346.
- Shirakihara, Y., A. G. W. Leslie, J. P. Abrahams, J. E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kamnbara, K. Saika, Y. Kagawa und M. Yoshida** (1997) The crystal structure of the nucleotide-free $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of F₁-ATPase from the thermophilic bacterium PS3 is a symmetric trimer. *Structure* 5: 825 - 836.
- Sholtz, K. F., I. A. Gorskaya und A. V. Kotelnikova** (1983) The stoichiometry of proton translocation through H⁺-ATPase of rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 136: 129 - 134.
- Silverman, M. und M. Simon** (1972) Flagellar assembly mutants in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112: 986 - 993.
- Silverman, M. und M. Simon** (1973) Genetic analysis of flagellar mutants in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 113: 105 - 113.
- Silverman, M. und M. Simon** (1974) Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* 249: 73 - 74.
- Singh, S. P. Turina, C. J. Bustamente, D. J. Keller und R. Capaldi** (1996) Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase in aqueous buffer. *FEBS Lett.* 397: 30 - 34.
- Skulachev, V. P.** (1994) Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetics concepts. *Antonie van Leeuwenhoek* 65: 271 - 284.
- Smith, D. R., L. A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, H., Safer, D. Patwell, S. Prabhakar, S. McDougall, G. Shimer,**

- A. Goyal, S. Pietrokovski, G. M. Church, C. J. Daniels, J.-I. Mao, P. Rice, J. Nölling und J. N. Reeve** (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* □H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179: 7135 - 7155.
- Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V. M. Irikura und R. M. Macnab** (1992) Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 174: 793 - 806.
- Soldo B., V. Lazarevic, C. Mauel und D. Karamata** (1996) Sequence of the 305 degrees-307 degrees region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiology* 142: 3079 - 3088.
- Soto, E. F., J. M. Pasquini, R. Placido und J. L. La Torre** (1969) Fractionation of lipids and proteolipids from cat grey white matter by chromatography on an organophilic dextran gel. *J. Chromatogr.* 41: 400- 409.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Speelmans, G., B. Poolman, T. Abee und W. N. Konings** (1994) The F- or V-type Na⁺-ATPase of the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. *J. Bacteriol.* 176: 5160 - 5162.
- Spruth, M., J. Reidlinger und V. Müller** (1994) Sodium ion dependence of inhibition of the Na⁺-translocation F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii*. Probing the site(s) involved in ion transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 96 -102.
- Stader, J., P. Matsumura, D. Vacante, G. E. Dean und R. M. Macnab** (1986) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *motB* gene and site-limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 166: 244 - 252.
- Stock, D., A. G. W Leslie und J. E. Walker** (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286: 1700 - 1705.
- Stolz, B. und H. C. Berg** (1991) Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 7033 - 7077.
- Sugiyama, S., E. J. Cragoe und Y. Imae** (1988) Amiloride, a specific inhibitor for the Na⁺-driven flagellar motor of alkalophilic *Bacillus*. *J. Biol. Chem.* 263: 8215 - 8219.
- Sumi, M., M. Yohda, Y. Koga und M. Yoshida** (1997) F₀F₁-ATPase genes from an archaebacterium *Methanosarcina barkeri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 427 - 433.
- Svergun, D. I., I. Aldag, T. Sieck, K. Altendorf, M. H. J. Kock, D. J. Kane, M. B. Kozin und G. Grüber** (1998) A model of the quaternary structure of the *Escherichia coli* F₁ ATPase from x-ray solution scattering and evidence for structural changes in the δ subunit during ATP hydrolysis. *Biophys. J.* 75: 2212 - 2219.
- Takase, K., I. Yamamoto und Y. Kakinuma** (1993) Cloning and sequencing of the genes coding for the A and B subunits of vacuolar-type Na⁺-ATPase form *Enterococcus hirae*.

Coexistence of vacuolar- and F_1F_0 -type ATPases in one bacterial cell. *J. Biol. Chem.* 268: 11610 - 11616.

Takase, K., S. Kakinuma, I. Yamato, K. Konishi, K. Igarashi und Y. Kakinuma (1994) Sequencing and characterization of the *ntp* gene cluster for Na^+ -translocating ATPase in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 269: 11037 – 11044.

Takeyasu, K., H. Omote, S. Nettikadan, F. Tokumasu, A. Iwamoto-Kihara und M. Futai (1996) Molecular imaging of *Escherichia coli* F_0F_1 -ATPase in reconstituted membranes by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 392: 110-113.

Taylor, B. L. und D. E. Koshland (1974) Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation of changes in direction. *J. Bacteriol.* 119: 640 - 642.

Thomas, D. R., D. G. Morgan und D. J. DeRosier (1999) Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10134 - 10139.

Toker, A. S und R. M. Macnab (1997) Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J. Mol. Biol.* 273: 623 - 634.

Tokuda, H. und T. Unemoto (1984) Na^+ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 259: 7785 - 7790.

Trachtenberg, S. und D. J. DeRosier (1992) Conformational switching in the flagellar filament of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 226: 447 - 454.

Tschech, A. und N. Pfennig (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 137: 163-167.

Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono und S. Yoshikawa (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272: 1136 - 1144.

Tsunoda, S. P., R. Aggeler, H. Noji, K. Kinoshita, M. Yoshida und R. A. Capaldi (2000) Observations of rotation within the F_0F_1 -ATP synthase: deciding between rotation of the F_0C subunit ring and artifact. *FEBS Lett.* 470: 244 - 248.

Tsunoda, S. P., R. Aggeler, M. Yoshida und R. A. Capaldi (2001) Rotation of the *c* subunit oligomer in fully functional F_1F_0 ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 898 - 902.

Ubbink-Kok, T., E. J. Boekema, J. F. van Breemen, A. Brisson, W. N. Konings und J. S. Lolkema (2000) Stator structure and subunit composition of the V_1V_0 Na^+ -ATPase of the thermophilic bacterium *Caloramator fervidus*. *J. Mol. Biol.* 296: 311 – 321.

Ueno, T., K. Oosawa und S.-I. Aizawa (1992) M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal bod of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J. Mol. Biol.* 227: 672 - 677.

Uhlin, U., G. B. Cox und J. M. Gay (1997) Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure* 5: 1219 - 1230.

- Umemoto, N., Y. Ohya und Y. Anraku** (1991) *VMA11*, a novel gene that encodes a putative proteolipid, is indispensable for expression of yeast vacuolar membrane H⁺-ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 266: 24526–24532.
- Vaituzis, Z. und R. N. Doetsch** (1969) Relationship between cell wall, cytoplasmic membrane, and bacterial motility. *J. Bacteriol.* 100: 512 - 521.
- van der Rest, M. E., D. Molenaar, und W. N. Konings** (1992) Mechanism of Na⁺-dependent citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 174: 4893 - 4898.
- Valentine, R. C., B. M. Shapiro und E. R. Stadtman** (1968) Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *E. coli*. *Biochemistry* 7: 2143 - 2152.
- Valiyaveetil, F. I. und R. H. Fillingame** (1997) On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit *a* in proton translocation by the *Escherichia coli* F₀F₁-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 272: 32635-32461.
- Valiyaveetil, F. I. und R. H. Fillingame** (1998) Transmembrane topography of subunit *a* in the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 273: 16241-16247.
- Velour, J., P. Paumard, V. Soubannier, C. Spannagel, J. Vaillier, G. Arselin und P.-V. Graves** (2000) Organisation of the yeast ATP synthase F₀: a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 1458: 443 - 456.
- Vik, S. B. und B. J. Antonio** (1994) A mechanism of proton translocation by F₁F₀ ATP synthases suggested by double mutants of the *a* subunit. *J. Biol. Chem.* 269: 30364 - 30369.
- Vogelstein, B. und D. Gillespie** (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615 – 619.
- Vonderviszt, F., H. Uedaira, S.-I. Kidokoro und K. Namba** (1990) Structural organization of flagellin. *J. Mol. Biol.* 214: 97 - 104.
- Vonderviszt, F., P. Zavodsky, M. Ishimura, H. Uedaira und K. Namba** (1995) Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 251: 520 - 532.
- Vonderviszt, F., K. Imada, Y. Furukawa, H. Uedaira, H. Taniguchi und K. Namba** (1998) Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2. *J. Mol. Biol.* 284: 1399 - 1416.
- Wada, T., J. C. Long, D. Zhang und S. B. Vik** (1999) A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 274: 17353-17357.
- Walker, J. E., M. Saraste und N. J. Gay** (1984) The *unc* operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 768: 164 - 200.
- Walz, D. und S. R. Caplan** (2000) An electrostatic mechanism closely reproducing observed behavior in the bacterial flagellar motor. *Biophys. J.* 78: 626 - 651.

- Watts, S. D., Y. Zhang, R. H. Fillingame und R. A. Capaldi** (1995) The γ subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF_1F_O) extends through the stalk and contacts the *c* subunits of the F_O part. *FEBS Lett.* 368: 235 - 238.
- Watts, S. D., C. Tang und R. A. Capaldi** (1996) The stalk region of the *Escherichia coli* ATP synthase. Tyrosine 205 of the γ subunit is in the interface between F_1 and F_O parts and can interact with both the ϵ and *c* oligomer. *J. Biol. Chem.* 271: 28341 - 28347.
- Weber, K. und M. Osborn** (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 224: 4406-4412.
- Wilkens, S. und R. A. Capaldi** (1994) Asymmetry and structural changes in ECF_1 examined by cryoelectron microscopy. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 43 - 51.
- Wilkens, S. und R. A. Capaldi** (1998). ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* 303: 29.
- Wilkens, S., J. Zhou, R. Nakayama, S. D. Dunn und R. A. Capaldi** (1999) Localization of the δ subunit in the *Escherichia coli* F_1F_O -ATP synthase by immuno electron microscopy: The δ subunit binds on top of F_1 . *J. Mol. Biol.* 295: 387 - 391.
- Wood, H. G.** (1991) Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. *FASEB J.* 5: 156 - 163.
- Xia, D., C. A. Yu, H. Kim, J. Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu und J. Deisenhofer** (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc*₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277: 60 - 66.
- Yamada, H., Y. Moriyama, M. Maeda und M. Futai** (1996). Transmembrane topology of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (ATP synthase) subunit *a*. *FEBS Lett.* 390: 34-38.
- Yanish-Perron, C., J. Vieira und J. Messing** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yasuda, R., H. Noji, K. Kinosita und M. Yoshida** (1998) F_1 -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* 93: 1117 - 1124.
- Yokoyama, K., T. Oshima und M. Yoshida** (1990) *Thermus thermophilus* membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 21946 - 21950.
- Yokoyama, K., E. Muneyuki, T. Amano, S. Mizutani, M. Yoshida, M. Ishida und S. Ohkuma** (1998) V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.* 273: 20504 - 20510.
- Yokoyama, K., S. Ohkuma, H. Taguchi, T. Yasunaga, T. Wakabayashi und M. Yoshida** (2000) V-type H⁺-ATPase/synthase from thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* 275: 13955 - 13961.

- Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada und K. Namba** (2000) The bacterial flagellar cap as a rotary promotor of flagellin self-assembly. *Science* 290: 2148 - 2152.
- Yorimitsu, T., K. Sato, Y. Asai, I. Kawagishi und M. Homma** (1999) Functional interaction between PomA and PomB, the Na⁺-driven flagellar motor components of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 181: 5102 - 5106.
- Yoshida, S., S. Sugiyama, Y. Hojo, H. Tokuda und Y. Imae** (1990) Intracellular Na⁺ kinetically interferes with the rotation of the Na⁺-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 265: 20346 - 20350.
- Young, M., N. P. Minton und W. L. Staudenbauer** (1989) Recent advances in the genetics of the *clostridia*. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 301 - 326.
- Zhang, Y. und R. H. Fillingame** (1995a) Changing the ion binding specificity of the *Escherichia coli* H⁺-transporting ATP synthase by directed mutagenesis of subunit *c*. *J. Biol. Chem.* 270: 87 - 93.
- Zhang, Y. und R. H. Fillingame** (1995b) Subunits coupling H⁺ transport and ATP synthesis in the *Escherichia coli* ATP synthase. Cys-Cys cross-linking of F₁ subunit ε to the polar loop of F_O subunit *c*. *J. Biol. Chem.* 270: 24609 - 24614.
- Zhang, Y., M. Oldenburg und R. H. Fillingame** (1994) Suppressor mutations in F₁ subunit ε recouple ATP-driven H⁺ translocation in uncoupled Q42E subunit *c* mutant of *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 269: 10221 - 10224.
- Zhao, R. N., C. D. Amsler und S. Khan** (1996a) FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. *J. Bacteriol.* 178: 258 - 265.
- Zhao, R., N. Pathak, H. Jaffe, T. S. Reese und S. Khan** (1996b) FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* 261: 195 - 208.
- Zhou, J. und D. F. Blair** (1997) Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 273: 428 - 439.
- Zhou, J., S. A. Lloyd und D. F. Blair** (1998) Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6436 - 6441.
- Zuberi, A. R., C. Ying, M. R. Weinreich und G. W. Ordal** (1990) Transcriptional organization of a cloned chemotaxis locus of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 1870 - 1876.
- Zuberi, A. R., C. Ying, D. S. Bischoff und G. W. Ordal** (1991) Gene-protein relationships in the flagellar hook-basal body complex of *Bacillus subtilis*: sequences of the *flgB*, *flgC*, *flgG*, *fliE* and *fliF* genes. *Gene* 101: 23 - 31.

Im folgendem sind Vergleiche von Aminosäuresequenzen aufgeführt. Die Vergleiche wurden mit dem Programm Megalign nach dem Clustal-Algorithmus erstellt. Gleiche Aminosäuren sind in Boxen gefasst.

Aminosäurevergleich von HAP-3-Proteinen

1	M	M	T	-	-	S	R	Y	S	T	N	L	N	D	L	S	-	V	G	-	-	-	-	L	D	K	L	N	T	<i>A. woodii</i>			
1	M	R	V	-	-	T	Q	G	M	I	Q	Q	N	S	L	R	Y	I	G	S	S	Y	S	K	L	D	K	L	Q	S	<i>A. subtilis</i>		
1	M	I	N	R	V	S	H	P	L	T	Y	E	N	F	K	T	S	S	A	E	Q	E	S	K	I	T	K	L	L	E	<i>B. burgdorferi</i>		
1	M	-	-	R	F	S	T	Q	M	M	Y	Q	Q	N	M	R	G	I	T	N	S	Q	A	E	W	M	K	Y	G	E	<i>E. coli</i>		
1	M	L	T	R	I	S	S	F	H	N	Y	Q	S	V	Q	N	D	L	R	R	Q	E	N	K	I	H	H	N	Q	E	<i>V. parahaemolyticus</i>		
23	Q	V	-	A	T	G	R	K	F	A	R	T	S	E	D	V	S	S	A	V	R	G	Y	Q	I	R	R	N	L	S	<i>A. woodii</i>		
29	Q	I	-	S	S	G	K	K	I	S	K	A	S	D	D	P	V	V	A	M	K	S	L	K	Y	N	T	Q	L	S	<i>B. subtilis</i>		
31	N	L	H	K	G	G	K	R	I	V	K	L	R	N	D	P	T	G	V	T	H	A	I	R	L	D	N	D	I	F	<i>B. burgdorferi</i>		
29	Q	M	-	S	T	G	K	R	V	V	N	P	S	D	D	P	I	A	A	S	Q	A	V	V	L	S	Q	A	Q	A	<i>E. coli</i>		
31	Q	L	-	A	S	G	K	K	L	L	K	P	S	D	D	P	L	A	A	H	Y	I	Q	N	I	G	Q	Q	Q	E	<i>V. parahaemolyticus</i>		
52	K	L	E	G	Y	Q	D	N	I	K	H	A	D	G	F	L	T	N	S	E	S	T	V	G	Q	L	E	S	S	L	<i>A. woodii</i>		
58	Q	V	Q	Q	Y	K	S	N	A	S	Q	A	F	T	W	L	E	N	T	E	T	N	I	T	E	G	I	D	I	L	<i>B. subtilis</i>		
61	K	L	N	V	Y	I	K	I	L	T	L	L	K	A	T	L	D	I	R	K	D	I	Y	S	L	L	Q	I	F	L	<i>B. burgdorferi</i>		
58	Q	N	S	Q	Y	T	L	A	R	T	F	A	T	Q	K	V	S	L	E	E	S	V	L	S	Q	V	T	T	A	I	<i>E. coli</i>		
60	Q	L	K	Q	Y	L	S	S	I	V	L	V	R	N	R	L	E	N	H	E	V	N	I	A	N	A	E	S	F	A	<i>V. parahaemolyticus</i>		
82	A	E	A	T	D	K	I	L	Q	G	L	N	G	T	Q	S	E	D	T	R	S	I	I	A	T	E	L	R	T	I	<i>A. woodii</i>		
88	S	K	V	R	E	L	A	V	E	A	Q	N	D	T	N	G	E	P	E	R	Q	A	I	G	V	E	V	K	Q	L	<i>B. subtilis</i>		
91	T	R	A	K	E	I	A	I	Q	G	A	S	G	T	Y	E	S	D	D	K	K	M	I	S	K	E	V	N	A	L	<i>B. burgdorferi</i>		
88	Q	N	A	Q	E	K	I	V	Y	A	S	N	G	T	L	S	D	D	D	R	A	S	L	A	T	D	I	Q	G	L	<i>E. coli</i>		
90	D	E	S	K	R	L	T	M	E	M	I	N	G	A	F	S	A	E	D	R	Q	A	K	K	R	E	L	E	E	I	<i>V. parahaemolyticus</i>		
112	Q	D	Q	V	L	E	T	L	N	T	N	-	V	T	G	T	Y	L	F	G	G	S	N	D	Q	K	P	F	A	V	<i>A. woodii</i>		
118	K	E	Q	L	L	N	I	A	N	T	Q	-	V	N	G	R	Y	I	F	N	G	T	N	S	D	K	P	P	V	T	<i>B. subtilis</i>		
121	L	E	D	V	V	A	I	A	N	A	K	G	P	D	G	Y	S	I	F	S	G	T	K	I	D	S	E	A	F	K	<i>B. burgdorferi</i>		
118	R	D	Q	L	L	N	L	A	N	T	T	D	G	N	G	R	Y	I	F	A	G	Y	K	T	E	T	A	P	F	S	<i>E. coli</i>		
120	A	N	N	F	L	N	L	V	N	A	Q	D	E	S	G	N	Y	V	F	A	G	T	K	P	K	S	Q	P	F	Y	<i>V. parahaemolyticus</i>		
141	V	-	-	G	G	K	L	Q	Y	N	G	K	N	L	D	D	L	K	E	G	T	P	A	E	I	E	E	V	E	A	<i>A. woodii</i>		
147	D	-	-	N	G	D	G	T	Y	T	I	S	D	T	A	D	V	-	-	-	V	V	N	I	S	N	N	M	S	<i>B. subtilis</i>			
151	V	T	R	E	N	K	I	S	K	T	S	K	D	G	A	G	P	Q	I	-	I	K	V	E	Y	N	G	N	Q	A	<i>B. burgdorferi</i>		
148	E	E	K	G	-	-	-	K	Y	V	G	G	A	-	E	S	I	K	Q	Q	V	D	A	S	R	S	M	V	I	G	<i>E. coli</i>		
150	R	D	K	D	G	S	V	Q	Y	A	G	D	D	-	Y	Q	R	K	M	K	V	S	S	M	L	D	M	P	M	N	<i>V. parahaemolyticus</i>		
169	L	K	R	D	S	L	Y	V	D	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	L	G	V	S	F	N	Q	I	T	G	-	-	<i>A. woodii</i>
171	L	K	V	N	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. subtilis</i>	
180	E	K	K	T	E	V	Y	N	D	I	H	M	S	N	N	Y	P	G	-	N	V	I	F	F	L	Q	N	Q	N	I	<i>B. burgdorferi</i>		
174	H	T	G	D	K	I	F	D	S	I	-	-	T	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i>		
179	D	P	G	S	K	L	F	M	E	I	-	-	P	N	P	F	G	D	Y	Q	P	S	Y	D	L	Q	S	G	S	D	<i>V. parahaemolyticus</i>		
190	-	-	-	-	-	-	-	D	V	D	R	N	S	V	F	N	Y	S	I	P	G	I	N	F	V	G	N	-	-	-	<i>A. woodii</i>		
176	-	-	-	-	-	-	-	-	D	P	K	S	A	F	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. subtilis</i>		
209	I	S	S	I	N	T	N	G	F	A	V	K	E	N	T	K	I	Y	I	D	N	I	E	I	G	L	T	A	G	D	<i>B. burgdorferi</i>		
186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i>		
207	L	L	L	S	K	A	T	N	V	D	A	K	D	T	A	S	Y	R	V	T	F	V	D	M	N	N	G	K	F	G	<i>V. parahaemolyticus</i>		
210	-	-	-	G	T	D	S	T	V	V	S	G	E	D	I	S	N	N	L	-	-	-	Y	D	L	L	G	R	I	A	<i>A. woodii</i>		
183	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T	S	E	S	G	Q	N	V	-	-	-	F	E	M	L	D	S	-	-	-	<i>B. subtilis</i>			
239	T	A	L	D	I	V	A	K	I	N	E	S	S	A	-	P	V	E	A	S	I	D	P	V	L	N	S	S	S	I	<i>B. burgdorferi</i>		
186	-	-	-	-	-	-	-	N	A	V	A	E	P	D	G	S	A	S	E	T	N	L	-	F	A	M	L	D	S	A	I	<i>E. coli</i>	
237	Y	Q	L	E	R	N	G	K	V	V	D	A	D	E	F	S	P	E	K	G	I	E	Y	K	G	L	K	V	H	V	<i>V. parahaemolyticus</i>		

234 T E F E K P D G S Y S R D T V D S L F G L F Q G N S Q K T Y *A. woodii*
 198 - - F E K A L N S G S L D G M D S V L N D I D H F S D G M S *B. subtilis*
 268 K T T T P H Q I W I T E E K E S N V L Q T L G I L T K N N D *B. burgdorferi*
 209 A A L K T P V A D S E A D K - - - - - - - - - - *E. coli*
 267 K G Q I T P G D S I G I E K R E S - F S I F D T F K E A M S *V. parahaemolyticus*

264 - *A. woodii*
 226 - *B. subtilis*
 298 T K L P P Y N L S S S T E V R S R S I F D A L I E L R D T L *B. burgdorferi*
 223 - - - - - - - - - - - - - - - - E T A A A A L D K T N R G L *E. coli*
 296 - - - - - - - - W S D K S V S D T S A T A K L H Q M T E E F *V. parahaemolyticus*

264 - - - - - - Q T T T - - A I G A K T Q Y L E F M T - - - *A. woodii*
 226 - - - - - - A E R S - - D L G A R Y N R L E L V N - - - *B. subtilis*
 328 Y N N K E E L V G S R S L A E I D E S L K K I T Y I R C R S *B. burgdorferi*
 237 K N S L N N V L T V R A - - E L G T Q L N E L E S L D - - - *E. coli*
 318 Q A A F I H L N K A R T - - D V G A R L S T L D I Q E - - - *V. parahaemolyticus*

281 - - - - - - - - - - N R Y E T Q N F N L D K R Q T E V D *A. woodii*
 243 - - - - - - - - - - T R L S A Q E E T A T K V L S D N E *B. subtilis*
 358 W S K K K N R L D R S Y E R I S K E A A D M K E D M I Q Y T *B. burgdorferi*
 262 - - - - - - - - - - S L G S D R A L G Q T Q Q M S D L V *E. coli*
 343 - - - - - - - - - - Q N H E D F N L S L A K A K S N F E *V. parahaemolyticus*

299 G V D A A Y T Y I A F Q S Q K V A Y S A A L Q M G Q S V V Q *A. woodii*
 261 D V E L E E V I T E F I A Q Q S V H R A T L A V N A Q I V Q *B. subtilis*
 388 D L D V T K A I T N L N M A S L A Y Q V S I G I S A K I M Q *B. burgdorferi*
 280 D V D W N A T I S S Y I M Q Q T A L Q A S Y K A F T D M Q G *E. coli*
 361 D L D Y S K A V I E F S E N S I R A L Q A S Q Q A F G K T K D *V. parahaemolyticus*

329 Q S V F D Y M S *A. woodii*
 291 P T L I D F L - K *B. subtilis*
 418 T T L L D F I - K *B. burgdorferi*
 310 L S L F Q L - S K *E. coli*
 391 L T L F N Y - I *V. parahaemolyticus*

A. woodii, *Acetobacterium woodii*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *B. burgdorferi*, *Borrelia burgdorferi*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *V. parahaemolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*

Aminosäurevergleich von Flagellinen

1 M R - - I N H N I A A L N T Y N K L S A N T S A T S K S L E A *A.*
 1 M R - - I N H N I A A L N T L N R L S S N N S A S Q K N M E *B. woodii*
 1 A Q V - I N T N S L S L I T Q N N I N K N Q S A L S S S I E *E. subtilis*
 1 M A L S M H T N Y A S L V T Q N T L N S T S G L L N T A M E *V. coli*
 1 - G F R I N T N G A A L N A K A N S D L N A K S L D S S L A *C. jejuni-A*

29 K L S S G L K I N R A G D N A A G L A I S E K M R G Q I S G *A. woodii*
 29 K L S S G L R I N R A G D D A A G L A I S E K M R G Q I R G *B. subtilis*
 30 R L S S G L R I N S A K D D A A G Q A I A N R F T S N I K G *E. coli*
 31 R L S T G Y R I N S A S D D A A G L Q I A N R L E A Q T R G *V. parahaemolyticus*
 30 R L S S G L R I N S A A D D A S G M A I A D S L R S Q A N T *C. jejuni-A*

59 L N T A S T N A N D S I S L I Q T A E G A L N E T H S I L Q *A. woodii*
 59 L E M A S K N S Q D G I S L I Q T A E G A L T E T H A I L Q *B. subtilis*
 60 L T Q A A R N A N D G I S V A Q T T E G A L S E I N N N L Q *E. coli*
 61 M S V A M R N A Q D G I S M M Q T A E G A M E E M T N I T Y *V. parahaemolyticus*
 60 L G Q A I S N G N D A L G I L Q T A D K A M D E Q L K I L D *C. jejuni-A*

89	R M R E L A V Q S S N D T N T D - - A D R G E I Q K E I N Q	<i>A. woodii</i>
89	R V R E L V V Q A G N T G T Q D K A T D L Q S I Q D E I S A	<i>B. subtilis</i>
90	R V R E L T V Q A T T G T N S E S - - D L S S I Q D E I K S	<i>E. coli</i>
91	R M N D L A T Q S L N G S N S D K - - D R A A M D A E F K Q	<i>V. parahaemolyticus</i>
90	T I K T K A T Q A A Q D G Q S L K T - - R T M L Q A D I N K	<i>C. jejuni-A</i>
117	L T K E I D R I S N D T E F N T Q K L L N G Y - K A I K T T	<i>A. woodii</i>
119	L T D E I D G I S N R T E F N G K K L L D G - - - - -	<i>B. subtilis</i>
118	R L D E I D R V S G Q T Q F N G V N V L A K N - G S M K I Q	<i>E. coli</i>
119	L S A E L N N I M G N T S F G G Q K L L A A G - G G F - - -	<i>V. parahaemolyticus</i>
118	L M E E L D N I A N T T S F N G K Q L L S G G F T N Q E F Q	<i>C. jejuni-A</i>
146	E A V S G L S S G G I S V E A - - - - G V A G G T Y H V K -	<i>A. woodii</i>
141	- -	<i>B. subtilis</i>
147	V G A N D N Q T I T I D L K Q I D A K T L G L D G F S V K N	<i>E. coli</i>
145	- - - E A G A V T F Q I G A S S A E T L D V D A - - - -	<i>V. parahaemolyticus</i>
148	I G S S S N Q T V K A T I G A T Q S S K I G V T R F E T G S	<i>C. jejuni-A</i>
171	- - T T V T A A A I S V F - - - - - - - N R Q E Q G M A V	<i>A. woodii</i>
141	- -	<i>B. subtilis</i>
177	N D T V T T S A P V T A F G A T T T N N I K L T G I T L S T	<i>E. coli</i>
166	- - - - - - - - - - - - - - - S A S I K K V A A T L A D	<i>V. parahaemolyticus</i>
178	Q S F T S G V V G L T I K N Y N G I E D F K F D N V V I S T	<i>C. jejuni-A</i>
191	F L V S H M V E S A Q Q T A K - - - - - - - - - - - - -	<i>A. woodii</i>
141	- -	<i>B. subtilis</i>
207	E A A T D T G G T N P A S I E - - - - - - - - - - - - -	<i>E. coli</i>
179	A A I T D G -	<i>V. parahaemolyticus</i>
208	S V G T G L G A L A E E I N K N A D K T G V R A T Y D V K T	<i>C. jejuni-A</i>
206	- G T Y T I T V D T A S N T A S L - - - - - - - - - - - A	<i>A. woodii</i>
141	- T Y K V D T A T P A N Q K N L - - - - - - - - - - - V	<i>B. subtilis</i>
222	- G V Y T D N G N D Y Y A K I T G - - - - - - - - - - - G	<i>E. coli</i>
185	- -	<i>V. parahaemolyticus</i>
238	T G A Y A I K A G T T S Q D F A I N G V I I G K V D Y K D G	<i>C. jejuni-A</i>
223	D V D G R L V A S I D T - - - - - - - - - - - S K T K V I	<i>A. woodii</i>
157	- -	<i>B. subtilis</i>
239	D N D G K Y Y A V T V A - - - - - - - - - - - N D G T V T	<i>E. coli</i>
185	- -	<i>V. parahaemolyticus</i>
268	D N N G S L I S A I N A V K D T T G V Q A S K D E N G K L V	<i>C. jejuni-A</i>
241	E G V N I S G N T S V N G T L S F T V G T - - - - - - - - -	<i>A. woodii</i>
157	- - - - - - - - - - - - - - - F Q I G A - - - - - - - - -	<i>B. subtilis</i>
257	M A T G A T A N A T V T D A N T T K A T T - - - - - - - - -	<i>E. coli</i>
185	- - - - - - - - - - - I G D A T K A K A A - - - - - - - - -	<i>V. parahaemolyticus</i>
298	L T S A D G R G I K I T G D I G V G S G I L S A Q K E N Y G	<i>C. jejuni-A</i>
262	- - - - A K K E T - - F A V T D A A N K A V T - - - - G I N	<i>A. woodii</i>
162	- - - - N A T Q Q - - I S V N - - - - - - I E - - - - D M G	<i>B. subtilis</i>
278	- - - - I T S G G T P V Q I D N T A G S A T A - - - - N L G	<i>E. coli</i>
195	- -	<i>V. parahaemolyticus</i>
328	R L S L V K N D G R D I N V S G T G L S A I G M G A A D M I	<i>C. jejuni-A</i>
282	I D L L I M L - - - - - - - - - - Y L L R H V V V D - - - -	<i>A. woodii</i>
176	A D A L - - - - - - - - - - - - - - - G I K E A - - - -	<i>B. subtilis</i>
300	A V S L V K L Q D S K G N D T D T Y A L K D T N G N L Y A A	<i>E. coli</i>
195	- - - L D K I S D A - - - - - - - - - - - G G L - - - -	<i>V. parahaemolyticus</i>
358	S Q A S V S L R E S K G Q I S A A N A D A M G F N S Y N G G	<i>C. jejuni-A</i>

305	Q I G A N T G Q S T T L G I D - - N M S A K E - - - - - L	<i>A. woodii</i>
192	H S V N D - - - - - L D V T - - K F A D N A - - - - - A	<i>B. subtilis</i>
359	K L G G D D G K T E V V D I D G K T Y D S A D - - - - - L	<i>E. coli</i>
205	- -	<i>V. parahaemolyticus</i>
418	S A G S G K G Y S T I L S G S V Q I V S S T A S M S S T Y V	<i>C. jejuni-A</i>
327	G V N D L D L T - - - - - - - - - - K Q A S A N S A - - -	<i>A. woodii</i>
208	D T A D I G F D - - - - - - - - - - A Q - - - - - - - - -	<i>B. subtilis</i>
383	N G G N L Q T G L T A G G E A L T A V A N G K T T D P - - -	<i>E. coli</i>
205	- -	<i>V. parahaemolyticus</i>
448	I S A G S G F S V G S G N S Q F A A L K T S T V S A H E A T	<i>C. jejuni-A</i>
343	- - - - - - - - - - - I T T I D N A I A N V S S Q R A K L	<i>A. woodii</i>
218	- - - - - - - - - - - L K V V D E A I N Q V S S Q R A K L	<i>B. subtilis</i>
410	- - - - - - - - - - - L K A L D D A I A S V D K F R S S L	<i>E. coli</i>
205	- -	<i>V. parahaemolyticus</i>
478	A G V T T L K G A M A V M D I A E T A I T N L D Q I R A D I	<i>C. jejuni-A</i>
361	G A V Q N R L E H T I N N L G T S A E N L P S A E S R I R D	<i>A. woodii</i>
236	G A V Q N R L E H T I N N L S A S G E N L T A A E S R I R D	<i>B. subtilis</i>
428	G A V Q N R L D S A V T N L N N T T T N L S E A Q S R I Q D	<i>E. coli</i>
216	G A N I N R L E H T M T N L G N M V E N T S A A K G R I M E	<i>V. parahaemolyticus</i>
508	G S I Q N Q V T S T I N N I T V T Q V N V K S A E S Q I R D	<i>C. jejuni-A</i>
391	V D M A K E M M E F T K N N I L S Q A A Q S M L A Q A N Q Q	<i>A. woodii</i>
266	V D M A K E M S E F T K N N I L S Q A S Q A M L A Q A N Q Q	<i>B. subtilis</i>
458	A D Y A T E V S N M S K A Q I I Q Q A G N S V L A K A N Q V	<i>E. coli</i>
246	A D F A V E S S N M T K N Q M L M Q A G T T V L S K T N Q L	<i>V. parahaemolyticus</i>
538	V D F A S E S A N Y S K A N I L A Q S G S Y A M A Q A N S S	<i>C. jejuni-A</i>
421	P Q S V L Q L L Q	<i>A. woodii</i>
296	P Q N V L Q L L R	<i>B. subtilis</i>
488	P Q Q V L S L L Q G	<i>E. coli</i>
276	P S M A M S L L R	<i>V. parahaemolyticus</i>
568	Q Q N V L R L L Q	<i>C. jejuni-A</i>

A. woodii, *Acetobacterium woodii*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *V. parahaemolyticus*; *C. jejuni-A*, *Campylobacter jejuni* Flagellin A

Aminosäurevergleich von MotA-Proteinen

1	M - - - N L A S I I G W G V G F G A I L I S M A F T P T G L	<i>B. burgdorferi</i>
1	M K K I D M L T P I G I L I G I S M V V F G V I S S G G N E	<i>B. megaterium</i>
1	M - - - D K T S L I G I I L A F V A L S V G M V L K G V - -	<i>B. subtilis</i>
1	M - - - D L S T I L G M V L A V T S I S V G D I L E G G - -	<i>C. jejuni</i>
1	M L I L - - - - - L G Y L V V L G T V F G G Y L M T G G S -	<i>E. coli</i>
1	M S K I - - - - - I G I I V V F A S V L G G F L L S G G K -	<i>P. aeruginosa</i>
1	M - - - D I A A A I G L I G A I V M V V G S M I Y A G G - -	<i>R. sphaeroides</i>
1	M N I I - - - - - I G L L V T F G C I L G G Y M A M G G H -	<i>S. meliloti</i>
1	M L I L - - - - - L G Y L V V I G T V F G G Y V M T G G H -	<i>S. typhimurium</i>
1	M - - - D I A S F I G L F G G F A I I I F G A V L G G S A R	<i>T. pallidum</i>
1	M - - - D L A T L L G L I G G F A F V I M A M V L G G S - -	<i>V. alginolyticus-PomA</i>
1	M K L R T V A A S L L L M L S A T T V R A S A A D V G A P V	<i>V. parahaemolyticus-MotX</i>
1	M Q K F - - - - - L G V L T I L V C V F G G Y M W A G G K -	<i>V. parahaemolyticus</i>

28	G V - - F W D L S S V F I T V V G S F S A L M A S S E V V A	<i>B. burgdorferi</i>
31	R F L A F I D V P S I L I V L G V F G T L C V S F P L K Q	<i>B. megaterium</i>
26	S F S A L I A N P A A I L I I I A G T I S A V V I A F P T K E	<i>B. subtilis</i>
26	N P L H V V H L S S F L I V M P T A A F C A M T S T H K K I	<i>C. jejuni</i>
25	- L G A L Y Q P A E L V I I A G A G I G S F I V G N N G K A	<i>E. coli</i>
25	- I G A I I Q P F E V L I I G G A A L G A F L Q S N P G S T	<i>P. aeruginosa</i>
26	- V A P F V D I P S L V I V V A G T A F I V L A M K P L P V	<i>R. sphaeroides</i>
25	- L E V L N Q P F E L M I I G G A G I G G F I M A N S M K V	<i>S. meliloti</i>
25	- L G A L Y Q P A E L V I I G G A G I G A F I V G N N G K A	<i>S. typhimurium</i>
28	G L - - F - H V P S L L I T V G G S Y L T L F L T Y P L S Y	<i>T. pallidum</i>
26	- I G M F V D V T S I L I V V G G S I F V V L M K F T M G Q	<i>V. alginolyticus-PomA</i>
31	P I - - Y T E A E L I K L I E Q N K H L Q R V R A D N C Q L	<i>V. parahaemolyticus-MotX</i>
25	- L G A I W Q P A E F L I I I G A A A G S L I I G N P H V	<i>V. parahaemolyticus</i>
56	V K K I P T Y L G F F F R - R N S Y A K V - - S I I K I L V	<i>B. burgdorferi</i>
61	L K N M G R V G K Q A F Q - S K E I N V E - - E I V G T F V	<i>B. megaterium</i>
56	I K K V P T L F R V L F K E N K Q L T I E - - E L I P M F S	<i>B. subtilis</i>
56	V K A A Y K E L K V V F K G S - G V N L P - - E R I A Q L I	<i>C. jejuni</i>
54	I K G T L K A L P L L F R R S K Y T K A M Y M D L L A L L Y	<i>E. coli</i>
54	F M V V L K K A P K M F S N - R F T Q T Y Y L E V L G M L Y	<i>P. aeruginosa</i>
55	F L G H F K A M M K V F K - P S R F D M N - - E V I S T M V	<i>R. sphaeroides</i>
54	V K D T G K A L G E A F R H K V P K E R E Y L D T L G V L Y	<i>S. meliloti</i>
54	I K G T M K A I P L L F R R S K Y T K S M Y M D L L A L L Y	<i>S. typhimurium</i>
55	A V G V F R V I A R V F H - A A D F H E R - - E I V Q R L Y	<i>T. pallidum</i>
55	F F G A T K I A G K A F M - F K A D E P E - - D L I A K I V	<i>V. alginolyticus-PomA</i>
59	V E D I V A - - - - - R A T R I N L P A Y - - - E F L Y	<i>V. parahaemolyticus-MotX</i>
54	L K E M R Q Q V P A T I K G P T E E Y E Y Y M E L M A L L N	<i>V. parahaemolyticus</i>
83	E L S E K A R K E G L L S L D D E L E Q I N D P - - - - -	<i>B. burgdorferi</i>
88	H L S E K A R R E G L L S L E A E L E Q I D D S - - - - -	<i>B. megaterium</i>
84	E W A Q L A R R E G L L A L E A S I E D V D D A - - - - -	<i>B. subtilis</i>
83	E F A I I A R R D G L L A L E S R T S E I E N E - - - - -	<i>C. jejuni</i>
84	R L M A K S R Q M G M F S L E R D I E N P R E S E I F A S Y	<i>E. coli</i>
83	E I L N K S R R E G M M A I E A D I E D P A A S P I F S K Y	<i>P. aeruginosa</i>
82	E L S N L A R K D G I M A L E G - - K A V P D A - - - - -	<i>R. sphaeroides</i>
84	S L M R D L R T K S R N E I E S H I D N P E E S S I F Q S A	<i>S. meliloti</i>
84	R L M A K S R R Q G M F S L E R E D I E N P K E S E I F A S Y	<i>S. typhimurium</i>
82	A L A E K S R R T G L L A L E E E I Q D F D D - - - - -	<i>T. pallidum</i>
82	E M A D A A R K G G F L A L E E - - M E I N N T - - - - -	<i>V. alginolyticus-PomA</i>
79	G - - - - - - - D M L A W G V C V E Q D V E L G L Y - - Y	<i>V. parahaemolyticus-MotX</i>
84	N L L E T A R S R G F K F L D S H I E A P E Q S S I F L M Y	<i>V. parahaemolyticus</i>
107	- - - - - - - - - F F K S G M R L V V D G A - D P E V I	<i>B. burgdorferi</i>
112	- - - - - - - - - F V K K G I L L A I D G V - E P E M I	<i>B. megaterium</i>
108	- - - - - - - - - F L K N G L S M A V D G Q - S A E F I	<i>B. subtilis</i>
107	- - - - - - - - - F L K N A M M L V D G K - S F E E I	<i>C. jejuni</i>
114	P R I I A D S V M L D F I V D Y L R L I I S G H M N T F E I	<i>E. coli</i>
113	P G V L K D E R M T A Y V C D Y L R I M S S G N M A P H E L	<i>P. aeruginosa</i>
104	- - - - - - - - - F F E K G L Q L L V D G T - D E A K L	<i>R. sphaeroides</i>
114	P T V L Q N K E L T A F I C D Y V R L I I I G N A R S H E I	<i>S. meliloti</i>
114	P R I L A D A V M L D F I V D Y L R L I I S G N M N T F E I	<i>S. typhimurium</i>
106	- - - - - - - - - F V R T G L R N V V D G V - D G D A I	<i>T. pallidum</i>
104	- - - - - - - - - F M Q K G I D L L V D G H - D A D V V	<i>V. alginolyticus-PomA</i>
99	M E N A A Q Q G L P A A L E Q I G R Y Y S R G T L - - - V	<i>V. parahaemolyticus-MotX</i>
125	R T M L Y L E L D Q M Q E R H K V G S D L F K T W A K L A P	<i>B. parahaemolyticus</i>
130	R E L L E A E I A T V E E R H A R G R S M F E K A G D Y A P	<i>B.</i>
126	R D I M T E E V E A M E D R H Q A G A A I F T Q A G T Y A P	<i>B. burgdorferi</i>
125	H E S M E I Q T E Q L E E H Y K E C A E Y W I V F G E T C P	<i>C. megaterium</i>
144	E A L M D E E I E T H E S E A E V P A N S L A L V G D S L P	<i>E. subtilis</i>
143	E G L F D M E L S S L K E D L E H P S H A V T K V A D A L P	<i>P. jejuni</i>
122	V K Q L K Y E I K A M K A R H E A Y Q G A V K A W I D I G P	<i>R. coli</i>
144	E A L M D E E I Q T I T H D K M K C Y H A M T T M G D A L P	<i>R. aeruginosa</i>
144	E A L M D E E I E T H E S E A E V P A N S L A M V G D S L P	<i>S. sphaeroides</i>
124	K A L M E S E L T H M E D R H N T W I S L L N S W A A L A P	<i>S. meliloti</i>
122	R A A L K K D I A L T D E R H T Q G T G V F R A F G D V A P	<i>T. typhimurium</i>
125	Q Q D K E R A I P Y L R E - - - - - - - - - - - A A	<i>T. pallidum</i>
144	E G L L E Q E I E A I Q N E L L L P S R S L Q R T A E A L P	<i>V. alginolyticus-PomA</i>
		<i>V. parahaemolyticus-MotX</i>
		<i>V. parahaemolyticus</i>

155 A F G M T G T L I G L V A L L G N L E D K S - - A L G S S M *B. burgdorferi*
 160 A W G M I G T L V G L V L M L K S L N T P S - - S L G P D M *B. megaterium*
 156 T L G V L G A V I G L I A A L S H M D N T D - - E L G H A I *B. subtilis*
 155 T M G L V G A V F G L I L A L K L L D N P Q - - A M A A G I *C. jejuni*
 174 A F G I V A A V M G V V H A L G S A D R P A - A E L G A L I *E. coli*
 173 G F G I V A A V L G I V I T M A L L G E G S Q A E I G H H V *P. aeruginosa*
 152 A M G M V G T L I G L V L M L G N M S D P K - - S I G P A M *R. sphaeroides*
 174 A I G I V A A V L G V I K A M G A I S E A P - E V V G A K I *S. meliloti*
 174 A F G I V A A V M G V V H A L A S A D R P A - A E L G A L I *S. typhimurium*
 154 G Y G M L G T V M G L I G M L A T L E D K S - - S L G S N M *T. pallidum*
 152 A M G M I G T L V G L V A M L S N M D D P K - - A I G P A M *V. alginolyticus-PomA*
 140 S M G N L N A R I H L A E L L - - L R D - - - - - *V. parahaemolyticus-MotX*
 174 G F G I L A A V G G I I I T M Q A I D - G S I A L I G Y H V *V. parahaemolyticus*

183 A V A L I T T L Y G T I M A N L M F T P V Q L K L E K I D T *B. burgdorferi*
 188 A I A L L T T F Y G A L L S N L F F Q P I A A K L A G K T E *B. megaterium*
 184 S A A F V A T L L G I F T G Y V L W H P F A N K L K R K S K *B. subtilis*
 183 S G A F T A T V T G I F G A Y A L F A P W G K K L K A N G M *C. jejuni*
 203 A H A M V G T F L G I L L A Y G F I S P L A S V L R Q K S A *E. coli*
 203 A A A L V G T F L G I L A A Y G F V G P L A G A L E H D A K *P. aeruginosa*
 180 A V A L L T T L Y G A L M A N V I F A P I L N K L E G Y S A *R. sphaeroides*
 203 A A A L V G T L L G V F L S Y S I V G P L V A N I K S V R E *S. meliloti*
 203 A H A M V G T F L G I L L A Y G F I S P L A T V L R O K S A *S. typhimurium*
 182 A T A L I T T F Y G S L V Q N W F I T P V A T K L Q Y Q H D *T. pallidum*
 180 A V A L L T T L Y G A I L S N M V F F P I A D K L S L R R D *V. alginolyticus-PomA*
 158 - - - - - Y G S P L D Y E D A Y R W L Y N S V T A D Q *V. parahaemolyticus-MotX*
 203 A A A L V G T F I G I F G C Y C G L D P L S N A M A Q R V K *V. parahaemolyticus*

213 E E A A V K T M I I E G V L S I Q S G D N P R I L E Q K L M *B. burgdorferi*
 218 H E L F V K E V I I E G V I G L L A G Q N S R F V Q A K L K *B. megaterium*
 214 Q E V K L R E V M I E G V L S V L E G Q A P K V I E Q K L L *B. subtilis*
 213 D L V K E Q I V I T E A I K G I A E G A N P R D L E A K L F *C. jejuni*
 233 E T S K M M Q C V K V T L L S N L N G Y A P P I A V E F G R *E. coli*
 233 E E L N L F E A I K A C L V A S A S G M P P S L A V E F G R *P. aeruginosa*
 210 D E V T Y R E L V I E G L R G I A R G E S A R M I E D Q M V *R. sphaeroides*
 233 K Q N R L Y V I V K Q T L L A Y M N G S V P Q V A L E Y G R *S. meliloti*
 233 E T T K M M O C V K I T L L S N L N G Y A P P I A V E F G R *S. typhimurium*
 212 L E V K S K E M V I E G V L S I Q A G D H P R V L A Q R L L *T. pallidum*
 210 Q E T L N R R L I M D G V L A I Q D G Q N P R V I D S Y L K *V. alginolyticus-PomA*
 180 R Q H K R I A V L R R G L - - - - - - - - - - *V. parahaemolyticus-MotX*
 233 R N M T A F E C V R A T L V A Y V A K K P T L L A I D A G R *V. parahaemolyticus*

243 T F L T P K D R S Q L - - - - - - - - - - N S S - - I *B. burgdorferi*
 248 V F - A P V E K R K L - - - - - - - - - - E E K R E H V *B. megaterium*
 244 M Y L P A K D R L K F A E Q G E - - - - - A Q N G E K K E *B. subtilis*
 243 N F L S H D D P - R I S Q F - - - - - - - - - - *C. jejuni*
 263 K T L Y S S E R P S F I E L E E H V R A V K N P Q Q Q T T *E. coli*
 263 K V L L P A H R P T F A E L E Q A V R G R *P. aeruginosa*
 240 C A L D - - - - - - - - - - - R K Q Q M K R *R. sphaeroides*
 263 K T I S A Y E R P S I D A V E Q E M M - - - N P G G G S E S *S. meliloti*
 263 K T L Y S S E R P S F I E L E E H V R A V R N P N Q Q O T T *S. typhimurium*
 242 T Y L S P K M R K E L - - - - - - - - - - E M E - - L *T. pallidum*
 240 N Y L N - - - - - - - - - - - - - - - E G K R A L E *V. alginolyticus-PomA*
 193 - - - - - - - - - - - E Q R M P Q N I I A R A K R R D *V. parahaemolyticus-MotX*
 263 K H I Q L D I K P T F N Q M E K W L - - - - - - - - - A E *V. parahaemolyticus*

258 G G E *B. burgdorferi*
 265 R E A *B. megaterium*
 268 E E A *B. subtilis*
 256 D K G *C. jejuni*
 293 E E A *E. coli*
 283 *P. aeruginosa*
 251 K A A *R. sphaeroides*
 290 K A A *S. meliloti*
 293 E E A *S. typhimurium*
 257 I K D *T. pallidum*
 251 I D E *V. alginolyticus-PomA*
 209 M F W *V. parahaemolyticus-MotX*
 283 Q E G *V. parahaemolyticus*

83 L P S T V R N K Q A S Q T A K N K S M I E F I E K I Q S K N B
 59 S V E K S Q Q S Q K L D N I L A K V Q G Y L K E N K L Q H V B
 96 E K E K A A D Q E E L E N V K S Q V E K F I K D K K L E H Q B burgdorferi
 131 - C. subtilis
 151 Q I I D S Q N R P M F R T G S A D V E P Y M R D I L R A I A E. jejuni
 165 Q I V D A A N R P M F D L G S A R L Q P Y F E D I L L A M A P. coli
 172 P L P E P Q T T S S R G P S R R S G R R A P E R V T G A R A R. aeruginosa
 152 Q I I D S Q N R P M F K T G S A E V E P Y M R D I L R A I A S. sphaeroides
 77 L P S L E K G Q K L A T A L K - K A V S L F A P E I K S N K T. typhimurium
 147 Q Q Q S K E M S Q E M E T L M E S I K K A L E R E I E Q G A V. alginolyticus-PomB
 161 V L Q D D Y K Q H M F S R G G A E L T P F F E D L L L A L A V. parahaemolyticus
 136 T F - - - S Y Q D W Q S R D Q R I E V A L S S V L F Q S K V. parahaemolyticus-MotY

113 I V V R Q E E R G I V I S L A A D A F - F D S A S A D V K - B
 89 I T A K R D E R G V V L I L Q E Q V L - F E T G Q A D I L - B
 126 L E T K M T S E G L L I T I K D S V I F - F D S G K A T I R - B burgdorferi
 146 T T Y L P P Q A K I E I R G Y T D N - - - - S D S I I R S C. subtilis
 181 P V L N G I P N R I S L S G H T D D F P Y A S G E K G Y S N E. jejuni
 195 E T I R Q V P N K I S I S G H T D A K P Y A - G N G D F G N P. coli
 202 A R W R R H G R C A A - - - - - - - - - - - - R. aeruginosa
 182 P V L N G I P N R I S L A G H T D D F P Y A N G E K G Y S N S. sphaeroides
 106 I A V T S D E R G L V I S L T S D S F - F Y P G S S D L N - T. typhimurium
 177 I E V E N L G Q Q I V I R M R E K G A - F P E G S A F L O - V. alginolyticus-PomB
 191 P L F E Q V T N P L I I S G H T D A I P F K K R F G R Q S N V. parahaemolyticus
 162 Y N A F S D C I A N L L K Y S F E D I A F T I L H Y E R Q G V. parahaemolyticus-MotY

141 - - L E E - N R D S I Q K I A S F I G F L S P R G Y N F K I B
 117 - - - K K - G T P F L D E L G R L F S - T I P N D - - I K V B
 154 - - - K E - D V P L A K E I S N L L V I N P P R N - - I I I B burgdorferi
 171 Y E L A Y - Q R A - - E N V L K Y F I E G G A N L K N I S I C. subtilis
 211 W E L S A - D R A N A S R - R E L M V G G L D S G K V L R V E. jejuni
 224 W E L S A - N R A N A A R - R A L V A G G Y P E G Q I A Q V P. coli
 213 - P V G A - G R T R C A P A A Q - - - C A R P R S G R G A G R. aeruginosa
 212 W E L S A - D R A N A S R - R E L V A G G L D N G K V L R V S. sphaeroides
 134 - - V E E - S R E A L L R V A Q F L S D H A L A G R R F R I T. typhimurium
 205 - - - P K - F R P L V R Q I A E L V K - D V P G I - - V R V V. pallidum
 221 W A L S A - S R A D V A R - K T L V E G G M P D D R V M Q V V. alginolyticus-PomB
 192 D Q L T K A S K K R L A Q I A D Y V R H N - Q D I D L V L V V. parahaemolyticus
 V. parahaemolyticus-MotY

168 E G H T D N I D T D V N G P W K S N W E L S A A R S V N M L B
 140 E G H T D N R P I H - T Y A Y P S N W E L S A A R A S G V I B
 178 S G H T D N M P I K - N S E F Q S N W H L S V M R A V N F M B burgdorferi
 198 K S Y G L N N P I N G N P Q - - - - - - - - - - - - C. subtilis
 239 V G M A A T M R L S D R G P D D A - - - V N R R I S L L V L E. jejuni
 252 V G Y A S A R L F D D K D P L N P - - - V N R R I D I V V L P. coli
 238 E G G A D R R Q G V R E P R R G A D P S L R L R R P H A R C R. aeruginosa
 240 V G M A A T M R L S D R G P D D A - - - I N R R I S L L V L S. sphaeroides
 161 E G H T D S V E V P E D G S - T D N W E L S T R R A V - - - T. typhimurium
 228 S G H T D N R P L D - S E L Y R S N W D L S S Q R A V S V A V. pallidum
 249 T G M S D R A L L N P D E P D S S - - - E N R R I E L F I L V. alginolyticus-PomB
 221 A T Y T D S T D G K S E S Q S L S E R R A E S L R T Y F - - V. parahaemolyticus
 V. parahaemolyticus-MotY

198 E H I L N Y L D Q S D V K R I E N N F E V S G F G G S R P I B
 169 - R Y L T N H F S L S A N R - - - - F E A L G Y G D T K P L B
 207 - G L L I E N P K L D A K V - - - - F S A K G Y G E Y K P V B burgdorferi
 212 - - - - - - - T L E N N R V E I Y F K V - - - - - - - C. subtilis
 266 N K Q A E Q A I L H E N A E S Q - - - - - - - N E P V S E. jejuni
 279 T R K A Q K A I E G E T G A P E A S A P A A A P G E Q P K P P. coli
 268 A R G H G P D C R G H A Q S R T H H H R D G S Y R Q C P V W R. aeruginosa
 267 N K Q A E Q A I L H E N A E S Q - - - - - - - N E P V S S. sphaeroides
 187 - R V L H Y L T D F G A Q - - - E N R F S L A G Y A D T R A K T. typhimurium
 257 - Q E M E K V R G F S H Q R - - - - L R V R G M A D T E P L V. pallidum
 276 T T P A A K V L E T L F - - - - - - - - - G N Q D D S V. alginolyticus-PomB
 249 - - - - - - - E S L G L P E D R I Q V Q G Y G K R R P I V. parahaemolyticus
 V. parahaemolyticus-MotY

228	A T D D T P E G R A Y N R R I D I L I T T D A S L S F P K E	<i>B</i>
194	V P N T S N D N L Q K N R R V E I I I S D P E A - - - - -	<i>B</i>
232	A S N K T A E G R S K N R R V E V L I L P R G A A - E T N E	<i>B. burgdorferi</i>
225	- - - D T A D T S T Q K S V L E L I - - - - -	<i>B. megaterium</i>
287	A L E K P E V A P Q V S V P T - - - - -	<i>C. subtilis</i>
309	A A E A P A A G A Q P S L P A D E V Q K K L N L F D D G G S	<i>E. jejuni</i>
298	A A P S G T I S R S P P G A P Q A W C A S L S - - - - P R A	<i>E. coli</i>
288	V L Q Q P A A A P P A S V P T - - - - -	<i>R. aeruginosa</i>
214	F S N E S P E G R A Y N R R V D I V I L D E G H F	<i>S. sphaeroides</i>
282	L P N D S D D N R A L N R R V E I S I M Q G E P L - Y S E E	<i>S. typhimurium</i>
294	E L Q K A K Q K A E F N Q P V - - I R Q E V I R Y S A D A E	<i>T. pallidum</i>
270	A D N G T P I G K D K N R R V - V I S L G R T Q V	<i>V. alginolyticus-PomB</i>
		<i>V. parahaemolyticus</i>
		<i>V. parahaemolyticus-MotY</i>
258	I K - - Q	<i>B</i>
218	- - - - Q	<i>B</i>
261	- - - - K	<i>B. burgdorferi</i>
240	- N K I G T K A P	<i>B. megaterium</i>
302	- - M P S A E P R	<i>C. subtilis</i>
339	L K L E Q I K G D	<i>E. jejuni</i>
324	A S I P D R S P R	<i>E. coli</i>
303	- - S P K A E P R	<i>R. aeruginosa</i>
238		<i>S. sphaeroides</i>
311	V P V I Q	<i>S. typhimurium</i>
322	K Q E A K I Q A L	<i>T. pallidum</i>
293		<i>V. alginolyticus-PomB</i>
		<i>V. parahaemolyticus</i>
		<i>V. parahaemolyticus-MotY</i>

B. burgdorferi, *Borrelia burgdorferi*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *B. megaterium*, *Bacillus megaterium*; *C. jejuni*, *Campylobacter jejuni*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *V. parahaemolyticus*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *R. sphaeroides*, *Rhodobacter sphaeroides*; *S. typhimurium*, *Salmonella typhimurium*; *T. pallidum*, *Treponema pallidum*; *V. alginolyticus-PomB*, *Vibrio alginolyticus PomB-Protein*; *V. parahaemolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus LafU-Protein* *V. parahaemolyticus-MotY*, *Vibrio parahaemolyticus MotY-Protein*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. V. Müller für die Vergabe des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Dr. M. Madkour und Prof. F. Mayer (Universität Göttingen). Herrn Prof. H. Schägger von der Universität Frankfurt danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor, die Unterweisung in die Blue-Native-PAGE und die aminoternale Sequenzierung der ATPase-Untereinheiten.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der AG Müller aus Göttingen, hier vor allem Stefan Rahlfs für meine Einarbeitung in die *A. woodii*-Forschung, und München, Andreas, Andy, Anja, Astrid, Bärbel, Brigitte, Claudia, Eva, Frank, Hannelore, Heidi, Iris, Kathi, Konstantin, Nadine, Smurf, Sönke, Stefan, Thorsten, Ulli und Ute, für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name: Sascha Aufurth
geboren am: 28.01.1970 in Diepholz

August 1976 bis Juni 1980 Grundschule Drebber
August 1980 bis Juni 1982 Orientierungsstufe Barnstorf
August 1982 bis Mai 1989 Gymnasium Diepholz

Oktober 1989 Immatrikulation an der Georg August Universität in Göttingen für den Diplomstudiengang Biologie
März 1990 bis März 1991 Zivildienst
Oktober 1992 Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
Februar 1995 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Molekulare Genetik und Organische Chemie
März 1995 bis Januar 1996 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. V. Müller am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August Universität Göttingen
Februar 1996 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August Universität in der Arbeitsgruppe von Prof. V. Müller
seit Juli 1997 Fortsetzung der Arbeiten am Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München in der Arbeitsgruppe von Prof. V. Müller