
**Heterologe Überexpression, Reinigung, biochemische
Charakterisierung und Untersuchungen zur Struktur
der A₁ ATPase aus *Methanosarcina mazei* Gö1**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
vorgelegt von
Thorsten Lemker
aus Bremen
im Februar 2002

-
1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller
 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2002

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. | Verbreitung der ATPasen | 3 |
| 1.2. | Funktion und Struktur der ATPasen..... | 7 |
| 1.2.1 | Funktion und Struktur der F ₁ F ₀ -ATPase | 7 |
| 1.2.2 | Funktion und Struktur der V ₁ V ₀ -ATPase | 10 |
| 1.2.3 | Funktion und Struktur der A ₁ A ₀ -ATPase | 11 |
| 1.3. | Fragestellung dieser Arbeit..... | 13 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN..... | 14 |
| 2.1. | Organismen, Plasmide und Oligonukleotide | 14 |
| 2.2. | Nährmedien..... | 15 |
| 2.2.1. | Medien für <i>Methanosarcina</i> | 15 |
| 2.1.2. | Medien für <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| 2.2. | Zellanzucht | 18 |
| 2.2.1. | Anaerobe Anzucht..... | 18 |
| 2.2.2. | Aerobe Anzucht..... | 19 |
| 2.2.3. | <i>E. coli</i> –Massenanzucht im Fermenter..... | 19 |
| 2.2.4. | Stammkultur-Haltung..... | 19 |
| 2.2.5. | Reinheitskontrollen | 19 |
| 2.2.6. | Bestimmung von Wachstumsparametern | 20 |
| 2.3. | Ernte der Fermenterkulturen | 20 |
| 2.4. | Molekularbiologische Methoden | 21 |
| 2.4.1. | Vorbereitung von Geräten und Lösungen | 21 |
| 2.4.2. | Standardmethoden | 21 |
| 2.4.3. | Isolierung von chromosomaler DNA mit Glasmilch..... | 21 |
| 2.4.4. | Aufreinigung von DNA mittels Glasmilch..... | 22 |
| 2.4.5. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 23 |
| 2.5. | Biochemische Methoden | 23 |
| 2.5.1. | Standardmethoden | 23 |
| 2.5.2. | Bestimmung der ATPase-Aktivität..... | 24 |
| 2.5.3. | Polyacrylamidgelelektrophorese..... | 24 |
| 2.5.4. | Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen..... | 26 |
| 2.5.5. | Bestimmung der Molekularmasse durch Gelpermeationschromatographie | 27 |
| 2.5.6. | Expression von <i>malE</i> -Fusionsgenen und Aufreinigung der Fusionsproteine..... | 27 |
| 2.5.7. | Isolierung, Solubilisierung und Aufreinigung von Einschlusskörpern..... | 28 |
| 2.5.8. | Herstellung von Antisera..... | 28 |
| 2.5.9. | Western-Blot-Analyse | 29 |
| 2.5.10. | Radioaktive Markierung von Proteinen | 29 |
| 2.5.11. | Quervernetzung von Proteinen..... | 30 |
| 2.6. | Chemikalien, Enzyme und Gase | 31 |
| 3. | EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE..... | 32 |
| 3.1. | Expression einzelner A ₁ -ATPase-Untereinheiten als MalE-Fusionen und deren Gewinnung | 32 |
| 3.2. | Heterologe Expression einer funktionellen A ₁ -ATPase in <i>E. coli</i> | 34 |
| 3.2.1. | Expressionsversuche mit pSÖ1 | 35 |
| 3.2.2. | Klonierung von und Expressionsanalysen mit pTL2..... | 36 |
| 3.2.3. | Nachweis einer funktionellen A ₁ -ATPase in <i>E. coli</i> DK8(pSÖ1)..... | 37 |

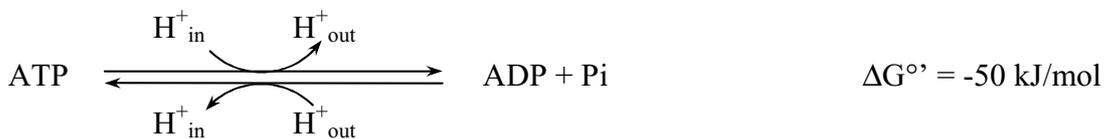
| | |
|---|-----------|
| 3.2.4. Untersuchungen zur Optimierung der Enzymaktivitäten durch Variation der Expressionsbedingungen..... | 38 |
| 3.2.5. Stabilität der A ₁ -ATPase | 40 |
| 3.3. Reinigung der heterolog produzierten A ₁ -ATPase..... | 41 |
| 3.3.1. Herstellung der Cytoplasmafraktion | 41 |
| 3.3.2. Ammoniumsulfatfällung..... | 41 |
| 3.3.3. Gelfiltration an BioPrep SE 1000/17 | 42 |
| 3.3.4. Anionentauschchromatographie an DEAE | 44 |
| 3.3.5. Gelfiltration an Sephacryl S-300 HR | 45 |
| 3.3.6. Zusammenfassung der Reinigung | 46 |
| 3.4. Biochemische Charakterisierung der ATPase..... | 47 |
| 3.4.1. Untereinheitszusammensetzung des isolierten A ₁ -ATPase-Komplexes..... | 47 |
| 3.4.2. Bestimmung der molekularen Masse des A ₁ -ATPase-Komplexes | 50 |
| 3.4.3. Substratspezifität der A ₁ -ATPase..... | 51 |
| 3.4.4. Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von divalenten Kationen | 51 |
| 3.4.5. Ermittlung des pH-Optimums | 52 |
| 3.4.6. Hemmung der A ₁ -ATPase durch Alkohole | 55 |
| 3.4.7. Stimulierung der A ₁ -ATPase durch Sulfid | 56 |
| 3.4.8. Einfluss von DTE auf die Aktivität der A ₁ -ATPase..... | 56 |
| 3.4.9. Einfluss von organischen Säuren auf die ATPase-Aktivität: Stimulierung durch Acetat..... | 57 |
| 3.4.10. Ermittlung eines optimierten Puffersystems für die Aktivität der A ₁ -ATPase..... | 58 |
| 3.4.11. Ermittlung kinetischer Daten der A ₁ -ATPase..... | 58 |
| 3.4.12. Hemmung der A ₁ -ATPase-durch Diethylstilbestrol und dessen Derivate | 59 |
| 3.5. Strukturelle Charakterisierung der A ₁ -ATPase | 62 |
| 3.5.1. Stöchiometrie der Untereinheiten in der A ₁ -ATPase | 63 |
| 3.5.2. Ermittlung der räumlichen Nähe der Untereinheiten zueinander durch Quervernetzungsexperimente | 64 |
| 3.5.2. Elektronenmikroskopische Analyse der A ₁ -ATPase..... | 70 |
| 3.5.3. Analyse der Raumstruktur der A ₁ -ATPase mittels Röntgenkleinwinkelstreuung..... | 71 |
| 3.6. Produktion von A ₁ -ATPase-Subkomplexen | 72 |
| 4. DISKUSSION | 75 |
| 4.1. Energiekonservierung in methanogenen Archaea | 75 |
| 4.2. Charakterisierung der methanoarchäellen A ₁ A ₀ -ATPase | 78 |
| 4.2.1. Genetische Organisation bekannter A ₁ A ₀ -ATPasen | 78 |
| 4.2.2. Heterologe Überproduktion, Assemblierung und Reinigung der A ₁ -ATPase | 81 |
| 4.2.3. Struktur und Eigenschaften der A ₁ -ATPase-Untereinheiten | 82 |
| 4.2.4. Struktur der A ₁ -ATPase..... | 86 |
| 4.2.5. katalytische Eigenschaften der A ₁ -ATPase..... | 88 |
| 4.3. Evolution der ATPasen..... | 90 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 93 |
| 6. LITERATUR | 95 |

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 |
| 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

Adenosintriphosphat ist die universelle Energiewährung einer jeden lebenden Zelle. Prinzipiell haben die Organismen zwei Möglichkeiten, ATP zu generieren. Beim ersten Mechanismus, der Substratkettenphosphorylierung, wird die bei einer chemischen Reaktion freiwerdende Reaktion direkt zur Phosphorylierung von ADP genutzt. Der wohl ursprünglichere Mechanismus ist indirekt. Bei ihm wird die bei einer chemischen Reaktion freiwerdende Energie zunächst zum Aufbau eines transmembranen Ionengradienten (H^+ oder Na^+) genutzt, und der so aufgebaute Ionengradient wird dann von einem transmembranen, Multikomponentenzym zur Synthese von ATP genutzt. Dieses Enzym wird als ATP-Synthase oder ATPase bezeichnet und katalysiert die *in vitro* vollkommen reversible Reaktion:



In vivo können die F_1F_0 - und die (bisher bekannten) A_1A_0 -ATPasen sowohl ATP synthetisieren als auch hydrolysieren (Capaldi *et al.*, 1996; Fillingame, 1999; Müller *et al.*, 1999; Weber und Senior, 1997; Weber und Senior, 2000). Neben mechanistischen Gründen bestimmt die Thermodynamik die Reaktionsrichtung. Die ATP-Synthase wandelt das elektrochemische Ionenpotential in ein chemisches Potential um, wobei diese beiden Größen über die transportierten Ionen miteinander in Verbindung stehen:

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

n = translozierte Protonen

F = Faraday-Konstante

Das Phosphorylierungspotential ($\Delta G_p, \frac{ATP}{ADP+P_i}$) ist dabei proportional dem an der Membran anliegenden elektrochemischen Potential. Bei einem physiologischen elektrochemischen Protonenpotential von -180 mV und einem ΔG_p von 50 – 70 mV müssten drei bis vier Protonen transloziert werden, um die Synthese eines ATP zu erlauben. Umgekehrt erlaubt die Hydrolyse eines ATP den Transport von maximal drei bis vier Protonen über die Cytoplasmamembran entgegen dem physiologischen elektrochemischen Membranpotential. Demnach ist die Richtung der Reaktion (ATP-Synthese oder ATP-Hydrolyse) abhängig von der Größe des $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$, dem ΔG_p der Zelle und der Anzahl der transportierten Protonen. In Gärern, wie z. B. den Milchsäurebakterien, die nicht über die Möglichkeit einer elektronentransportgetriebenen H^+ -Translokation über die Cytoplasmamembran verfügen und ATP durch

Substratkettenphosphorylierung synthetisieren, läuft die Reaktion überwiegend in Richtung der ATP-Hydrolyse und damit der H^+ -Extrusion ab. Hier dient die F_1F_0 -ATPase als primäre Protonenpumpe zum Aufbau eines $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, das dem Antrieb des sekundären Stofftransports und der Flagellenrotation dient. Wenn jedoch eine Elektronentransportkette vorhanden ist, liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der ATP-Synthese und die F_1F_0 -ATPase dient überwiegend als sekundärer Energiekonverter. Auch ein hoher ADP-Gehalt in den Zellen (kleines ΔG_P) verschiebt das Gleichgewicht in Richtung der ATP-Regenerierung. Die Reaktionsrichtung kann aber auch durch andere Faktoren beeinflusst werden. So verhindert die sogenannte "Thiol-Modifikation" der ATPase aus Pflanzen oder Cyanobakterien im Dunkeln, also unter Bedingungen, unter denen keine Photophosphorylierung stattfindet, eine Hydrolyse des ATP's.

Wie diese Reaktionskaskaden ablaufen, lässt sich anhand der am besten untersuchten F_1F_0 -ATP-Synthase aus *E. coli* zeigen. Dieses Enzym besteht aus den acht Untereinheiten a , c , b , α , β , γ , δ und ϵ , welche von einem Operon mit den Genen *uncB*, *uncE*, *uncF*, *uncH*, *uncA*, *uncG*, *uncD* und *uncC* kodiert werden (s. Abb. 1) (Walker *et al.*, 1984).

ATP-Synthasen/ATPasen sind für jedwedes Leben essentiell und daher ubiquitär verbreitet. Sie sind alle nach einem gemeinsamen Bauprinzip aufgebaut: eine hydrophobe, membranständige Domäne ist über einen, zwei oder drei Stiel(e) mit einer hydrophilen, cytoplasmatischen Domäne verbunden. Sie allen enthalten eine minimale Anzahl von mindestens 8 nicht-identischen Untereinheiten, diese Mindestzahl kann aber in einigen Fällen um ein Vielfaches überschritten sein.

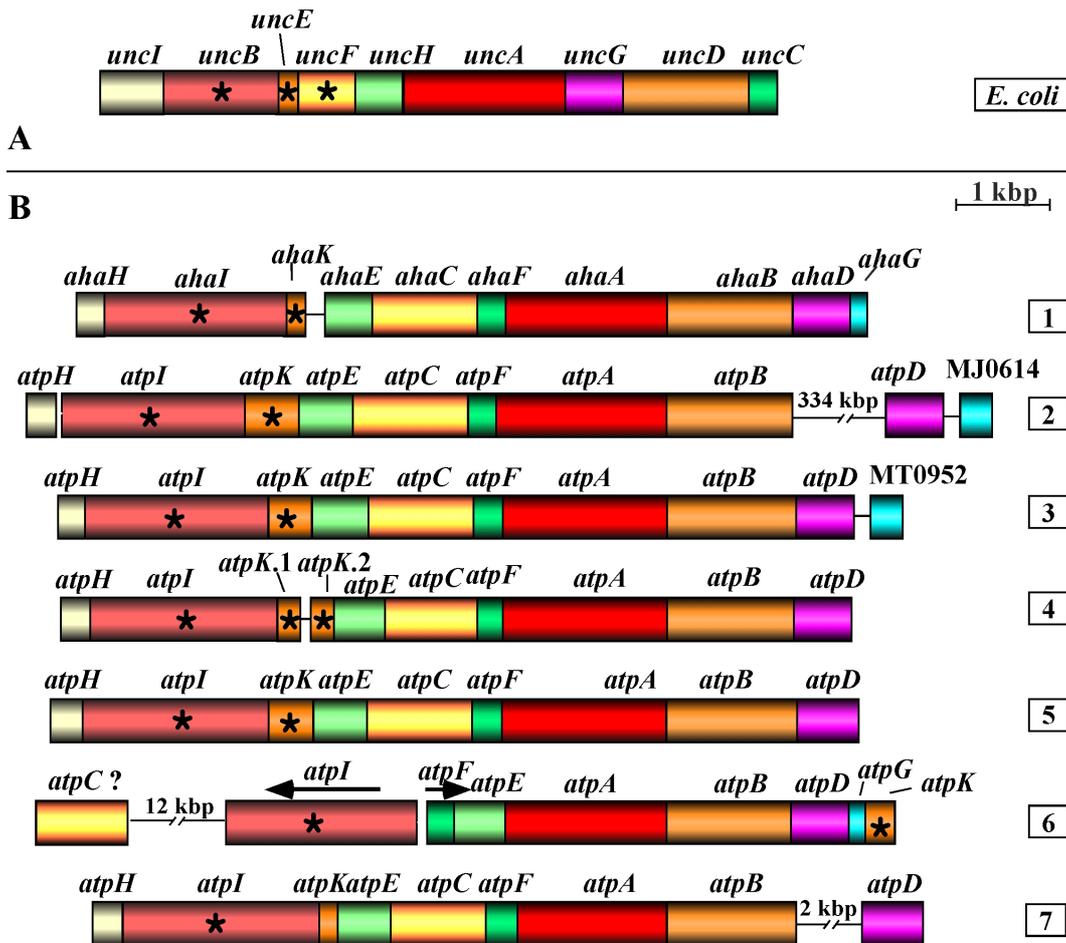


Abb. 1: Physikalische Karten von ATPasen. A, F₁F₀-ATPase-Operon aus *E. coli*; B, archäelle A₁A₀-ATPase-Operone von *Methanosarcina mazei* Gö1 (1), *Methanococcus jannaschii* (2), *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (3), *Archaeoglobus fulgidus* (4), *Pyrococcus horikoshii* (5), *Sulfolobus solfataricus* (6), *Halobacterium* NRC-1 (7).

1.1. Verbreitung der ATPasen

Immunologische und biochemische, aber vor allem molekulare Analysen zeigten, dass die ATPasen einen gemeinsamen evolutionären Vorläufer haben. Entsprechend der Aufteilung der belebten Natur in die drei Domänen Archaea, Bacteria und Eukarya werden drei Klassen von ATPasen unterschieden: die V₁V₀-, F₁F₀- und A₁A₀-ATPasen (Abb. 2). Die F₁F₀-ATPase ist außer in den Bakterien natürlich auch in den Mitochondrien und Chloroplasten enthalten und dort essentiell für die ATP-Synthese. Die V₁V₀-ATPase wurde zuerst in den mit Clathrin-ummantelten Vesikeln und danach in einer Reihe anderer eukaryotischer Zellorganellen gefunden (Skulachev, 1994).

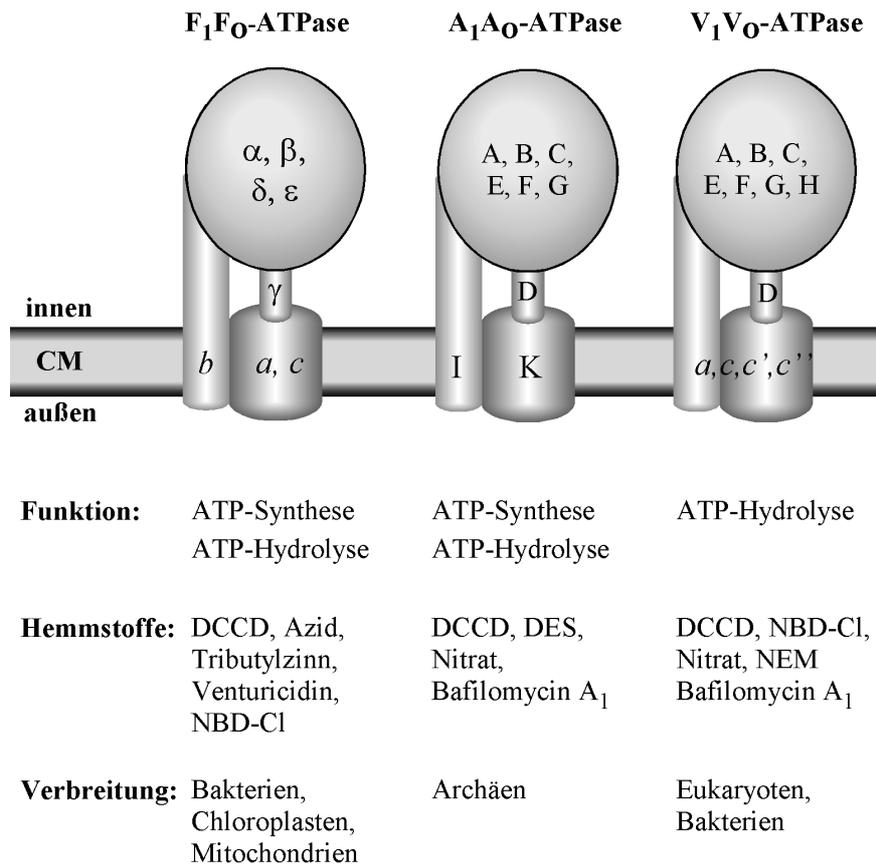


Abb. 2: Vergleich charakteristischer Merkmale von F₁F₀-, A₁A₀- und V₁V₀-ATPasen. Beispielhaft sind die Untereinheitenzusammensetzungen der F₁F₀-ATPase aus *Escherichia coli*, der A₁A₀-ATPase aus *M. mazei* Gö1 und der V₁V₀-ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt. CM, Cytoplasmamembran.

Die Klasse der archäellen A₁A₀-ATPase ist die jüngste. Lange Zeit wurde über die Abstammung der archäellen ATPasen diskutiert. Es gab Befunde, die sowohl auf eukaryotischen, aber auch bakteriellen Ursprungs hinwiesen. Heute weiss man jedoch, dass die A₁A₀-ATPase tatsächlich ein chimäres Enzym ist, das aber auf eine eigene Entwicklungslinie zurückzuführen ist.

In den letzten Jahren wurde gefunden, dass Vertreter der einzelnen Klassen auch in anderen Domänen zu finden sind. Die erste Entdeckung war die einer Na⁺-pumpenden V₁V₀-ATPase im Gram-positiven Bakterium *Enterococcus hirae* (Heefner und Harold, 1982; Kakinuma und Igarashi, 1994; Kakinuma *et al.*, 1991; Kakinuma *et al.*, 1993). Dieses anaerobe, strikt fermentative Bakterium kann nur über Substratkettenphosphorylierung ATP synthetisieren. Allerdings haben kürzlich Hederstedt und Mitarbeiter in *E. hirae* (*E. faecalis* V583) den Gencluster *cydABCD* detektieren können, welcher für eine terminale *bd*-Typ Oxidase kodiert (Winstedt *et al.*, 2000). Eine im Organismus vorhandene F₁F₀-ATPase dient – so die gängige Meinung - nur zum Export

von Protonen. Die Na^+ -abhängige V_1V_0 -ATPase wird nicht konstitutiv, sondern pH-Wert-abhängig gebildet (Kakinuma, 1987; Kakinuma und Igarashi, 1989; Kakinuma und Igarashi, 1990; Waser *et al.*, 1992). Unter alkalischen Bedingungen wird die Na^+ -pumpende V_1V_0 -ATPase (Kakinuma und Igarashi, 1989; Kakinuma und Igarashi, 1990) gebildet, um auch unter diesen Protonen-limitierten Bedingungen die Membran energetisieren zu können.

In einem weiteren anaeroben und thermophilen Bakterium, *Caloramator* (ehemals *Clostridium*) *fervidus*, wurde ebenfalls eine Na^+ - V_1V_0 -ATPase gefunden (Höner zu Bentrup *et al.*, 1997). *C. fervidus* wächst auf Aminosäuren und Peptiden, die er über einen Na^+ -gekoppelten Transport aufnimmt (Ubbink-Kok *et al.*, 2000). Der hierfür benötigte Na^+ -Gradient wird über die Hydrolyse von ATP an der V_1V_0 -ATPase generiert. Die Identifizierung des Na^+ -pumpenden Enzyms als eine V_1V_0 -ATPase wurde mittels Hemmstoffanalysen, N-terminaler Sequenzierung von Untereinheiten und immunologischen Untersuchungen durchgeführt (Höner zu Bentrup *et al.*, 1997).

Weiterhin wurden V_1V_0 -ATPasen in *Thermus thermophilus* HB8, *T. thermophilus* HB27, *T. aquaticus* YT-1 und *Meiothermus* (ehemals *Thermus*) *chliarophilus* ALT-8 gefunden (Radax *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 1990). Bei *T. thermophilus* wurde kürzlich angenommen, dass dieser Organismus über diese protonenabhängige V_1V_0 -ATPase ATP zu synthetisieren vermag (Yokoyama *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen wurden mit gereinigtem Enzym durchgeführt. Ob diese V_1V_0 -ATPase auch tatsächlich als ATP Synthase fungiert, muss allerdings erst noch an intakten Zellen gezeigt werden.

Auch die F_1F_0 -ATPasen sind nicht nur auf das Reich der *Bacteria* beschränkt. Bereits 1992 wurde postuliert, dass die ATP-Synthese in *Halorubrum saccharovororum* über eine F_1F_0 -ATPase verläuft (Hochstein, 1992; Schobert, 1991). Hemmstoffanalysen an Membranvesikeln von *H. saccharovororum* und *Halobacterium salinarium*, an denen die Synthese von ATP gemessen wurde, deuten die Existenz einer F_1F_0 -ATPase in *H. saccharovororum* an, während in *H. salinarium* nur eine V_1V_0 -ähnliche ATPase detektiert werden konnte (Hochstein und Lawson, 1993). Allerdings wurde bisher keine F_1F_0 -ATPase gereinigt und auch keine F_1F_0 -ATPase-Gene gefunden, daher sind diese Hemmstoffdaten mit Skepsis zu betrachten.

Unter den methanogenen Archaea gibt es zwei Organismen, die im Verdacht standen, eine F_1F_0 -ATPase zu besitzen: *M. mazei* Gö1 und *M. barkeri* MS. Beide Organismen generieren während der Methanbildung aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ neben einem Protonen- ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$) auch einen Natriumionengradienten ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$) (Müller *et al.*, 1988a; Müller *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1988b). Beide Gradienten dienen als Triebkraft für die

ATP-Synthese (Becher und Müller, 1994). Ebenso wurden Experimente präsentiert, die den Schluss erlaubten, dass neben dem H^+ - auch der Na^+ -Gradient die ATP Synthese in *M. thermotrophicus* antreibt (Smigan *et al.*, 1988; Smigan *et al.*, 1994). Welcher der beiden Gradienten und damit welche ATP-Synthase (F- oder A-Typ) für die ATP Synthese genutzt wird, sollte vom jeweiligen pH-Wert abhängig sein (Smigan *et al.*, 1994; Smigan *et al.*, 1995). Hemmstoffanalysen an invertierten Vesikeln von *M. mazei* Gö1 ergaben ebenfalls, dass die ATP-Synthese durch F_1F_0 -ATPase-spezifische Inhibitoren (z. B. Azid) und durch das Na^+ -Ionophor ETH157 gehemmt wird. V_1V_0 -ATPase-spezifische Inhibitoren (z. B. Nitrat und NEM) und das Protonophor SF6847 zeigten keinen Einfluss auf die ATP-Synthese (Becher und Müller, 1994). Diese Daten ließen ebenfalls die Vermutung zu, dass es in diesem Organismus zwei ATPasen gibt: eine Na^+ -abhängige F_1F_0 - und eine H^+ -abhängige A_1A_0 -ATPase. Diese Vermutungen ließen sich allerdings nicht bestätigen. Analysen der bekannten genomischen Sequenz von *M. mazei* Gö1 und *M. thermotrophicus* schlossen die Existenz einer F_1F_0 -ATPase eindeutig aus, während die A_1A_0 -ATPase-Operone in beiden Organismen vorhanden sind. 1992 gelang es aber der Arbeitsgruppe von Prof. Yoshida aus dem Genom des methanogenen Archäons *M. barkeri* MS ein Fragment zu amplifizieren, dessen abgeleitetes Genprodukt zur β -Untereinheit bekannter F_1F_0 -ATPasen ähnlich ist (Sumi *et al.*, 1992). Inzwischen wurde von dieser Arbeitsgruppe ein komplettes Operon sequenziert, dessen abgeleitete Proteine den acht Untereinheiten der F_1F_0 -ATPasen sehr ähnlich sind (Sumi *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigte der Vergleich der Aminosäuresequenzen der einzelnen möglichen F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten von *M. barkeri* MS mit Aminosäuresequenzen bekannter F_1F_0 -ATPasen aus *Bacillus megaterium*, *Propionigenium modestum*, *Escherichia coli* oder *Acetobacterium woodii*, dass der Verwandtschaftsgrad der F_1F_0 -ATPase aus *M. barkeri* MS zu den Referenzstämmen weitaus geringer war als der zwischen den Referenzstämmen untereinander (Lemker, 1997). Auch konnte, trotz intensiver Bemühungen, bislang weder eine Expression der F_1F_0 -ATPase-Gene noch eine F_1F_0 -ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (Lemker, 1997). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem F_1F_0 -ATPase-Operon im Genom des methanogenen Archäons *M. barkeri* MS um ein kryptisches Operon handelt. Weiterhin wurden in den bekannten Genomen der Archäen *Methanococcus jannaschii*, *Methanothermobacter thermotrophicus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Halobacterium* Spezies NRC-1 und *Sulfolobus solfataricus* keine F_1F_0 -ATPase-Gene gefunden (Bult *et al.*, 1996; Kawarabayasi *et al.*, 1998; Klenk *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2000; Ruppert *et al.*, 1998; She *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997; Wilms *et al.*, 1996).

1.2. Funktion und Struktur der ATPasen

1.2.1 Funktion und Struktur der F₁F₀-ATPase

Die am längsten bekannte und damit am besten untersuchte ATPase ist die F₁F₀-ATPase, die in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien vorkommt. In ihrer einfachsten Form, die in Bakterien gefunden wird, besteht das Enzym aus 8 nicht-identischen Untereinheiten in stark unterschiedlicher Kopienzahl ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{9-12}$), die in zwei Domänen organisiert sind (F₁ und F₀). Die Untereinheiten *a*, *b* und *c* sind integrale Membranproteine und bilden die F₀-Domäne, während die hydrophilen Proteine α , β , γ , δ und ϵ die katalytische F₁-Domäne bilden (Abrahams *et al.*, 1994; Fillingame, 1992a; Senior, 1990). Zwischen den beiden Domänen vermitteln zwei Stiele, die von den Untereinheiten *b* und γ gebildet werden.

Die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten α und β sind zu 20% identisch. Sie enthalten jeweils ein Nukleotid-Bindemotiv (Walker *et al.*, 1982), aber nur die β -Untereinheit ist katalytisch aktiv (Abrahams *et al.*, 1994). Die Hydrolyse bzw. Synthese von ATP in der F₁-Domäne erfolgt nach dem „binding change“-Mechanismus (Boyer, 1979), bei dem jede β -Untereinheit in einem Kreislauf die drei möglichen Konformationen „open“, „loose“ und „tight“ durchläuft (Boyer, 1979; Cross *et al.*, 1991). Der Arbeitsgruppe um J. E. Walker ist es 1993 gelungen, gut beugende Kristalle von Teilen der F₁-ATPase aus Rinderherz-Mitochondrien herzustellen. Die aus der hochauflösenden Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,8 Å hervorgegangenen Raumstrukturdaten dieser Domäne zeigen, dass die Untereinheiten α und β eine Art Krone bilden, die aus β -Faltblatt-Strukturen besteht (Abrahams *et al.*, 1994). Die jeweils 3 α - und β -Untereinheiten sind alternierend angeordnet, und zwischen ihnen befinden sich insgesamt sechs Nukleotid-Bindestellen. Die zur β -Untereinheit orientierten Bindestellen sind katalytisch aktiv. Die drei $\alpha\beta$ -Paare enthalten jeweils ATP, ADP und P_i oder sind unbesetzt.

Im Zentrum des $\alpha\beta$ -Komplexes befindet sich in der F₁-ATPase die asymmetrisch geformte, antiparallele α -helikale, langgestreckte γ -Untereinheit, die die F₁- mit der F₀-Domäne verbindet (Boekema *et al.*, 1988; Pedersen und Amzel, 1993). Dunn und Futai konnten bereits 1980 zeigen, dass die γ -Untereinheit im $\alpha\beta$ -Komplex zur Hydrolyse bzw. Synthese von ATP benötigt wird (Dunn und Futai, 1980). Biochemische, strukturelle, spektroskopische und mikroskopische Untersuchungen des $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplexes zeigten zunächst, dass die γ -Untereinheit im Zentrum des $\alpha\beta$ -Komplexes lokalisiert ist. Jedoch lag diese Untereinheit zu 65% in ungeordneter Form vor, so dass zunächst keine Aussagen über der Struktur der γ -Untereinheit im

F₁-Komplex gemacht werden konnte. Diese Untersuchungen ließen bereits den Schluss zu, dass die γ -Untereinheit beweglich ist. Spätere Untersuchungen zeigten dann, dass die γ -Untereinheit inner- und unterhalb des $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes rotiert (Abrahams *et al.*, 1994; Duncan *et al.*, 1995; Kaibara *et al.*, 1996; Noji *et al.*, 1997; Sabbert *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996). 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 120°-Schritten (Hisabori *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 1997; Yasuda *et al.*, 1998). Diese Rotation in 120°-Schritten konnte auch mit anderen Fluorophoren nachgewiesen werden (Adachi *et al.*, 2000). Durch weitere Strukturanalysen der F₁-ATPase aus Hefe und Rinderherzmitochondrien wurde bestätigt, dass die γ -Untereinheit einen Stiel bildet, an dem die δ - (entspricht der ϵ -Untereinheit in der bakteriellen F₁-ATPase) und ϵ -Untereinheit (keine entsprechende Untereinheit in bakteriellen F₁F₀-ATPasen vorhanden) lokalisiert sind (Gibbons *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 1999). Während einer Umdrehung tritt die γ -Untereinheit nacheinander in Wechselwirkungen mit den drei β -Untereinheiten. Durch den Kontakt wird eine Konformationsänderung induziert, wodurch spontan gebildetes ATP aus dem Enzym freigesetzt wird. Der Wechsel der Konformationen erfolgt kooperativ, so dass zwei Untereinheiten nie dieselbe Konformation aufweisen.

Andere Untersuchungen zur Beweglichkeit und Beteiligung von Untereinheiten an der Rotation der F₁-ATPase zeigten, dass die γ -Untereinheit nicht alleine für die Konformationsänderungen des katalytischen Zentrums der β -Untereinheit verantwortlich ist. Erste Quervernetzungsexperimente ergaben, dass die Untereinheiten α , β , γ und ϵ in räumlicher Nähe zueinander sind (Aggeler *et al.*, 1992; Skakoon und Dunn, 1993b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich einige konservierte Aminosäurereste der ϵ -Untereinheit in räumlicher Nähe zu den DELSEED-Sequenzen der Untereinheiten α und β befinden (Dallmann *et al.*, 1992; Kanazawa *et al.*, 1982). In der Arbeitsgruppe von Capaldi wurden weitere Quervernetzungsexperimente durchgeführt, durch die gezeigt wurde, dass die Untereinheiten γ und ϵ miteinander in Wechselwirkung treten (Gogol *et al.*, 1990; Tang und Capaldi, 1996). Eine Wechselwirkung der ϵ -Untereinheit wurde über Mutationsstudien auch mit der c -Untereinheit der F₀-Domäne der ATPase aus *E. coli* gezeigt (Fillingame *et al.*, 1995). Zur Struktur der δ -Untereinheit liegen bislang nur sehr wenige Daten vor, da diese Untereinheit zur Verbesserung der Röntgenbeugung bei den bisherigen Kristallisationen aus der F₁-ATPase entfernt wurde. Lediglich Svergun gelang es die gesamte *E. coli* F₁-ATPase zu kristallisieren, allerdings war die erzielte Auflösung sehr gering. In den 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 steht aber im Widerspruch zu elektronenmikroskopischen Analysen, die eine

Positionierung der δ -Untereinheit an der Spitze der F_1 -ATPase zeigten (Wilkins *et al.*, 1999).

Die aus den Untereinheiten a , b und c bestehende F_0 -Domäne katalysiert den Ionentransport. Die c -Untereinheit wird auch als Proteolipid bezeichnet und faltet sich in der Membran wie eine Haarnadel. Dessen polare Schleife ist auf der cytosolischen Seite der Membran lokalisiert (Girvin und Fillingame, 1994). 9 – 12 dieser Untereinheiten bilden einen Ring in der cytoplasmatischen Membran der Bakterien (Deckers-Hebestreit und Altendorf, 1996; Fillingame, 1992a; Fillingame, 1992b; Fillingame *et al.*, 1992; Girvin *et al.*, 1998). Die Schleifen des Proteolipidringes treten zusätzlich mit der ϵ -Untereinheit in Verbindung, so dass die Rotation der γ -Untereinheit auf den Proteolipidring übergeht. Durch die Beobachtung, dass sich die ATP-Synthese durch eine kovalente Bindung des Inhibitors Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) an die Proteolipide inhibieren ließ, wurde schon sehr früh eine Beteiligung der c -Untereinheit an der Protonentranslokation vermutet (Altendorf und Zitzmann, 1975; Fillingame, 1975). Die α -Helices der Proteolipide stehen in Wechselwirkung mit der b - und der a -Untereinheit. Die Untereinheiten a und c vermitteln gemeinsam die Protonentranslokation durch die Membran (Fillingame, 1992a). Es wird angenommen, dass die a -Untereinheit die Membran mit 5 - 6 α -Helices durchspannt (Jäger *et al.*, 1998; Valiyaveetil und Fillingame, 1998). Die b -Untereinheit besteht aus einer transmembranen Helix und einer cytoplasmatischen Domäne und bildet in der F_1F_0 -ATPase ein Dimer, das über die δ -Untereinheit vermittelt Kontakt zur F_1 -Domäne herstellt. Die b -Untereinheit scheint in diesen b - δ - $\alpha\beta$ -Komplex eine strukturelle Funktion zu übernehmen. Mutationsanalysen und Quervernetzungsexperimente deuten stark darauf hin, dass die Untereinheiten a und b außen an der Peripherie des Proteolipidringes lokalisiert sind (Birkenhäger *et al.*, 1995; Deckers-Hebestreit und Altendorf, 1996).

Ob der Proteolipidring ebenso wie die γ -Untereinheit rotiert, wird immer noch diskutiert. Kürzlich wurde in Analogie zum Nachweis der Rotation der γ -Untereinheit durch die Kopplung des c -Rings mit einem fluoreszierenden Actin-Filament und durch Quervernetzungsexperimente Hinweise für eine Rotation des c -Ringes erhalten (Jones *et al.*, 2000a; Jones *et al.*, 2000b; Panke *et al.*, 2000; Sambongi *et al.*, 1999; Tsunoda *et al.*, 2000; Tsunoda *et al.*, 2001). Wenn es tatsächlich zu einer Rotation in F_0 kommt, muss ein Stator vorhanden sein. In sämtlichen zur Zeit diskutierten Modellen stellt die a -Untereinheit die Stator- und der Proteolipidring die Rotorkomponente dar. In der F_1 -Domäne, in der die γ -Untereinheit die Rotorfunktion erfüllt, ist der $\alpha\beta$ -Komplex der Stator. Beide Statoren sind über die δ -Untereinheit miteinander verbunden, während die Rotoren über die ϵ -Untereinheit verbunden sind.

Die genauen Mechanismen der Iontentranslokation, ATP-Synthese und Rotationskopplung sind aber bislang noch unklar. Zur Aufklärung dieser Fragen kann das Studium von ATP-Synthasen aus Organismen mit ungewöhnlichen Eigenschaften neue Ansatzpunkte bieten.

1.2.2 Funktion und Struktur der V_1V_O -ATPase

Die vakuolären H^+ -ATPasen (auch V_1V_O -ATPasen) gehören zur Familie der ATP-abhängigen Protonenpumpen, die für die Ansäuerung von intrazellulären Kompartimenten von eukaryotischen Zellen zuständig sind. Die ummantelten Vesikel vollziehen Bewegungen innerhalb der Zellen zu den Endosomen und synaptischen Vesikeln, bei denen ihre Funktion jeweils im Wiederaufbereiten von Rezeptoren und Aufnahmen von Neurotransmittern liegt (Arai *et al.*, 1988; Stevens und Forgac, 1997). Die V_1V_O -ATPase aus Hefe ist hingegen für die Ansäuerung der zentralen Vakuole zuständig und ist zudem für den Proteinabbau und gekoppelte Transportprozesse über die Membranen notwendig (Forgac, 1999a). Des Weiteren sind V_1V_O -ATPasen noch in Chromafingranula (Moriyama und Nelson, 1989), Lysosomen (Arai *et al.*, 1993) und Pflanzenvakuolen (Lai *et al.*, 1988) anzutreffen. Wie auch die F_1F_O -ATPase setzt sich diese ATPase aus einer hydrophilen (V_1) und einer hydrophoben (V_O) Domäne zusammen. Die Untereinheiten A und B sind jeweils homolog zu den β - und α -Untereinheiten der F_1F_O -ATPase. In Analogie zu den F_1 -ATPasen wurde auch für die V_1 -ATPasen ein zentraler Stiel postuliert, der im A_3B_3 -Komplex rotiert (Yokoyama *et al.*, 2000). Von Vma8p wurde bislang angenommen, dass es diesen zentralen Stiel in der V_1 -ATPase bildet, allerdings bestehen hier immer noch Zweifel (Bowman *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 2000). Zu F_O - δ und F_O - ϵ homologe Proteine wurden jeweils bei der V_O -ATPase mit Vma4p und Vma7p bezeichnet. Vma10p ist homolog zur Untereinheit H der A_1A_O -ATPasen. In F_1F_O -ATPasen konnten allerdings keine homologen Proteine zu Vma10p gefunden werden. Für die V_1 -ATPase-Untereinheiten Vma13p und Vma5p sind keine homologen Untereinheiten in den beiden anderen ATPase-Typen vertreten. Von der V_O -Domäne der vakuolären ATPase sind bislang 5 verschiedene Untereinheiten beschrieben worden, von denen jeweils Vph1p, Stv1p und Vma3p homolog zu den Untereinheiten *a*, *b* und *c* der F_O - und den Untereinheiten I und K der A_O -Domänen sind. Vma6p ist der Untereinheit C der A_O -Domänen ähnlich. Für die Untereinheiten Vma11p und Vma16p sind weder in den F_O - noch in den A_O -Domänen homologe Proteine zu detektieren.

Am Beispiel der V_1V_O -ATPase aus ummantelten Vesikeln wurde ein Strukturmodell vorgeschlagen (Forgac, 1999b). Die V_1 -Domäne ist in diesem Fall ein peripherer 570 kDa-Komplex, der aus 8 verschiedenen Untereinheiten (A-H) in einer Stöchiometrie

von $A_3B_3C_1D_1E_1F_XG_YH_Z$ zusammengesetzt ist. Die V_1 -Domäne ist für die ATP-Hydrolyse verantwortlich, wobei die katalytischen Nukleotid-Bindestellen in den A-Untereinheiten zu finden sind. Es wurden viele Untersuchungen zur Charakterisierung der Nukleotidbindestelle unternommen. Die erste identifizierte Aminosäure war Cys254, das sich verantwortlich für die Sensitivität der V_1V_O -ATPase gegenüber Sulphydrylen wie z. B. dem spezifischen Hemmstoff NEM zeigte (Feng und Forgac, 1992). Diese Aminosäure befindet sich in der glycinreichen Konsensussequenz G-C-G-K-T-V (auch „Walkersequenz“) der Untereinheit A und ist zudem in allen bekannten A-Untereinheiten mit Ausnahme der β -Untereinheit in F_1 -ATPasen konserviert (Forgac, 1992). Die V_O -Domäne ist ein 280 kDa membranintegraler Komplex, der aus den 5 verschiedenen Untereinheiten a , d , c , c' und c'' zusammengesetzt ist (Arai *et al.*, 1988). Die V_O -ATPase ist für die Ionentranslokation verantwortlich. Untereinheit c war ursprünglich als sehr hydrophobes Polypeptid mit einer molekularen Masse von 17 kDa beschrieben worden, das sich für die Sensitivität der V_1V_O -ATPase gegenüber dem Hemmstoff DCCD verantwortlich zeigte (Arai *et al.*, 1987). Diese Untereinheit weist Sequenzhomologien zur Untereinheit c der F_O -ATPasen auf, wobei angenommen wurde, dass die Untereinheit c der V_O - aus Genduplikationen der Untereinheit c der F_O -ATPasen entstanden ist (Mandel *et al.*, 1988). Im Unterschied zur F_O - besitzt die V_O -Domäne noch zwei weitere Proteolipid-Untereinheiten (c' und c''), die beide Homologien zur Untereinheit c ausweisen (Hirata *et al.*, 1997). Obwohl bislang unklar ist, warum die V_1V_O -ATPasen diese drei unterschiedlichen Kopien des Proteolipids besitzen, so zeigten genetische Studien, dass es jedoch für eine funktionelle V-ATPase notwendig ist, mindestens jeweils eine der drei Kopien im Protein-Komplex zu positionieren (Hirata *et al.*, 1997).

1.2.3 Funktion und Struktur der A_1A_O -ATPase

Über die Funktion und Struktur der ATP-Synthasen aus der dritten Domäne des Lebens, den Archaea, war relativ wenig bekannt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die archäellen ATPasen auch aus zwei Domänen bestehen, die durch einen Stiel miteinander verbunden sind (Müller *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 1999). Untersuchungen an Membranpräparationen von halophilen Archäen zeigten, dass die ATP-Synthase in ihrem kinetischen Verhalten der F_1F_O -ATPase ähnelt (Müller *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 1999). Andererseits deuteten immunologische Untersuchungen und Vergleiche der Primärsequenzen der beiden großen Untereinheiten darauf hin, dass (zumindest) die großen Untereinheiten den Untereinheiten der V_1V_O -ATPase viel ähnlicher waren als denen der F_1F_O -ATPase. Diese Befunde führten zur Vermutung, dass die ATPase aus Archaea *quasi* ein chimäres Protein ist, das Eigenschaften der

F₁F₀- und V₁V₀-ATPase in sich vereinigt und ein evolutionärer Vorläufer sein könnte (Denda *et al.*, 1988a; Ihara und Mukohata, 1991; Inatomi *et al.*, 1989a; Lemker, 1997; Müller *et al.*, 1999). Durch diese Entdeckung wurde das Studium der archäellen ATPase forciert. Zum weiteren Studium wurde versucht, ATPasen aus Archäen anzureichern oder zu isolieren. Dies gelang auch häufig, allerdings mit wechselnden Ausbeuten an Untereinheiten. So schwankt die Zahl der Untereinheiten der in der Literatur beschriebenen, gereinigten ATPasen aus Archäen zwischen 3 und 9 (Chen und Konisky, 1993; Inatomi, 1986; Inatomi *et al.*, 1993; Inatomi *et al.*, 1989b; Scheel und Schäfer, 1990; Wilms *et al.*, 1996).

Tab. 1: Vergleich der Untereinheitenzusammensetzung der ATPasen^a

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

^a Es sind in A₁A₀-ATPasen weder homologe Proteine zu den V₁V₀-ATPase-Untereinheiten Vma12p, Vma14p, Vma15p, Vma21p, Vma22p oder Vma23p noch zu AtpI der F₁F₀-ATPasen gefunden worden. Zueinander ähnliche Proteine sind in der selben Zeile aufgeführt. UE, Untereinheit(e)n.

Während die großen Untereinheiten A und B in den meisten Fällen eindeutig identifiziert wurden, wurde die Identität der kleinen Untereinheiten in keinem Fall aufgeklärt. Trotz dieses offensichtlichen Mankos führten diese Befunde aber in der Literatur zu dem Bild, dass die ATPasen aus Archaea recht unterschiedlich in ihrem Aufbau sind. Diese Vermutung wurde allerdings durch molekulare Analysen widerlegt. Das für die ATPase aus *M. mazei* GöI kodierende Operon wurde kloniert und sequenziert (Ruppert *et al.*, 1998; Wilms *et al.*, 1996). Später konnten die entsprechenden Operone in den Genomen von komplett-sequenzierten Spezies identifiziert werden. Trotz der beobachteten Unterschiede in der Zahl der Untereinheiten haben alle bisher sequenzierten A₁A₀-ATPase-Operone eine ähnliche Organisation. Sie bestehen aus 9-10 Genen, deren abgeleitete Produkte den Untereinheiten der V₁V₀-ATPasen sehr ähnlich sind (Tab. 1).

1.3. Fragestellung dieser Arbeit

Da die ATPasen aus den Archäen bisher nur unter Verlust von Untereinheiten gereinigt werden konnten, sollte versucht werden, dieses Problem durch ein heterologes Expressionssystem zu umgehen. Durch die molekularen Analysen waren die Voraussetzungen dafür geschaffen worden. Als Modellsystem wurde die A_1A_0 -ATPase aus dem mesophilen methanogenen Archäon *M. mazei* Gö1 gewählt, da diese zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten die einzige vollständig klonierte A_1 -ATPase war. Da zuerst Pionierarbeit geleistet werden musste, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zur Produktion der hydrophilen A_1 -Domäne entwickelt werden. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren bereits die Gene sequenziert und kloniert worden, die für die hydrophilen Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaD, AhaE, AhaF und AhaG kodieren. Es sollte überprüft werden, ob diese Gene in *E. coli* exprimiert und die Genprodukte zu einer funktionellen Einheit assembliert werden. Anschließend sollte ein Verfahren zur Reinigung der heterolog produziert A_1 -Domäne entwickelt werden. Die gereinigte ATPase bot dann die Möglichkeit, erste kinetische und strukturelle Untersuchungen in einem definierten System durchzuführen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 2: Verwendete Organismen

| Stamm | relevanter Geno- oder Phänotyp | Referenz |
|---|---|---------------------------------|
| <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1 | Wildtyp | DSMZ 3647 |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | F ⁻ Φ 80d/ <i>lacZ</i> M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hspR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> | (Hanahan, 1983) |
| <i>E. coli</i> DK8 | 1100 Δ [<i>uncB-uncC</i>] <i>ilv::Tn10</i> | (Klionsky <i>et al.</i> , 1984) |
| <i>E. coli</i> K38 | HfrC <i>phoA4 pit-10 tonA22 ompF627 relA1</i> λ^+ <i>spoT1</i> | (Lyons und Zinder, 1972) |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | <i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>hsdS</i> , Gal, λ DE3 | (Studier und Moffatt, 1986) |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>unc 702</i> | Tc ^r , F ₁ F _O -ATPase Mutante, BL21(DE3) <i>unc 702 asnA ::Tn10</i> | (Nichols und Harwood, 1997) |
| <i>E. coli</i> GJ1158 | <i>E. coli</i> BL21 <i>proUp::T7 RNAP::malQ-lacZ</i> , Tet ^S | (Gowrishankar und Manna, 1996) |

Tab. 3: Verwendete Vektoren und Plasmide

| Plasmid | relevantes Merkmal | Referenz |
|---------|---|----------------------------------|
| pGEM-4Z | Ap ^r , <i>lacZ'</i> | Fa. Promega, Heidelberg |
| pT7-6 | Ap ^r , ϕ 10 | (Tabor, 1990) |
| pHSG399 | Cm ^r , <i>lacZ'</i> | Fa. Takara, Japan |
| pHSG398 | Cm ^r , <i>lacZ'</i> | Fa. Takara, Japan |
| pMal-c2 | Ap ^r , <i>malE</i> , <i>lacI</i> , P _{tac} , <i>lacZ</i> , M13 <i>ori</i> | Fa. NEB, U.S.A. |
| pUBS520 | pACYC177; Km ^r <i>lacI argU</i> ; <i>ori</i> p15A | (Brinkmann <i>et al.</i> , 1989) |
| pGP1-2 | Km ^r , T7-RNA Polymerase, <i>cl</i> ⁸⁵⁷ | (Tabor und Richardson, 1985) |
| pRT103 | pHSG399 :: 7,8 kB <i>XbaI/KpnI</i> -Fragment | (Lemker <i>et al.</i> , 2001) |
| pEW1 | pGEM-Z7f(7 ⁺) :: 8 kB <i>BglII</i> -Fragment | (Wilms <i>et al.</i> , 1996) |
| pSÖ1 | pGEM-4Z :: 8 kB <i>PstI/KpnI</i> -Fragment | (Lemker <i>et al.</i> , 2001) |

Tab. 4: Plasmid-Konstrukte

| Plasmidname | relevantes Merkmal (endständige Schnittstellen des klonierten Fragments; Gene) | Insertionsgröße | Ursprungsvektor |
|--------------------|---|-----------------|-----------------|
| pMalE-AhaA | <i>BamHI/SalI</i> ; <i>ahaA</i> | 1654 Bp | pMalE-c2 |
| pMalE-AhaB | <i>EcoRI/XbaI</i> ; <i>ahaB</i> | 1383 Bp | pMalE-c2 |
| pMalE-AhaG | <i>EcoRI/PstI</i> ; <i>ahaG</i> | 175 Bp | pMalE-c2 |
| <i>pahaABD-T7</i> | <i>XbaI/SacI</i> ; <i>ahaA</i> , <i>ahaB</i> , <i>ahaD</i> | 3801 Bp | pT7-6 |
| <i>pahaABD-lac</i> | <i>XbaI/SacI</i> ; <i>ahaA</i> , <i>ahaB</i> , <i>ahaD</i> | 3801 Bp | pGEM-4Z |
| pTL0 | <i>SalI/XbaI</i> ; | 404 Bp | pMalE-c2 |
| pTL2 | <i>SalI/SacI</i> ; 228 Bp der IR, <i>ahaE</i> , <i>ahaC</i> , <i>ahaF</i> , <i>ahaA</i> , <i>ahaB</i> , <i>ahaD</i> , <i>ahaG</i> | 7255 Bp | pGEM-4Z |

Tab. 5: Verwendete Oligonukleotide. Sämtliche Oligonukleotide sind bis auf die integrierten Schnittstellen den genomischen Sequenzen homolog

| Bezeichnung | Zielgen/Region | Länge | Schnittstelle |
|--|---|-------|---------------|
| AahaA(B)down Sequenz: 5' - CCAAATAGTAGGATCCAAAACCATC - 3' | <i>ahaA</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 25 Bp | <i>Bam</i> HI |
| AahaA(S)up Sequenz: 5' - GGCTCTGTTTTGTCTGACAAAAAT - 3' | <i>ahaA</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 23 Bp | <i>Sal</i> I |
| AahaB(E)down Sequenz: 5' - CGGAATTCGTCAAAGAGTACAAGAC - 3' | <i>ahaB</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 25 Bp | <i>Eco</i> RI |
| AahaB(X)up Sequenz: 5' - GCTCTAGACAATCACTTAGCCTTTC - 3' | <i>ahaB</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 25 Bp | <i>Xba</i> I |
| AahaG(E)down Sequenz: 5' - CGGAATTCGCAGAATGCGACGATC - 3' | <i>ahaG</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 24 Bp | <i>Eco</i> RI |
| AahaG(P)up Sequenz: 5' - AACTGCAGCCCTGTCATGTCACATA - 3' | <i>ahaG</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 25 Bp | <i>Pst</i> I |
| <i>aha</i> IR(<i>Sal</i> I)down Sequenz: 5' - CTTAAATTTTCGTCGACCATTGCTTT - 3' | IR bis <i>ahaE</i> vom <i>aha</i> -Operon aus <i>M. mazei</i> Gö1 | 25 Bp | <i>Sal</i> I |
| <i>oaha</i> Eup(<i>Xba</i> I) Sequenz: 5' - CGGTATCTAGAAGTT - 3' | IR bis <i>ahaE</i> vom <i>aha</i> -Operon aus <i>M. mazei</i> Gö1 | 15 Bp | <i>Xba</i> I |
| <i>ahaA</i> (<i>Xba</i> I)down Sequenz: 5' - GCTCAACGAGTTTTTCTAGAAAAATAAAAC - 3' | <i>ahaA</i> , <i>ahaB</i> , <i>ahaD</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 30 Bp | <i>Xba</i> I |
| <i>ahaD</i> (<i>Sac</i> I)up Sequenz: 5' - CAACCAGATGAGCTCGATCGTCG - 3' | <i>ahaA</i> , <i>ahaB</i> , <i>ahaD</i> von <i>M. mazei</i> Gö1 | 23 Bp | <i>Sac</i> I |

2.2. Nährmedien

2.2.1. Medien für *Methanosarcina*

2.1.1.1. *Methanosarcina* –Komplexmedium (Hippe *et al.*, 1979)

Für die Zellanzucht von *Methanosarcina mazei* Gö1 wurde ein Medium verwendet, das sich aus den drei Komponenten A, B und C zusammensetzte. Als Kohlenstoffquelle wurde Methanol verwendet (Komponente D).

| | | |
|----|--|--------|
| A: | K ₂ HPO ₄ | 348 mg |
| | KH ₂ PO ₄ | 227 mg |
| | NH ₄ Cl | 500 mg |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 500 mg |
| | FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 4 mg |
| | CaCl ₂ | 188 mg |
| | NaCl | 2,25 g |
| | NaHCO ₃ | 3 g |

| | |
|--|-------------|
| Na-Acetat | 820 mg |
| Hefeextrakt | 2 g |
| Casiton | 2 g |
| Spurenelementelösung SL6 (Pfennig und Lippert, 1966) | 3 ml |
| Vitaminlösung (DSMZ 141) 10x konz. | 1 ml |
| Resazurin | 1 mg |
| H ₂ O _{demin} pH 6,9 | ad 1.000 ml |
| | |
| B: Cystein-HCl x H ₂ O | 300 mg/l |
| | |
| C: Na ₂ S x 9 H ₂ O | 300 mg/l |
| | |
| D: Methanol | 200 mM |

2.1.1.2. Spurenelementelösung SL6 (Pfennig und Lippert, 1966)

| | |
|---|-------------|
| ZnSO ₄ | 100 mg |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 30 mg |
| H ₃ BO ₃ | 300 mg |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 200 mg |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 10 mg |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 20 mg |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 30 mg |
| H ₂ O _{dest} | ad 1.000 ml |

2.1.1.3. Vitaminlösung

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

2.1.1.4. Herstellung des *Methanosarcina*-Komplexmediums

Das Nährmedium wurde nach der von Hungate und Bryant beschriebenen Technik unter anaeroben Bedingungen hergestellt (Bryant, 1972; Hungate, 1969). Hierfür wurde die Komponente A für 25 min mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80% / 20%, v/v) durchgast. Im Anschluss daran wurde der pH-Wert kontrolliert und falls notwendig mit einer konzentrierten NaOH- oder HCl-Lösung auf pH 6,9 eingestellt. Die Kulturgefäße wurden mit einem Butylgummistopfen verschlossen und nach Sicherung der Stopfen durch Aluminiumschraubkappen gegen den sich bildenden Überdruck bei 121°C für 30

min autoklaviert. Die Komponenten B und C, die als Reduktionsmittel dienen, wurden separat als 50- bzw. 500fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Um den Sauerstoffgehalt im destillierten Wasser zu reduzieren, wurde es ca. 20 min gekocht und beim Abkühlen mit sauerstofffreiem N₂ durchgast. Zur Entfernung des Restsauerstoffs wurden alle verwendeten Gasgemische (Fa. Messer Griesheim, Kassel) über einen erhitzten Kupferkatalysator geleitet (Fa. Ochs, Bovenden). Dieser Katalysator wurde regelmäßig mit Wasserstoff regeneriert. Bei Anzucht auf Methanol wurde das Substrat als Komponente D aus einer anaeroben Stammlösung kurz vor dem Beimpfen zugegeben.

2.1.2. Medien für *Escherichia coli*

2.1.2.1. LB-(Luria-Bertani) Medium

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

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

2.1.2.2. M9 –Mineralmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

| | |
|----------------------------------|-------------|
| KH ₂ PO ₄ | 3,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 6,0 g |
| NH ₄ Cl | 1,0 g |
| NaCl | 0,5 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1.000 ml |

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Medium nach dem Autoklavieren durch folgende, getrennt sterilisierte Komponenten vervollständigt:

| | |
|---|--------|
| 1 M MgSO ₄ + 1 M MgCl ₂ | 1,0 ml |
| 1 M CaCl ₂ | 0,1 ml |
| 40% [w/v] Glukose | 5,0 ml |
| 10 mM Thiamin-HCl | 5,0 ml |
| Aminosäure-Mix | 5,0 ml |

Der Aminosäuremix setzte sich aus den proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Cystein und Methionin) zusammen. Die Konzentrationen betragen jeweils 2% [w/v].

2.1.2.3. Medienzusätze

In Tab. 6 sind die den Medien zugesetzten Substanzen aufgeführt. Die Zugabe erfolgte erst nach dem Autoklavieren und anschließender Abkühlung auf mindestens 60°C.

Tab. 6: Medienzusätze

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

2.2. Zellanzucht

2.2.1. Anaerobe Anzucht

Die Kultivierung strikt anaerober Organismen erfolgte nach den Methoden von Hungate und Bryant (Bryant, 1972; Hungate, 1969). Als Kulturgefäße dienten wahlweise 16-ml-Hungate-Röhrchen, Steilbrustflaschen oder Serumflaschen. Die Gefäße wurden mit gasdichten Septen oder Stopfen aus Butylgummi verschlossen. Die Zugabe der Reduktionsmittel, Substrate und Vorkulturen erfolgte mittels steriler Plastikspritzen oder mit verschließbaren 50-ml-Luer-Lock-Glasspritzen. Alle Anzuchten erfolgten bei 37°C. Als Inokulum dienten jeweils 5-10% einer Kultur, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befand.

2.2.2. Aerobe Anzucht

E. coli wurde aerob in LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C angezogen. Die Medien wurden bei Bedarf mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Bei Nutzung von *lac*-Promotoren in Expressions-Versuchen wurde 1% Glukose zu den Vorkulturen zugefügt, um die basale Transkription möglichst weitgehend zu hemmen.

2.2.3. *E. coli* –Massenanzucht im Fermenter

Große Zellmengen wurden im 10-l-Fermenter (Fa. Braun, Melsungen) als 8-l-Kultur aerob in mit 100 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C angezogen. Als Vorkultur dienten 10 ml einer spätlogarithmischen Kultur. Die 8-l-Kultur wurde 16 h bei 150 Upm gerührt, die Luftzufuhr betrug 3 l/min. Nach der Zugabe von Laktose (0,25% [w/v]) wurde für weitere 6 h inkubiert. Um die Sauerstoffkonzentration in der Kultur zu steigern, wurde die Umdrehungszahl nach dem Induktionsstart auf 300 Upm erhöht. Nach 6 h wurden die Zellen wie unter 2.3. geerntet.

2.2.4. Stammkultur-Haltung

Die Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte über kürzere Zeiträume auf festen Komplexmedien bei 6°C. Zum Schutz vor der Austrocknung wurden die Petrischalen mit Parafilm (Fa. Ochs, Bovenden) umwickelt. Zur Konservierung der Stämme wurden die Zellen abzentrifugiert, in 87%igem Glyzerin resuspendiert und bei -70°C gelagert.

2.2.5. Reinheitskontrollen

Die Kulturen wurden regelmäßig durch Mikroskopieren im Phasenkontrast (Standard RA, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) und Reinigungsausstriche (der aeroben Kulturen) auf mögliche Kontaminationen hin überprüft.

2.2.6. Bestimmung von Wachstumsparametern

2.2.6.1. Bestimmung der Gesamtgasmenge

Die gebildete/verbrauchte Gasmenge in Kulturen von anaerob gezogenen Organismen wurde nach der von Chung beschriebenen Methode bestimmt (Chung, 1976). Dazu wurden sterile, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ geschmierte 50-ml-Glasspritzen (Fa. Ochs, Bovenden; Fa. Schütt, Göttingen) benutzt, die mit einem Luer-Lock-Hahn (Fa. Ochs, Bovenden) zur Dosierung des ein- und ausströmenden Gases versehen waren.

2.2.6.2. Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte durch Trübungsmessung. Die Bestimmung der Trübung von Kulturen in Glas- oder Hungate-Röhrchen wurde in einem Spektralphotometer 1101 M (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm gegen unbeimpfte Nährlösung durchgeführt. Für die Bestimmung der OD von größeren Kulturen wurden Proben entnommen und bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Spektralphotometer Modell 100-20 (Fa. Hitachi, Tokyo, Japan) in 1-ml-Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Bei Zelldichten mit $\text{OD}_{600} > 0,3$ wurden die Proben mit Nährlösung entsprechend verdünnt. Resazurin enthaltende Proben wurden vor der Messung durch Zugabe eines Reduktionsmittels (Na-Dithionit) entfärbt.

2.3. Ernte der Fermenterkulturen

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation in einer Milchzentrifuge, einer Durchlaufzentrifuge Contifuge Stratos oder einer Sorval Zentrifuge RC5B (Fa. Kendro Laboratory Products, München). Die Sedimente der abzentrifugierten Kulturen wurden einmal im TMDG-Puffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTE, 10% [v/v] Glycerin, pH 7,5) gewaschen, in 2 ml TMDG-Puffer/g Zellmaterial aufgenommen und mit 0,1 mg DNase/ml Zellsuspension versetzt. Nach einer 3-maligen Passage der Zellen durch eine French-Press bei 13.000 p.s.i. wurde das Zelllysate mit 10 μl 0,1 M PMSF in 2-Propanol/ml Extrakt versetzt, und die Zelltrümmer wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C entfernt.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden, um Nukleasen zu inaktivieren, durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 70% [v/v] Ethanol abgewischt. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert und danach direkt den autoklavierten Puffern zugesetzt.

2.4.2. Standardmethoden

In aller Regel wurden molekularbiologische Standardmethoden nach Sambrook verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Enzyme wurden von den Firmen MBI-Fermentas (St. Leon Rot) und Roche (Mannheim) nach den Herstellerangaben verwendet. Plasmide wurden aus *E. coli* nach der Methode von Holmes und Quigley (Holmes und Quigley, 1981) und, sofern sehr reine Präparationen nötig waren, mittels des Qiagen Mini-Prep-Kits (Fa. Qiagen, Hilden) isoliert. Die Analyse von DNA erfolgte durch Gelelektrophorese in 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 (Cohen *et al.*, 1972; Inoue *et al.*, 1990). Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt (Hanahan, 1983).

Die Ermittlung von DNA-Sequenzen erfolgte automatisch mit fluoreszenzmarkierter DNA an einem ABI PrismTM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems GmbH/Perkin Elmer, Washington, GB).

2.4.3. Isolierung von chromosomaler DNA mit Glasmilch (Marmur, 1961; Rahlfs und Müller, 1997)

Es wurden jeweils Kulturen aus der späten logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Eine 500-ml-*M. mazei* Gö1-Kultur wurde auf 4 GS3-Becher aufgeteilt und 10 min bei 8.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Sedimente wurden in 7 ml EDTA/Tris-Puffer (100 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl) aufgenommen und mit 1 ml einer 25%igen [w/v] SDS-Lösung versetzt. Die Zellyse setzte sofort nach Zugabe der SDS-Lösung ein. Dem Zellysate wurden 100 µl einer Proteinase-K-Lösung (80 µg/ml TE-Puffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0]) zugegeben und für mindestens 30 min bei 65°C inkubiert. Um die DNA zu isolieren, wurden 12 ml einer 6 M

Guanidiniumthiocyanat-Lösung und 0,3 – 0,8 ml Glasmilch (Vogelstein und Gillespie, 1979) zugegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Umschwenken mit dem Proteinase-behandelten Zelllysate gemischt. Nach Zugabe von 20 ml Isobutanol und dem Absetzen der an die Glasmilch gebundenen DNA wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 10 ml einer NaI-Lösung (16,5 M NaI, 90 mM Na₂SO₃, filtrieren und lichtgeschützt lagern) versetzt. Das Sediment wurde mit 10 ml „new-wash“-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7, 1 mM EDTA, 50% Ethanol, [v/v]) vorsichtig gewaschen und anschließend in 10 ml TE-Puffer aufgenommen. Eine 15-minütige Inkubation dieses Ansatzes bei 50°C bewirkte die Elution der DNA von der Glasmilch, die anschließend durch eine Zentrifugation (4.000 x g, 4°C, 2 min) sedimentierte. Die Zugabe von 1 ml einer 7,5 M NH₄-Acetat-Lösung und 30 ml eiskaltem Ethanol (reinst.; 96%, v/v) zum DNA-haltigem Überstand bewirkte durch den eintretenden Wasserentzug die Fällung der DNA. Eine weitere Zentrifugation (3.000 x g, 4°C, 5 min) sedimentierte die gefällte DNA, die anschließend mit 1 – 2 ml TE-Puffer versetzt und über Nacht bei 37°C in Lösung gebracht wurde.

2.4.4. 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 NaI-Lösung (s. 2.4.3.) versetzt und solange bei 50°C inkubiert, bis die Agarose aufgelöst war (5 - 10 min). Sollte bereits gelöste DNA aufkonzentriert werden, wurde dieser Schritt übersprungen. Dem Ansatz wurde 20 µl Glasmilch (Vogelstein und Gillespie, 1979) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur 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) und zweimal mit 500 µl „new-wash“-Puffer (s. 2.4.3.) 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 (kürzere DNA-Fragmente benötigen höhere Elutionstemperaturen und Fragmente unter 50 Bp lassen sich kaum noch von der Glasmilch ablösen). Die Glasmilch wurde durch vier aufeinander folgende Zentrifugationen (60 s, 21.000 x g, Hettich Mikro 2448-Zentrifuge, Fa. Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) aus dem Ansatz entfernt.

2.4.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) wurde in 100 µl Ansätzen in einem Minicycler MJ (Fa. Biometra, Göttingen) mit den Komponenten des „Taq-PCR- Core-Kits“ (Fa. Qiagen, Hilden), der *Pfu*-DNA-Polymerase (Fa. Stratagene, Amsterdam, Holland) oder des „Expand High Fidelity PCR System“ (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Programme umfassten eine 5-minütige Denaturierung der DNA bei 94°C, gefolgt von einer Inkubation bei 85°C für 2 min zur Zugabe der jeweiligen Polymerase und 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94°C, 30 s), Anlagerung (35 - 60°C, 1 min) und Synthese (68 oder 72°C, die Temperatur und die Länge der Synthesezeit stützte sich auf die Angabe des Herstellers der Polymerasen). Das Programm wurde mit einer Inkubation bei 68 bzw. 72°C für 10 min abgeschlossen, während letzte 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) und MgCl₂ in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die Oligonukleotide wurden von MWG-BioTech (Ebersberg) hergestellt.

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1. Standardmethoden

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Lowry oder Bradford (Bradford, 1976; Lowry *et al.*, 1951). Die Proteinbestimmung an ganzen Zellen erfolgte nach Schmidt (Schmidt *et al.*, 1963).

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden Zellultrans-Dialyseschläuche (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) mit einer Ausschlussgröße von 8 – 10 kDa 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 oder, im Falle der A₁-ATPase, in Centrex-Ultrafiltrationsröhrchen (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa überführt und bei 1.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die Konzentrationsschritte wurden jeweils solange durchgeführt, bis die gewünschte Verringerung des Probenvolumens erreicht worden war.

2.5.2. 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 (anfänglich 100 mM MES-HCl, 40 mM NaHSO₃, 10 mM MgSO₄, 10% [v/v] Glycerin, pH 5,2; dann in dieser Arbeit optimiert zu 100 mM MES-HCl, 30 mM NaHSO₃, 8 mM MgSO₄, 40 mM Na-Acetat, pH 5,2) gemischt. Nach einer 5-minütigen Vorinkubation bei 37°C im Testpuffer erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 40 µl 0,1 M ATP. Zur Bestimmung kinetischer Daten (K_m - und V_{max} -Wert) wurde eine 0,1 M ATP-Stammlösung in 200 mM MgSO₄ angesetzt (entspricht einem ATP:Mg-Verhältnis von 1:2) und in unterschiedlichen Volumina zum Testansatz gegeben. In diesem Fall enthielt der Testpuffer kein MgSO₄. Sollte eine andere Komponente des Testpuffers untersucht werden, so wurde diese Komponente aus einer Stammlösung in verschiedenen Volumina zum Testansatz gegeben. Auch hier wurde der Testpuffer ohne diese entsprechende Komponente angesetzt. Bei Untersuchungen zu den Hemmstoffeinflüssen wurde die A₁-ATPase 30 min mit dem Inhibitor bei 37°C im Testpuffer vorinkubiert, bevor die Reaktion gestartet wurde.

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

2.5.3. Polyacrylamidgelelektrophorese

2.5.3.1. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteinen durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach Schägger oder Laemmli (Laemmli, 1970; Schägger und von Jagow, 1987). Die Gele wurden mit Silber (Blum *et al.*, 1987) (s. 2.5.4.2.) oder Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (Weber und Osborn, 1969) (s. 2.5.4.1.).

Zur Herstellung von Gradientengelen wurde ein Gradientenmischer verwendet. In die vordere Kammer des Gradientenmischers wurden 3,5 ml einer 10%igen Trenngellösung und in die hintere Kammer 3,5 ml einer 4%igen Trenngellösung gegeben. Kurz vor dem Gießen wurde in beide Kammern 20 µl APS (100 mg/ml) und 2 µl TEMED gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 12 - 24 h.

2.5.3.2. 2D-SDS-Gradienten-PAGE

Die Proteine wurden zunächst in der 1. Dimension in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Eine Spur wurde ausgeschnitten und entsprechend der jeweiligen Vorschrift behandelt. Sollten z. B. mit Formaldehyd quervernetzte Proteine wieder voneinander getrennt werden, so wurde der Gelstreifen im Gelpuffer nach Schägger und von Jagow (1987) 5 – 10 min in der Mikrowelle bei 600 W gekocht. Der abgekühlte Gelstreifen wurde oben zwischen zwei Polyacrylamidgel-Glasplatten geklemmt und das SDS-Polyacrylamidgradientengel um diesen Gelstreifen vorbei gegossen, so dass der Abstand zwischen dem Gelstreifen und dem noch flüssigen Gradientengel ca. 1 cm betrug. Nach dem Polymerisieren unter Luftabschluss wurde um den Gelstreifen herum das Sammelgel mit der Acrylamidkonzentration gegossen, die auch im Gelstreifen der 1. Dimension vorhanden war (z. B. 7% [w/v] Polyacrylamid). Zusätzlich wurden noch neben den Gelstreifen Taschen für den Standard und die Kontrolle ausgespart. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 12 - 24 h.

2.5.3.3. Blue-Native-PAGE

Die Auftrennung von Proteinkomplexen im nativen Zustand zur Ermittlung ihrer Untereinheitszusammensetzung erfolgte durch Blue-Native-PAGE (Schägger *et al.*, 1994). Es wurden Gradientengele mit 4 - 13% Acrylamid und Sammelgele mit 4% Acrylamid verwendet. Die Gelplatten hatten die Maße 1,4 x 1,6 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 7,0) eingesetzt.

2.5.3.4. Native-Gradienten-PAGE

Die Auftrennung von nativen Proteinkomplexen erfolgte in Gradientengelen (Andersson *et al.*, 1972) (4 - 20%) mit den Maßen 1,4 x 1,6 x 0,01 cm (Breite x Höhe x Dicke). Die Gele wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen. In die vordere

Kammer des Gradientenmischers wurden 12 ml schwere Lösung (250 mM Tris, 20% Acrylamid, 1% Bisacrylamid, 8,6% Glycerin, pH 8,5) und in die hintere Kammer 12 ml leichte Lösung (250 mM Tris, 4% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 8,6% Glycerin, pH 8,5) gefüllt. Kurz vor dem Gießen wurde in beide Kammern 60 µl APS (100 mg/ml) und 12 µl TEMED gegeben. Das Sammelgel wurde mit der leichten Lösung gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für mindestens 20 - 24 h.

2.5.4. Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.5.4.1. Coomassie-Färbung, modifiziert (Weber und Osborn, 1969)

Polyacrylamidgele wurden nach Beendigung der Elektrophorese für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in der Färbelösung (0,08% [w/v] Serva Blau G-250, 45% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) inkubiert. Anschließend wurde das Gel kurz mit H₂O_{dest} gespült und dann in Entfärbelösung (33% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) so lange inkubiert, bis sich der Hintergrund entfärbt hatte. Nach der Entfärbung wurden die Gele digital archiviert und in 5% [v/v] Eisessig bei 4°C gelagert.

2.5.4.2. Silberfärbung, modifiziert (Blum *et al.*, 1987)

Zur Färbung von Proteinen mit Silbernitrat wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese 1 – 24 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Eisessig, 0,037% [v/v] Formaldehyd) leicht schüttelnd inkubiert. Um das Methanol für die weiteren Schritte zu entfernen, wurde das Gel dreimal für 5 min mit 50% [v/v] Ethanol gewaschen, dann 1 min in einer 2 mM Thiosulfatlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 20 s wurde das Gel 20 min in einer Silbernitratlösung (24 mM AgNO₃, 0,0555% [v/v] Formaldehyd) inkubiert. Bevor die Proteine im Gel durch eine Entwicklerlösung (1,13 M Na₂CO₃, 0,08 mM Thiosulfat, 0,074% Formaldehyd) sichtbar gemacht wurden, musste das überschüssige Silbernitrat durch zweimaliges Waschen mit Wasser für jeweils 20 s entfernt werden. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurde die Entwicklerlösung rasch durch eine Stopplösung (50 mM EDTA, pH 7 - 8) ersetzt. Hiernach wurden die Gele digital archiviert und in 5% [v/v] Eisessig bei 4°C gelagert.

2.5.4.3. Densitometrische Analyse der Konzentrationen von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbungsintensität von mit Coomassie eingefärbten Proteinen aus Polyacrylamidgelen wurde für densitometrische Analysen mit Hilfe des Personal Densitometers (Fa. Molecular Dynamics, Wien, Österreich) erfasst. Die Daten wurden mit dem Computerprogramm „ImageQuant“ (Version 1.00) auf einem Macintosh G3 Computer (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, USA) bearbeitet. Die Verteilung der Färbungsintensität wurde anhand der Pixelauswertung graphisch ermittelt, und die Peakflächen wurden durch Integration berechnet. Die Stöchiometrie der Untereinheiten im Enzymkomplex konnten aus dem Verhältnis der Peakflächen zu den jeweiligen molekularen Massen der Proteine ermittelt werden.

2.5.5. Bestimmung der Molekularmasse durch Gelpermeationschromatographie (Siegel und Monty, 1966).

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie wird eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Stoke'schen Radius ermöglicht. Bei globulärer Form der Proteine ist das Elutionsvolumen umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse. Für die Gelpermeationschromatographie an einer BioRad DuoFlow-Anlage (Fa. BioRad, München) wurde eine BioPrep SE 1.000/17 Säule verwendet.

2.5.6. Expression von *malE*-Fusionsgenen und Aufreinigung der Fusionsproteine

Die Expression von *malE*-Fusionsgenen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in *E. coli* DH5 α in LB-Medium bei 37°C. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 2 h nach der Induktion geerntet und in der French-Press aufgebrochen. 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).

2.5.7. Isolierung, Solubilisierung und Aufreinigung von Einschlusskörpern (De Bernardes-Clark *et al.*, 1999)

Häufig werden bei heterologen Produktionen von Proteinen diese in Form von unlöslichen Einschlusskörpern in den Zellen abgelegt. Zur Isolierung der Einschlusskörper wurden 2 g Zellen in Puffer A (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) aufgenommen (5 ml Puffer/g Zellen), mit 7,5 mg Lysozym und 50 µg DNase/g Zellen versetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 2-malige Passage durch eine French-Press-Zelle bei 124 MPa. Der Extrakt wurde mit EDTA (20 mM), Triton X-100 (2% [w/v]) und NaCl (0,5 M) versetzt und für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Die Einschlusskörper wurden dann durch 30-minütige Zentrifugation bei 5.000 x g und 4°C sedimentiert. Die Sedimente wurden in 30 ml Puffer B (0,1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7) gewaschen. Zur Solubilisierung der Einschlusskörper wurden die jeweiligen Sedimente in Puffer C (50 mM Tris-HCl, 5 M Harnstoff, pH 7) aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (5.000 x g, 4°C, 30 min) konnten die Überstände, die das solubilierte Protein enthielten, gesammelt werden. Der letzte Reinigungsschritt der solubilierten Proteine der Einschlusskörper wurde mittels einer Anionenaustauscher-Chromatographie an einer UNOTMQ-Säule (Fa. BioRad, München) durchgeführt. Die Probe wurde mit dem Puffer C auf die Säule aufgetragen. Solubilierte Proteine binden reproduzierbar nicht an die Säule und wurden direkt im Durchfluss gesammelt (Gindl, 2000). Alle anderen kontaminierenden Proteine banden an die Säule und wurden bei der Säulenregeneration mit Puffer D (Puffer C + 1 M NaCl) eluiert.

2.5.8. Herstellung von Antisera

Zur Herstellung von Antikörpern wurde 200 µg gereinigtes Protein oder Einschlusskörper einem Kaninchen injiziert (Fa. Biomol, Göttingen). Die zweite Immunisierung erfolgte mit 100 µg nach einem Monat. Das Antiserum wurde nach zwei Monaten gewonnen. Die IgGs wurden vor der Verwendung aus den Antisera über ProteinA-Sepharose (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt. Dazu kam eine 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 Na-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 K₂HPO₄ (pH 9,5) versetzt. War in den Eluatens kein Protein mehr zu detektieren, wurde

die Säule mit 20 ml Säulenpuffer regeneriert. Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei -20°C.

2.5.9. Western-Blot-Analyse

Zur immunologischen Analyse von Proteinen mit Antiseren wurden die Proteine nach dem Semidry-Verfahren bei 15 V für 30 min auf eine Nitrocellulosemembran ProtranBA 85 (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Als Transferpuffer, mit dem die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa. Whatman, Maldstone, GB) angefeuchtet wurden, diente 100 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% Methanol, pH 7. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Amidoschwarz (0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure) für 5 min angefärbt und nach Markierung der Proteinstandards mit PBST (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 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 Protein A-Konjugat (6 µl/20 ml PBST, Fa. ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA) inkubiert und dann erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Die Detektion von Proteinen erfolgte nach Inkubation der Membran in Detektionslösung (0,03% H₂O₂, 1,2 mM Luminol, 0,2 mM p-Coumarsiure, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) für 2 min. Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (X-OMAT-AR, Fa. Kodak AG, Stuttgart).

2.5.10. Radioaktive Markierung von Proteinen (Tabor und Richardson, 1985)

Eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Expressionen von auf Plasmiden kodierten Genen ist die *in vitro*-Expression der Zielgene. Die Expressionsstudien wurden in dem *E. coli* Stamm K38 durchgeführt. Dieser Stamm ist besonders sensitiv gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum Rifampicin. Da dieser Stamm kein eigenes, die T7-RNA-Polymerase kodierendes Gen trägt, musste dieses über das Plasmid pGP1-2 in die Zellen transformiert werden. Nach der Cotransformation des Plasmids mit den zu untersuchenden Genen wurde die Kultur für die Expressionsstudien angezogen. Aus einer Kultur, die bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 30°C gewachsen war, wurden 200 µl entnommen und die Zellen nachfolgend 2x in 1 ml M9 Medium (s. 2.1.2.2.) gewaschen. Nach der Resuspension der Zellen im 4 ml M9 Medium wurde

die Kultur mit 20 µg/ml Thiamin, 0,01% [w/v], einer Aminosäurelösung (bestehen aus den 18 Aminosäuren Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln und Pro) und 1% [w/v] Glukose versetzt. Die Zellen wurden für 30 min bei 30°C im Rotationsinkubator inkubiert. Eine Temperaturerhöhung auf 42°C induzierte die Expression der zu untersuchenden Gene. Nach 15 min wurde 200 µg/ml Rifampicin zugegeben und für weitere 10 min bei 42°C inkubiert. Nach einer Temperaturerniedrigung auf 30°C und weiterer Inkubation für 20 min, wurden 10 µCi [³⁵S]-Methionin zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, 1x in 200 µl M9 Medium gewaschen und in 100 µl Denaturierungspuffer (Schägger und von Jagow, 1987) aufgenommen und 10 min bei 100°C denaturiert. 10 und 20 µl dieser Lösung wurden auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel (Schägger und von Jagow, 1987) aufgetragen und die Proteine über Nacht bei 80 V im Gel aufgetrennt. Nachdem die Gele mit Coomassie-Färbelösung (s. 2.5.4.1.) eingefärbt worden waren, wurden sie kurz mit Wasser gespült und 1 h in 1 M Natriumsalicylat inkubiert. Die Gele wurden anschließend auf Whatman-Papier getrocknet, bevor ein Röntgenfilm zur Durchführung einer Autoradiographie aufgelegt und in einer Röntgenfilmkassette für ca. 48 h bei -20°C exponiert wurde.

2.5.11. Quervernetzung von Proteinen

Das Quervernetzen von Proteinen, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, kann mittels quervernetzender Chemikalien erreicht werden. Als quervernetzendes Agens wurde in dieser Arbeit Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen (0,1 – 1% [v/v]) eingesetzt. Die Inkubationszeiten betragen 15 min – 16 h. Formaldehyd wirkt auf die nicht-ionisierten Seitengruppen der Proteine und zeigt die Tendenz zur Polymerbildung. Hierdurch besteht die Möglichkeit der Quervernetzung von Proteinen. Dieses Formaldehydpolymer ist jedoch hitzesensitiv und zerfällt bei höheren Temperaturen. Daher werden Proteinproben, die mit Formaldehyd zur Quervernetzung behandelt worden waren, nicht gekocht bevor sie im Polyacrylamidgel analysiert werden. Die Quervernetzungen konnten durch Erhitzen wieder gespalten werden. Dieses ist eine nützliche Eigenschaft zur Analyse der quervernetzten Untereinheiten.

2.6. Chemikalien, Enzyme und Gase

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

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

In dieser Arbeit sollte ein Verfahren zur heterologen Produktion und Reinigung der A₁-ATPase von *M. mazei* Gö1 und Subkomplexen davon etabliert werden. Die für die ATPase kodierenden Gene sind in der folgenden Reihenfolge auf dem Chromosom in einem Operon organisiert: *ahaH*, *ahaI*, *ahaK*, *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG*. *ahaH* kodiert für ein hydrophiles Protein, das damit wahrscheinlich Teil der A₁-Domäne oder des Stiels ist; dieses Protein wurde aber in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. *ahaI* und *ahaK* sind hydrophobe Proteine und Bestandteil der A_O-Domäne und wurden daher nicht in die Untersuchungen einbezogen. Die Gene *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* kodieren alle für hydrophile Proteine, die damit sehr wahrscheinlich an der Struktur der A₁-Domäne und des Stiels beteiligt sind. Dieser Gencluster sollte in *Escherichia coli* exprimiert werden. Weiterhin sollte ein Subkomplex bestehend aus AhaA, AhaB und AhaD gebildet werden.

3.1. Expression einzelner A₁-ATPase-Untereinheiten als Male-Fusionen und deren Gewinnung

In einem ersten Versuch musste zunächst überprüft werden, ob die archäellen ATPase-Gene in dem Bakterium *E. coli* exprimiert werden. Dazu wurden die Gene *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* jeweils per PCR amplifiziert und an das für das Maltosebindeprotein kodierende Gen *malE* fusioniert, wobei die korrekte Insertion der PCR-Fragmente im Leserahmen von *malE* in allen Fällen durch Sequenzierung verifiziert wurde. Die Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert, und die Genexpression durch Zugabe von IPTG gestartet. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, kam es in jedem Fall zur Produktion des entsprechenden Fusionsproteins. Damit war sichergestellt, dass die archäellen Proteine tatsächlich im bakteriellen Wirt gebildet werden.

Für die weiteren Untersuchungen war es wünschenswert, die Untereinheiten-zusammensetzung der in *E. coli* produzierten ATPase-Subkomplexe schnell und zuverlässig nachweisen zu können. Dazu wurde ein immunologischer Ansatz gewählt. Da methanogene Archäen kein Male enthalten und Vorversuche zeigten, dass auch *E. coli* unter den gewählten Bedingungen kein Male produziert, wurden die beschriebenen Fusionen aus Male und den entsprechenden ATPase-Untereinheiten über eine Affinitätschromatographie gereinigt und direkt den Kaninchen injiziert. Die erhaltenen Antiseren wurden gereinigt und auf ihre Spezifität untersucht.

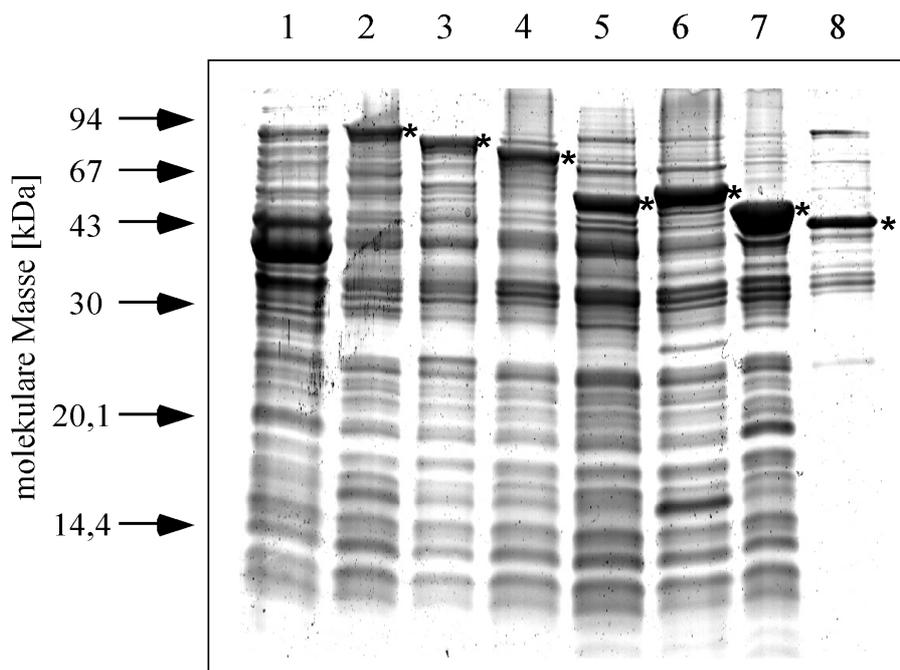


Abb. 3: Produktion von Fusionsproteinen bestehend aus MalE und archäellen ATPase-Untereinheiten in *E. coli*. Die Fusionsproteine wurden wie beschrieben in *E. coli* produziert, Zellextrakte wurden hergestellt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Spur 1: MalE; Spur 2: MalE-AhaA-Fusion; Spur 3: MalE-AhaB-Fusion; Spur 4: MalE-AhaC-Fusion; Spur 5: MalE-AhaD-Fusion; Spur 6: MalE-AhaE-Fusion; Spur 7: MalE-AhaF-Fusion; Spur 8: MalE-AhaG-Fusion. Die Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Dazu wurde *M. mazei* Gö1 auf Methanol angezogen, ein Zellextrakt hergestellt und dieser in Western-Blots gegen die Antikörper hybridisiert. Wie in Abb. 4 zu erkennen ist, reagierte das Antiserum gegen AhaA mit nur einem Protein von 65 kDa; dies entspricht der vorhergesagten Masse von 64 kDa. Das Antiserum gegen AhaB reagierte mit nur einem Protein von 55 kDa; dies entspricht der vorhergesagten Masse von 51 kDa. Das Antiserum gegen AhaC reagierte mit nur einem Protein von 41 kDa; dies entspricht der vorhergesagten Masse von 41,5 kDa. Das Antiserum gegen AhaE reagierte mit nur einem Protein von 22 kDa; dies entspricht der vorhergesagten Masse von 20 kDa. Diese vier Antiseren sind daher sehr spezifisch. Demgegenüber reagierte das Antiserum gegen AhaF hauptsächlich mit einem Protein (9 kDa) der erwarteten Größe (11 kDa), zeigte aber, wenn auch viel schwächere, Reaktionen mit größeren Proteinen; dieses Antiserum war daher nur beschränkt einsetzbar. Das Antiserum gegen die Untereinheit D reagierte mit einem 67-kDa-Protein und nicht mit einem Protein von 24 kDa, der vorhergesagten molekularen Masse von AhaD. Das Antiserum gegen AhaG zeigte keinerlei Reaktion mit dem Zellextrakt von *M. mazei* Gö1 (Daten nicht gezeigt).

Nur die vier polyklonalen Antiseren gegen AhaA, AhaB, AhaC und AhaE konnten demnach eingesetzt werden, um einwandfrei die vier Untereinheiten in *E. coli* zu detektieren. Das Antiserum gegen AhaF war beschränkt einsetzbar.

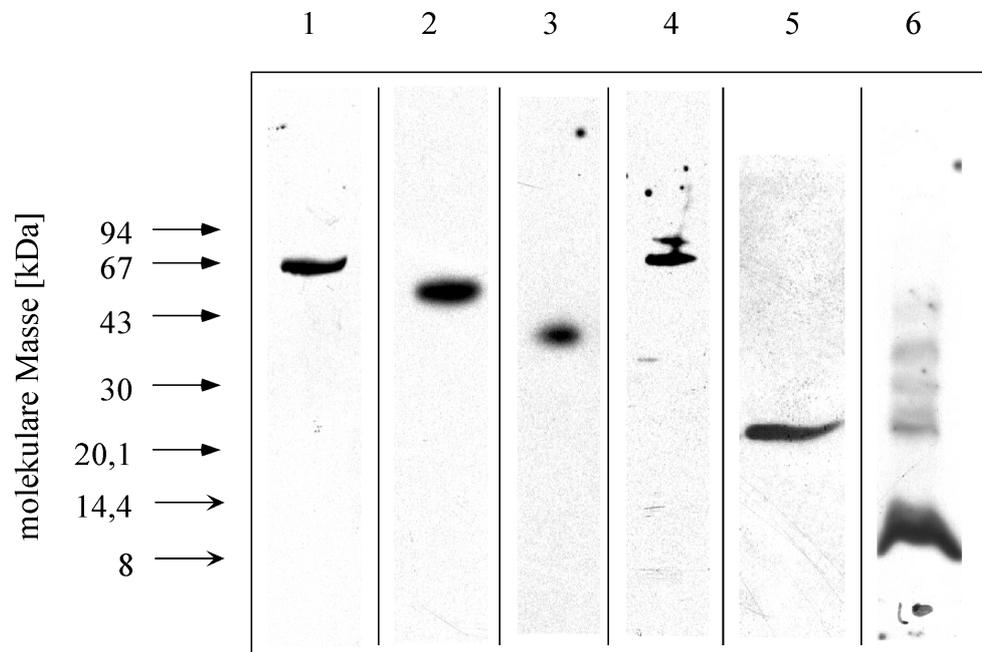


Abb. 4: Überprüfung der Spezifität der gegen die A_1 -ATPase-Untereinheiten gerichteten Antikörper. Zellextrakte von auf Methanol gewachsenen Zellen von *M. mazei* Gö1 wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die Blots wurden gegen die Antiseren gegen AhaA (Spur 1), AhaB (Spur 2), AhaC (Spur 3), AhaD (Spur 4), AhaE (Spur 5) und AhaF (Spur 6) hybridisiert.

3.2. Heterologe Expression einer funktionellen A_1 -ATPase in *E. coli*

Nachdem gezeigt worden war, dass einzelne A_1 -ATPase-Untereinheiten in *E. coli* als MalE-Fusionen produziert werden, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die einzelnen Untereinheiten auch in Abwesenheit von MalE produziert werden und stabil sind und ob diese zu einem funktionellen Komplex assemblieren.

3.2.1. Expressionsversuche mit pSÖ1

Zu Beginn dieser Arbeit stand das Plasmid pSÖ1 zur Verfügung, auf dem hinter einem T7- und einem mit IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor die Gene *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* der A₁-ATPase von *M. mazei* Gö1 enthalten sind (Abb. 5). Das Plasmid pSÖ1 wurde in die F₁F₀-ATPase-negative Mutante *E. coli* DK8 transformiert, von den Transformanden wurde ein Zellextrakt hergestellt und dieser mit den Antiseren auf die Anwesenheit der ATPase-Untereinheiten überprüft (Abb. 6). Dabei zeigte sich, dass die Untereinheiten AhaA, AhaB und AhaC gebildet wurden. Zusätzlich konnte durch das Antiserum gegen AhaF, das sich in diesem System als spezifisch erwies, eindeutig AhaF nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigte eindeutig, dass die Untereinheiten A, B, C und F stabil in *E. coli* produziert werden. Erstaunlicherweise könnte aber durch dieses Verfahren die Untereinheit AhaE nicht detektiert werden. Auch eine maximale Erhöhung der Proteinkonzentration erbrachte keine Änderung dieses Befundes. Dieses war umsomehr erstaunlich als radioaktive Markierungsexperimente mit Minizellen von *E. coli* DK6(pSÖ1) Hinweise auf die Expression von *ahaE* gegeben hatten (Lemker *et al.*, 2001). Ein möglicher Grund für die schlechte Expression von *ahaE* könnte durch das Konstrukt pSÖ1 bedingt sein. Das Insert in pSÖ1 beginnt exakt mit der putativen Shine-Dalgarno-Sequenz von *ahaE*. Da diese aber nur durch Sequenzvergleich vorhergesagt wurde, bestand zum einen die Möglichkeit, dass eine falsche Zuordnung getroffen wurde. Zum anderen könnte die stromaufwärts von *ahaE* zwischen *ahaI* und *ahaE* gelegene DNA-Sequenz von 211 Basenpaaren, die offensichtlich nicht kodierend ist, für eine stabile Expression von *ahaE* wichtig sein. Daher sollte ein neues Plasmid zu konstruiert werden, das zusätzlich die gesamte Region zwischen *ahaI* und *ahaE* enthält.

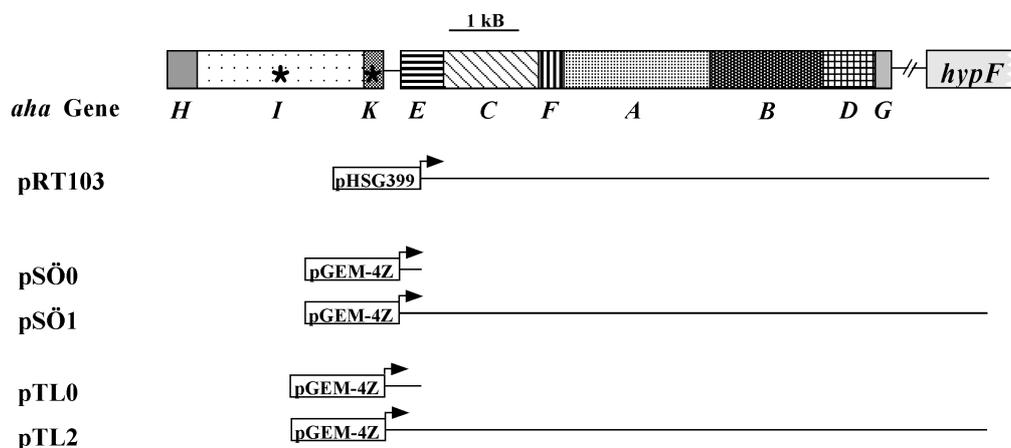


Abb. 5: Schematische Übersicht der verwendeten Plasmide. Mit Sternen markierte Gene kodieren für hydrophobe, membranständige Proteine. Pfeile zeigen die jeweilige Transkriptionsrichtung an.

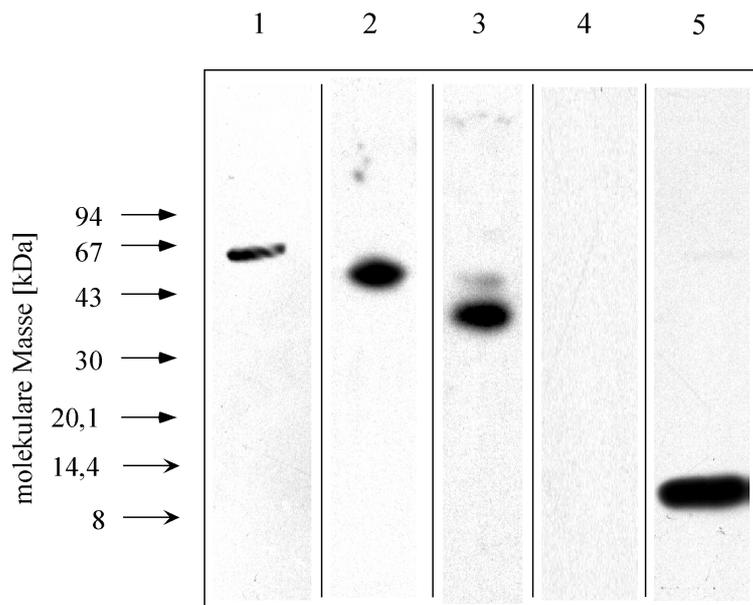


Abb. 6: Produktion von A_1 -ATPase-Untereinheiten in *E. coli* DK8(pSÖ1). Die Genexpression wurde durch IPTG induziert. 2 h nach Beginn der Expression wurde ein Zellextrakt hergestellt, in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nylonmembranen geblottet und mit den Antisera gegen die A_1 -ATPase-Untereinheiten AhaA (Spur 1), AhaB (Spur 2), AhaC (Spur 3), AhaE (Spur 4) und AhaF (Spur 5) hybridisiert.

3.2.2. Klonierung von und Expressionsanalysen mit pTL2

Die Klonierungsstrategie war ähnlich der von pSÖ1, wobei zwei Schritte benötigt wurden (Abb. 7). Im ersten Schritt wurde ein Bereich, der die intergene Region zwischen *ahaI* und *ahaE* und Teile von *ahaE* (bis zur *XbaI*-Schnittstelle) umfaßt, über PCR amplifiziert und als 416-Bp-*SalI/XbaI*-Fragment in pGEM-4Z kloniert (pTL0). In dieses Konstrukt wurde dann das *XbaI/KpnI*-Fragment aus pRT103, das die Gene *ahaE* (3' Terminus), *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* umfaßt, kloniert (pTL2). Die Identität der Konstrukte wurde jeweils durch Sequenzanalyse verifiziert. pTL2 wurde in *E. coli*(DK8) transformiert, und Expressionsanalysen wurden analog zu den Versuchen mit pSÖ1 durchgeführt. Leider wurde in keinem Fall eine Produktion der Untereinheit E in *E. coli* beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Grundlagen für diesen Effekt könnten vielfältig sein und werden in der Diskussion näher betrachtet. Obwohl AhaE also nicht nachweisbar war, sollte im folgenden überprüft werden, ob die produzierten Untereinheiten zu einem funktionellen Komplex assemblieren.

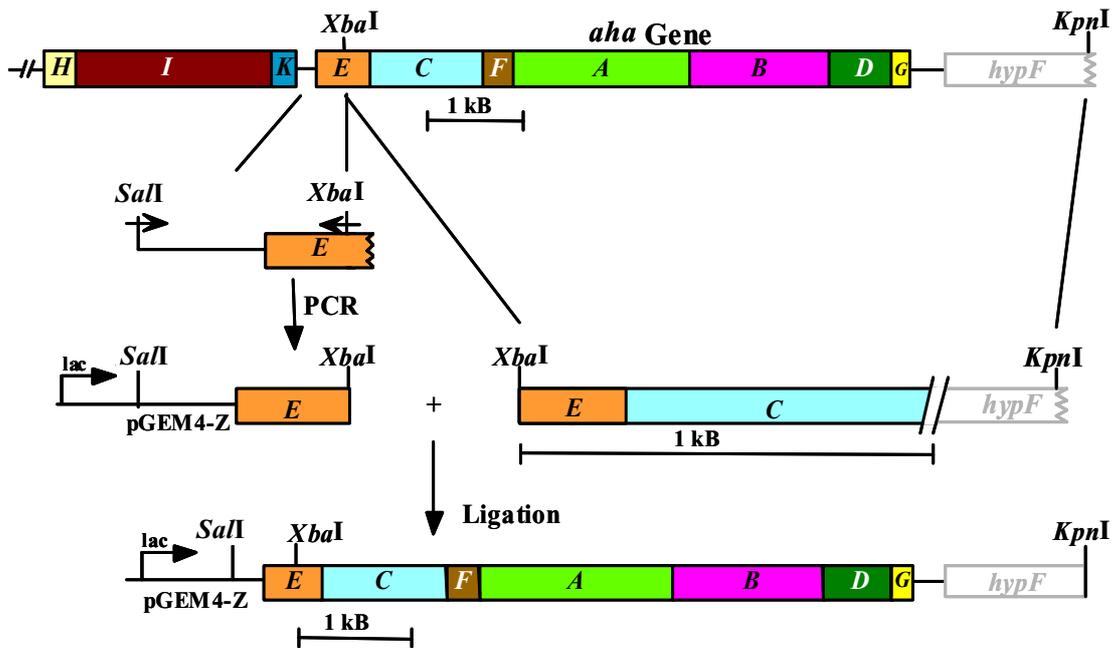


Abb. 7: Klonierung von pTL2. Mit Sternen markierte Gene kodieren für hydrophobe, membranständige Proteine. Pfeile zeigen die jeweilige Transkriptionsrichtung an.

3.2.3. Nachweis einer funktionellen A_1 -ATPase in *E. coli* DK8(pSÖ1)

Zum Nachweis der funktionellen Produktion der A_1 -ATPase wurde deren Aktivität im Rohextrakt von *E. coli*(DK8) überprüft. Der Enzymtest basiert auf dem Nachweis von Phosphat, einem der beiden Produkte der ATP-Hydrolyse. Da der Stamm *E. coli* DK8 keine F_1F_0 -ATPase enthält, kann deren Aktivität natürlich nicht mit dem Testsystem interferieren. Zellextrakte anderer *E. coli*-Stämme enthalten aber darüberhinaus beträchtliche ATPase-Aktivitäten, die durchaus zu einem Problem bei der Interpretation der Ergebnisse werden können. Glücklicherweise waren diese Fremdaktivitäten bei dem für die A_1 -ATPase aus *M. mazei* optimalen pH-Wert von 5,2 so gering, dass sie mit dem Testsystem nicht mehr nachzuweisen waren (*E. coli* DK8(pGEM-4Z, pGP1-2), siehe Tab. 7). Demgegenüber war in *E. coli* DK8(pSÖ1) eine ATPase-Aktivität von 186 mU/mg Protein nachzuweisen. Diese Aktivität war bereits ca. 19fach größer als die ATPase-Aktivität an der Cytoplasmamembran von *M. mazei* Gö1 (Wilms *et al.*, 1996).

Hemmstoffanalysen sollten eine weitere Evidenz dafür liefern, dass die beobachtete ATPase-Aktivität tatsächlich durch die A_1 -ATPase katalysiert wird. Diethylstilbestrol (DES) ist der potenteste Hemmstoff der A_1A_0 -ATPasen aus methanogenen Archäen. Wurde er in einer Konzentration von 100 μ M zum Zellextrakt hinzugegeben, war die ATPase-Aktivität in *E. coli* DK8(pSÖ1) zu 100% inhibiert. Diese Ergebnisse belegen

eindeutig, dass die ATPase-Untereinheiten nicht nur produziert, sondern auch zu einem funktionellen Komplex assembliert werden.

Tab. 7: Produktion einer funktionellen A₁-ATPase von *M. mazei* G01 in *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen. Die Expression der A₁-ATPase-Gene, die unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors stehen, wurde mit IPTG induziert. Das T7-RNA-Polymerasegen stand unter der Kontrolle des hitzeinduzierbaren λP_L-Promotors in pGP1-2, dem *lac*-Promotor in *E. coli* BL21(DE3)uncΔ702 oder dem *proU*-Promotor in *E. coli* GJ1158. Die Expression des T7-RNA-Polymerasegens wurde also entweder durch einen Temperatursprung von 30 auf 42°C, durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM oder Salz in Form von NaCl zu einer Endkonzentration von 0,3 M induziert.

| Expressions-Stamm | zu untersuchendes Plasmid ^{a)} | benutzter Promoter | spezifische A ₁ -ATPase-Aktivität [mU/mg Protein] |
|---------------------------------|---|--------------------|--|
| <i>E. coli</i> DK8 | pGEM-4Z (Kontrolle) | <i>lac</i> | 0 |
| | + pGP1-2 (Kontrolle) | T7 | 0 |
| | pSÖ1 | <i>lac</i> | 186 |
| | pSÖ1 + pUBS520 | <i>lac</i> | 165 |
| | pSÖ1 + pGP1-2 | T7 | 143 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)uncΔ702 | pGEM-4Z (Kontrolle) | T7 | 0 |
| | pSÖ1 | T7 | 40 |
| | pSÖ1 + pUBS520 | T7 | 40 |
| <i>E. coli</i> GJ1158 | pGEM-4Z (Kontrolle) | T7 | 19 |
| | pSÖ1 | T7 | 150 |
| | pSÖ1 + pUBS520 | T7 | 133 |

^{a)} Stämme und Plasmide, s. „Material & Methoden“.

3.2.4. Untersuchungen zur Optimierung der Enzymaktivitäten durch Variation der Expressionsbedingungen

Um die Ausbeute der ATPase-Aktivität in den Rohextrakten zu erhöhen, wurden die Variablen (Expressionsstamm und -bedingungen) der Expressionssysteme variiert (Tab. 7). *E. coli* DK8 ist ein idealer Expressionsstamm, da in seinem Genom die F₁F₀-ATPase-Gene komplett deletiert sind (Klionsky *et al.*, 1984). Somit entfällt das Problem der Trennung von endogener F₁- und heterologer A₁-ATPase während der für später geplanten Reinigung der A₁-ATPase. Zur Überproduktion von Proteinen ist häufig die Verwendung des T7-Promotors vorteilhaft. Deshalb sollte dieser Promotor auf seine Eignung zur Expression des ATPase-Genclusters untersucht werden. Da *E. coli* DK8 kein T7-RNA-Polymerase-Gen enthält, wurde dies über das Plasmid pGP1-2 in den Stamm gebracht. Die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens in pGP1-2 wird über den hitzeinduzierbaren λP_L-Promotor reguliert, wobei eine Temperaturerhöhung

auf 42°C die Induktion bewirkt. Nach der Temperaturerhöhung wurde die A₁-ATPase induziert, allerdings waren die Aktivitäten nicht gegenüber der Expression vom *lac*-Promotor erhöht, sondern sogar leicht reduziert.

E. coli BL21(DE3)uncΔ702 besitzt wie *E. coli* DK8 keine eigene F₁F₀-ATPase-Aktivität (Nichols und Harwood, 1997). Allerdings trägt dieser Stamm das Gen für die T7-RNA-Polymerase, dessen Expression unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors steht, im Genom. Die Induktion der Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Auch in diesem Fall wurde eine aktive ATPase gebildet, allerdings mit weit weniger Aktivität als in den anderen Stämmen.

E. coli GJ1158 trägt ebenfalls das T7-RNA-Polymerasegen im Genom, der Nachteil ist jedoch, dass die F₁F₀-ATPase-Gene nicht deletiert sind. In diesem Stamm steht die Expression des T7-RNA-Polymerasegens unter der Kontrolle eines *cis*-regulatorischen Elements des *proU*-Operons. Die Expression wird induziert, in dem die Salzkonzentration im Medium auf 0,3 M NaCl erhöht und somit ein Salzstress erzeugt wird. Durch die Anwesenheit der F₁F₀-ATPase zeigte dieser Stamm natürlich auch in der Kontrolle eine - wenn auch geringe - ATPase-Aktivität. Nach Induktion der Expression des ATPase-Genclusters nahm die spezifische Aktivität aber um den Faktor 8 auf 150 mU/mg zu.

Methanogene Archäen, wie andere Archäen auch, verwenden für einige Aminosäuren andere Codons als *E. coli*; dies verhindert oft eine Überproduktion des Zielproteins. Dieses Problem kann umgangen werden, indem die für seltene tRNAs kodierenden Gene in den Expressionstamm eingebracht werden. Allerdings hatte die Anwesenheit des Plasmides pUBS520, das die Gene für die in *E. coli* seltenen tRNAs (tRNA^{Arg}_{AGA/AGG}) trägt, keinerlei stimulierenden Effekt auf die ATPase-Aktivitäten (Tab. 7).

Als Ergebnis dieser Expressionsstudien bleibt festzuhalten, dass die beste Expression der A₁-ATPase-Gene im Stamm *E. coli* DK8 zu ermitteln war, wenn die Expression über den *lac*-Promotor induziert wurde. Die spezifische A₁-ATPase-Aktivität betrug in diesem Fall 186 mU/mg Protein. Wurde das Plasmid pTL2 als Quelle des ATPase-Genclusters gewählt, wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten. Mit diesem Expressionssystem war es nun möglich, nach einer Massenkultivierung von *E. coli* DK8(pTL2) (s. 2.2.3.) im Fermenter genügend Ausgangsmaterial für eine Reinigung der ATPase zu erhalten. Allerdings mußte vor der zeitaufwendigen Reinigung noch die Stabilität der heterolog produzierten ATPase überprüft werden.

3.2.5. Stabilität der A_1 -ATPase

Eine der größten Nachteile bei der Funktionsanalyse von methanoarchäellen ATPasen ist nicht nur, dass den bislang gereinigten ATPasen Untereinheiten fehlten, sie waren zudem auch extrem instabil. Daher war es von großem Interesse, die Stabilität der heterolog synthetisierten A_1 -ATPase zu untersuchen. Wie aus Abb. 8 zu entnehmen ist, war die A_1 -ATPase bei Temperaturen von -70 bis -5°C nicht stabil. Die Inkubation bei 8°C resultierte in einer erhöhten Stabilität des Enzyms. Das beste Ergebnis wurde jedoch bei der Inkubation auf Eis (0°C) erzielt. Nach 18 Tagen war noch eine A_1 -ATPase-Aktivität von 50% zu detektieren.

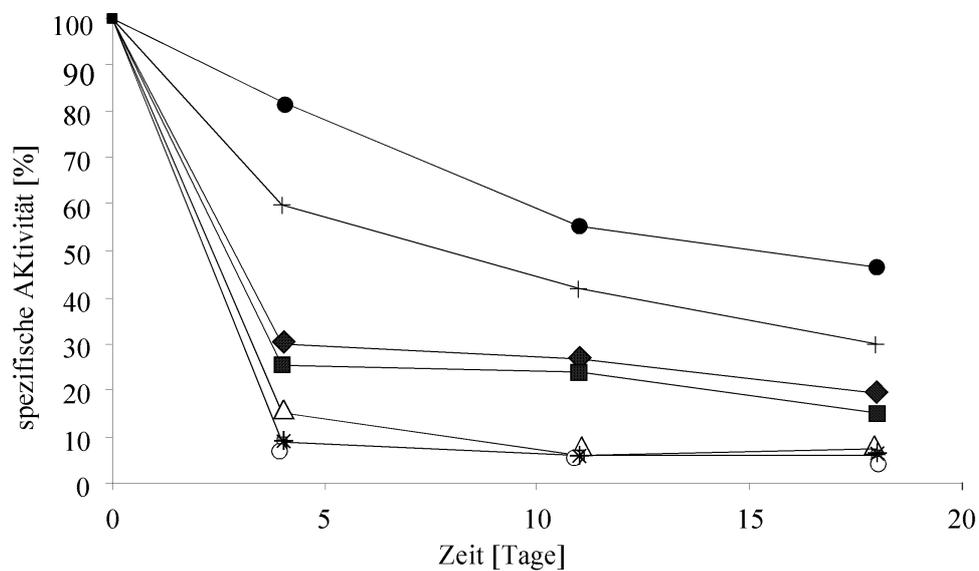


Abb. 8: Stabilität der A_1 -ATPase bei verschiedenen Temperaturen. Zellfreier Extrakt von *E. coli* DK8(pSÖ1) wurde bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden nach jeweils 4, 11 und 18 Tagen der Inkubation bestimmt. (●), 0°C ; (+), 8°C ; (◆), -70°C ; (○), -20°C ; (*), -5°C ; eingefroren im flüssigen N_2 und gelagert bei (■) -70°C oder (Δ) -20°C .

3.3. Reinigung der heterolog produzierten A₁-ATPase

Für die Reinigungen wurde der Klon *E. coli* DK8(pTL2) genutzt, da dieser noch einen Großteil der intergenen Region zwischen *ahaE* und *ahaI* besitzt, deren Einfluss auf die Expression noch immer unklar war.

3.3.1. Herstellung der Cytoplasmafraktion

Da die heterolog produzierte A₁-ATPase ein löslicher Enzymkomplex ist, wurde sie aus dem Cytoplasma von *E. coli* DK8(pTL2) gereinigt. Dazu wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation (2h, 4°C, TI50.2 Rotor, Fa. Beckmann) aus dem Rohextrakt entfernt. Das Cytoplasma wies eine ATPase-Aktivität von 0,35 U/mg Protein auf.

3.3.2. Ammoniumsulfatfällung

Proteine befinden sich dann in Lösung, wenn sie von einer genügend großen Anzahl von Wassermolekülen umgeben sind. Werden diese entfernt, so verlieren die Proteine ihre Löslichkeit und präzipitieren. Da unterschiedliche Proteine verschieden viel Wasser benötigen, um in Lösung zu bleiben, kann man sich diese Eigenschaft für ihre Trennung zu Nutze machen. Ein sehr verbreiteter Weg, Wasser zu binden, ist die Zugabe von Salzen (z. B. Ammoniumsulfat) oder hochmolekularen Polymerverbindungen (z. B. Polyethylenglycol). Im Falle der A₁-ATPase wurde eine Fällung mit Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) gewählt. Dazu wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung im TMDG-Puffer (s. 2.3.) hergestellt, die dann im definierten Volumen entsprechend der gewählten Endkonzentration an Ammoniumsulfat dem jeweiligen Extrakt langsam unter Kühlung zugegeben wurde.

Um einen relativ engen Konzentrationsbereich zu finden, in dem möglichst nur noch die A₁-ATPase präzipitiert, wurde in Vorversuchen die Ammoniumsulfatkonzentration sukzessiv zuerst in 10%-Schritten (v/v) erhöht. Im kritischen Fällungsbereich der A₁-ATPase führte die Verkleinerung der Schritte auf 5% (v/v) zu einer besseren Auflösung (Abb. 9). Bestimmt wurden nach der Fällung die jeweiligen Proteinmengen in den Überständen und den resolubilisierten Sedimenten sowie die jeweiligen A₁-ATPase-Aktivitäten. In Vorversuchen wurde das Fällungsverhalten der A₁-ATPase untersucht. Dabei zeigte sich, dass 80% der A₁-ATPase-Aktivität bei 65% (NH₄)₂SO₄ gefällt wurden (Abb. 9).

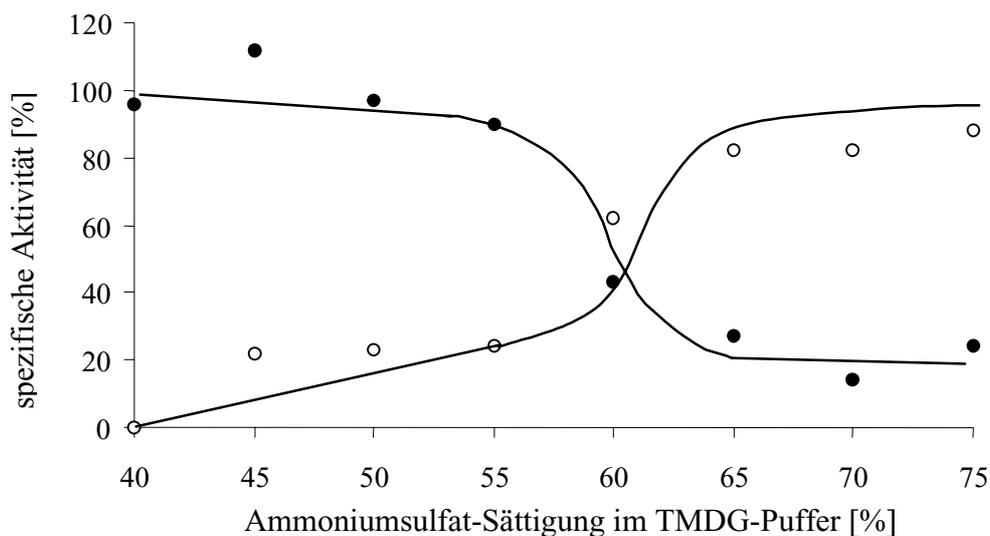


Abb. 9: Ammoniumsulfatfällung der A_1 -ATPase Die Cytoplasmafraktion von *E. coli* DK8(pTL2) wurde mit verschiedenen Mengen an Ammoniumsulfat versetzt. Nach der Zentrifugation wurde die A_1 -ATPase-Aktivität in den Überständen (●) und Sedimenten (○) untersucht.

Das Sediment wurde nach der Fällung mit 65% Ammoniumsulfat in ca. 20 ml TMDG-Puffer gelöst und erneut gefällt. Zunächst wurde mit 55% Ammoniumsulfatsättigung gefällt, wobei die ATPase im Überstand blieb. Aus diesem Überstand wurde die ATPase bei 65% Ammoniumsulfatsättigung gefällt. Das Sediment wurde in einem Endvolumen von 2 ml TMDG-Puffer aufgenommen. In dieser Lösung war noch eine Gesamt-ATPase-Aktivität von 90 U festzustellen, was einem 63%igem Verlust der ATPase allein in diesem Reinigungsschritt entsprach. Die spezifische ATPase-Aktivität nach dieser Behandlung betrug 1 U/mg Protein und wies bereits hier eine Anreicherung der A_1 -ATPase um den Faktor 2,7 auf. Die 2-ml-Probe wurde direkt für die nun folgende erste Gelfiltration eingesetzt.

3.3.3. Gelfiltration an BioPrep SE 1000/17

Die Gelpermeationschromatographie wurde mit der DuoFlow-Apparatur (Fa. BioRad, München) und einer BioPrep SE 1000/17-Gelfiltrationssäule (Ausschlussvolumen 1000 kDa) durchgeführt. Die Flussrate des Laufpuffers bzw. Nidrigsalzpuffers (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 6,9) betrug 60 cm/h. Die Salzkonzentration wurde auf 150 mM NaCl eingestellt, da sich bei dieser Konzentration die Proteine, die zum Eichen der Säule eingesetzt wurden, am besten auftrennen ließen. Zudem konnte diese

Salzkonzentration auch bei dem unter 3.2.3. beschriebenen Ionenaustauscherschritt eingesetzt werden, ohne dass die A_1 -ATPase frühzeitig von der DEAE-Säule eluierte.

Die 2-ml-Probe nach der Ammoniumsulfatfällung wurde direkt auf die Säule gegeben. Da es sich um eine 15-ml-Säule handelte, und das maximale Volumen, das auf einmal aufgetragen werden kann, nicht über 2% (v/v) des Säulenvolumens liegen sollte, musste die 2-ml-Probe in sechs Läufen sukzessiv aufgetragen werden. Die sechs Durchgänge wurden getrennt voneinander analysiert; exemplarisch ist ein Lauf in Abb. 10 gezeigt.

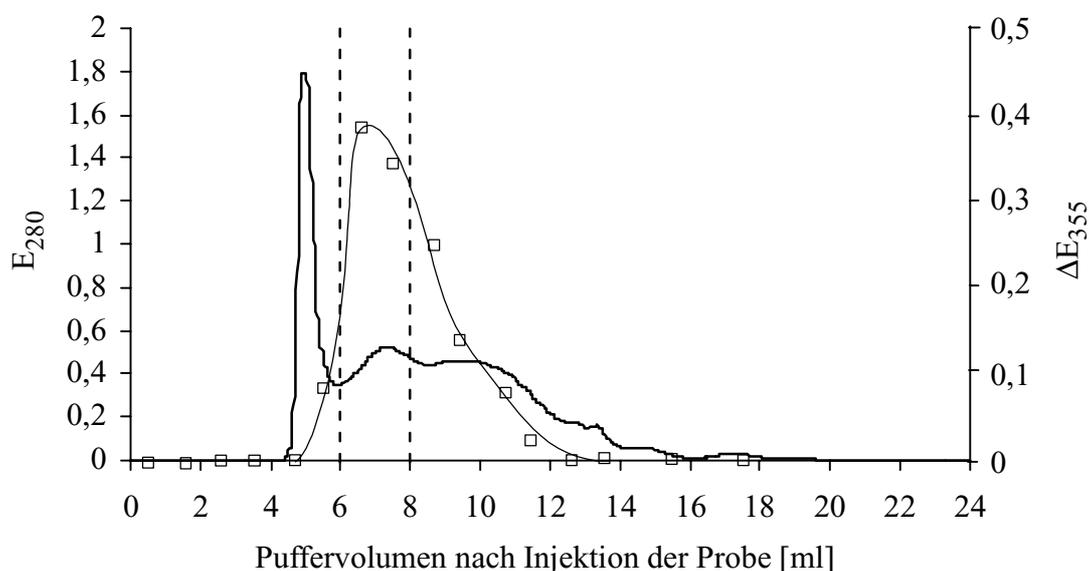


Abb. 10: Reinigung der A_1 -ATPase durch Gelfiltration an BioPrep SE 1000/17. Elutionsprofil der BioPrepSE 1000/17-Säule. Die Proteinkonzentration ist als Linie dargestellt. Der Großteil der ATPase-Aktivität (\square) befand sich in den beiden 1-ml-Fraktionen bei 7 und 8 ml Puffervolumen (vertikale Linien).

Im Laufe der Filtration wurden direkt nach der Injektion der Probe 1-ml-Fraktionen gesammelt. Nach dem Ausschlußvolumen war leider keine scharfe Auftrennung der Proteine zu erkennen. Allerdings war der Großteil der ATPase-Aktivität auf die Fraktionen 7 und 8 begrenzt. Diese Fraktionen aller sechs Parallelen wurden vereinigt (insgesamt 12 ml). Die Gesamtaktivität der A_1 -ATPase betrug nach diesem Reinigungsschritt noch 52 U, was einer Ausbeute von 22% entspricht. Die spezifische Aktivität betrug 1,9 U/mg Protein, was einen Anreicherungsfaktor von 5,4 ergibt.

3.3.4. Anionenauschromatographie an DEAE

Zur weiteren Aufreinigung wurde die gewonnene 12-ml-Probe auf eine prääquilibrierte BioScale DEAE5 Säule (Fa. BioRad, München) gegeben. Die Äquilibration dieser Säule wurde mit zwei Puffern durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 20 ml Niedrigsalzpuffer (s. 3.2.3.) gespült, dann mit 20 ml Hochsalzpuffer (Niedrigsalzpuffer mit 1 M NaCl) von vielleicht vorhandenen restlichen Proteinen befreit, um abschließend wieder mit 20 ml Niedrigsalzpuffer in die Ausgangssituation für die folgende Proteinreinigung gebracht zu werden. Die Flussrate betrug über den gesamten Verlauf dieser Chromatographie 0,5 ml/min. Nachdem die 12-ml-Probe auf die Säule aufgetragen worden war, wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer (entspricht 50 ml) von ungebundenen Proteinen gesäubert. Die Salzkonzentration wurde nun über ein Volumen von 10 Säulenvolumen von 150 auf 430 mM NaCl angehoben und das Eluat fraktioniert gesammelt. Das Profil dieser Reinigung ist in Abb. 11 zu sehen.

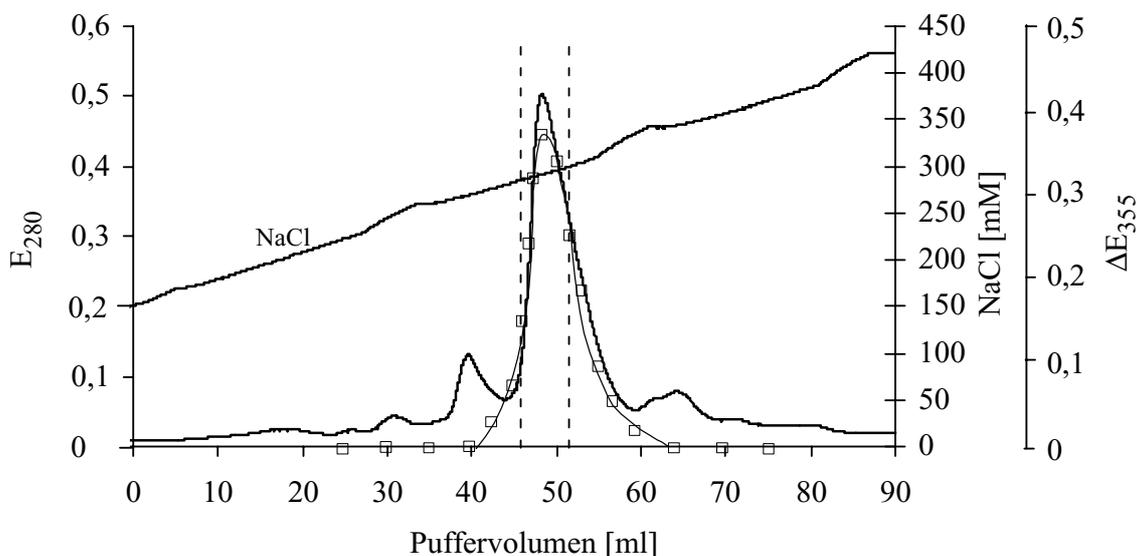


Abb. 11: Reinigung der A₁-ATPase durch Ionenauschromatographie an DEAE. Elutionsprofil der BioScaleDEAE5-Säule. Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen der BioPrepSE 1000/17-Säule. Die Proteinkonzentration ist als Linie dargestellt. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen. Der Großteil der ATPase-Aktivität (□) befand sich in den vier 1-ml-Fractionen bei 48, 49, 50 und 51 ml Puffervolumen (vertikale Linien).

Wie dem Elutionsprofil zu entnehmen ist, wurde bei einer Salzkonzentration von ca. 280 bis 330 mM NaCl sehr viel Protein eluiert. Bei der Bestimmung der ATPase-

Aktivität stellte sich heraus, dass die A_1 -ATPase in genau diesen Fraktionen enthalten war. Die vier 1-ml-Fraktionen bei 48, 49, 50 und 51 ml Puffervolumen mit den höchsten ATPase-Aktivitäten wurden vereinigt. Die gesamte A_1 -ATPase-Aktivität betrug nach diesem Reinigungsschritt noch 28,6 U, was einer Ausbeute von 11,7% entsprach, wohingegen die spezifische ATPase-Aktivität um den Faktor 13 auf 4,6 U/mg Protein anstieg. Eine Analyse der ATPase-enhaltenden Fraktionen nach der DEAE-Säule mittels SDS-PAGE ergab, dass neben den ATPase-Untereinheiten noch 2 Polypeptide mit molekularen Massen von 70 und 29 kDa enthalten waren (vergl. Abb. 15). Nach der Ermittlung ihrer N-terminalen Sequenzen wurden diese als DnaK und GrpE identifiziert. Es galt daher, diese kontaminierenden Proteine von der A_1 -ATPase abzutrennen. Dazu wurde eine weitere Gelchromatographie durchgeführt.

3.3.5. Gelfiltration an Sephacryl S-300 HR

Die Sephacryl S-300 HR (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) hat eine Ausschlussgrenze von 1500 kDa. Bei dieser Säule wurde ein Probenvolumen von 1 ml gewählt, was einem Anteil von 0,8% (v/v) des Bettvolumens der Säule entsprach. Um die Zeit für die Auftrennung der Probe so kurz wie möglich zu halten, wurde die 4-ml-Probe aus 3.3.4. zunächst mittels eines zuvor mit BSA abgesättigten Centrex UF-2-Ultrafiltrationsröhrchens (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa auf 1 ml Probenvolumen eingeengt. Die Flussrate in der Sephacryl S-300 HR-Säule betrug während der Auftrennung 7,5 cm/h. Als Laufpuffer diente wiederum der Nidrigsalzpuffer (s. 3.2.3.). Im Elutionsprofil der Abb. 12 sind bei 51,3 und 55,4 ml Elution (Puffervolumen nach Injektion der Probe) jeweils eine „Schulter“ und ein Maximum zu erkennen. ATPase-Aktivität war in beiden Fraktionen zu finden; die höhere spezifische Aktivität mit 8,4 U/mg Protein befand sich im zweiten Maximum. Auch die Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte eindeutig, dass die kontaminierenden Polypeptide DnaK und GrpE im zweiten Maximum nicht mehr zu detektieren war, sodass nur noch die gereinigte A_1 -ATPase vorlag.

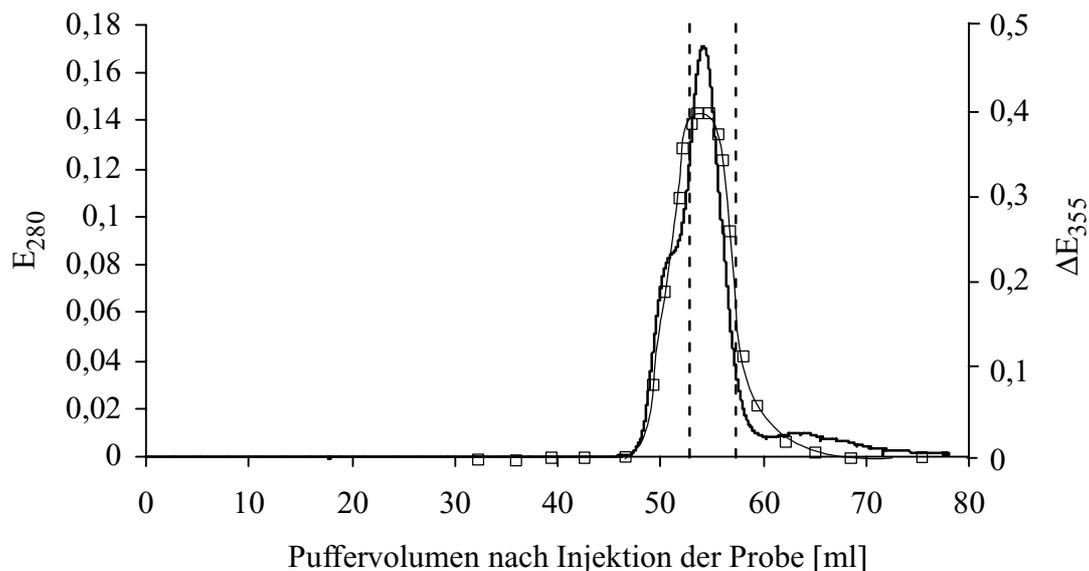


Abb. 12: Reinigung der A_1 -ATPase durch Gelfiltration an Sephacryl S-300 HR. Elutionsprofil der vereinigten Fraktionen der DEAE-Säule. Die Proteinkonzentration ist als Linie dargestellt. Die höchste ATPase-Aktivität (\square) befand sich in den 1-ml-Fraktionen von 53 bis 58 ml Puffervolumen (vertikale Linien).

3.3.6. Zusammenfassung der Reinigung

Die heterolog produzierte A_1 -ATPase wurde aus dem Cytoplasma von *E. coli* DK8(pSÖ1) durch Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie und einer weiteren Gelfiltration 27,4fach angereichert. Die Ausbeute betrug 10,3% oder 0,1125 mg Protein/l Kultur. In Tab. 8 ist die Reinigung zusammenfassend dargestellt.

Tab. 8: Zusammenfassung der Reinigung der A_1 -ATPase aus *E. coli* DK8(pSÖ1).

| | Protein [mg · ml ⁻¹] | Volumen [ml] | Aktivität [U] | Ausbeute [%] | spez. A_1 -ATPase Aktivität [U · mg ⁻¹] | Anreicherung [x fach] |
|-----------------------|--|-----------------|------------------|-----------------|---|--------------------------|
| Cytoplasma | 35 | 20 | 244 | 100 | 0,35 | 1 |
| Fällung | 42 | 2,2 | 90 | 37 | 1 | 2,7 |
| BioPrep SE 1000/17 | 2,3 | 12 | 52 | 22 | 1,9 | 5,4 |
| BioScale DEAE5 | 1,6 | 4 | 28,6 | 11,7 | 4,6 | 13,1 |
| Sephacryl S-300 HR | 0,9 | 3 | 25 | 10,3 | 9,6 | 27,4 |

* Die Aktivität wurde im optimierten Enzymassay bestimmt.

Die Analyse der ATPase-enhaltenden Fraktionen nach den einzelnen Reinigungsschritten in der nativen Polyacrylamidgelelektrophore (Abb. 13) zeigt eindeutig, dass ein Komplex von 350 kDa bis zur apparenten Homogenität gereinigt wurde. Dieser Komplex reagiert mit dem Antiserum gegen AhaA, wodurch er eindeutig als A_1 -ATPase-Komplex identifiziert wurde.

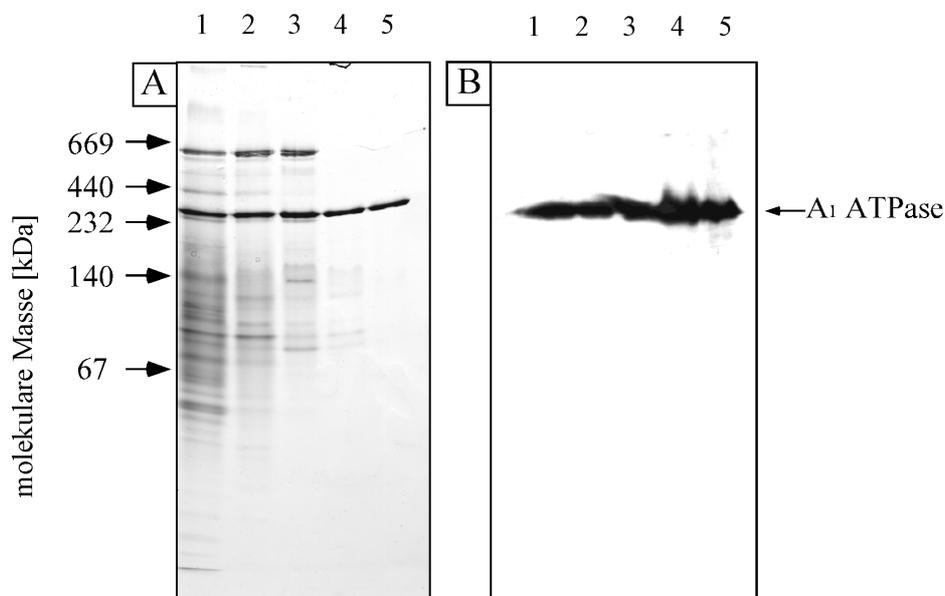


Abb. 13: Proteinmuster der ATPase-enhaltenden Fraktionen nach den einzelnen Reinigungsschritten. A: Coomassie Blue G-250 gefärbtes natives Polyacrylamid-Gradientengel (4-20%); in jeder Spur wurden gleiche Mengen an A_1 -ATPase aufgetragen. B: Western-Blot des nativen Polyacrylamid-Gradientengels mit dem anti AhaA-Antiserum. Spur 1, Cytoplasma von *E. coli* DK8 (pTL2); Spur 2, $\text{NH}_2(\text{SO}_4)_2$ -Präzipitat; Spur 3, vereinigte Fraktionen der BioPrep SE 1000/17-Chromatographie; Spur 4, vereinigtetes DEAE-Eluat; Spur 5, vereinigte Fraktionen nach der Sephacryl S-300 HR-Chromatographie.

3.4. Biochemische Charakterisierung der ATPase

3.4.1. Untereinhenitzusammensetzung des isolierten A_1 -ATPase-Komplexes

Der gereinigte A_1 -ATPase-Komplex wurde in der SDS-PAGE auf seine Untereinhenitzusammensetzung untersucht. In Abb. 15 ist zu sehen, dass der Komplex aus 5 Untereinheiten von 65, 55, 41, 28 und 9 kDa besteht. Die Proteine oberhalb von 65 kDa sind keine Untereinheiten der A_1 -ATPase, sondern auf Aggregationen zurückzuführen. Das Enzym neigt zu ausgeprägter Denaturierung bzw. zu Aggregatbildung. In Abb. 14 ist das Denaturierungsverhalten der gereinigten A_1 -ATPase bei verschiedenen Denaturierungsbedingungen dargestellt. Je höher die

gewählte Temperatur zur Denaturierung ist, umso mehr zerfallen auch die einzelnen Untereinheiten der A_1 -ATPase. Nur eine milde Denaturierung des Enzyms bei 37°C für 1 h ergab eine reproduzierbare Denaturierung des A_1 Komplexes.

Die Identifizierung der ATPase-Untereinheiten erfolgte zum einen durch immunologische Untersuchungen, zum anderen durch N-terminale Sequenzierungen. Das 65-kDa-Protein reagierte mit dem Antiserum gegen AhaA, das 55-kDa-Protein mit dem Antiserum gegen AhaB, das 41-kDa-Protein mit dem Antiserum gegen AhaC und das 9-kDa-Protein mit dem Antiserum gegen AhaF (Abb. 15). Daraus kann geschlossen werden, dass das 65-kDa Protein AhaA, das 55 kDa-Protein AhaB, das 41-kDa-Protein AhaC und das 9-kDa-Protein AhaF ist. Dieser Befund wurde durch die N-terminalen Sequenzierungen verifiziert (Tab. 9). Weiterhin konnte durch die Sequenzermittlung das 28-kDa-Protein eindeutig als AhaD bestimmt werden. Die ermittelten Aminosäuresequenzen entsprachen den aus der DNA-Sequenz vorhergesagten Primärsequenzen. Damit konnten die bisher nur postulierten Start-Codons einwandfrei verifiziert werden (siehe Diskussion).

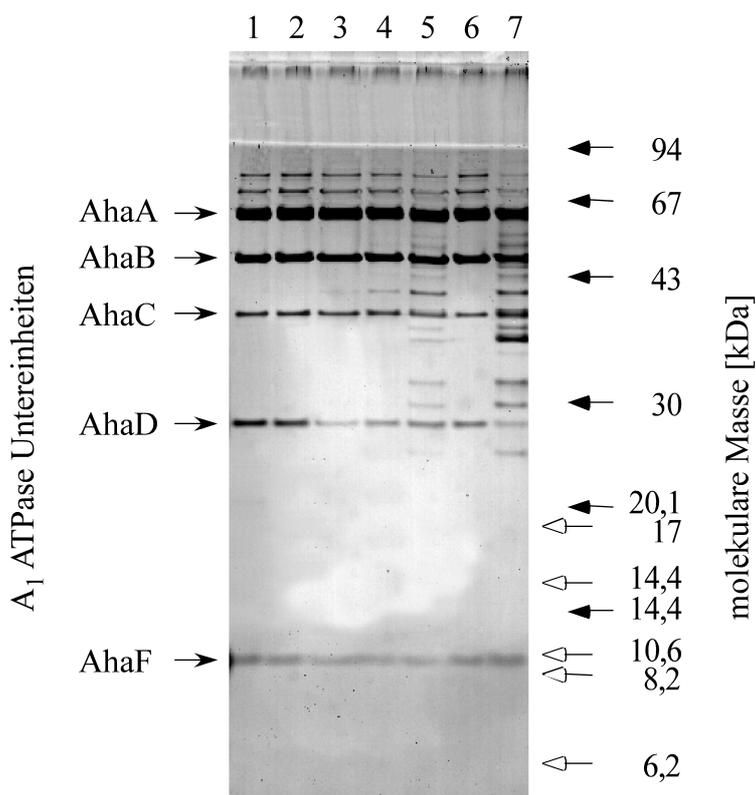


Abb. 14: Denaturierungsverhalten der A_1 -ATPase. Das Enzym wurde unter verschiedenen Bedingungen denaturiert (Spur 1, 1 h 25°C; Spur 2, 1 h 37°C; Spur 3, 1 h 50°C; Spur 4, 1 h 60°C; Spur 5, 1 h 80°C; Spur 6, 10 sec. 100°C; Spur 7, 10 min 100°C), in der SDS-PAGE ausgetrennt und mit Silber angefärbt.

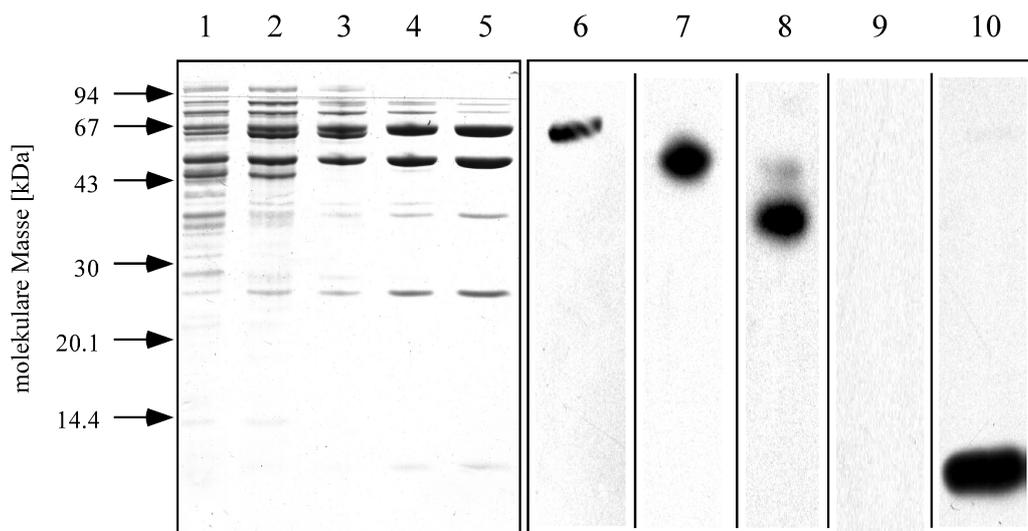


Abb. 15: Analyse der Untereinheitszusammensetzung der A_1 -ATPase. Die ATPase enthaltenden Fraktionen nach den einzelnen Anreicherungs-schritten wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 gefärbt; Spur 1, Cytoplasma von *E. coli* DK8 (pTL2); Spur 2, $NH_2(SO_4)_2$ Präzipitat; Spur 3, vereinigte BioPrep SE 1000/17 Fraktionen; Spur 4, vereinigt DEAE Eluat; Spur 5, vereinigte Sephacryl S-300 HR Fraktionen. Die gereinigte A_1 -ATPase wurde im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembranen geblottet. Die Blots wurden gegen die Antiseren gegen AhaA (Spur 6), AhaB (Spur 7), AhaC (Spur 8), AhaE (Spur 9) und AhaF (Spur 10) hybridisiert.

Tab. 9: Gen-Polypeptid Vergleich der A_1 -ATPase von *M. mazei* Gö1.

| Gen/ Untereinheit | Sequenzen ^{ab} |
|-------------------|--|
| <i>ahaA</i> | <u>GTG</u> GAA GTA AAA GGT GAA |
| AhaA | M E V K G E |
| <i>ahaB</i> | <u>ATG</u> GTC AAA GAG TAC AAG ACG ATC ACT CAG ATT GCA GGG CCT |
| AhaB | - (A) K E Y K T I T Q I A G P |
| <i>ahaC</i> | <u>ATG</u> CGG CTT TTG GAG AAT CTC TGG GGG AAA AAA CCC TCA CGA |
| AhaC | M R L L E N L W G K K P S R |
| <i>ahaD</i> | <u>ATG</u> GCT CAG CAG GAC GTA AAA CCA ACT CGT |
| AhaD | - A Q Q D V K P T R |
| <i>ahaF</i> | <u>ATG</u> GAG TTA GCA GTG ATC GGA AAG AGC GAA TTC |
| AhaF | M E L A V I G K S E F |

^a Startcodons sind unterstrichen

^b (), Unstimmigkeiten zur DNA-Analyse; -, keine Aminosäure

3.4.2. Bestimmung der molekularen Masse des A_1 -ATPase-Komplexes

Die molekulare Masse der gereinigten A_1 -ATPase von *M. maezi* Gö1 wurde mittels Gelfiltration durch den Vergleich mit den Elutionsvolumina von 6 Standardproteinen bekannter Masse bestimmt. Die Elutionsvolumina der Standardproteine mit einer molekularen Masse von 1,35 bis 670 kDa ergaben eine lineare Beziehung zum Logarithmus ihrer Massen (Abb. 16). Aus dieser Eichkurve wurde die molekulare Masse der A_1 -ATPase zu 355 kDa bestimmt.

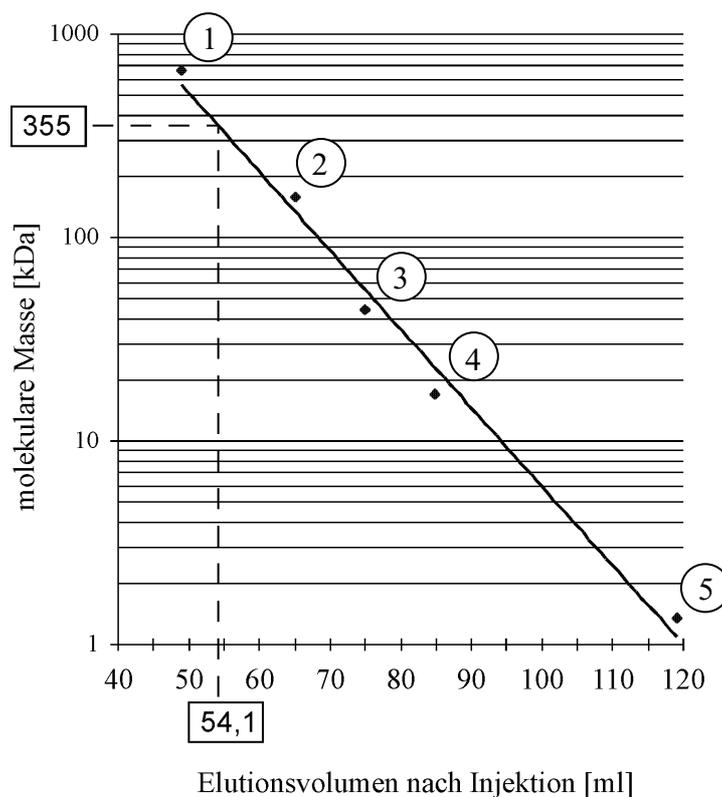


Abb. 16: Bestimmung der molekularen Masse der A_1 -ATPase. Es sind die Elutionsvolumina der Standardproteine/-moleküle (♦) und der A_1 -ATPase (○) gegen den Logarithmus ihrer molekularen Masse aufgetragen worden. Als Standard wurde der „BioRad size exclusion standard“ (Fa. BioRad, München) verwendet. 1, Thyroloblin (670 kDa); 2, IgG (158 kDa); 3, Ovalbumin (44 kDa); 4, Myoglobin (17 kDa); 5, Vitamin B₁₂ (1,35 kDa).

Diese Experimente zeigten, dass der A_1 -ATPase-Komplex mit einer molekularen Masse von 355 kDa die Untereinheiten A, B, C, D und F enthält. Die Untereinheit E war im Komplex nicht enthalten. Densitometrische Analysen ergaben eine Stöchiometrie der Untereinheiten im Komplex von A_3B_3CDF (Abb. 30).

Nachdem die heterolog produzierte A_1 -ATPase zur apparenten Homogenität gereinigt wurde und ihre Untereinheitenzusammensetzung aufgedeckt war, wurden Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Enzyms aufgenommen. Zunächst werden die Untersuchungen zur Funktion der A_1 -ATPase beschrieben.

3.4.3. Substratspezifität der A_1 -ATPase

Neben ATP konnte das gereinigte Enzym auch andere Nukleotide umsetzen, allerdings waren die Raten deutlich geringer als die der mit ATP bestimmten. Mit GTP als Substrat war die Aktivität nur noch 50, mit UTP nur noch 33 und mit CTP nur noch 20%. ADP und Pyrophosphat wurden nicht hydrolysiert (Abb. 17)

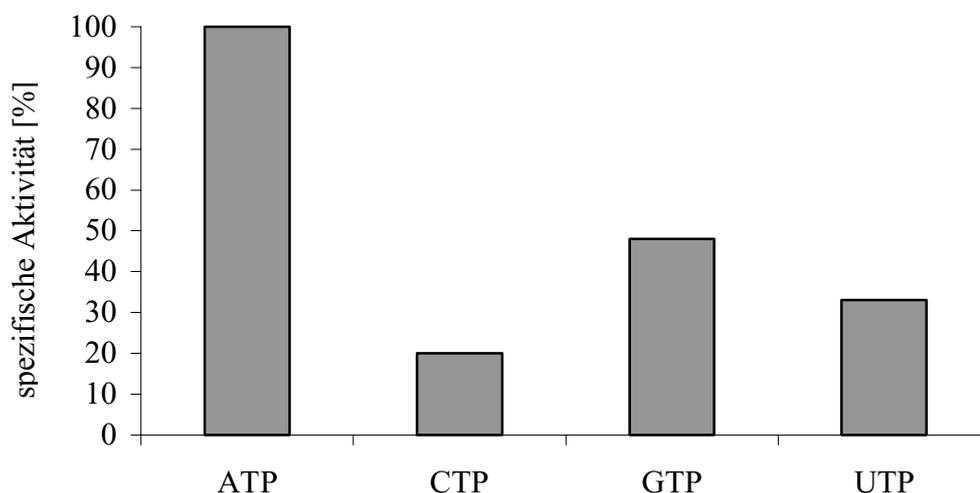


Abb. 17: Substratspezifität der A_1 -ATPase. Die Nukleotide wurden in einer Konzentration von 4 mM im optimierten Puffer (100 mM MES, 30 mM NaHSO_3 , 40 mM Na-Acetat, 8 mM MgSO_4 , pH 5,2) eingesetzt. 100% Aktivität entspricht 9,6 U/mg Protein.

3.4.4. Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von divalenten Kationen

Mg^{2+} -Ionen dienen häufig als Metallkomponenten im ATP-Metallion-Komplex. Ob dieses auch bei der gereinigten A_1 -ATPase zutreffend war, wurde im folgenden untersucht. Eingesetzt wurden die divalenten Kationen Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+} in der jeweiligen Konzentration von 10 mM. Da einige der Salze als Sulfatsalze kaum oder nur schwer löslich waren, wurden die jeweiligen Chloridsalze verwendet. Die höchsten Aktivitäten wurden mit Mg^{2+} bestimmt (Abb. 18). Allerdings

waren die Aktivitäten mit MgCl_2 um 17% niedriger als mit MgSO_4 . Alle anderen divalenten Kationen konnten Mg^{2+} nur begrenzt ersetzen. So betrug die Aktivitäten mit Fe^{2+} nur 60, mit Zn^{2+} nur 42, mit Mn^{2+} nur 32, mit Ni^{2+} nur 30 und mit Ca^{2+} nur 11%. Co^{2+} konnte Mg^{2+} dagegen nicht ersetzen.

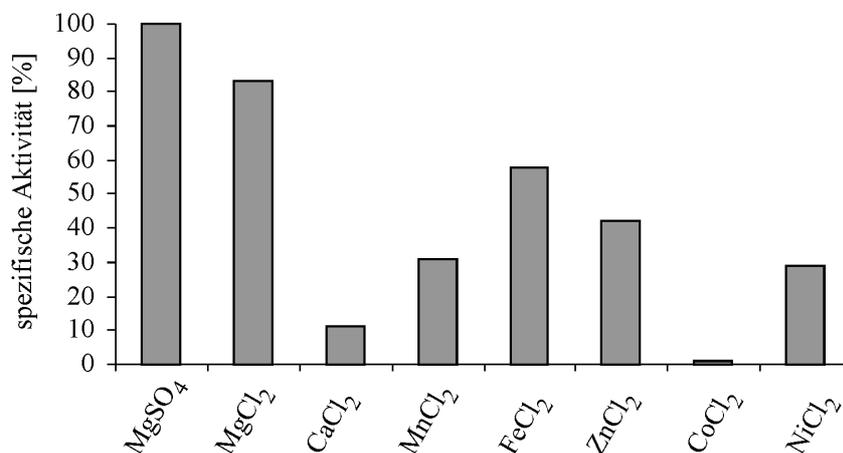


Abb. 18: Effekt verschiedener divalenter Kationen auf die A_1 -ATPase-Aktivität. Die Kationen wurden in einer Konzentration von 10 mM im optimierten Puffer (100 mM MES, 30 mM NaHSO_3 , 40 mM Na-Acetat, 4 mM ATP, pH 5,2) eingesetzt. 100% Aktivität entspricht 9,6 U/mg Protein.

3.4.5. Ermittlung des pH-Optimums

Das eigentliche Substrat für die ATPase ist ein Komplex aus Mg^{2+} und ATP^{4-} , in der Stöchiometrie 2:1. Bei der Ermittlung des pH-Optimums ist daher zu beachten, dass unterschiedliche pH-Werte zu unterschiedlichen Protonierungszuständen des ATP's führen. ATP^{4-} liegt im Gleichgewicht mit H-ATP^{3-} , Mg-H-ATP^- und Mg-ATP^{2-} vor (Abb. 19).

Durch eine Veränderung der Mg-Konzentration oder/und des pH-Wertes werden die Gleichgewichte verschoben und das Mg : ATP –Verhältnis verändert. Somit musste für jeden gegebenen pH-Wert zunächst die optimale Mg-Konzentration im Testpuffer ermittelt werden. Als Pufferkomponente wurde stets MES gewählt, da sich andere getestete Puffer inhibierend auf die A_1 -ATPase auswirkten (Daten nicht gezeigt). Die Tests wurden mit 4 mM ATP durchgeführt.

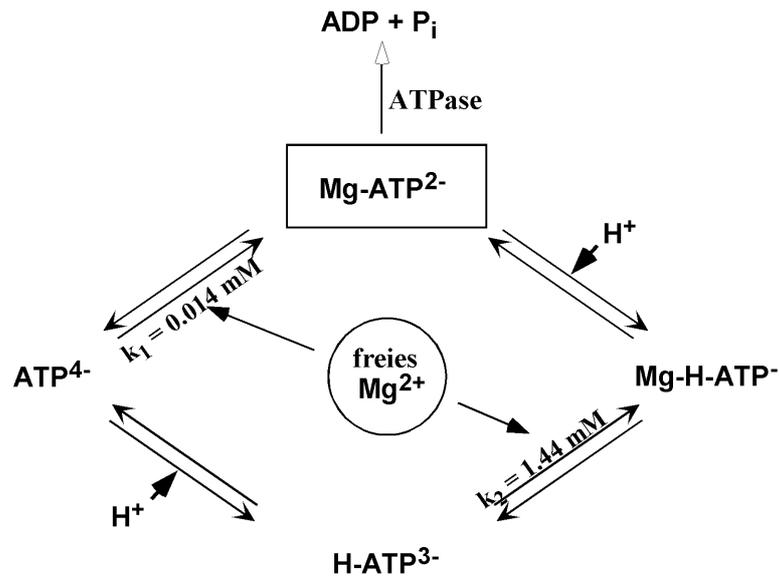


Abb. 19: Die Abhängigkeit der $Mg-ATP^{2-}$ -Konzentration vom pH-Wert.

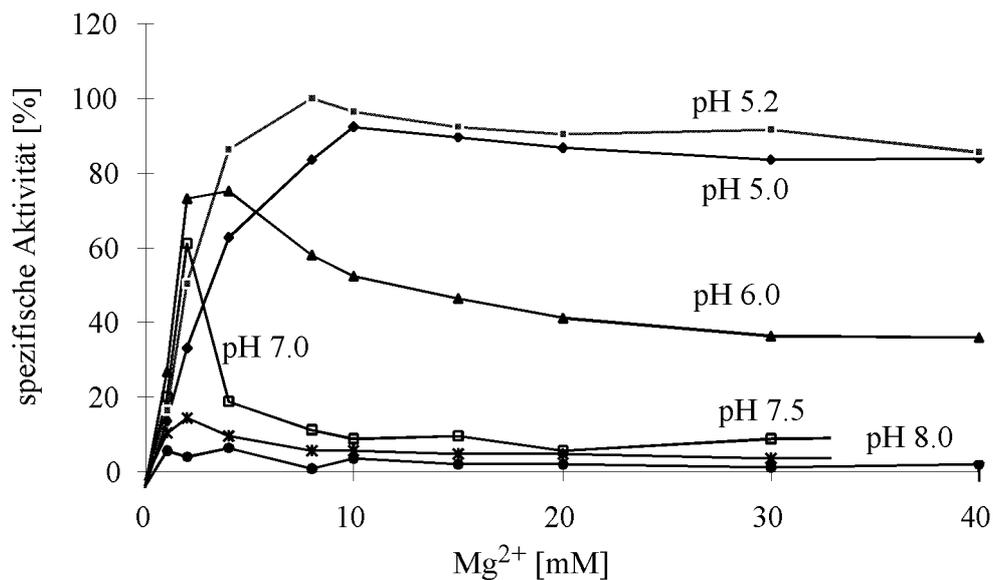


Abb. 20: Einfluss der Mg^{2+} -Konzentration auf die A_1 -ATPase-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten. Die spezifischen A_1 -ATPase-Aktivitäten wurden im optimierten Puffer mit 4 mM ATP, steigenden Mg^{2+} -Konzentrationen und bei pH-Werten von pH 5.0 (\blacklozenge), pH 5.2 (\blacksquare), pH 6.0 (\blacktriangle), pH 7.0 (\square), pH 7.5 ($*$), und pH 8.0 (\bullet) bestimmt. 100% Aktivität entspricht 9,6 U/mg Protein.

In Abb. 20 ist der Effekt der Mg^{2+} -Konzentration auf die Aktivität der gereinigten A_1 -ATPase unter verschiedenen pH-Werten dargestellt. Dabei bestätigte sich der theoretisch vorhergesagte Effekt. Die optimale Mg^{2+} -Konzentration war deutlich vom

verwendeten pH-Wert abgänglich. Bei jedem getesteten pH-Wert stieg mit steigender Mg^{2+} -Konzentration zunächst auch die Enzymaktivität an bis diese ein Maximum erreichte, um dann wieder leicht abzufallen. Die Aktivitäts-Maxima waren bei den jeweils getesteten pH Werten unterschiedlich hoch und bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen zu detektieren.

Trägt man nun die Maxima der Enzymaktivitäten aus Abb. 20 gegen den pH Wert auf, so ergibt sich daraus die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert des Puffers, bereinigt um den Nebeneffekt auf den Protonierungsgrad des ATP's (Abb. 21). Maximale Aktivitäten waren bei pH 5,2 zu verzeichnen, eine Erniedrigung der Protonenkonzentration führte zu einer ständig abnehmenden ATPase-Aktivität. Bei pH 8 konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Vergleicht man allerdings die Daten, die bei variablen Mg:ATP (1-10 mM Mg^{2+} : 4 mM ATP) und einer fixen Mg:ATP-Stöchiometrie (10 mM Mg^{2+} : 4 mM ATP) erzielt wurden, wird deutlich, dass bei einem physiologischen pH von 7.0 in dem korrigierten System immerhin noch eine Aktivität von 60% festgestellt werden konnte, während bei der fixen Mg:ATP-Stöchiometrie von 2,5:1 keine Aktivität mehr beobachtet wurde (Wilms *et al.*, 1996). Dieses Experiment löst das alte Phänomen, das immer wieder beobachtet aber nicht erklärt werden konnte, warum methanoarchäelle ATPasen im physiologischen pH-Bereich *in vitro* inaktiv sind (siehe Diskussion).

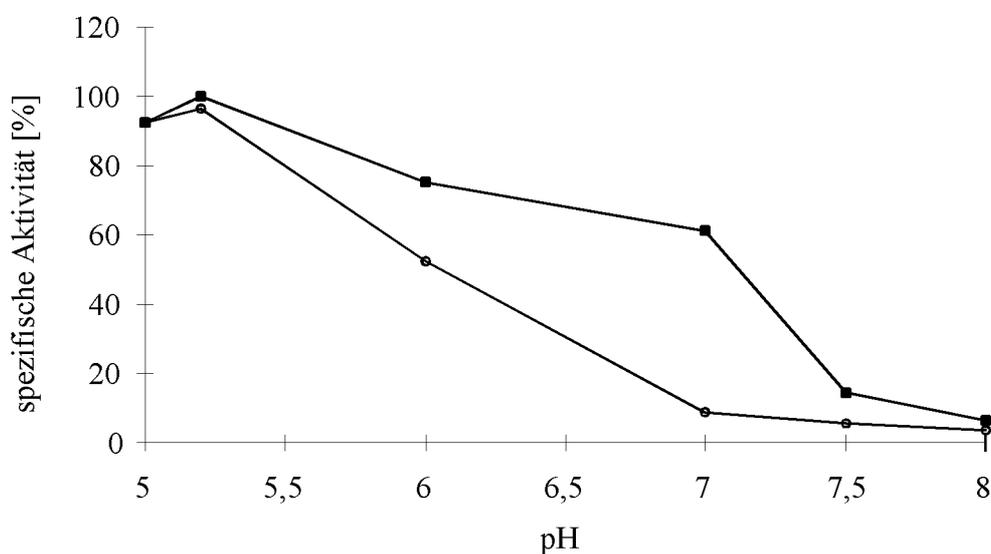


Abb. 21: Abhängigkeit der ATPase-Aktivität vom pH-Wert bei konstanten und variierenden Mg^{2+} -Konzentrationen. (○), spezifische A_1 -ATPase-Aktivität, ermittelt im optimierten Puffer (100 mM MES, 30 mM $NaHSO_3$, 40 mM Na-Acetat) mit 4 mM ATP und 10 mM Mg^{2+} unter definierten pH Bedingungen. (■), spezifische A_1 -ATPase-Aktivität, ermittelt im optimierten Puffer mit 4 mM ATP und 10 bei pH 5, 8 bei pH 5,2, 4 bei pH 6, 2 bei pH 7, 2 bei pH 7,5 und 1 mM Mg^{2+} bei pH 8. 100% Aktivität entspricht 9,6 U/mg Protein.

3.4.6. Hemmung der A₁-ATPase durch Alkohole

Alkohole können zwei ganz verschiedene Wirkungen auf die Aktivitäten der ATPasen haben. Zum einen wurde gezeigt, dass geringe Mengen an Ethanol und Methanol die Enzymaktivität zu stimulieren vermögen, in anderen Systemen führen Alkohole aber auch zur Hemmung der Aktivität. Die A₁-ATPase-Aktivität sank mit steigendem Glyzeringehalt im Puffer (Abb. 22). Bei einer Glyzerinkonzentration von 10% (v/v) betrug die Aktivität des Enzyms nur noch 70%. Der Zusatz von Glycerin führte also zur Hemmung der Aktivität.

Ebenso verliefen die Experimente mit Ethanol. Ethanol spielt als Lösungsmittel von Hemmstoffen eine wichtige Rolle. Aus Abb. 22 wird deutlich, dass Ethanol nur bis zu einer Konzentration von ca. 1% (v/v) dem Testpuffer zugegeben werden konnte, ohne dass die A₁-ATPase zu sehr gehemmt worden wäre.

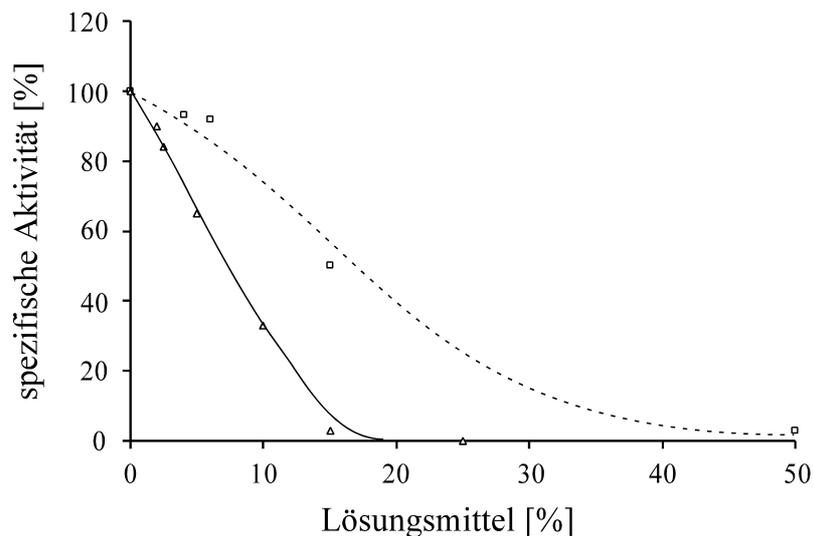


Abb. 22: Einfluss von Alkoholen auf die ATPase-Aktivität. Die ATPase wurde mit Glycerin (□) oder Ethanol (Δ) für 5 min vorinkubiert, bevor die Aktivität im optimierten Puffer (100 mM MES, 30 mM NaHSO₃, 40 mM Na-Acetat, 8 mM MgSO₄, 4 mM ATP, pH 5,2) gemessen wurde. 100% Aktivität entspricht 9,6 U/mg Protein.

3.4.7. Stimulierung der A₁-ATPase durch Sulfit

Sulfit ist ein bekanntes, aktivierendes Agens vor allem methanoarchäeller ATPasen. In Abb. 23 ist zu erkennen, dass NaHSO₃ auch die Aktivität der gereinigten A₁-ATPase stimuliert. In Abwesenheit von NaHSO₃ ist die Aktivität nur 35% der maximalen Aktivität. Eine Zugabe von NaHSO₃ führt zu einer Stimulierung der Aktivität, bis bei 30 mM NaHSO₃ ein Plateau eintritt; die maximale Stimulierung beträgt 290%. NaHSO₃ konnte durch Na₂SO₃ ersetzt werden (Daten nicht gezeigt).

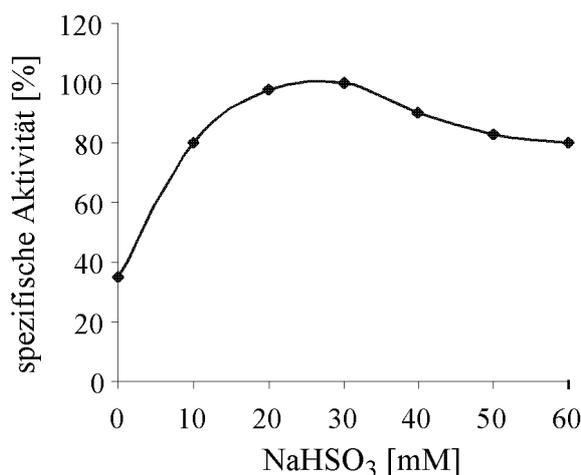


Abb. 23: Einfluss von NaHSO₃ auf die ATPase-Aktivität. Die ATPase wurde mit NaHSO₃ für 5 min vorinkubiert, bevor die Aktivität im optimierten Puffer (100 mM MES, 40 mM Na-Acetat, 8 mM MgSO₄, pH 5,2) gemessen wurde. 100% Aktivität entspricht 9,6 U/mg Protein.

3.4.8. Einfluss von DTE auf die Aktivität der A₁-ATPase

Von einigen A₁- bzw. V₁-ATPasen ist bekannt, dass deren enzymatische Aktivität durch Thiolmodifikation inaktiviert werden (Nanba und Mukohata, 1987; Schneider, 1987). In einigen Fällen bewirkte die Zugabe von Thiolen eine Steigerung der archäellen ATPase-Aktivität (Schobert und Lanyi, 1989). Die am Enzym bewirkte Thiol-Modifikation bedeutet, dass im oxidierten Zustand Disulfidbrücken ausgebildet werden und das Enzym damit inaktiviert wird. Um zu untersuchen, wie sich Thiole auf die enzymatische Aktivität der gereinigten A₁-ATPase aus *M. mazei* Gö1 auswirken, wurde der Effekt von DTE überprüft. Allerdings hatte DTE in Konzentrationen bis zu 10 mM keinen Effekt auf die ATPase-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

3.4.9. Einfluss von organischen Säuren auf die ATPase-Aktivität: Stimulierung durch Acetat

Organische Säuren sind bekannte Aktivatoren verschiedener ATPasen (Braley und Piper, 1997; Piper *et al.*, 1997). Daher sollte der Effekt von Na-Acetat, Na-Propionat, Na-Succinat oder Na-Maleinat auf die Aktivität überprüft werden. Diese Versuche wurden mit Cytoplasma von *E. coli* DK8(PSÖ1) durchgeführt; die Kontrollen waren Cytoplasmapräparationen von *E. coli* DK8(pGEM-4Z). Die Anwesenheit der Säuren hatte nur einen marginalen Effekt auf die ohnehin äußerst geringe Aktivität in der Kontrolle *E. coli* DK8(pGEM-4Z), womit ein Effekt auf endogene ATPase-Aktivität ausgeschlossen werden konnte. Die ATPase-Aktivität im Cytoplasma von *E. coli* DK8(pSÖ1) betrug ohne die organischen Säuren jeweils ca 0,45 U/mg Protein. Die Zugabe von Na-Propionat, Na-Succinat oder Na-Malat ließ die ATPase-Aktivität ab einer Konzentration von 10 mM auf maximal 0,6 U/mg ansteigen. Demgegenüber stimulierte Na-Acetat die Aktivität um ein Vielfaches (Abb. 24).

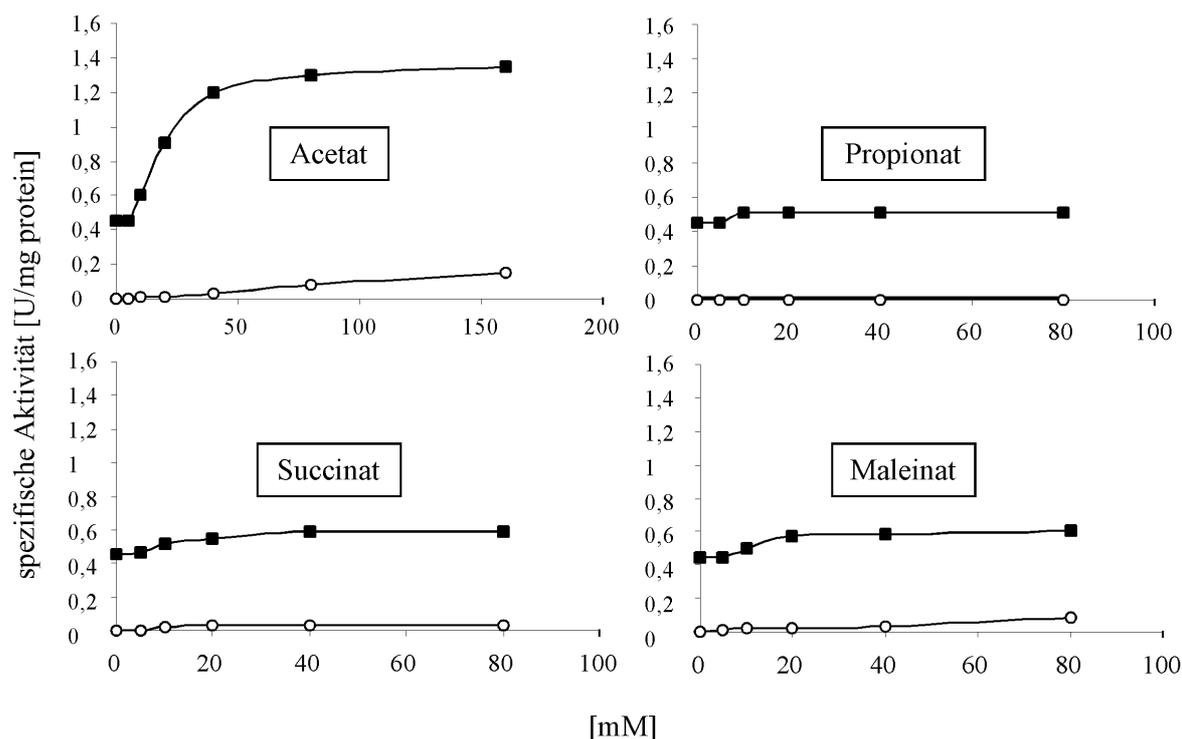


Abb. 24: Einfluss organischer Säuren auf die Aktivität der A₁-ATPase. Die ATPase-Aktivität wurde im Cytoplasma von *E. coli* DK8(pGEM-4Z) (Kontrolle) (○) oder *E. coli* DK8(pSÖ1) (■) bestimmt. Das Cytoplasma wurde mit den organischen Säuren in der angegebenen Konzentration für 5 min vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 4 mM ATP gestartet wurde.

Durch den Zusatz von 40 mM Essigsäure wurde die spezifische Aktivität um den Faktor 3 auf 1,2 U/mg Protein erhöht. Konzentrationen über 40 mM führten zu keiner weiteren Steigerung der Aktivität. Der gleiche Stimulationsfaktor von 3 wurde auch im Test mit der gereinigten A₁-ATPase nachgewiesen. Ohne den Zusatz von Essigsäure betrug die spezifische ATPase-Aktivität nur 35% (Daten nicht gezeigt).

3.4.10. Ermittlung eines optimierten Puffersystems für die Aktivität der A₁-ATPase

Die bisherigen Daten wurden genutzt, um den Puffer für die A₁-ATPase zu optimieren. Als optimal erwies sich folgende Pufferzusammensetzung: 100 mM MES, 30 mM NaHSO₃, 40 mM Na-Acetat, 8 mM MgSO₄, pH 5,2. Die Reaktionen wurden jeweils mit 4 mM ATP gestartet.

3.4.11. Ermittlung kinetischer Daten der A₁-ATPase

Die kinetischen Daten wurden im optimierten Puffersystem ermittelt. Die Enzymaktivität war abhängig von der Konzentration des Substrates Mg-ATP, Substratsättigung wurde bei ca. 8 mM Mg-ATP erzielt. (Abb. 25). Aus der doppelt reziproken Auftragung (Abb. 26) ließ sich der K_M -Wert für Mg-ATP zu $1,3 \pm 0,3$ mM bestimmen, die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} betrug 13 ± 3 U/mg Protein. Aus V_{\max} wurde in Verbindung mit der molekularen Masse der gereinigten A₁-ATPase (355 kDa) die Wechselzahl des Enzyms zu $77 \pm 18 \cdot s^{-1}$ bestimmt. Die Anzahl der besetzten aktiven Zentren der gereinigten A₁-ATPase wurde nach Gleichung (1) errechnet.

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1)$$

Die Anzahl der besetzten aktiven Zentren der A₁-ATPase betrug 0,723. D. h., dass bei den eingesetzten 4 mM ATP⁴⁻, 8 mM Mg²⁺ und einem pH-Wert von 5,2 und der daraus resultierenden spezifischen Aktivität von 9,6 U/mg Protein bei einer Substratkonzentration von 3,4 mM Mg-ATP²⁻ 72,3% aller aktiven Zentren des Enzyms belegt sind.

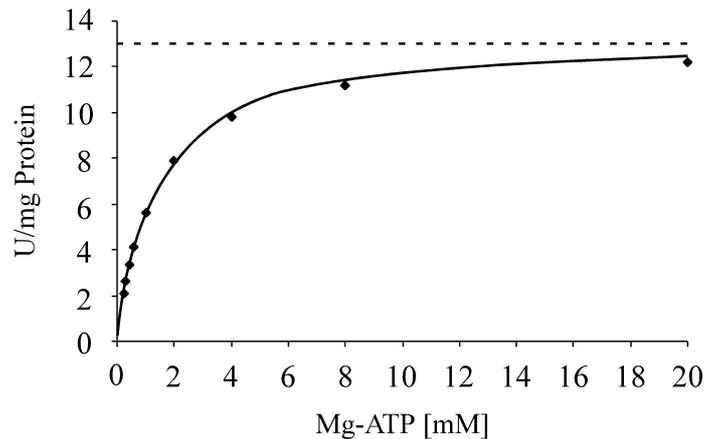


Abb. 25: Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von der Mg-ATP-Konzentration. Die Enzymaktivität wurde im optimierten Testpuffer mit steigenden Substratkonzentrationen bestimmt.

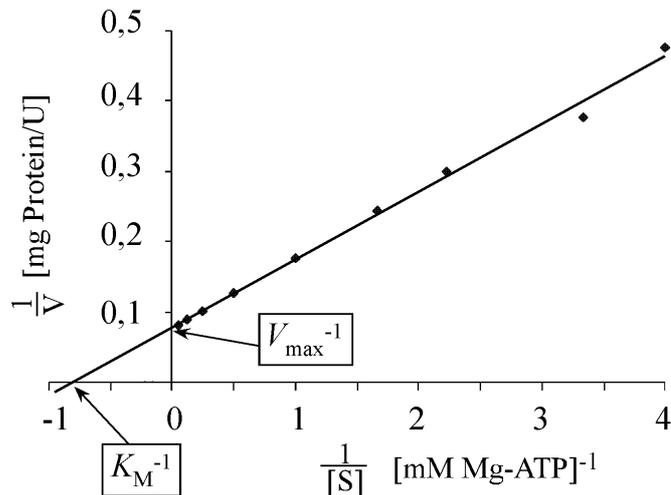


Abb. 26: Lineweaver-Burk-Plot der Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von der Mg-ATP-Konzentration. Die in Abb. 26 ermittelten Daten wurden zur Bestimmung der maximalen Enzymgeschwindigkeit und des K_m -Wertes reziprok aufgetragen.

3.4.12. Hemmung der A_1 -ATPase durch Diethylstilbestrol und dessen Derivate

F_1F_0 -, A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Inhibitoren. Der effektivste Inhibitor der methanoarchäellen ATPase ist das Diethylstilbestrol (DES) (Becher und Müller, 1994), wobei die Wirkung von DES aber bisher nur an Cytoplasmamembranen untersucht wurde. Da DES als Hemmstoff der hydrophoben F_0 -Domäne der F_1F_0 -ATPase beschrieben wurde (McEnery *et al.*, 1989), wurde angenommen, dass DES wahrscheinlich mit der

A_0 -Domäne interagiert. Um zu testen, ob DES auch auf die A_1 -ATPase eine hemmende Wirkung hat, wurde es in einer Endkonzentration von 100 μM dem Enzymtestpuffer zugesetzt. In zellfreien Extrakten von *E. coli* DK8(pSÖ1) war in Gegenwart von 650 nmol DES/mg Protein (100 μM) keinerlei ATPase-Aktivität mehr feststellbar. Dieses Experiment zeigte, dass DES mit der hydrophilen A_1 Domäne der A_1A_0 -ATPase interagiert. Eine zusätzliche Interaktion mit der A_0 Domäne kann durch dieses Experiment aber nicht ausgeschlossen werden.

Um einen ersten Hinweis auf die Art und Weise der DES-ATPase-Interaktion zu erhalten, wurde DES in einer Endkonzentration von 100 μM zu 100 μl zellfreiem Extrakt gegeben (5,7 mg Protein/ml) und 30 min bei 37°C inkubiert. 30 μl des Ansatzes wurde für einen ATPase-Test eingesetzt, sodass der Verdünnungsfaktor des Inhibitors 1:37 betrug. Dennoch war keine ATPase-Aktivität detektierbar. Dieses läßt auf eine kovalente Bindung von DES an das Enzym oder eine irreversible Schädigung des Enzyms durch DES schließen.

DES inhibiert die A_1 -ATPase nicht-kompetitiv; aber es war nichts darüber bekannt, wie dieses Molekül chemisch auf das Enzym einwirkte. Daher wurden die DES-Derivate DES-Dipropionat, Dienstrol, Hexestrol und *trans*-Stilben (Abb. 27) eingesetzt, die sich durch ihre funktionellen Gruppen oder Seitenketten unterscheiden.

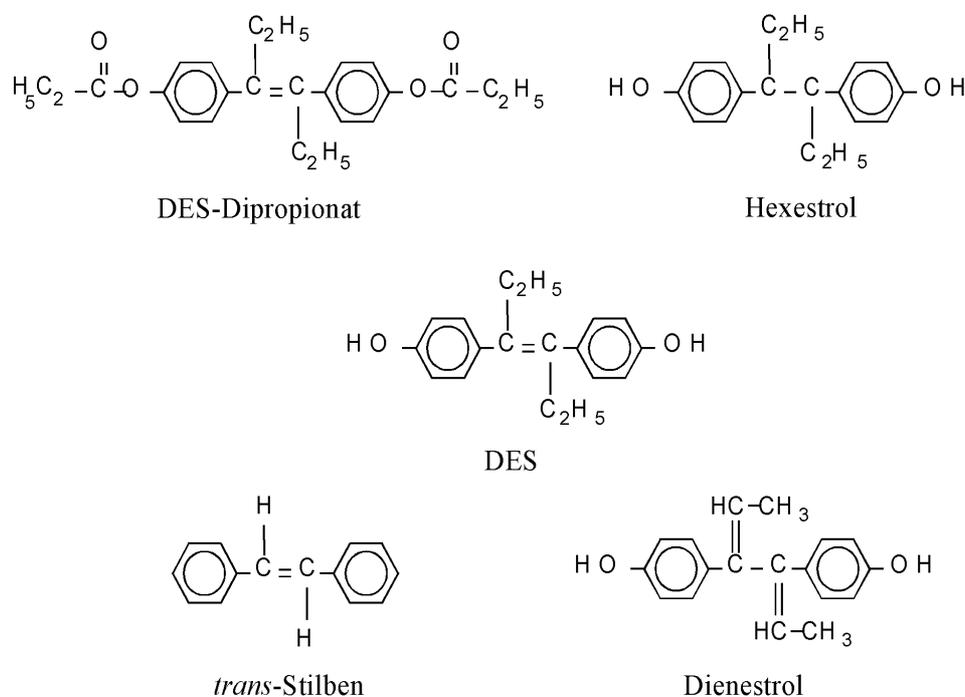


Abb. 27: Strukturformeln von DES und seinen Derivaten

Die A_1 -ATPase wurde nicht durch DES-Dipropionat oder *trans*-Stilben, aber durch DES, Hexestrol und Dienestrol effektiv gehemmt. Dabei zeigte Dienestrol eine leicht schwächere Wirkung. Aus einer Auftragung der relativen Aktivitäten gegen die Inhibitorkonzentration (Abb. 28) wurde die I_{50} -Werte zu 108 nmol Hexestrol/mg Protein, 120 nmol DES/mg Protein und 161 nmol Dienestrol/mg Protein bestimmt.

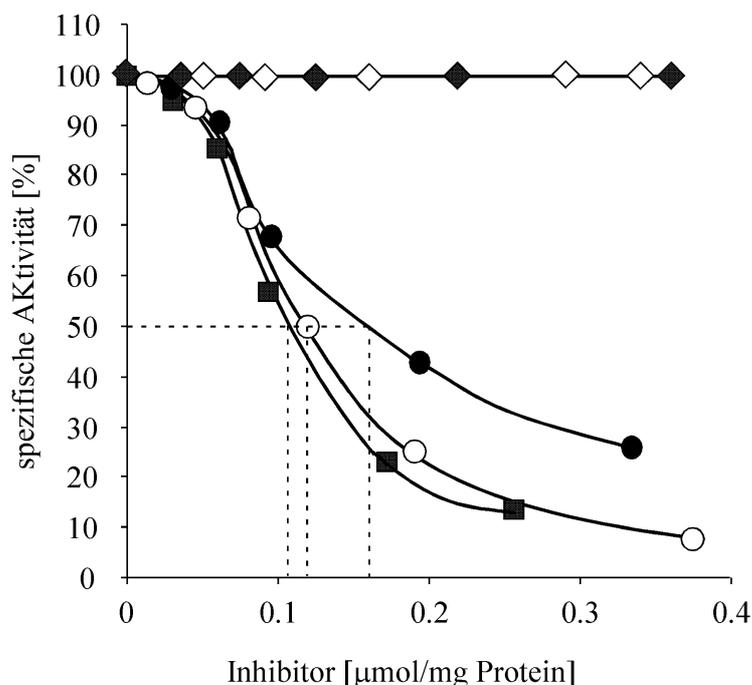


Abb. 28: Hemmung der A_1 -ATPase durch DES und dessen Derivate. Die ATPase-Aktivität wurde in zellfreiem Extrakt von *E. coli* DK8(pSÖ1) bestimmt. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug jeweils 160 µg Protein/ml. Der Extrakt wurde mit den Inhibitoren 30 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Reaktionen durch Zugabe von 4 mM ATP gestartet wurde. 100% entspricht 0,45 U/mg Protein. (○), DES; (■), Hexestrol; (●), Dienestrol; (◆), DES-Dipropionat; (◇), *trans*-Stilben. 100% Aktivität entspricht 1,3 U/mg Protein.

Diese Versuche wurde mit gereinigter A_1 -ATPase verifiziert (s. Abb. 29). Allerdings waren die für die 50%ige Inhibierung notwendigen Konzentration der Hemmstoffe sehr viel höher. Die I_{50} -Werte betragen 5 µmol Hexestrol/mg Protein, 3 µmol DES/mg Protein und 6 µmol Dienestrol/mg, was einer Erhöhung um den Faktor 22 für Hexestrol, 40 für DES und 27 für Dienestrol entsprach.

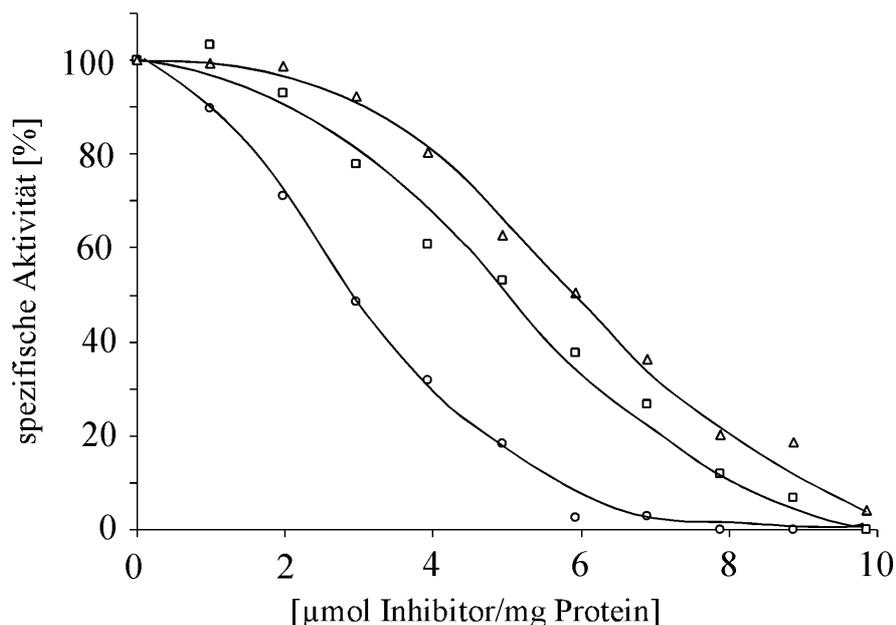


Abb. 29: Hemmung der gereinigten A_1 -ATPase durch DES und dessen Derivate. Der Enzymassay wurde mit gereinigter ATPase durchgeführt. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug jeweils 15 µg Protein/ml. Das Enzym wurde mit den Inhibitoren 30 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Reaktionen durch Zugabe von 4 mM ATP gestartet wurden. 100% entspricht 9,4 mU/mg Protein. DES (○), Hexestrol (□), und Dienestrol (△).

Durch diese Experimente wurde Hexestrol und Dienestrol als neue Hemmstoffe der A_1 -ATPase erkannt. Bei einem Vergleich der Strukturformeln aus Abb. 27 wird deutlich, dass nur diejenigen Derivate die A_1 -ATPase zu hemmen vermochten, die einen freien Phenylrest enthalten.

3.5. Strukturelle Charakterisierung der A_1 -ATPase

Ziel dieser Arbeit war die heterologe Produktion der A_1 -ATPase in Mengen, die eine strukturelle Charakterisierung erlauben würden. Nachdem dieses Ziel erreicht war, wurde mit den strukturellen Untersuchungen begonnen. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. G. Grüber, Homburg, durchgeführt. Von vorrangigem Interesse ist natürlich die Herstellung von Kristallen, die dann einer Röntgenstrukturanalyse zugeführt werden sollen. Systematische Versuche zur Erzeugung von Kristallen werden gegenwärtig im Labor von Dr. Grüber durchgeführt und sind noch nicht abgeschlossen. In der Zwischenzeit wurden erste strukturelle Daten mittels Elektronenmikroskopie oder Röntgenkleinwinkelstreuung erhalten. Weiterhin

sollten weitere Hinweise zur räumlichen Anordnung der Untereinheiten zueinander durch Quervernetzungsexperimente erhalten werden.

3.5.1. Stöchiometrie der Untereinheiten in der A_1 -ATPase

Um die relative Stöchiometrien der Untereinheiten festzustellen, wurden die Untereinheiten der gereinigten A_1 -ATPase im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 angefärbt (s. 2.5.4.1.). Dieser Farbstoff färbt im Gegensatz zum Silber (s. 2.5.4.2.) die Proteine gleichmäßig ein. Das gefärbte Gel wurde wie unter 2.5.4.3. beschrieben im Densitometer eingelesen, und die relativen Intensitäten der Proteine wurden am Computer berechnet (Abb. 30).

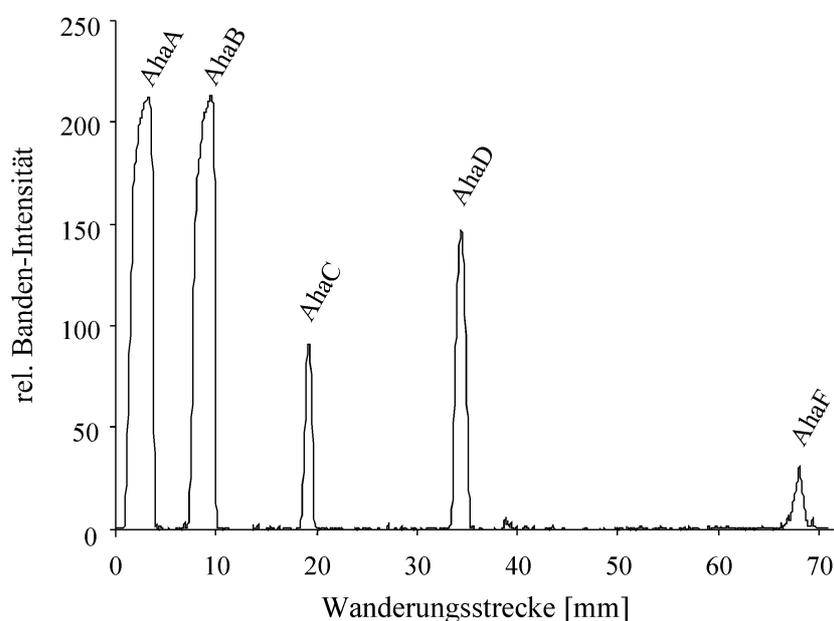


Abb. 30: Densitometrische Analyse der A_1 -ATPase im SDS-Polyacrylamidgel. Ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel der gereinigten A_1 -ATPase wurde mit Coomassie Blue G-250 gefärbt, zwischen zwei Folien gelegt und im Densitometer analysiert.

Die jeweiligen Flächen der den A_1 -ATPase-Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaD und AhaF zugeordneten Peaks wurden durch Integration ermittelt und ergaben in Relation zur molekularen Masse der einzelnen Untereinheiten eine Stöchiometrie von $A_3B_3C_1D_2F_1$. Diese Stöchiometrie steht nicht im Einklang mit den Stöchiometrien bekannter ATP-Synthasen. Die zur γ Untereinheit aus F_1F_0 -ATPasen homologen Untereinheit D würde nach diesen Untersuchungen in zweifacher Kopienzahl im A_1 -ATPase-Komplex vorliegen. Demgegenüber legten strukturelle Untersuchungen eine Stöchiometrie von $A_3B_3C_1D_1F_1$ nahe (Grüber *et al.*, 2001).

3.5.2. Ermittlung der räumlichen Nähe der Untereinheiten zueinander durch Quervernetzungsexperimente

Die räumliche Anordnung von Untereinheiten eines Multikomponentenenzym zueinander kann durch Quervernetzungsexperimente etabliert werden. Dazu werden sogenannte Quervernetzer eingesetzt, die zwei Proteine kovalent miteinander verbinden. Die "Länge" des Quervernetzers determiniert den Abstand, den zwei Proteine voneinander haben können, aber dennoch quervernetzt werden. In dieser Arbeit kam Formaldehyd zum Einsatz. Die verknüpften Untereinheiten wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgrund ihrer addierten molekularen Massen und durch Western-Blot-Analysen identifiziert.

Zunächst wurde die Wirkung von Formaldehyd auf die Untereinheiten der A_1 -ATPase untersucht. Um zu ermitteln, welche Formaldehydkonzentration Quervernetzungen der A_1 -ATPase-Untereinheiten in solchen Mengen entstehen lässt, dass diese in einem SDS-Polyacrylamidgel nachzuweisen sind, wurde Formaldehyd in Konzentrationen von 0,1 bis 1% (v/v) der gereinigten A_1 -ATPase (0,4 mg Protein/ml) zugesetzt; die Proben wurden bei Raumtemperatur für 15 min oder 16 h inkubiert. Hierbei ist zu erwähnen, dass Formaldehyd hydratisierte Ketten bildet, die Polypeptide miteinander verbinden können. Diese Formaldehydketten sind thermolabil und zerfallen bei höheren Temperaturen (Beyer und Walter, 1984). Daher wurde zwar der Denaturierungspuffer nach Schägger und von Jagow (1987) zum Denaturieren der A_1 -ATPase eingesetzt, jedoch wurde die Probe nicht erhitzt, sondern 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Andernfalls waren keine Quervernetzungen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Auftrennung der quervernetzten Proteine im SDS-PAGE ist in Abb. 31 dargestellt. Die Existenz der höhermolekularen Proteine bei 70, 75 und 80 kDa (s. Abb. 31 z. B. in Spur 1) finden ihre Ursache in den unter den gewählten Denaturierungsbedingungen nicht vollständig denaturierten Polypeptid-Komplexen (Daten nicht gezeigt).

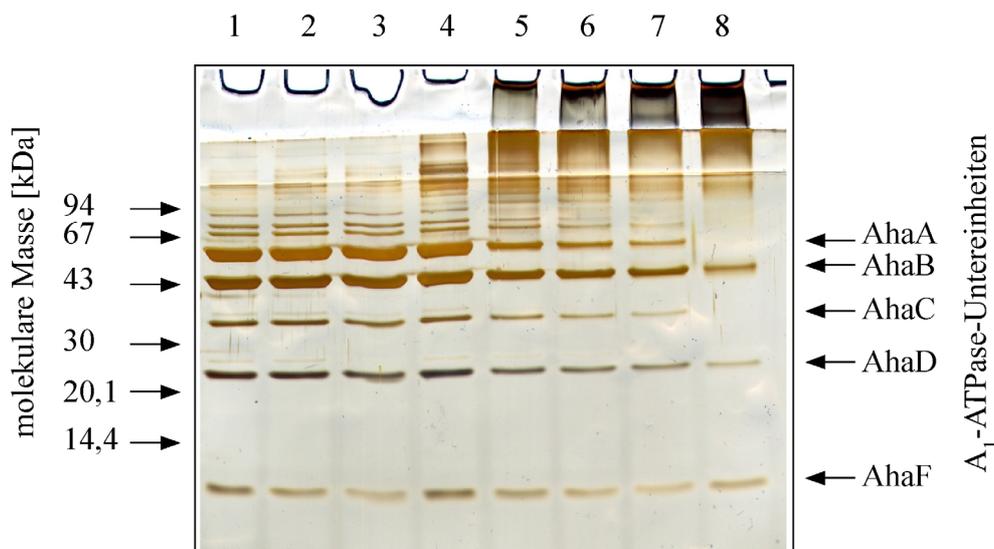


Abb. 31: Ermittlung der optimalen Formaldehydkonzentration zur Quervernetzung der A_1 -ATPase-Untereinheiten. Die A_1 -ATPase (0,4 mg/ml) wurde mit 0,1% (Spur 1+5), 0,2% (Spur 2+6), 0,3% (Spur 3+7) oder 1% (v/v) Formaldehyd (Spur 4+8) inkubiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur denaturiert (Spuren 1-4: 15 min, Spuren 5-8: 16 h) und in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Bei 15minütiger Inkubation in Gegenwart von 0,1% Formaldehyd waren bereits Quervernetzungsprodukte von über 95 kDa zu erkennen. Mit steigender Formaldehydkonzentration waren zusätzliche Produkte im hochmolekularen Bereich zu erkennen (Zwischengel und Obergrenze vom Trenngel in Abb. 31 in z. B. Spur 4). Wurde die Inkubationszeit von 15 min auf 16 h erhöht, so wurden bei jeder der gewählten Formaldehydkonzentrationen (0,1-1% [v/v]) unzählige Quervernetzungsprodukte gebildet; diese waren nur noch als „Schmier“ im Gel zu erkennen (Sammelgel, Zwischengel und Obergrenze Trenngel in Abb. 31 in den Spuren 5-8). Zusätzlich verringerte sich die Konzentration der Untereinheiten AhaA und AhaC eindeutig mit zunehmender Formaldehydkonzentration. Nach der Inkubation der A_1 -ATPase mit 1% (v/v) Formaldehyd für 16 h waren die Untereinheiten AhaA und AhaC nicht mehr als freie Untereinheiten zu detektieren (Abb. 31 Spur 8).

Aufgrund der gut sichtbaren Wirkung von 1% (v/v) Formaldehyd auf die A_1 -ATPase wurde diese Konzentration für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Analyse der Quervernetzungsprodukte erfolgte in 4 – 10%igen Gradientengelen.

Um die optimale Inkubationsdauer zu ermitteln, wurden die Proben mit 1% (v/v) Formaldehyd für 1, 2, 3, 4 oder 5 h bei Raumtemperatur inkubiert, 1 h bei Raumtemperatur denaturiert und im SDS-Gradientengel aufgetrennt.

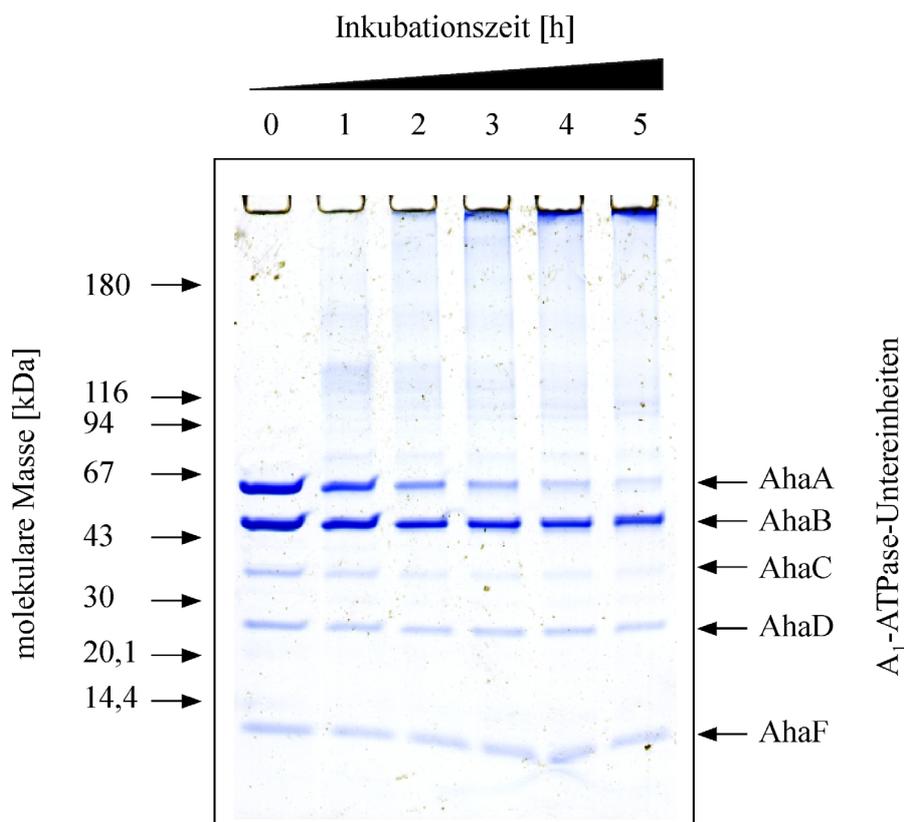


Abb. 32: Zeitabhängigkeit der Quervernetzung der A_1 -ATPase-Untereinheiten mit Formaldehyd (1% [v/v]). Die A_1 -ATPase (0,4 mg/ml) wurde mit 1% (v/v) Formaldehyd für 0 (Spur 0), 1 (Spur 1), 2 (Spur 2), 3 (Spur 3), 4 (Spur 4) und 5 h (Spur 5) bei Raumtemperatur inkubiert, in einem 4 – 10%igen SDS-Gradienten-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blue 250 G eingefärbt.

Es war eindeutig zu erkennen, dass bereits eine Inkubationszeit der A_1 -ATPase in 1% (v/v) Formaldehyd von 1 h Proteinkomplexe entstehen ließ, deren molekulare Massen u.a. weitaus größer als 200 kDa waren. Mit zunehmender Inkubationszeit wurden die Proteinkomplexe sogar so groß, dass diese gar nicht mehr in die obere 4%ige SDS-Polyacrylamidgelschicht des Sammelgels einwandern konnten. Mit zunehmender Inkubationszeit verringerte sich die Konzentration der Untereinheiten AhaA, AhaC, und AhaB.

Die Identität der Quervernetzungsprodukte wurde im Western-Blot überprüft. Dazu wurden die Gele mit Antikörpern gegen AhaA (Abb. 33A), AhaB (Abb. 33B), AhaC (Abb. 33C) und AhaF (Abb. 33D) inkubiert. Wie bereits im Coomassie-gefärbten Gel in Abb. 32 zu erkennen war, verringerte sich die Konzentration an AhaA, AhaB und AhaC mit fortschreitender Inkubationsdauer, wohingegen AhaF gegen das Formaldehyd völlig inert war. Zudem ist zu sehen, dass AhaA und AhaC stärker quervernetzt wurden als AhaB, was sehr gut mit den Ergebnissen der Coomassie-gefärbten Gelen korrelierte.

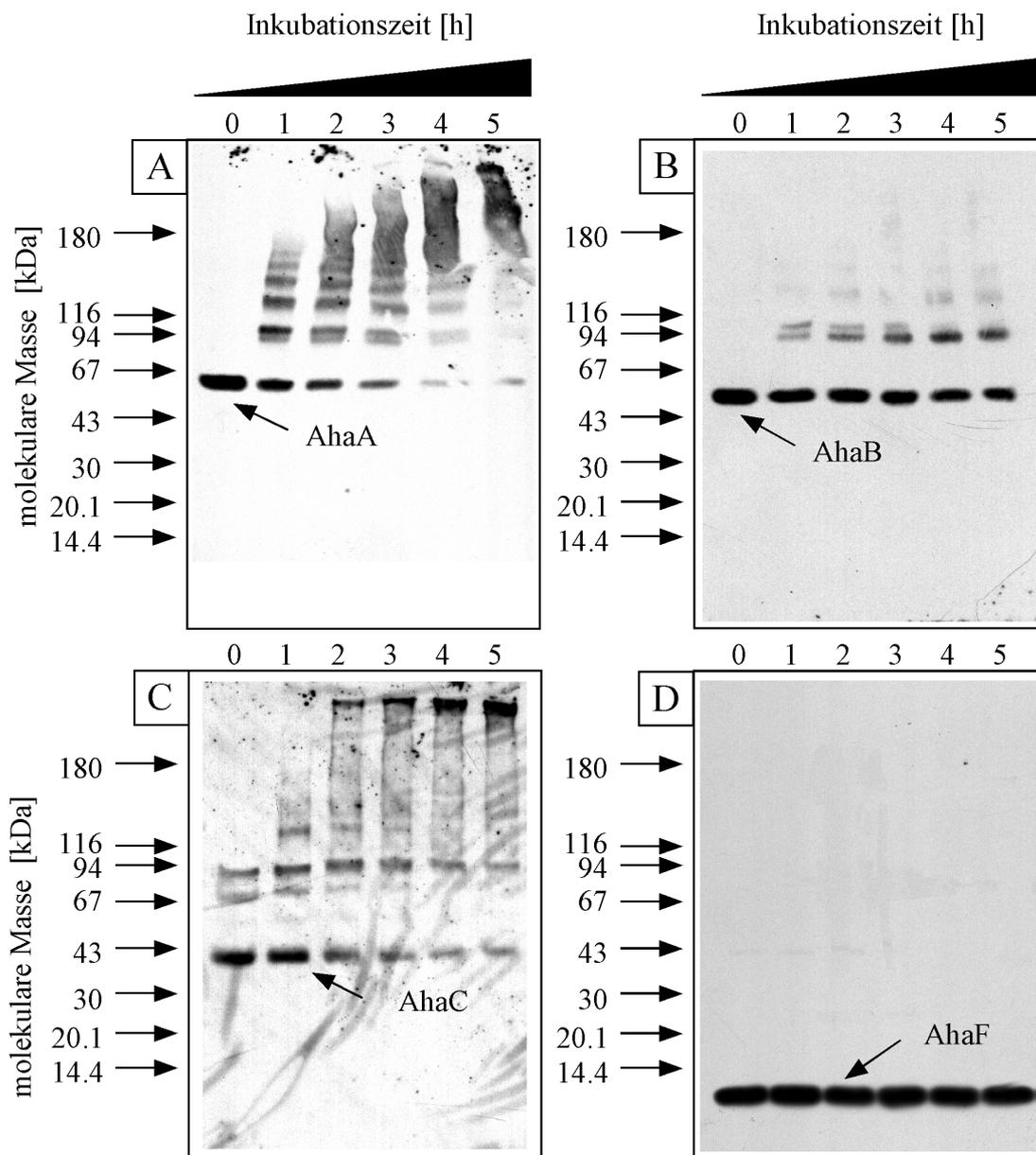


Abb. 33: Western-Blot-Analyse der quervernetzten A_1 -ATPase-Untereinheiten. 4 – 10%ige SDS-PAGE geblottet auf Nylonmembran. Die A_1 -ATPase-Untereinheiten-spezifischen Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:5.000 zugegeben. Spuren 1 – 5 wie in Abb. 32. A: Detektion mit dem anti-AhaA-Antiserum, B: Detektion mit dem anti-AhaB-Antiserum, C: Detektion mit dem anti-AhaC-Antiserum, D: Detektion mit dem anti-AhaF-Antiserum.

Bei näherer Betrachtung der Blots ist zu erkennen, dass bei den Quervernetzungen Produkte entstanden waren, die im Gel definierte Banden ergaben und dass mit Zunahme der Inkubationszeiten immer größere Proteinkomplexe entstanden. Im Western-Blot mit dem anti-AhaA-Antiserum wurden neben dem Signal für die freie Untereinheit AhaA noch Produkte mit den molekularen Massen von 100, 130, 140, 150 und 160 kDa detektiert. Bei steigender Inkubationszeit bildete sich oberhalb des

160-kDa-Signals ein „Schmier“, dessen Proteinkomplexe in dieser Untersuchung nicht zu identifizieren waren. Zudem gingen mit steigender Inkubationsdauer die Konzentrationen von freiem AhaA und der niedermolekularen Proteinkomplexe (100, 130 und 140 kDa) zurück. Es scheint wahrscheinlich, dass sich größere Proteinkomplexe bildeten, was im Einklang mit der Zunahme der hochmolekularen Proteinkomplexe (>160 kDa) steht.

Das Antiserum gegen die Untereinheit AhaB detektierte neben dem freien AhaB noch Proteinkomplexe mit molekularen Massen von 94, 100, 130 und 160 kDa, wobei die letzteren beiden Signale sehr schwach waren und somit auf eine geringe Konzentration der jeweiligen Komplexen schließen ließ. Mit steigender Inkubationszeit stieg auch die Konzentration des 94-kDa-Proteinkomplexes an, wohingegen die Konzentration an freiem AhaB leicht zurück ging. Ab einer Inkubationszeit von >2 h ging zudem auch die Konzentration vom 100-kDa-Komplex zurück, und es bildeten sich in geringen Mengen hochmolekulare Komplexe, die als „Schmier“ bei ca. 180 kDa zu erkennen sind.

In Abb. 33C wurden mit dem anti-AhaC-Antiserum Proteinkomplexe detektiert, in denen die Untereinheit AhaC involviert war. Obwohl in Spur 0 kein Formaldehyd zugesetzt worden war, sind bereits hier drei Proteine mit den molekularen Massen von 41, 68 und 90 kDa zu erkennen. Das 41-kDa-Protein entspricht der Untereinheit AhaC. Da das Antiserum gegen AhaC sehr spezifisch ist (s. Abb. 6) wurde davon ausgegangen, dass die beiden Signale bei 68 und 90 kDa in Abb. 33 von unvollständig denaturierten AhaC-enthaltenden Proteinkomplexen herrührte. Bereits nach 1 h Inkubationszeit der A₁-ATPase mit Formaldehyd bildeten sich weitere Proteinkomplexe mit den molekularen Massen von 130 und 160 kDa, wobei das Signal bei 160 kDa sehr schwach und auch diffus war. Die Konzentration des 130-kDa-Produkts nahm allerdings bei einer Inkubationszeit von >3 h wieder ab, und es bildeten sich hochmolekulare Proteinkomplexe, die so groß waren, dass sie nicht mehr ins Sammelgel einwandern konnten und somit in den Taschen verblieben. Zusätzlich nahm auch die Konzentration an freiem AhaC mit steigenden Formaldehydkonzentration ab. Eine quervernetzende Wirkung des Formaldehyds auf AhaF konnte bei keiner der getesteten Konzentrationen oder Einwirkzeiten festgestellt werden.

Bei der Betrachtung der molekularen Massen der durch das Einwirken des Formaldehyds gebildeten Proteinkomplexe können Spekulationen über die Zusammensetzung dieser Komplexe gemacht werden. Ein 130-kDa-Proteinkomplex könnte aus der Quervernetzung der Untereinheiten AhaA (65 kDa) und AhaB (55 kDa) entstanden sein. Wenn zusätzlich noch AhaC (41 kDa) quervernetzt worden ist, dann wäre möglicherweise ein 160-kDa-Proteinkomplex gebildet worden. Ein 130-kDa-Komplex mit AhaC ließe sich über eine Quervernetzung von AhaC mit AhaB erklären. Genauere Aussagen über die Natur dieser hochmolekularen Komplexe lassen sich mit

dieser Untersuchung nicht machen. Auch konnten bislang noch keine Daten zum Verbleib der Untereinheit AhaD gemacht werden. Da keine Antikörper gegen die Untereinheit D vorlagen, sollten Untereinheit D-enthaltende Produkte in der 2D-Gelelektrophorese erkannt werden. Zusätzlich sollten diese Untersuchungen Aufschluss über die Zusammensetzung der hochmolekularen Proteinkomplexe geben. Dazu wurden die Proben in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aus dem Gel wurden die einzelnen Spuren ausgeschnitten und zur Trennung der mit Formaldehyd quervernetzten Proteine im Gelpuffer gekocht. Nachdem durch diese Prozedur das Formaldehyd aus dem Gel entfernt worden war, konnte der Gelstreifen als Probenträger für eine SDS-Gradienten-PAGE dienen (s. 2.5.3.2.). In dieser 2. Dimension wurden dann die zuvor quervernetzten ATPase-Untereinheiten aufgetrennt.

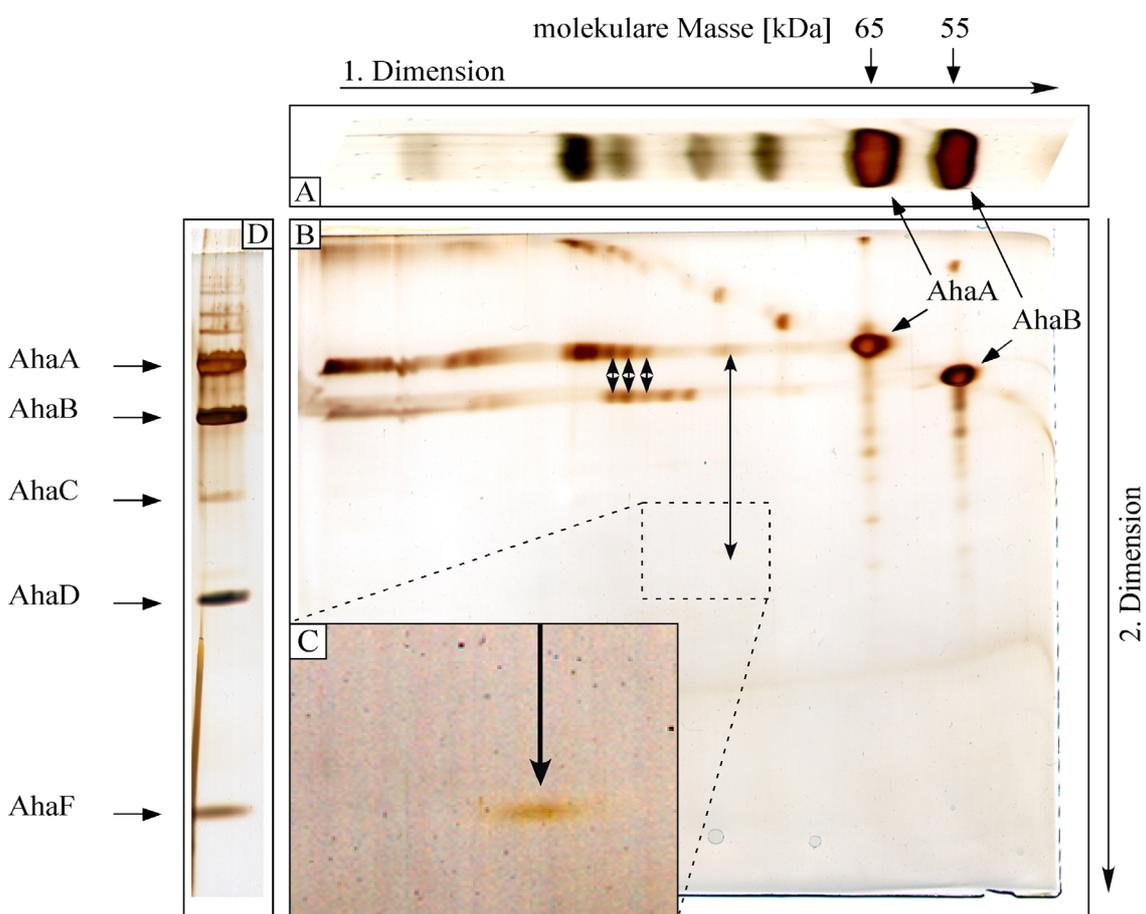


Abb. 34: Identifizierung der quervernetzten ATPase-Untereinheiten in einer 2D-SDS-Gradienten-PAGE. A: 1. Dimension, 6%iges SDS-Polyacrylamidgel, nur für diese Abbildung mit Silber gefärbt; B: 2. Dimension, 10 – 15%iges SDS-Gradienten-Polyacrylamidgel, mit Silber gefärbt, die Untereinheiten AhaA und AhaB sind markiert; C: Bildausschnitt stärker kontrastiert und vergrößert, Doppelpfeile zeigen die zuvor quervernetzten Polypeptid-Paare AhaA-AhaB und AhaA-AhaD; D: 10 – 15%iges SDS-Gradienten-Polyacrylamidgel mit aufgetrennter A_1 -ATPase zur Zuordnung der Proteine in der 2. Dimension.

Sehr gut sind in der 1. Dimension Quervernetzungsprodukte mit molekularen Massen von ca 130, 120, 110 und 93 kDa zu erkennen. Diese wurden in einer zweiten Dimension in ihre Bestandteile getrennt. Hauptsächlich wurden die Untereinheiten AhaA und AhaB miteinander und auch mit sich selbst quervernetzt. Die Produkte bei 130 kDa waren größtenteils Addukte der Untereinheit AhaA, die etwas kleineren Produkte bei 120 kDa waren Addukte der Untereinheiten AhaA und AhaB. Die Produkte bei 110 kDa setzten sich ausschließlich aus Kopien der Untereinheit AhaB zusammen. Interessanterweise sind für alle Quervernetzungen mehrere diskrete Produkte unterschiedlicher molekularen Massen zu erkennen. Es gibt 2 AhaA-AhaA-Produkte, gefolgt von 3 AhaA-AhaB- und 2 AhaB-AhaB-Produkten. Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass Kopien der Untereinheiten AhaA und AhaB partiell degradiert wurden und somit unterschiedliche molekulare Massen aufwiesen. Die Anzahlen der unterschiedlichen Untereinheiten in den Komplexen konnte mittels dieser Untersuchung nicht ermittelt werden.

Weiterhin konnte mit diesem Gel-System gezeigt werden, dass das 93-kDa-Produkt aus den Untereinheiten A und D bestand, was zeigt, dass AhaA und AhaD im A_1 -ATPase-Komplex in einem direkten Kontakt zueinander stehen müssen.

Zusammenfassend bleibt aufgrund der durchgeführten Quervernetzungsstudien zu sagen, dass neben den erwarteten A-A-, A-B und B-B-Produkten auch eine Interaktion der Untereinheiten A und D nachgewiesen wurde.

3.5.2. Elektronenmikroskopische Analyse der A_1 -ATPase

Die elektronenmikroskopische Analyse der A_1 -ATPase zeigte die erwartete globuläre Struktur, die aus sechs peripheren und einer zentralen Masse besteht. Diese sechs peripheren Massen entsprechen den alternierend angeordneten Untereinheiten AhaA und AhaB, wie sie schon vorher in A_1 -ATPasen nachgewiesen wurden (Wilms *et al.*, 1996). Die isolierte A_1 -ATPase wies eine Rotationssymmetrie auf (Grüber *et al.*, 2001) und stimmte damit und in ihrer Größe mit denen der mitochondrialen F_1 -ATPase und A_1 -ATPase aus *Sulfolobus acidocaldarius* überein (Wilms *et al.*, 1996).

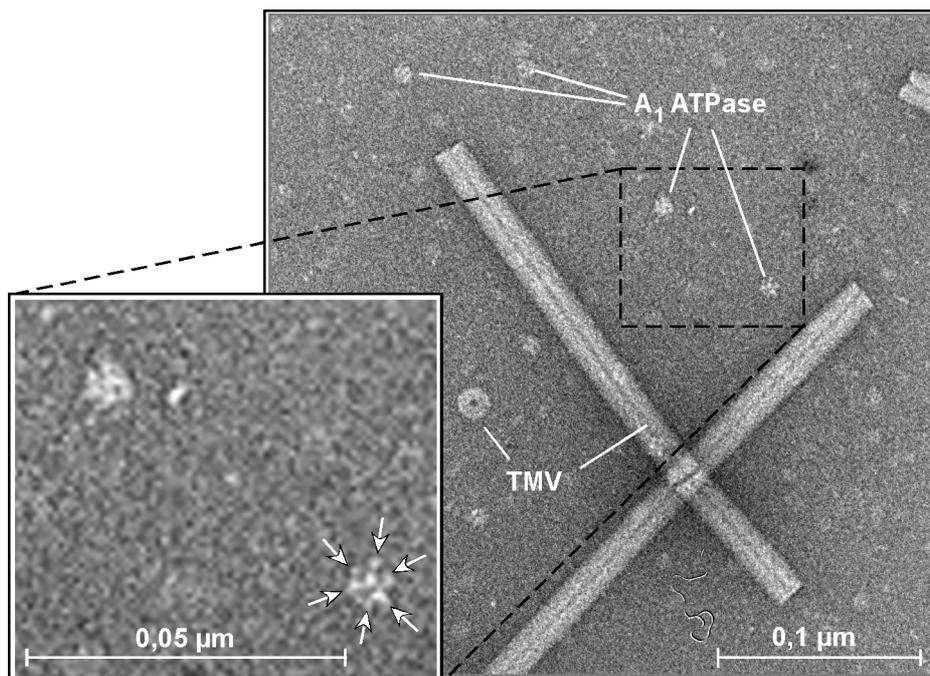


Abb. 35: Elektronenmikroskopische Analyse der A_1 -ATPase Struktur. Präparat mit gereinigter A_1 -ATPase und Tabakmosaikvirus (TMV) als Standard. Negativkontrastierung. Die Pfeile in der Vergrößerung deuten auf die sechs peripheren Massen der A_1 -ATPase.

3.5.3. Analyse der Raumstruktur der A_1 -ATPase mittels Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung wurde von Dr. Gerhard Grüber, Homburg, durchgeführt. Eine hochkonzentrierte A_1 -ATPase-Lösung (bis zu 10 mg Protein/ml) wurde einer Synchrotron-Strahlung ausgesetzt und die Streuungsdaten mittels einer X33 Kamera am DORIS-Ring des Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) bei EMBL gesammelt (Grüber *et al.*, 2001). Diese Methode ergibt mit 30 Å zwar nicht so hochauflösende Strukturdaten wie die Röntgenstrukturanalyse von Kristallen, jedoch konnten mit den entsprechenden Computerprogrammen SAPOKO, ORTOGNOM, GNOM, DAMMIN, MASSHA und SASHA Eigenschaften der A_1 -ATPase errechnet werden, die bereits die Dimensionen und grobe Formen des Enzyms preisgaben (Grüber *et al.*, 2001).

Die A_1 -ATPase (ohne Substrat) lag mit einer Gesamtlänge von 17,8 nm zwischen der F_1 - und V_1 -ATPase (Abb. 36). Die Kopfteile der jeweiligen Domänen waren mit 9,4 nm nahezu gleichgroß, wohingegen die Stiellängen immens variierten. Der Stiel der A_1 -ATPase war 8,4 nm lang und lag somit genau zwischen den Stiellängen der F_1 - (4-4,5 nm) und V_1 -ATPase (11 nm). Der Durchmesser des Stiels der A_1 -ATPase betrug

wie bei der F_1 - und V_1 -ATPase ca. 6 nm. Der pilzförmige Kopfteil des Enzyms hatte einen Durchmesser von 10,06 nm, der sich durch die Rotationssymmetrie der A_1 -ATPase mit einem Radius von 5,03 nm ergab. Dieser Durchmesser variierte in Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms (Coskun *et al.*, 2001). So vergrößerte sich der Radius der A_1 -ATPase von 4.92 ± 0.1 auf 5.23 ± 0.1 nm während der Zugabe der folgenden Substrate: Mg-AMP·PNP, Mg-ADP oder Mg-ATP. Desweiteren waren auch die drei Konformationszustände der ATPase vom Substrat abhängig. Quervernetzungsuntersuchungen haben gezeigt, dass bei Mg-ATP und Mg-ADP die Untereinheiten AhaA und AhaD miteinander interagieren. Diese Interaktion konnte bei der Zugabe von Mg-AMP·PNP nicht mehr beobachtet werden. Genauere Daten kann in diesem Zusammenhang nur noch eine Röntgenstrukturanalyse ergeben.

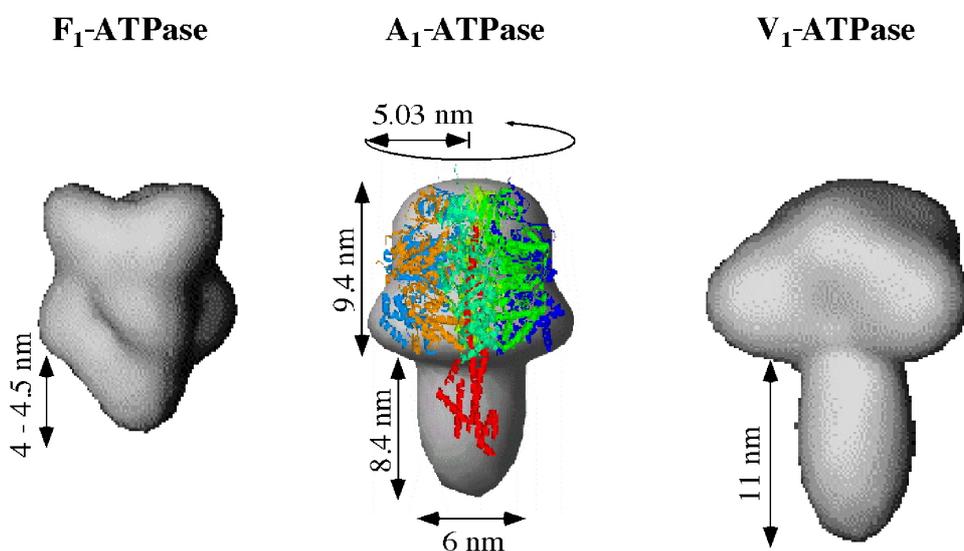


Abb. 36: Struktur der A_1 -ATPase aus *M. mazei*, ermittelt durch Röntgenkleinwinkelstreuung. Die RASMOL-Abbildung der F_1 -ATPase wurde über die Abbildung der A_1 -ATPase gelegt (Grüber *et al.*, 2001).

3.6. Produktion von A_1 -ATPase-Subkomplexen

Der kleinste Subkomplex der F_1 -ATPase mit ATP-Hydrolyse-Aktivität ist der $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplex. Da kleinere Komplexe mitunter einfacher zu kristallisieren sind, sollte versucht werden, das Pendant zum $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplex, einen A_3B_3D -Komplex der A_1 -ATPase aus *M. mazei* in *E. coli* zu produzieren. Dazu wurden die Gene *ahaA*, *ahaB* und *ahaD* von pSÖ1 amplifiziert. Das 5'-Oligonukleotid „*ahaA*(*Xba*I)down“ wurde mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xba*I und das 3'-Oligonukleotid „*ahaD*(*Sac*I)up“ mit einer *Sac*I-Schnittstelle versehen; das Konstrukt begann mit dem Start-Codon von *ahaA* und endete mit dem Stop-Codon von *ahaC*. Das Amplifikat

wurde in pT7-6 oder pGEM-4Z, die beide high-copy-Vektoren sind und über den T7-Promotor verfügen, kloniert. Aus dieser Klonierung konnten jeweils 5 unabhängig entstandene Plasmide isoliert werden.

Die Plasmide wurden getrennt voneinander in die ATPase-negativen *E. coli*-Mutanten DK8 und BL21(DE3)unc Δ 702 transformiert, um dort die jeweiligen Expressionsstudien durchzuführen. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ = 1 angezogen und dem Expressionssystem entsprechend induziert (Induktion mit 0,5 mM IPTG beim Vektor pGEM-4Z bzw. Temperaturerhöhung von 30 auf 42°C beim Vektor pT7-6). Wurde *E. coli* DK8 verwendet, musste zusätzlich das Plasmid pGP1-2 transformiert werden. Die Zellernte sowie die Herstellung des zellfreien Extrakts wurde wie unter 3.2.1. durchgeführt. In diesen Extrakten wurde wie unter 2.5.2. beschrieben die ATPase-Aktivität bestimmt. In keinem der Klone konnte eine ATPase-Aktivität festgestellt werden. Mit der Western-Blot-Analyse wurden die Untereinheiten AhaA und AhaB aber zweifelsfrei nachgewiesen (Abb. 37).

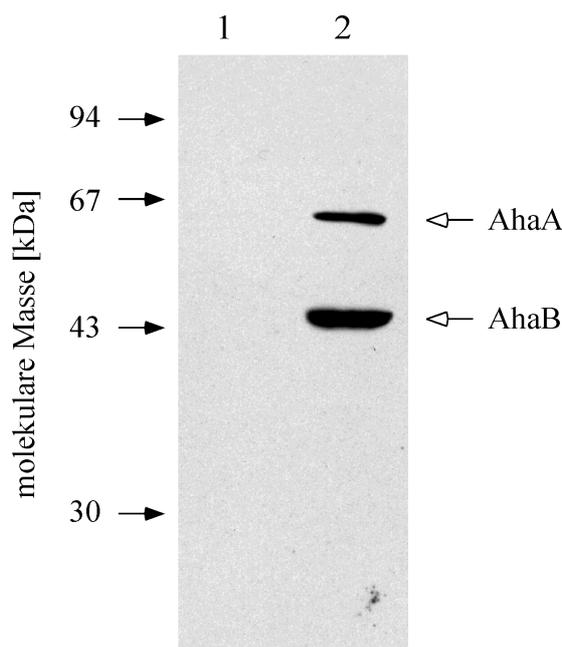


Abb. 37: Nachweis von AhaA und AhaB in *E. coli* DK8(pahaABD-T7) durch Western-Blot-Analyse. 10 μ g Zellextrakt von *E. coli* DK8(pT7-6) (Spur 1) und *E. coli* DK8(pahaABD-T7) (Spur 2) wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und entweder mit dem anti-AhaA- oder anti-AhaB-Antiserum behandelt. Die belichteten Röntgenfilme beider Untersuchungen wurden für diese Abbildung übereinander gelegt.

Da kein Antikörper gegen AhaD zur Verfügung stand, wurde diese Untereinheit durch radioaktive Markierung nachgewiesen. Dazu wurde das Plasmid pahaABD-T7 in den *E. coli* Stamm K38(pGP1-2) transformiert. Um die Proteinsynthese von *E. coli* zu

unterdrücken, wurde dessen RNA-Polymerase durch die Zugabe von Rifampicin gehemmt (s. 2.5.10.). Neu synthetisierte Proteine wurden mit ^{35}S radioaktiv markiert. Die Zellen wurden nach dieser Behandlung denaturiert im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach einer Autoradiographie des getrockneten Gels waren die Proteine als Banden sichtbar, die unter der Kontrolle des $\phi 10$ -Promotors vom Plasmid (hier pT7-6) standen (Abb. 38).

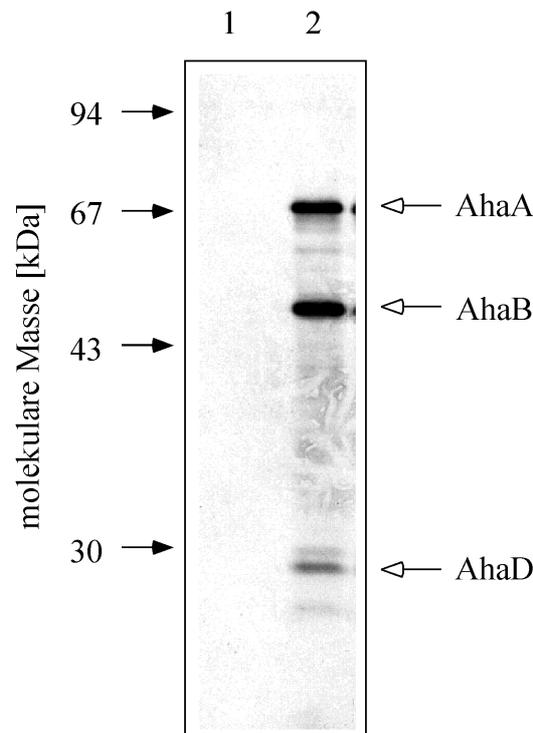


Abb. 38: Radioaktive Markierung der vom Plasmid *pahaABD-T7* kodierten Proteine. 10%iges SDS-PAGE nach (Laemmli, 1970). Spur 1, Zellfreier Proteinextrakt *E. coli* K38(pT7-6; pGP1-2); Spur 2, Zellfreier Proteinextrakt *E. coli* K38(*pahaABD-T7*; pGP1-2).

In diesen Experimenten konnte eindeutig eine Produktion von Proteinen mit molekularen Massen von 68, 55 und 29 kDa nachgewiesen werden. Diese Größen entsprachen den jeweiligen erwarteten molekularen Massen von AhaA, AhaB und AhaD. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Untereinheiten A, B und D in *E. coli* K38 produziert werden. Die fehlende enzymatische Aktivität musste daher auf andere Faktoren wie z. B. fehlende Assemblierung zurückzuführen sein.

4. DISKUSSION

4.1. Energiekonservierung in methanogenen Archaea

Methanogene Mikroorganismen sind strikt anaerob und verwerten nur eine begrenzte Anzahl von Substraten. Die meisten von ihnen wachsen chemolithoautotroph mit $H_2 + CO_2$, einige können zusätzlich Methylgruppen aus z. B. Methanol oder Methylaminen verwerten, und einige wenige vermögen auch Acetat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Blaut, 1994; Ferry, 1992a; Ferry, 1992b; Thauer *et al.*, 1993). Die Umsetzung der C1-Verbindungen erfolgt über einen linearen Stoffwechselweg, der letztendlich zum Methan führt. Dieses soll am Beispiel des Substrats $H_2 + CO_2$ veranschaulicht werden. Die Methanogenese aus $H_2 + CO_2$ beginnt mit der Synthese von *N*-Carboxymethanofuran aus CO_2 und Methanofuran, das anschließend durch einen membranständigen Formyl-MF-Dehydrogenase-Komplex (Formyl-MF-DH) (Börner *et al.*, 1989) zu Formyl-MF reduziert wird. Diese Reaktion ist *in vivo* aufgrund des geringen H_2 -Partialdrucks im natürlichen Lebensraum (1 - 10 Pa) stark endergon ($G^{\circ} = +45 \pm 2$ kJ/mol). Da diese Reaktion ohne die Hydrolyse von ATP abläuft, wurde postuliert, dass sie durch einen Ionengradienten (ΔpH oder ΔpNa) getrieben wird. Experimente von Kaesler und Schönheit mit ruhenden *M. barkeri* -Zellen zeigten, dass während der Reduktion von CO_2 zu CH_4 und gleichzeitiger Inhibition des Na^+/H^+ -Antiporters ein $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$ von -120 mV erreicht wird (Kaesler und Schönheit, 1989). Durch Transportstudien mit $^{22}Na^+$ wurde im Zuge der Methanogenese aus $H_2 +$ Formaldehyd eine Stöchiometrie von 3 - 4 Na^+ /Methan bestimmt, während bei der Methanogenese aus $H_2 + CO_2$ eine Stöchiometrie von 1 - 2 Na^+ /Methan ermittelt wurde (Kaesler und Schönheit, 1989). Dadurch ergibt sich für die Umsetzung von CO_2 zu Formaldehyd ein Einstrom von 2 - 3 Na^+/CO_2 über die Membran. In *M. mazei* Gö1 konnte aber keine Na^+ -Abhängigkeit der Formaldehydoxidation gezeigt werden (Winner und Gottschalk, 1989).

Die Formyl-Gruppe wird im weiteren Verlauf über eine Formyl-MF: H_4MPT -Formyltransferase auf Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) übertragen und durchläuft anschließend eine F_{420} -abhängige Reduktionskaskade zum Methyl- H_4MPT . Der Methyl-Gruppen-Transfer vom Methyl- H_4MPT zum Coenzym M (CoM) wird von der Methyl- H_4MPT :HS-CoM Methyltransferase vermittelt. Diese exergone Reaktion (s. o.) wird von der membranständigen N^5 -Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym M Methyltransferase (Becher *et al.*, 1992a) zum Export von 3 - 4 Na^+ /Methylgruppe genutzt (Becher *et al.*, 1992a; Kaesler und Schönheit, 1989; Müller *et al.*, 1988a; Müller *et al.*, 1988b). Becher konnte 1992 zeigen, dass die Hemmung der Methyl- H_4MPT :HS-CoM Methyltransferase gleichzeitig auch die Hemmung des Natriumtransports über die

Membran bewirkte und somit die Methyltransferase als primäre Natriumpumpe identifizieren (Becher *et al.*, 1992b).

Die Demethylierung des Methyl-CoM kann in zwei Reaktionen aufgeteilt werden, die jeweils von der Methyl-CoM-Reduktase und Heterodisulfid-Reduktase katalysiert werden. Die beiden Elektronen, die für die Reduktion des Methyl-CoM ($G^{\circ} = -43$ kJ/mol) und damit der Freisetzung von Methan benötigt werden, entstammen dem Coenzym B (CoB, 7-Mercaptoheptanoyl-*O*-Phospho-L-Threonin). Aus den beiden Coenzymen HS-CoM und HS-CoB entsteht dabei das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB, welches von einer Heterodisulfid-Reduktase wieder zu HS-CoM und HS-CoB reduziert wird ($G^{\circ} = -42$ kJ/mol). Diese Reaktion ist mit der Generierung eines $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ gekoppelt (Blaut und Gottschalk, 1984; Deppenmeier *et al.*, 1991; Peinemann *et al.*, 1989), welches die Synthese von ATP bewirkt. Durch die Reduktion des Heterodisulfids werden zwei Protonen gepumpt und ein halbes Mol ATP synthetisiert (Deppenmeier *et al.*, 1991). Eine F_{420} -unabhängige Hydrogenase, Cytochrom *b* und ein kürzlich entdeckter neuer Elektronenüberträger Methanophenazin bilden das H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase System.

Während der Methanogenese mit $H_2 + CO_2$ werden zwei primäre Ionengradienten generiert: der pH wird durch die Heterodisulfid-Reduktase-Reaktion und der pNa durch die Methyltransferase-Reaktion erzeugt. Die Reduktion eines CO_2 -Moleküls zum Methan bewirkt den Export von $2 H^+$ und $1 - 2 Na^+$, die zur ATP-Synthese genutzt werden können.

Wie aus dem Stoffwechselweg ersichtlich, ist im Zuge der Methanogenese eine Substratkettenphosphorylierung ausgeschlossen, die Energiekonservierung erfolgt über Ionengradienten-getriebene Phosphorylierung. Untersuchungen an den mesophilen Organismen *M. barkeri* und *M. mazei* und dem thermophilen Archäon *M. marburgensis* zeigten, dass die Energie, die bei der Methyltransferase-Reaktion frei wird, zum Aufbau eines transmembranen Na^+ -Gradienten genutzt wird. Eine zweite energiekonservierende Reaktion ist die Heterodisulfidreduktion, die in *M. mazei* mit einer Protonentranslokation gekoppelt ist. Allerdings legen Untersuchungen an ganzen Zellen von *M. voltae* nahe, dass die Heterodisulfid-Reduktion in diesem Organismus Na^+ -abhängig sein könnte (Dybas und Konisky, 1989; Dybas und Konisky, 1992), es ist daher nicht auszuschließen, dass auch Na^+ -abhängige Heterodisulfidreduktasen möglich sind.

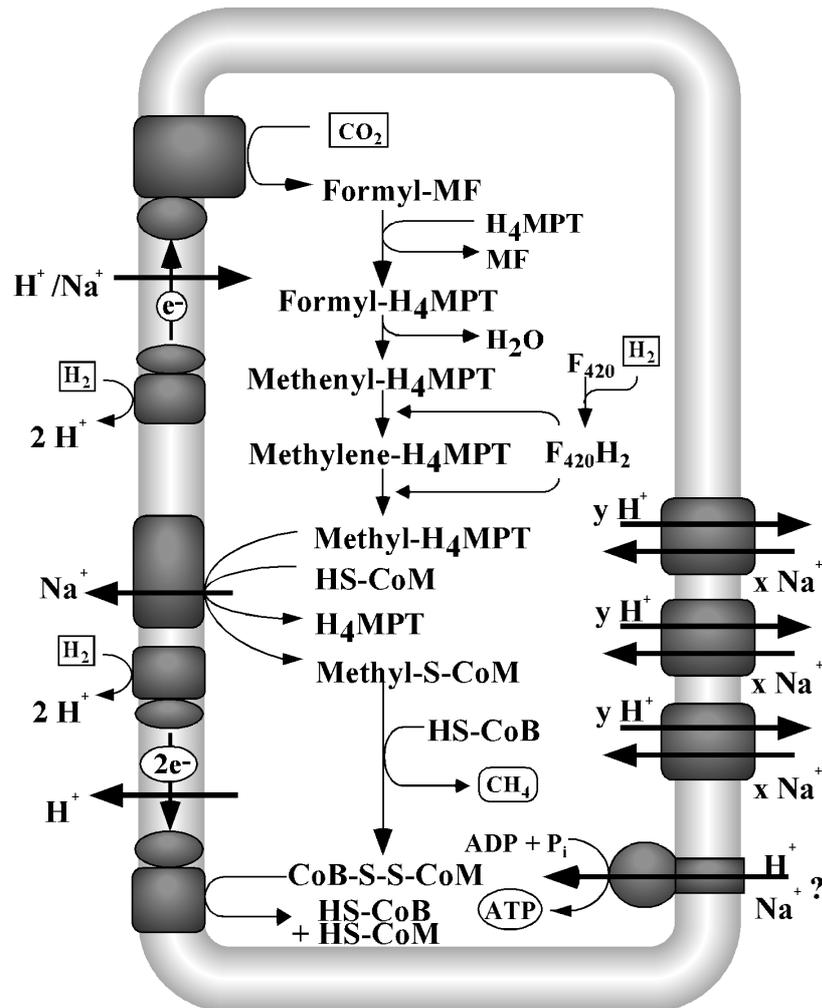


Abb. 39: Schematische Darstellung der Methanogenese aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$.

Eine Kardinalfragen für die Bioenergetik der Methanogenen ist, wie der Na^+ - und der H^+ -Gradient zur Synthese von ATP genutzt werden. Dazu sind verschiedene Szenarien vorstellbar. Man könnte zwei unterschiedliche ATP-Synthasen vermuten, von denen eine mit Na^+ koppelt und die andere mit H^+ . Die zweite Möglichkeit wäre, dass eine ATPase sowohl Na^+ als auch H^+ nutzen kann; dies sollte theoretisch möglich sein. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass bei nur einer ATP-Synthase mit einem spezifischen Ionenbedürfnis der ΔpH oder ΔpNa über einen Na^+/H^+ -Antiporter in den entsprechenden anderen Gradienten umgewandelt wird. Für die erste Theorie spricht, dass $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ -abhängige ATPase-Reaktionen bereits in Archaea beschrieben wurden. Ganze Zellen von *M. thermautotrophicus* zeigten eine pNa -getriebene ATP-Synthase (Al-Mahrouq *et al.*, 1986; Smigan *et al.*, 1988). Smigan hat 1994 durch Inhibitorstudien festgestellt, dass *M. thermautotrophicus* verschiedene Enzyme für die $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ - und $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ -getriebene ATP-Synthase benötigt (Smigan *et al.*, 1994). Müller hat 1988 in *M. barkeri* auch durch Experimente mit ganzen Zellen eine Na^+ -abhängige ATPase

identifiziert (Müller, 1988; Müller *et al.*, 1988b). In Membranpräparationen von *M. thermotrophicus* und *Methanococcus halophilus* wurde eine induzierbare, Na⁺-stimulierbare ATPase beschrieben (Smigan *et al.*, 1988; Smigan *et al.*, 1992). Eine pNa-getriebene ATP-Synthese wurde ebenso in *Methanococcus voltae* demonstriert (Carper und Lancaster, 1986). In invertierten Vesikeln von *M. mazei* Gö1 konnte pNa ebenfalls die ATP-Synthese treiben. (Becher und Müller, 1994). Inhibitorstudien legten den Schluss nahe, dass sowohl F₁F₀- (Na⁺-abhängig) als auch A₁A₀-ATPasen (H⁺-abhängig) in diesen Methanogenen vorkommen. Allerdings wurden in den Genomen von *M. mazei* Gö1 und *M. thermotrophicus* nur A₁A₀-ATPasen gefunden (unveröffentlichte Daten; Smith *et al.*, 1997). Ein F₁F₀-ATPase-Operon konnte in *M. barkeri* MS detektiert werden (Sumi *et al.*, 1997); jedoch scheint dieser Organismus dieses Enzym nicht zu nutzen (Lemker, 1997).

Die zweite Theorie wurde 1985 von Schönheit und Beimborn vertreten (Schönheit und Beimborn, 1985). Die Autoren konnten in *M. thermotrophicus* einen Na⁺/H⁺-Antiporter nachweisen, der den ΔpNa in einen ΔpH überführt und somit für die A₁A₀-ATPasen zugänglich machen könnte. Diese zweite Theorie ist momentan am wahrscheinlichsten.

Die dritte Theorie könnte bei *M. jannaschii* zutreffen. Dieser methanogene Organismus besitzt in seinem Genom die Sequenz für nur eine ATPase. Diese Tatsache spricht für die Theorie 2.) von Schönheit und Beimborn; es könnte sich bei dieser ATPase aber auch um ein Enzym handeln, welches zwei verschiedene Ionengradienten zur ATP-Synthese nutzen kann, was noch zu untersuchen wäre.

Die Frage nach dem Mechanismus der ΔpH- und ΔpNa-vermittelten ATP-Synthese ist also weiterhin offen, allerdings kann die Existenz zweier unterschiedlicher ATPasen (F₁F₀ und A₁A₀) ausgeschlossen werden.

4.2. Charakterisierung der methanoarchäellen A₁A₀-ATPase

4.2.1. Genetische Organisation bekannter A₁A₀-ATPasen

Biochemische und strukturelle Daten über die A₁A₀-ATPase waren kaum vorhanden und auch deren Untereinheitenzusammensetzung war weit von einer Aufklärung entfernt. A₁A₀-ATPasen und auch A₁-ATPasen wurden aus verschiedenen Archaea isoliert, wobei deren Polypeptid-Zusammensetzung von 3 bis 6 variierte (Chen und Konisky, 1993; Hochstein *et al.*, 1987; Hochstein und Stan-Lotter, 1992; Ihara *et al.*, 1997; Inatomi, 1986; Inatomi *et al.*, 1993; Lübben *et al.*, 1987; Lübben und Schäfer, 1989; Nanba und Mukohata, 1987; Scheel und Schäfer, 1990; Steinert und Bickel-

Sandkötter, 1996; Wilms *et al.*, 1996). Nur die großen Untereinheiten A und B wurden eindeutig über immunologische Untersuchungen und Primärsequenzbestimmungen identifiziert, wohingegen die Identität der kleineren Untereinheiten nicht geklärt wurde. Obwohl die verschiedenen Präparationen der A_1A_0 -ATPasen sehr unterschiedliche Polypeptidzusammensetzungen enthielten, zeigten molekularbiologische Analysen, dass die genetische Organisation der ATPasen sehr ähnlich ist. In *M. mazei* Gö1 wird die ATPase durch ein Operon kodiert, das aus 9 - 10 Genen besteht (Müller *et al.*, 1999; Ruppert *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 1999) (s. Abb. 1, Abb. 5, Abb. 7). In allen Operonen ist zunächst ein Gen enthalten, das ein hydrophiles Protein kodiert, gefolgt von Genen, die die zwei hydrophoben Untereinheiten kodieren und dann denen, die die hydrophilen Untereinheiten von A_1 kodieren. *ahaH*, das erste Gen im *aha*-Operon von *M. mazei* Gö1, kodiert laut Hydrophobizitätsanalyse für ein hydrophiles Polypeptid, das offensichtlich keine homologen Polypeptide in V_1V_0 - und F_1F_0 -ATPasen besitzt (Müller *et al.*, 1999). AhaI und AhaK bilden die membranständige Domäne und sind jeweils homolog zu den Untereinheiten *a+b* und *c* der V_1V_0 - und F_1F_0 -ATPasen. Die Untereinheiten AhaE, AhaC, AhaF, AhaA, AhaB und AhaD der A_1 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 sind hydrophile Proteine und weisen hohe Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten E, C, F, A, B und D der V_1 -ATPasen auf. AhaA, AhaB und AhaD sind zudem noch zu den Untereinheiten α , β und γ der F_1 -ATPasen ähnlich, wohingegen die Homologen der Untereinheiten δ und ϵ in der A_1 -ATPase nicht durch Sequenzvergleich zu ermitteln sind.

Diese Anordnung der ATPase-Gene ist größtenteils in den Archäen konserviert. Aus drei methanogenen Archäen wurden bislang die A_1A_0 -ATPase-Gene kloniert. Bei *Methanococcus jannaschii* und *M. thermautotrophicus* wurde jeweils das Genom sequenziert (Bult *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997) und aus *M. mazei* Gö1 wurden auf konventionellem Wege die A_1A_0 -ATPase-Gene kloniert und sequenziert (Ruppert *et al.*, 1998; Wilms *et al.*, 1996). Zusätzlich sind in jüngster Vergangenheit die Genome der Archäen *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997), *Halobacterium* spez. NRC-1 (Ng *et al.*, 2000), *Sulfolobus solfataricus* (She *et al.*, 2001) und *Pyrococcus horikoshii* (Kawarabayasi *et al.*, 1998) veröffentlicht worden, wie auch einige A_1A_0 -ATPase kodierenden Gene aus den hyperthermophilen Organismen *Sulfolobus acidocaldarius* (Denda *et al.*, 1990) und *Desulfurococcus* sp. SY (Shibui *et al.*, 1997) sowie aus dem halophilen *Haloferax volcanii* (Steinert *et al.*, 1997). Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, ist die generelle Organisation der A_1A_0 -ATPasen der drei Methanogenen wie auch im hyperthermophilen Sulfatreduzierer *A. fulgidus* beinahe identisch. Das erste Gen eines jeden Operons kodiert für ein hydrophiles Polypeptid. Diesem Gen folgen diejenigen, die für die hydrophoben Untereinheiten der ATPasen kodieren. Die übrigen Gene kodieren wiederum die cytoplasmatische A_1 -Domäne der ATPase. Der letzte offene

Leserahmen im *aha*-Operon wurde als authentisches Gen identifiziert, da es in *E. coli* heterolog exprimiert wurde (Lemker *et al.*, 2001). An der selben Position wurde im Operon der V_1V_0 -ATPase von *Enterococcus hirae* das homologe Gen *ntpH* entdeckt (Takase *et al.*, 1994), dessen Genprodukt als Teil eines K^+/H^+ -Austauschsystems fungiert. In *S. acidocaldarius* (Denda *et al.*, 1990) und *S. solfataricus* (She *et al.*, 2001) befindet sich an dieser Stelle im A_1A_0 -ATPase-Operon das Gen *atpE*. In *M. jannaschii* und *M. thermautotrophicus* befindet sich stromabwärts von *atpD* je ein offener Leserahmen (MJ0614 bzw. MT0952), der ein hydrophiles Polypeptid kodiert und nach Sequenzvergleichen mit 22% Identität bei MJ0614 und 20% bei MT0952 dem Gen *ahaG* aus *M. mazei* Gö1 entsprechen könnten. Außer in *M. barkeri* MS wurde in anderen Archaea keine weiteren homologen Proteine identifiziert. Daher ist es immer noch fraglich, ob AhaG überhaupt an der Funktion oder Struktur der ATPase beteiligt ist (Müller *et al.*, 1999).

Die ATPase-Gene von *M. jannaschii* sind nicht in einem, sondern in zwei Operonen organisiert, die 334 kBp voneinander entfernt liegen. In *S. acidocaldarius* wurde durch klassische Klonierungen ein ATPase-Gencluster gefunden, der aus den 6 Genen *atpD*, *atpA*, *atpB*, *atpG*, *atpE* und *atpP* besteht. Im Zuge der kürzlich abgeschlossenen Genomsequenzierung von *S. solfataricus* wurde ein A_1A_0 -ATPase kodierendes Operon gefunden, das eine völlig andere Zusammensetzung der Gene aufwies. Zunächst ist auch wie bei *M. jannaschii* das Operon in zwei Gencluster aufgeteilt, wobei *atpC* als erster Cluster durch eine ca. 12 kBp große intergene Region vom zweiten Cluster getrennt wird. Dieser zweite Cluster beginnt mit *atpI*, das homolog zu dem *ahaI* aus *M. mazei* Gö1 ist. Allerdings hat *atpI* eine zum restlichen Operon der A_1A_0 -ATPase aus *S. solfataricus* entgegengesetzte Orientierung. Der Rest des Operons besteht aus den Genen *atpF*, *atpE*, *atpA*, *atpB*, *atpD*, *atpG* und *atpK*. Demnach wurde nicht nur *atpC*, sondern auch *atpK* im Laufe der Evolution aus der konservierten Position entfernt und am Ende des Operons neu positioniert.

Die Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaD und AhaF der gereinigten A_1 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 wurden N-terminal ansequenziert. Aus den N-terminalen Sequenzen war es nun möglich, die Start-Codons zweifelsfrei zu identifizieren und mit den vorhergesagten Start-Codons zu vergleichen (Wilms *et al.*, 1996). Das Start-Codon in *ahaB*, *ahaC*, *ahaD* und *ahaF* ist ein ATG, während GTG als Start-Codon in *ahaA* genutzt wird (s. Tab. 9). Das N-terminale Methionin ist in den Untereinheiten B und D nicht mehr enthalten. Eine solche Modifikation wurde auch bei den zu AhaB und AhaD homologen F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten α und γ in *E. coli* (Walker und Gay, 1983) und *Propionigenium modestum* (Gerike und Dimroth, 1993) beschrieben. Zu erwähnen

bleibt hier noch, dass der zweite Aminosäurerest, der von *ahaB* kodiert wird, ein Alanin und kein Valin ist, wie es ursprünglich aus Sequenzanalysen postuliert worden war.

4.2.2. Heterologe Überproduktion, Assemblierung und Reinigung der A₁-ATPase

Um einen neuen Weg zur Analyse der Funktion und Struktur der archäellen A₁A₀-ATPase zu beschreiten, wurden A₁-ATPase-kodierenden Gene des mesophilen *M. mazei* Gö1 in *E. coli* überexprimiert. Das Enzym wurde im Anschluss bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Durch N-terminale Sequenzierungen und immunologische Untersuchungen wurden die A₁-ATPase-Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaD und AhaF klar identifiziert. Die Untereinheiten AhaE und AhaG konnten weder im gereinigten Enzym noch im zellfreien Extrakt von *E. coli* DK8(pTL2) detektiert werden, obwohl die jeweiligen kodierenden Gene *ahaE* und *ahaG* auf dem Expressionsplasmid vorhanden waren. In früheren Untersuchungen wurden hingegen Expressionen dieser Gene in heterologen Systemen über radioaktive Markierungen festgestellt (Lemker *et al.*, 2001). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Untereinheiten AhaE und AhaG ohne die Untereinheiten AhaH, AhaK und AhaI in keinem stabilen Zustand gehalten werden können. Ebenso scheint es wahrscheinlich, dass die Untereinheit AhaH eine besondere Funktion im Hinblick auf die Stabilität von AhaE und AhaG zu haben scheint. Im Gegensatz zu AhaK und AhaI handelt es sich bei AhaH um ein komplett hydrophiles Protein, das eventuell als Chaperon wirken könnte. Bislang wurden noch keine möglichen Funktionen der Untereinheit AhaH oder dessen homologe Vertreter aus anderen archäellen ATPasen (Abb. 1) beschrieben. AhaI bildet u.a. eine Statorkomponente der A₁A₀-ATPase und steht wahrscheinlich über seine hydrophile Domäne mit dem Kopfteil der A₁-ATPase in Verbindung. Von den F₁F₀-ATPasen ist bekannt, dass deren Untereinheit δ – das ein Homolog zu AhaE aus *M. mazei* Gö1 darstellen könnte – eben genau an dieser Kontaktstelle zum Kopfteil lokalisiert ist. Wenn aber AhaI fehlt, dann wird nach der oben beschriebenen Theorie AhaE nicht benötigt. Ob dieses so zutrifft, bleibt zu beweisen. Wenn es aber zutrifft, dann lässt sich auch die Problematik bei der Produktion eines funktionellen A₃B₃D-Subkomplexes erklären. Um einen funktionell assemblierten Enzymkomplex zu erhalten, wären wahrscheinlich noch weitere, die Assemblierung des A₃B₃D-Subkomplexes fördernde Untereinheiten notwendig gewesen.

4.2.3. Struktur und Eigenschaften der A₁-ATPase-Untereinheiten

Die gereinigte A₁-ATPase enthielt die Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaD und AhaF. Elektronenmikroskopische Aufnahmen hatten gezeigt, dass die Untereinheiten A und B jeweils in drei Kopien in alternierender Folge um eine zentrale Masse herum angeordnet sind (Wilms *et al.*, 1996). In F₁F₀-ATPasen wird diese zentrale Masse von der Untereinheit γ gebildet, die eine sehr wichtige Rolle in der Energievermittlung zwischen der hydrophoben, membranständigen und der hydrophilen, cytoplasmatischen Domäne spielt (Abrahams *et al.*, 1994; Noji *et al.*, 1997; Sabbert *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997). Sequenzvergleiche ergaben, dass die Untereinheit AhaD (28 kDa, vorhergesagte Größe $M_r = 23900$) der A₁A₀- und die Untereinheit Vma8p (28% Identität zu AhaD) der V₁V₀-ATPasen (Graham *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1995) homolog zu der Untereinheit γ der F₁F₀-ATPasen sind. 21,7% der Aminosäurereste von AhaD sind identisch mit denen von γ aus *E. coli* (Walker *et al.*, 1984). Weitere homologe Proteine werden in *E. hirae* (V₁V₀-ATPase-Untereinheit NtpD, 37% Identität) (Takase *et al.*, 1994), *S. acidocaldarius* (A₁A₀-ATPase-Untereinheit AtpG, 28% Identität) (Denda *et al.*, 1990) und Rind (34-kDa-Untereinheit mit 26% Identität) (Nelson *et al.*, 1995) gefunden. Eine Analyse der Sekundärstruktur ergab, dass AhaD aus längeren α -helikalen Strukturen besteht. Das spricht zusätzlich dafür, dass diese Untereinheit das γ -Homolog ist, obwohl keine konservierten Aminosäurereste zu erkennen sind (Müller *et al.*, 1999). Untersuchungen zur näheren Umgebung von AhaD im A₁-Komplex haben ergeben, dass AhaD in der unmittelbaren Nähe von AhaA liegt (diese Arbeit; Coskun *et al.*, 2001). Zudem ist ein Kontakt zwischen AhaA und AhaD von funktioneller Bedeutung. Durch die Zugabe von unterschiedlichen Substrat-Analoga weisen diese beiden Untereinheiten unterschiedliche Konformationszustände - in Form von variierenden Abständen - zueinander auf (Coskun *et al.*, 2001). Ob ein direkter Kontakt zwischen AhaB und AhaD zustande kommt, konnte bislang noch nicht gezeigt werden.

Über die Untereinheit AhaC (41 kDa, vorhergesagte Größe $M_r = 41486$) ist bislang sehr wenig bekannt. Die von Wilms ermittelte molekulare Masse betrug 40 kDa, die im Einklang mit der in dieser Arbeit detektierten Größe steht. Es gibt offensichtlich keine homologen Polypeptide in F₁F₀- (Müller *et al.*, 1999), jedoch in den jeweiligen A₁A₀- und V₁V₀-ATPase-Untereinheiten der Organismen *H. volcanii* (35% Identität) (Wilms *et al.*, 1996) und *E. hirae* (22% Identität) (Takase *et al.*, 1994). Computeranalysen ergaben, dass dieses Polypeptid einen hydrophilen Charakter besitzt, obwohl das entsprechende homologe 39-kDa-Protein Vma6p der V₁V₀-ATPase aus *S. cerevisiae* (Bauerle *et al.*, 1993) zusammen mit den membranständigen Untereinheiten gereinigt worden war (Stevens und Forgac, 1997; Zhang *et al.*, 1992). Das gleiche Phänomen war

bei der Reinigung der A_1A_0 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 zu beobachten, bei der ein 40-kDa-Protein zusammen mit der Membrandomäne gereinigt wurde (Wilms *et al.*, 1996). Diese Tatsache könnte ein Indiz dafür sein, dass AhaC ein Bestandteil des Stiels ist, der mit der Membrandomäne verbunden ist.

Die Untereinheit AhaA (65 kDa, vorhergesagte Größe $M_r = 63973$) wurde aus einer Vielzahl von Archaea gereinigt und das kodierende Gen kloniert (Bult *et al.*, 1996; Denda *et al.*, 1988a; Ihara *et al.*, 1992; Inatomi *et al.*, 1989a; Klenk *et al.*, 1997; Shibui *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 1995; Wilms *et al.*, 1996). Sie ist der Untereinheit Vma1p der V_1V_0 -ATPase der Hefe homolog und weist im Vergleich der Aminosäuresequenzen bis zu 50% Identität auf (Hirata *et al.*, 1990). 86% der Aminosäuren sind mit denen der Untereinheit A aus *M. barkeri* identisch (Wilms *et al.*, 1996). 63 und 52% der Aminosäurereste sind zur Untereinheit A der A_1A_0 -ATPasen aus jeweils *H. volcanii* (Steinert *et al.*, 1995) und *S. acidocaldarius* (Denda *et al.*, 1988a) identisch. Die Identitäten zwischen AhaA und Untereinheit A aus jeweils *Enterococcus hirae*, Rind und Mensch schwanken zwischen 50 und 55% (Pan *et al.*, 1991; Takase *et al.*, 1993; Van Hille *et al.*, 1993). 26,9-27,6% der Aminosäurereste sind mit der β -Untereinheit der F_1F_0 -ATPase aus *E. coli* identisch (Walker *et al.*, 1984), was auf einen gemeinsamen Ursprung der Untereinheiten AhaA aus A_1A_0 -ATPasen und β aus F_1F_0 -ATPasen schließen lässt. AhaA enthält die Walker-Motive A und B (Walker *et al.*, 1982), die Bestandteil der Nukleotidbindestelle sind. Hieraus, und aus der Tatsache, dass anti-Untereinheit-A-spezifische Antikörper stärker als anti-Untereinheit-B-spezifische Antikörper die ATPase-Aktivität zu inhibieren vermochten (Wilms *et al.*, 1996), ergibt sich, dass AhaA die katalytische Untereinheit der A_1 -ATPase darstellt. Dieses konnte auch mit den Markierungsexperimenten von Coskun an gereinigter A_1 -ATPase gezeigt werden (Coskun *et al.*, 2001). Es konnte eine gekoppelte Konformationsänderung zwischen AhaA und AhaD festgestellt werden, wenn unterschiedliche Substrate zugegeben wurden. Vergleiche der Aminosäuresequenzen der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase (Abrahams *et al.*, 1994) mit der A_1A_0 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 zeigten eindeutig, dass die Aminosäuren, die in die Nukleotid-Bindung involviert sind, in der archäellen ATPase konserviert sind. Untersuchungen zur Stöchiometrie konnten belegen, dass AhaA wie auch AhaB in dreifacher Kopienzahl im A_1 -ATPase-Komplex vorliegen (diese Arbeit). Quervernetzungs-Experimente ergaben, dass sich mehrere Kopien von AhaA im A_1 -Komplex in direkter Nachbarschaft zueinander befinden (diese Arbeit). Gleiches ist auch für Kopien von AhaB gezeigt worden. Die Bildung von Quervernetzungen zwischen den gleichen Untereinheiten AhaA bzw. AhaB ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese am gegenüberliegenden Ende von AhaD im A_1 -Komplex in einer wie für F_1 -ATPasen beschriebenen Art „Kronen“-Struktur zusammentreffen und somit in direkter

Nachbarschaft zu liegen kommen (Abrahams *et al.*, 1994). Desweiteren befinden sich die Untereinheiten AhaA und AhaB in direkter Nachbarschaft zueinander.

AhaB (55 kDa, vorhergesagte Größe $M_r = 50622$) ist sehr nahe - mit 56% Identität (Senior, 1990) - mit Vma2p der V_1V_O -ATPase aus *S. cerevisiae* verwandt (Nelson *et al.*, 1989) und zeigt zudem noch 24% Identität zur Untereinheit α der F_1F_O -ATPase aus *E. coli* (Walker *et al.*, 1984). Die von Wilms ermittelte molekulare Masse von AhaB betrug 49 kDa, was zwar in gewisser Diskrepanz zu 55 kDa steht, aber durch das Laufverhalten in verschiedenen Gelsystemen zu erklären ist. 90, 67 und 56% identische Aminosäuren wurden in der entsprechenden A_1A_O -ATPase-Untereinheit B der Organismen *M. barkeri* (Inatomi *et al.*, 1989a), *H. volcanii* (Steinert *et al.*, 1995) und *S. acidocaldarius* (Denda *et al.*, 1988b) gefunden. Das Walker-A-Motiv G-X-X-X-X-G-K-T ist im Gegensatz zur α -Untereinheit der F_1F_O -ATPase in AhaB nicht an der erwarteten Position, sondern 195 Aminosäurereste dahinter zu finden. In *S. acidocaldarius* wurden 6 Nukleotid-Bindestellen detektiert, was dafür spricht, dass auch AhaB Nukleotide zu binden vermag (Schäfer und Meyering-Vos, 1992). Aufgrund der durchgeführten Sequenzvergleiche und biochemischer Experimente kann jedoch weiterhin davon ausgegangen werden, dass die Untereinheit B der V_1V_O -ATPasen und AhaB der A_1A_O -ATPasen nicht katalytisch sind.

AhaE ($M_r = 20399$) ist der Untereinheit D der A_1A_O -ATPase aus *H. volcanii* sehr ähnlich (33% Identität) (Wilms *et al.*, 1996). 17% der Aminosäuren sind auch in NtpE der V_1V_O -ATPase aus *E. hirae* konserviert (Takase *et al.*, 1994). Die homologe Untereinheit Vma4p der V_1V_O -ATPase aus *S. cerevisiae* besitzt im Gegensatz zur homologen 13-kDa-Untereinheit AtpD aus *S. acidocaldarius* eine molekulare Masse von 31 kDa (Foury, 1990). Untersuchungen der Sekundärstruktur von AhaE und seiner homologen Proteine legen eine größtenteils α -helikale Struktur nahe. Aminosäuresequenz-Vergleiche konnten belegen, dass diese sehr gut zwischen den bakteriellen, eukaryotischen und archäellen Untereinheiten konserviert sind. In F_1F_O -ATPasen ist die entsprechende Untereinheit als δ bekannt, welche wahrscheinlich als stabilisierende Stator-Komponente zwischen den *b*-Untereinheiten und dem Kopfteil der F_1 -ATPase lokalisiert ist. Bei der archäellen A_1 -ATPase konnte AhaE in keiner Präparation – sei es aus ganzen Zellen oder im gereinigten Protein – detektiert werden. Da die gereinigte A_1 -ATPase auch in Abwesenheit von AhaE ATP hydrolysieren kann, scheint diese Untereinheit für die katalytische Funktion der A_1 -ATPase nicht essentiell zu sein, was für eine periphere Position dieser Untereinheit im Enzymkomplex spricht und dessen Rolle als Strukturprotein widerspiegelt. Kürzlich wurde ein Plasmid generiert, das sämtliche Gene des *aha*-Operons enthält. Erste Expressionsversuche mit

diesem Plasmid in *E. coli* zeigten, dass AhaE als 20-kDa-Protein synthetisiert werden kann, wenn das Operon komplett vorliegt (C. Weidner, pers. Mitteilung).

AhaF ($M_r = 10893$) ist ein hydrophiles Polypeptid mit einer molekularen Masse von 9 kDa, das bislang als homologe Untereinheit zu Vma7p der V_1V_0 -ATPase aus der Hefe und ϵ der F_1F_0 -ATPase aus *E. coli* bekannt war (Graham *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1984). Die Aminosäuresequenz von AhaF ist zu 50% identisch mit der A_1A_0 -ATPase-Untereinheit AtpE aus *H. volcanii* (Wilms *et al.*, 1996). AhaF ist aufgrund seiner Position im Operon der V_1V_0 -ATPase-Untereinheit NtpG von *E. hirae* zugeordnet worden (Takase *et al.*, 1994; Wilms *et al.*, 1996). Gleiches gilt für die entsprechenden V_1V_0 -ATPase-Untereinheiten des Tabak-Hornwurms (Graf *et al.*, 1992) und *Drosophila melanogaster* (Wilms *et al.*, 1996). Untersuchungen zur Sekundärstruktur von AhaF ergaben, dass diese Untereinheit am N-Terminus eine kleine α -helikale und am C-Terminus eine β -Faltblatt-Domäne enthält. Durch Quervernetzungs-Experimente konnte belegt werden, dass die zu AhaE homologe ϵ -Untereinheit der F_1F_0 -ATPasen im Zusammenspiel mit den Untereinheiten α , β und γ die Energieübertragung von der ATP-Hydrolyse zur Ionentranslokation vermittelt (Aggeler und Capaldi, 1992; Skakoon und Dunn, 1993a; Skakoon und Dunn, 1993b). Einige hochkonservierte Aminosäurereste der ϵ -Untereinheit (Kanazawa *et al.*, 1982) zeigten bei Experimenten Kontakt zu den hochkonservierten DELSEED-Sequenzen der α - und β -Untereinheiten (Dallmann *et al.*, 1992). In der Arbeitsgruppe von Capaldi wurden weitere Quervernetzungs-Experimente durchgeführt, die gezeigt haben, dass γ und ϵ miteinander in Wechselwirkung treten (Chunlin und Capaldi, 1995; Gogol *et al.*, 1990) und dass die ϵ -Untereinheit zwischen den α - und β -Untereinheiten Nukleotid-abhängige Bewegungen vollzieht (Aggeler und Capaldi, 1996). Da die Verknüpfungen nicht zur selben Zeit zwischen einem $\alpha\beta$ -Komplex, γ und ϵ nachweisbar waren, liegt die Vermutung nah, dass zwei der drei Konformationen der katalytischen β -Zentren gleichzeitig durch die Wechselwirkungen je eines der $\alpha\beta$ -Paare mit einem der beiden γ - oder ϵ -Untereinheiten hervorgerufen werden. Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Quervernetzern konnten leider keine Interaktionen von AhaF mit AhaA, AhaB, AhaC oder AhaD festgestellt werden. Da überhaupt keine Kontaktstellen von AhaF mit irgendeiner anderen A_1 -ATPase-Untereinheit nachgewiesen werden konnte, die A_1 -ATPase aber im Komplex auch AhaF enthält, bleibt festzustellen, dass Formaldehyd als quervernetzendes Agens in diesem Fall ungeeignet ist.

AhaG ($M_r = 6135$) ist das einzige Polypeptid, zu dem fast keine – ausgenommen bei *M. barkeri* - homologen Proteine gefunden wurden. Allerdings sind in den ATPase-Operonen von *M. thermotrophicus* und *M. jannaschii* jeweils die offenen Leserahmen MT0952 und MJ0614 mit der zu *ahaG* entsprechenden Größe und Position

vorhanden. *ahaG* konnte in *E. coli* als Teil des *aha*-Operons exprimiert werden (Lemker *et al.*, 2001), was als Indiz für eine Existenz eines Genprodukts von *ahaG* in *M. mazei* Gö1 angesehen werden kann. Es ist aber immer noch unklar, ob die Untereinheit G überhaupt eine Rolle in der Struktur oder Funktion der A_1A_0 -ATPase spielt.

4.2.4. Struktur der A_1 -ATPase

Die molekularen Daten ergaben, dass die A_1A_0 -ATPase aus mindestens neun nicht-identischen Untereinheiten besteht. A_1A_0 - als auch F_1F_0 - und V_1V_0 -ATPasen bestehen aus einem Kopfteil, der über mehrere Stiele mit dem Basisteil verbunden ist. Der erste Stiel - so wird bislang angenommen - ist Teil des Rotors, wohingegen der zweite Stiel dem Stator der Rotationsmaschine zugehörig ist (Boekema *et al.*, 1997; Rodgers und Capaldi, 1998; Wilkens und Capaldi, 1998a; Wilkens und Capaldi, 1998b). In der gereinigten A_1 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 würden demnach die Untereinheiten AhaA und AhaB zum Stator gehören, die Untereinheiten AhaD und AhaF zum Rotor. Über die Funktion von AhaC lässt sich bislang nur spekulieren. Wenn AhaC in Verbindung mit AhaA und der Membrandomäne steht, dann erscheint es sehr wahrscheinlich, dass diese Untereinheit auch wie AhaA und AhaB zum Stator gehört. Um dieses zu verifizieren, müssten allerdings noch weitere Quervernetzungsstudien folgen, die das Zusammenspiel von AhaC mit weiteren hydrophilen als auch mit den hydrophoben, membranständigen Untereinheiten AhaI und AhaK beschreiben.

3-dimensionale Modelle der F_1 - und V_1 -ATPasen zeigen jeweils die hexagonale Anordnung der alternierenden $\alpha\beta$ - und AB- Untereinheiten, deren Verzahnung fast über die gesamte Länge der Untereinheiten verläuft (Abrahams *et al.*, 1994; Bianchet *et al.*, 1998; Gogol *et al.*, 1989; Grüber *et al.*, 2000). Die hexamere Einheit ist jeweils über einen Stiel mit der ionentranslozierenden Einheit verbunden (Abb. 40). Vergleiche der jeweiligen Strukturen ergaben, dass sich die Stiele der F_1 - und V_1 -ATPasen in ihren Längen unterscheiden (Boekema *et al.*, 1999; Dschida und Bowman, 1992; Svergun *et al.*, 1998a; Svergun *et al.*, 1998b; Wilkens *et al.*, 1999). Die A_1A_0 -ATPasen zeigen im Vergleich der Primärsequenzen, dass sie mit denen der V_1V_0 - näher als mit den F_1F_0 -ATPasen verwandt sind. Eine Raumstruktur der A_1 -ATPase von *M. mazei* Gö1 konnte mittels Synchrotron-Röntgen-Kleinwinkelstreuung erzeugt werden. Dabei zeigte sich, dass sich die A_1 -ATPase nicht nur von der F_1 - sondern auch von der V_1 -ATPase strukturell unterscheidet. Die bereits erwähnten Stiel-Längen der Enzyme variieren immens. Während die F_1 -ATPase aus *E. coli* eine Stiellänge von 4 - 4,5 nm und die V_1 -ATPase eine von 11 nm aufweist, beträgt die Länge des Stiels der A_1 -ATPase $8,4 \pm 0,1$ nm (Grüber *et al.*, 2001). Auch dieser Unterschied unterstreicht die Sonderstellung der

archäischen A_1A_0 -ATPasen; sie unterscheiden sich nicht nur von den F_1 - sondern auch von den V_1 -ATPasen und bilden somit einen eigenständigen ATPase-Typus. Grüber verglich seine Daten noch mit denen von Wilms und verifizierte mit dem von ihm ermittelten A_1 -ATPase-Volumen von $710 \pm 20 \text{ nm}^3$ die molekulare Masse von 350-360 kDa und somit die in dieser Arbeit ermittelte molekulare Masse von 355 kDa. Die Stielregion mit den Untereinheiten AhaC, AhaD und AhaF weist eine molekulare Masse von ca. 80 kDa auf. Diese Masse legt eine Stöchiometrie von $C_1D_1F_1$ nahe (Grüber *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit bestimmte Stöchiometrie von $C_1D_2F_1$ ist sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Proteolyse der Untereinheiten zurückzuführen. Der Radius der A_1 -ATPase wurde mit $5 \pm 0,2 \text{ nm}$ bestimmt.

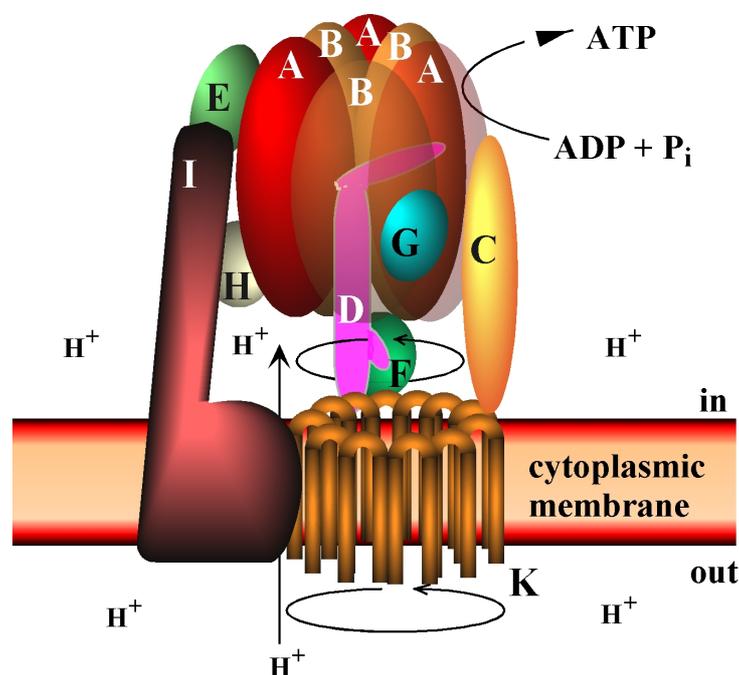


Abb. 40: Hypothetische Struktur der A_1A_0 -ATPase von *M. mazei* Gö1. Das Enzym von *M. mazei* Gö1 enthält wahrscheinlich 12 Kopien des 8 kDa-Proteolipids, wohingegen das Enzym von *M. thermotrophicus* 6 Kopien des 16 kDa- und das Enzym von *M. jannaschii* 4 Kopien des 21-kDa-Proteolipids enthält. Die Lokalisation von AhaC, AhaD, AhaE, AhaF, AhaG und AhaH sind rein spekulativ.

Die Positionen der Untereinheiten AhaC und AhaF im A_1 -ATPase-Komplex wurde mittels tryptischer Verdauung untersucht. Je länger die A_1 -ATPase dem Trypsin ausgesetzt war, umso weniger wurde von diesen beiden Untereinheiten am Komplex detektiert. Demnach befanden sich die Untereinheiten AhaC und AhaF an der Peripherie der A_1 -ATPase und waren somit leichter für das Trypsin zugänglich als die zentralen Untereinheiten AhaA, AhaB oder AhaD.

Ein besonders interessantes Ergebnis wurde mit einer Quervernetzungs-Studie erzielt. Die A_1 -ATPase-Untereinheit AhaD konnte mit AhaA quervernetzt werden, was einen Hinweis auf ihre räumliche Nähe gibt. Dieses Ergebnis konnte von Coskun *et al.* (2001) verifiziert werden. Jedoch scheint der Abstand zwischen diesen beiden Untereinheiten abhängig vom zugesetzten Substrat zu sein. Bei Mg-ATP oder Mg-ADP als Substrat konnte eine AhaA-AhaD-Quervernetzung festgestellt werden. Wurden allerdings Mg-ADP+P_i oder Mg-AMP·PNP zugegeben, so blieb diese Quervernetzung aus. Mit diesem Experiment konnte besonders gut die Substrat-abhängige Konformationsänderung in der A_1 -ATPase gezeigt werden.

Substrat-abhängige Konformationsänderungen wurden auch durch andere Untersuchungen belegt. So war der Radius des Kopfteils der A_1 -ATPase vom zugegebenen Substrat abhängig (Coskun *et al.*, 2001). Bei dem nicht-spaltbaren Substrat Mg-AMP·PNP wurde ein Wert von $R_g = 4,9 \pm 0,1$ nm gemessen, während bei den Substraten Mg-ADP, Mg-ADP+P_i oder dem hydrolysierbaren Mg-ATP die Radien mit jeweils $5,14 \pm 0,1$, $5,21 \pm 0,1$ und $5,23 \pm 0,1$ nm bestimmt wurden. Es fanden demnach substratvermittelte Konformationsänderungen in der A_1 -ATPase statt. Weiterhin unterlag das Ausmaß des tryptischen Verdaus einer Substrat-Abhängigkeit. Wurden die Untersuchungen mit Mg-AMP·PNP anstelle von Mg-ATP durchgeführt, so wurden die Untereinheiten AhaC und AhaF schneller vom Komplex abgespalten.

4.2.5. Katalytische Eigenschaften der A_1 -ATPase

Über die katalytischen Eigenschaften der A_1 -ATPasen aus Methanogenen war aufgrund der hohen Instabilität des Enzyms bislang noch nicht sehr viel bekannt. Die tryptischen Verdaue der gereinigten A_1 -ATPase aus *M. mazei* Göl erwiesen sich neben der Ermittlung struktureller Daten auch hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften als sehr interessant. Die ATPase-Aktivität wurde durch die Trypsin-Behandlung nur marginal beeinflusst, da 80% der ursprünglich eingesetzten spezifischen Aktivität von 9,6 U/mg Protein am Ende des Experimentes noch detektierbar waren (Grüber *et al.*, 2001). Diese Untersuchung zeigte im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen eindrucksvoll, dass ein A_3B_3D -Subkomplex ATP hydrolysieren kann. Dieser Subkomplex entspricht der in den Rotationsexperimenten eingesetzten Zusammensetzung von $\alpha_3\beta_3\gamma$ der F_1 -ATPase (Noji *et al.*, 1997) und scheint somit die minimale Ausstattung einer A_1 -ATPase zu beschreiben. Der Befund, dass es nicht möglich war, einen funktionellen A_3B_3D -Subkomplex in *E. coli* zu produzieren war damit nicht auf das Unvermögen des Subkomplexes, ATP zu hydrolysieren, sondern wahrscheinlich auf

Instabilitäten der solitären Untereinheiten und/oder Assemblierungsprobleme zurückzuführen.

Einige der kinetischen Parameter der heterolog produzierten und gereinigten und der aus Membranen von *M. mazei* Gö1 gereinigten A₁-ATPase sind ähnlich. Diese A₁A₀-ATPase-Präparation aus Membranen von *M. mazei* Gö1 enthielt 6 Polypeptide, deren Identitäten nicht geklärt worden waren (Wilms *et al.*, 1996). Die höchste Enzymaktivität wurde mit einem Mg²⁺:ATP-Verhältnis von 2:1 bei pH 5,2 ermittelt. Allerdings variierten die Werte für V_{\max} und K_m . Die aus den Membranen isolierte A₁-ATPase hydrolysierte ATP mit einem V_{\max} von 0,09 U/mg Protein. Dieser Wert lag um den Faktor 100 unter dem in dieser Arbeit ermitteltem Wert. Der V_{\max} der archäellen ATPase aus *S. acidocaldarius* wurde mit 13 U/mg Protein bestimmt, was mit dem Wert der heterolog produzierten A₁-ATPase aus *M. mazei* Gö1 vergleichbar ist (Konishi *et al.*, 1987). Der ermittelte K_m von 1,3 mM für Mg-ATP der heterolog produzierten A₁-ATPase aus *M. mazei* Gö1 war um den Faktor 3 geringer als derjenige, der mit der aus Membranen isolierten A₁-ATPase bestimmt wurde (Wilms *et al.*, 1996). Der K_m -Wert aus dieser Arbeit ist jedoch gut vergleichbar mit denen der A₁-ATPasen aus *S. acidocaldarius* ($K_m = 0,2$ mM für Mg-ATP), *M. barkeri* ($K_m = 0,31$ mM Mg-ATP), *H. volcanii* ($K_m = 1,0$ mM Mg-ATP) und *M. thermophila* ($K_m = 1,2$ mM Mg-ATP) (Inatomi, 1986; Inatomi *et al.*, 1993; Inatomi und Maeda, 1988; Lübben *et al.*, 1987; Steinert und Bickel-Sandkötter, 1996). Wie auch für die aus Membranen präparierte zeigte auch die aus dem Cytoplasma von *E. coli* DK8(pTL2) isolierte A₁-ATPase ein Aktivitäts-Maximum bei pH 5,2. Die ATPase aus *M. barkeri* hatte ebenfalls dieses Optimum bei pH 5,2 (Inatomi, 1986). Die ATPasen aus anderen Archäen wiesen jedoch bei anderen pH-Werten Maxima auf: pH 6,25 bei *S. acidocaldarius*, pH 7,0 bei *M. thermophila* und pH 9,0 bei *H. volcanii* und bei *H. mediterranei* (Dane *et al.*, 1992; Inatomi *et al.*, 1993; Lübben *et al.*, 1987). Sämtliche archäelle ATPasen, die bislang isoliert wurden, hydrolysierten bevorzugt Mg-ATP. Neben ATP wurde auch GTP, CTP und UTP hydrolysiert, allerdings mit weitaus geringeren Aktivitäten. Hydrogensulfit ist als stimulierende Komponente der archäellen, mitochondrialen und bakteriellen ATPasen bekannt, aber die molekulare Wirkung dieser Substanz wird noch nicht verstanden (Adolfsen und Moudrianakis, 1978; Chen und Konisky, 1993; Ebel und Lardy, 1975; Wilms *et al.*, 1996). Die A₁A₀-ATPase aus *S. acidocaldarius* wurde durch die Zugabe von 20 mM Na₂SO₃ stimuliert (Lübben *et al.*, 1987). Eine Sulfid-vermittelte Stimulation wurde zudem noch mit den ATPasen aus *M. barkeri* und *M. thermophila* beobachtet (Inatomi, 1986; Inatomi *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu wurde die A₁A₀-ATPase aus *M. thermotrophicus* durch Sulfid nicht beeinflusst (Roth und Bachofen, 1994).

Eine der besonderen Eigenschaften der A_1 -ATPase ist ihre Sensitivität gegenüber dem Inhibitor Diethylstilbestrol (DES) und seinen Derivaten Hexestrol und Dienestrol. Diese Komponenten wurden zunächst als Inhibitoren der F_1F_0 -ATPasen beschrieben, von denen man annahm, dass sie mit der membranständigen F_0 -Domäne interagieren würden (McEnery *et al.*, 1989; McEnery und Pedersen, 1986). Obwohl eine zusätzliche Wirkung der Inhibitoren auf die A_0 -Domäne nicht ausgeschlossen werden kann, zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Daten, dass es sich bei den Substanzen DES, Hexestrol und Dienestrol um potente A_1 -ATPase-Inhibitoren handelt. Sie werden sich in zukünftigen Studien als sehr hilfreich bei der Klärung des katalytischen Mechanismus der A_1 -ATPase erweisen.

4.3. Evolution der ATPasen

Bei der Oxidation von Kohlenwasserstoffen in lebenden Zellen entstehen zwei Kategorien von Produkten: a) ungeladene Produkte, wie z. B. Ethanol und CO_2 , welche über die Membranen frei diffundieren und als weitere Substrate den Zellen damit verloren gehen können und b) geladene Produkte, wie z. B. organische Säuren und Protonen, welche als geladene Moleküle nicht in der Lage sind, die Zellmembran frei zu durchdringen. Letztere bewirken eine Ansäuerung des Zellinneren. Wenn der pH-Wert des Cytoplasmas zu sehr fällt, droht eine zunehmende Denaturierung von Proteinen, was schließlich den Zelltod verursachen könnte. Im Laufe der Evolution mussten also Systeme entwickelt werden, die der Ansäuerung des Zellinneren entgegenwirken konnten. Diese Aufgabe übernahmen evolutionsgeschichtlich zuerst H^+ -Export-Kanäle, welche später durch ATP-hydrolysierende, primäre Protonenpumpen - den ersten ATPasen - ergänzt bzw. von ihnen verdrängt wurden (Skulachev, 1994).

Das UV-Licht war zu dieser Zeit nicht nur eine Energiequelle, es war zusätzlich durch seine sehr energiereiche Strahlung für die lebenden Zellen gefährlich, da es u.a. mutagenisierende Wirkungen auf Poly-Nukleinsäuren hat. Den einzigen Schutz vor diesen Strahlen hatten die Zellen im Wasser, dass das UV-Licht des Sonnenspektrums größtenteils herausfiltert. Das energieärmere, sichtbare Licht dringt jedoch in tiefere Regionen des Wassers ein und stand den damaligen Zellen als weitere Energiequelle zur Verfügung. Die Nutzung dieses Spektrums des Sonnenlichts wurde mit der Entwicklung der frühen Photosynthese ermöglicht. Neben dem Sauerstoff ist dabei zusätzlich auch das Ozon entstanden, welches die UV-Einstrahlung der Sonne durch filternde Wirkungen dezimiert hatte.

Im Zuge der Photosynthese werden Protonen aus dem Zellinneren über die Zellmembranen in das Medium gepumpt werden. Der Ψ erzeugende Mechanismus der frühen Photosynthese führte zur Umkehrung des ATPase-vermittelten Protonenflusses, welches die Synthese anstatt der Hydrolyse von ATP zur Folge hatte. Dieses war die erste, Ψ -nutzende, ATP-regenerierende ATPase: eine ATP-Synthase. Da der Ionenfluss und damit die Funktion der F_1F_0 -ATPase grundsätzlich reversibel ist, konnte am Beispiel des Stoffwechsels von *E. coli* gezeigt werden: unter aeroben Bedingungen synthetisiert die ATPase ATP, während sie unter anaeroben Bedingungen ATP hydrolysiert (Maloney, 1987). Auch in Pflanzen ist die Thiol-Modifikation der γ -Untereinheit bekannt. Sie verhindert die ATP-Hydrolyse im Dunkeln. In einigen rezenten extrem halophilen und thermophilen Archäen sind diese Ur-Photosynthese-Systeme mit Bakteriorhodopsin und Retinal als Chromophore nicht zuletzt aus der Tatsache erhalten geblieben, dass diese Moleküle extrem stabil und damit den Lebensbedingungen dieser Archäen gut angepasst sind. Bakteriorhodopsin und Retinal enthaltende Proteine sind die ältesten bekannten Protonen-Pumpen, die vom sichtbaren Licht betrieben werden (Skulachev, 1994).

Im Laufe der Evolution erfuhren die Ur-ATPasen zusammen mit den beteiligten Organismen Entwicklungen, welche die Organismen in Gruppen und die ATPasen in gruppenspezifische Typen trennten. Die Entwicklung der Ur-ATPasen wurde bereits zu einem frühen Zeitpunkt zunächst in zwei Richtungen gelenkt, was zur Entstehung der Ur-F- und Ur-V-Typ-ATPasen führte. Die Ur-F-Typ-ATPasen entwickelten sich zu den heutigen F_1F_0 -ATPasen (Blair *et al.*, 1996). Die Ur-V-Typ-ATPasen erfuhren nach der evolutionären Trennung von den F_1F_0 -ATPasen nochmals eine Gliederung in die rezenten A_1A_0 -ATPasen der Archaea und wiederum eine Vorläuferform der rezenten V_1V_0 -ATPasen (Abb. 41). In allen bislang gefundenen ATPasen aus allen drei Domänen des evolutionären Stammbaums ist die gleiche Zwei-Domänen-Struktur erhalten. Die großen Untereinheiten A und B entstammen einer Duplikation eines gemeinsamen Gens. Auf dem evolutionären Wege zu den heutigen A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen erfuhren die ATPasen eine Reihe von Deletionen und Insertionen, was einerseits zum Verlust des aktiven Zentrums einer Untereinheit des A_3B_3 -Komplexes, aber andererseits zur Vergrößerung der katalytischen Untereinheit führte (Müller *et al.*, 1999).

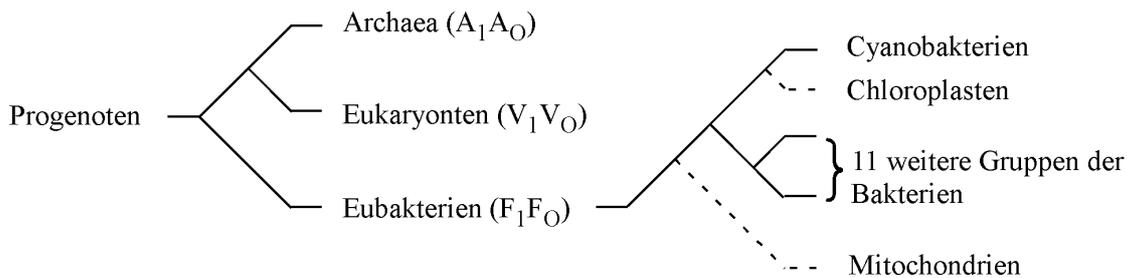


Abb. 41: Schematische Darstellung der evolutionären Entwicklung der verschiedenen ATPase-Typen A_1A_0 , V_1V_0 und F_1F_0 (Blair *et al.*, 1996). Dargestellt sind die Organismenreiche. Die entsprechenden ATPase-Typen sind in Klammern eingefügt. Gestrichelte Linien beruhen auf die Endosymbionten-Hypothese.

Es wurde bislang immer davon ausgegangen, dass die Trennung der A_1A_0 - und V_1V_0 -ATPasen durch die Duplikation und anschließende Fusion des Proteolipid-kodierenden Gens verursacht worden war. Diese Genverdopplung sollte auch der Grund dafür sein, dass die V_1V_0 -ATPasen unter physiologischen Bedingungen kein ATP zu synthetisieren vermögen. Allerdings wurden in jüngster Zeit duplizierte und triplizierte Proteolipidgene in ATP-Synthasen aus methanogenen Archäen und acetogenen Bakterien gefunden. Interessanterweise wurden die multiplen Gene in *M. thermotrophicus* und *M. jannaschii* fusioniert, in *A. fulgidus* jedoch nicht. Letzteres Phänomen könnte eine Zwischenstufe in der Evolution darstellen. Klar ist allerdings, dass die molekulare Masse der Proteolipide nicht darüber Auskunft geben kann, ob dieses Protein eine Untereinheit einer ATP-synthetisierenden ATPase ist. Zusätzlich wirkt sich die Entdeckung von duplizierten Proteolipiden auf die Evolutionstheorie der ATPasen aus; es kann nun nicht mehr mit Sicherheit angenommen werden, dass die Auftrennung der V_1V_0 - und A_1A_0 -ATPasen auf der Duplikation des Proteolipid-kodierenden Gens beruht. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die meisten archäellen ATPasen im Besitz eines 8-kDa-Proteolipids sind und dass die multimeren Proteine Ausnahmen sind. Kürzlich wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Genduplikation bei den V_1V_0 - und A_1A_0 -ATPasen zwei voneinander unabhängige Ereignisse in der Evolution darstellen (Hilario und Gogarten, 1998). Vor dem Hintergrund des horizontalen Gentransfers wird die Diskussion über die Ursprünge der ATPasen sehr kompliziert. Die Existenz von V_1V_0 -ATPasen in Bakterien als auch die Koexistenz von A_1A_0 - und F_1F_0 -ATPase-Genen in *M. barkeri* MS wurde bereits auf horizontalen Gentransfer zurückgeführt (Olendzenski *et al.*, 1998).

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die A_1 -ATPase-Gene *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* wurden in den Fusionsvektor pMal-c2 kloniert und in *Escherichia coli* exprimiert. Die Fusionsproteine wurden aus dem Zellextrakt isoliert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die spezifischen Antiseren gegen die A_1 -ATPase-Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC, AhaE und AhaF wurden für die Studien dieser Arbeit eingesetzt.
 2. Die für die hydrophile Domäne der A_1 -ATPase kodierenden Gene *ahaE*, *ahaC*, *ahaF*, *ahaA*, *ahaB*, *ahaD* und *ahaG* des methanogenen Archäons *Methanosarcina mazei* Gö1 wurden in den Überexpressionsvektor pGEM-4Z hinter die *lac*- und T7-Promotoren kloniert. Dieses Konstrukt wurde pTL2 genannt. pTL2 enthält zusätzlich 162 Bp stromaufwärts von *ahaE*.
 3. Die auf pTL2 lokalisierten Gene wurden heterolog in *E. coli* DK8 exprimiert und die A_1 -ATPase funktionell synthetisiert. Die spezifische ATPase-Aktivität im zellfreien Extrakt von *E. coli* DK8 (pSÖ1) betrug 186 mU/mg Protein. Die Synthese der A_1 -ATPase-Untereinheiten AhaA, AhaB, AhaC und AhaF konnte nachgewiesen werden. AhaE und AhaG konnten nicht detektiert werden.
 4. Die A_1 -ATPase wurde aus dem Zellextrakt von *E. coli* DK8 (pTL2) über Ultrazentrifugation, Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration an BioPrep SE 1000/17, Ionenaustauschchromatographie an BioScale DEAE und einer zweiten Gelfiltration an Sephacryl S-300 HR bis zur apparenten Homogenität gereinigt.
 5. Das gereinigte Enzym wies eine molekulare Masse von 355 kDa auf und setzte sich aus 5 verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die einzelnen Untereinheiten AhaA (65 kDa), AhaB (55 kDa), AhaC (41 kDa), AhaD (28 kDa) und AhaF (9 kDa) wurden mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert und wiesen im ATPase-Komplex eine Stöchiometrie von A_3B_3CDF auf. AhaE und AhaG waren nicht im Komplex enthalten.
 6. Der ATPase-Testpuffer wurde für die heterolog exprimierte A_1 -ATPase optimiert (50 mM MES-HCl, 40 mM Na-Acetat, 30 mM NaHSO₃, 8 mM MgSO₄, 4 mM ATP, pH 5,2). Na-Acetat und Sulfit stimulieren die A_1 -ATPase, wohingegen sich alkoholische Lösungsmittel die ATPase-Aktivität hemmten.
-

7. Die gereinigte A_1 -ATPase aus *M. mazei* Gö1 hydrolysierte Mg-ATP (im Verhältnis 2:1) als bevorzugtes Substrat mit einem V_{\max} von 13 ± 3 U/mg Protein und einem K_m von $1,3 \pm 0,3$ mM für ATP.
 8. DES, Hexestrol und Dienestrol wurden als spezifische Inhibitoren der archäellen A_1 -ATPase identifiziert. Die I_{50} -Werte dieser Hemmstoffe betragen 5 μ mol Hexestrol/mg Protein, 3 μ mol DES/mg Protein und 6 μ mol Dienestrol/mg Protein.
 9. Quervernetzungsexperimente konnten belegen, dass die Kopien der Untereinheit AhaA in direkter Nachbarschaft zueinander stehen. Dies trifft auch für die Kopien der Untereinheit AhaB und für die Untereinheiten AhaA und AhaB untereinander zu. Zudem konnte eine direkte Nachbarschaft der Untereinheiten AhaA und AhaD festgestellt werden.
 10. Die A_1 -ATPase besitzt eine dreifache Achsensymmetrie. Der Kopfteil der A_1 -ATPase ist hexagonal geformt und setzt sich aus sechs peripheren und einer zentralen Masse zusammen.
 11. Die über Röntgenkleinwinkelstreuung ermittelten Dimensionen der A_1 -ATPase sind: Gesamtlänge = 17,8 nm, Länge Kopfteil = 9,4 nm, Stiellänge = 8,4 nm, Stieldurchmesser = 6 nm, Kopfdurchmesser (variabel, abhängig vom Substrat) = 10,06 nm, Kopfradius (variabel, abhängig vom Substrat) = 5,03 nm.
-

6. LITERATUR

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. und Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁ ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628

Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. und Kinoshita, K., Jr. (2000) Stepping rotation of F₁-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 7243-7247

Adolfsen, R. und Moudrianakis, E. N. (1978) Kinetic mechanisms of ionic activation and inhibition of the adenosine triphosphatase of the 13S-coupling factor of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **253**: 4380-4388

Aggeler, R. und Capaldi, R. A. (1992) Cross-linking of the γ -subunit of the *Escherichia coli* ATPase (ECF₁) via cysteines introduced by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**: 21355-21359

Aggeler, R. und Capaldi, R. A. (1996) Nucleotide-dependent movement of the ϵ -subunit between α and β subunits in the *Escherichia coli* F₁F₀-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**: 13888-13891

Aggeler, R., Chicascruz, K., Cai, S. X., Keana, J. F. W. und Capaldi, R. A. (1992) Introduction of reactive cysteine residues in the ϵ -subunit of *Escherichia coli* F₁ ATPase, modification of these sites with tetrafluorophenyl azide-maleimides, and examination of changes in the binding of the ϵ -subunit when different nucleotides are in catalytic sites. *Biochemistry* **31**: 2956-2961

Al-Mahrouq, H. A., Carper, S. W. und Lancaster, J. R., Jr. (1986) Discrimination between transmembrane ion gradient-driven and electron transfer-driven ATP synthesis in the methanogenic bacteria. *FEBS Lett.* **207**: 262-265

Altendorf, K. und Zitzmann, W. (1975) Identification of the DCCD-reactive protein of the energy transducing adenosinetriphosphatase complex from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **59**: 268-272

Andersson, L.-O., Borg, H. und Mikaelsson, M. (1972) Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity. *FEBS Lett.* **20**: 199-202

Arai, H., Berne, M. und Forgac, M. (1987) Inhibition of the coated vesicle proton pump and labeling of a 17,000-Dalton polypeptide by *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **262**: 11006-11011

Arai, H., Terres, G., Pink, S. und Forgac, M. (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* **263**: 8796-8802

Arai, K., Shimaya, A., Hiratani, N. und Ohkuma, S. (1993) Purification and characterization of lysosomal H⁺-ATPase. An anion-sensitive V-type H⁺-ATPase from rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **268**: 5649-5660

Baeuerle, C., Ho, M. N., Lindorfer, M. A. und Stevens, T. H. (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H⁺-ATPase membrane sector. *J. Biol. Chem.* **268**: 12749 - 12757

Becher, B. und Müller, V. (1994) $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ drives the synthesis of ATP via an $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ -translocating F₁F₀-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Bacteriol.* **176**: 2543-2550

Becher, B., Müller, V. und Gottschalk, G. (1992a) The methyl-tetrahydromethanopterin-coenzyme-M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is a primary sodium pump. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 239-244

Becher, B., Müller, V. und Gottschalk, G. (1992b) *N*⁵-methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme-M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is a Na⁺-translocating membrane protein. *J. Bacteriol.* **174**: 7656-7660

Beyer, H. und Walter, W. (1984) Aliphatische Aldehyde (Alkanale). In: *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Hirzel, Stuttgart

Bianchet, M. A., Hüllihen, J., Pedersen, P. L. und Amzel, L. M. (1998) The 2.8-Å structure of rat liver F₁-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 11065-11070

Birkenhäger, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F. und Altendorf, K. (1995) The F₀ complex of the *Escherichia coli* ATP synthase - Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy. *Eur. J. Biochem.* **230**: 58-67

Blair, A., Ngo, L., Park, J., Paulsen, I. T. und Saier, M. H. (1996) Phylogenetic analyses of the homologous transmembrane channel-forming proteins of the F₀F₁-ATPases of bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Microbiology* **142**: 17-32

Blaut, M. (1994) Metabolism of methanogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 187-208

Blaut, M. und Gottschalk, G. (1984) Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **141**: 217-222

Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93 - 98

Boekema, E., van Heel, M. und Gräber, P. (1988) Structure of the ATP-synthase from chloroplasts studied by electron microscopy and image processing. *Prog. Clin. Biol. Res.* **273**: 75-80

Boekema, E. J., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J. S., Brisson, A. und Konings, W. N. (1997) Visualization of a peripheral stalk in V-type ATPase: Evidence for the stator structure essential for rotational catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 14291-14293

Boekema, E. J., van Breemen, J. F., Brisson, A., Ubbink-Kok, T., Konings, W. N. und Lolkema, J. S. (1999) Connecting stalks in V-type ATPase. *Nature* **401**: 37-38

Börner, G., Karrasch, M. und Thauer, R. K. (1989) Formylmethanofuran dehydrogenase activity in cell extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* and of *Methanosarcina barkeri*. *FEBS Lett.* **1**: 21-25

Bowman, E. J., Steinhardt, A. und Bowman, B. J. (1995) Isolation of the *vma4* gene encoding the 26 kDa subunit of the *Neurospora crassa* vacuolar ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1237**: 95-98

Boyer, P. D. (1979) The binding-change mechanism of ATP synthesis. In: *Membrane bioenergetics* (Lee, C. P., Schatz, G. und Ernster, L., eds.) Adisson-Wesley, U.S.A.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteine-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

Braley, R. und Piper, P. W. (1997) The C-terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase is essential for the regulation of this enzyme by heat shock protein Hsp30, but not for stress activation. *FEBS Lett* **418**: 123-126

Brinkmann, U., Mattes, R. E. und Buckel, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**: 109-114

Bryant, M. P. (1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1324-1328

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L. X., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., Fitzgerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M., Weidman, J. F., Fuhrmann, J. L., Nguyen, D., Utterback, T. R., Kelley, J. M., Peterson, J. D., Sadow, P. W., Hanna, M. C., Cotton, M. D., Roberts, K. M., Hurst, M. A., Kaine, B. P., Borodovsky, M., Klenk, H. P., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R. und Venter, J. G. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073

Capaldi, R. A., Aggeler, R., Wilkens, S. und Grüber, G. (1996) Structural changes in the γ and ϵ subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-type ATPase during energy coupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 397-401

Carper, S. W. und Lancaster, J. R., Jr. (1986) An electrogenic sodium-translocating ATPase in *Methanococcus voltae*. *FEBS Lett.* **200**: 177-180

Chen, W. und Konisky, J. (1993) Characterization of a membrane-associated ATPase from *Methanococcus voltae*, a methanogenic member of the Archaea. *J. Bacteriol.* **175**: 5677-5682

Chung, K. T. (1976) Inhibitory effects of H₂ on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 342-348

Chunlin, T. und Capaldi, R. A. (1995) Characterization of the interface between γ - and ϵ -subunits of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**: 3018-3024

Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 2110-2114

Coskun, Ü., Grüber, G., Koch, M. H. J., Godovac-Zimmermann, J., Lemker, T. und Müller, V. (2001) Crosstalk in the A₁ ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1 due to nucleotide-binding. *J. Biol. Chem.* submitted

Cross, A. D., Morimoto, H., Williams, P. G. und Beardsley, G. P. (1991) Catalytic reduction in the synthesis of tritiated-(6R) and tritiated-(6S) 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolate. *J. Label. Compound. Radiopharm* **29**: 753-763

Dallmann, H. G., Flynn, T. G. und Dunn, S. D. (1992) Determination of the 1-ethyl-3-[(3-dimethylamino)propyl]-carbodiimide-induced cross-link between the β - and ϵ -subunits of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 18953-18960

Dane, M., Steinert, K., Esser, K., Bickel-Sandkötter, S. und Rodriguez-Valera, F. (1992) Properties of the plasma membrane ATPases of the halophilic archaeobacteria *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii*. *Z. Naturforsch. C* **47**: 835-844

De Bernardes Clark, E., Schwarz, E. und Rudolph, R. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods in Enzymology* **309**: 217-236

Deckers-Hebestreit, G. und Altendorf, K. (1996) The F₁F₀-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 791-824

Denda, K., Konishi, J., Hajiro, K., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1990) Structure of an ATPase operon of an acidothermophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* **265**: 21509-21513

Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1988a) The membrane-associated ATPase from *Sulfolobus acidocaldarius* is distantly related to F₁-ATPase as assessed from the primary structure of its α -subunit. *J. Biol. Chem.* **263**: 6012-6015

Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1988b) Molecular cloning of the β -subunit of a possible non- F_0F_1 type ATP synthase from the acidothermophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* **263**: 17251-17254

Deppenmeier, U., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1991) H_2 :heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. *Arch. Microbiol.* **155**: 272-277

Dschida, W. J. und Bowman, B. J. (1992) Structure of the vacuolar ATPase from *Neurospora crassa* as determined by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **267**: 18783-18789

Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L. und Cross, R. L. (1995) Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10964-10968

Dunn, S. D. und Futai, M. (1980) Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli* F_1 ATPase. *J. Biol. Chem.* **255**: 113-118

Dybas, M. und Konisky, J. (1989) Transport of coenzyme-M (2-mercaptoethanesulfonic acid) and methylcoenzyme-M [(2-methylthio)ethanesulfonic acid] in *Methanococcus voltae*: identification of specific and general uptake systems. *J. Bacteriol.* **171**: 5866-5871

Dybas, M. und Konisky, J. (1992) Energy transduction in the methanogen *Methanococcus voltae* is based on a sodium current. *J. Bacteriol.* **174**: 5575-5583

Ebel, R. E. und Lardy, H. A. (1975) Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* **250**: 191-196

Feng, Y. und Forgac, M. (1992) Cysteine 254 of the 73-kDa *a* subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle H^+ -ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.* **267**: 5817-5822

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

Ferry, J. G. (1992b) Methane from acetate. *J. Bacteriol.* **174**: 5489-5495

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. (1992a) H⁺ transport and coupling by the F₀ sector of the ATP synthase - insights into the molecular mechanism of function. *J. Bioenerg. Biomembrane* **24**: 485-491

Fillingame, R. H. (1992b) Subunit-*c* of F₁F₀ ATP synthase - structure and role in transmembrane energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1101**: 240-243

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

Fillingame, R. H., Girvin, M. E., Fraga, D. und Zhang, Y. (1992) Correlations of structure and function in H⁺ translocating subunit-*c* of F₁F₀ ATP synthase. In: *Ion - Motive ATPases : Structure, Function, and Regulation* (Scarpa, A., Carafoli, E. und Papa, S., eds.) New York Acad. Sciences, New York, U.S.A.

Fillingame, R. H., Girvin, M. E. und Zhang, Y. (1995) Correlations of structure and function in subunit *c* of *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 760-766

Forgac, M. (1992) Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **172**: 155-169

Forgac, M. (1999a) Structure and properties of the vacuolar H⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* **274**: 12951-12954

Forgac, M. (1999b) Structure, mechanism and regulation of the clathrine-coated vesicles and yeast vacuolar H⁺-ATPases. *J. Exp. Biol.* **203**: 71-80

Foury, F. (1990) The 31-kDa polypeptide is an essential subunit of the vacuolar ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 18554-18560

Gerike, U. und Dimroth, P. (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., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. und Walker, J. E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1055-1061

Gindl, E. S. (2000) Untersuchung zur Rolle von Bicarbonat im heterotrophen Stoffwechsel von *Acetobacterium woodii*. *Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München*

Girvin, M. E. und Fillingame, R. H. (1994) Hairpin folding of subunit-*c* of F₁F₀ ATP synthase. H-1 distance measurements to nitroxide-derivatized aspartyl-61. *Biochemistry* **58**: 7652-7659

Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L. und Fillingame, R. H. (1998) Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit *c* of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry* **37**: 8817-8824

Gogol, E. P., Johnston, E., Aggeler, R. und Capaldi, R. A. (1990) Ligand-dependent structural variations in *Escherichia coli* F₁ ATPase revealed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 9585-9589

Gogol, E. P., Lucken, U., Bork, T. und Capaldi, R. A. (1989) Molecular architecture of *Escherichia coli* F₁ adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* **28**: 4709-4716.

Gowrishankar, J. und Manna, D. (1996) How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. *Genetica* **97**: 363-378

Gräf, R., Novak, F. J. S., Harvey, W. R. und Wieczorek, H. (1992) Cloning and sequencing of cDNA encoding the putative insect plasma membrane V-ATPase subunit A. *FEBS Lett.* **300**: 119-122

Graham, L. A., Hill, K. J. und Stevens, T. H. (1994) VMA7 encodes a novel 14-kDa subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* **269**: 25974-25977

Graham, L. A., Hill, K. J. und Stevens, T. H. (1995) VMA8 encodes a 32-kDa V₁ subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase required for function and assembly of the enzyme complex. *J. Biol. Chem.* **270**: 15037-15044

Grüber, G., Radermacher, M., Ruiz, T., Godovac-Zimmermann, J., Canas, B., Kleine-Kohlbrecher, D., Huss, M., Harvey, W. R. und Wieczorek, H. (2000) Three-dimensional structure and subunit topology of the V₁ ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochemistry* **39**: 8609-8616

Grüber, G., Svergun, D. I., Coskun, Ü., Lemker, T., Koch, M. H. J., Schägger, H. und Müller, V. (2001) Structural insights into the A₁ ATPase from the archaeon, *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* **40**: 1890-1896

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580

Heefner, D. L. und Harold, F. M. (1982) ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 2798-2802

Heinonen, J. E. und Lahti, R. J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* **113**: 313-317

Hilario, E. und Gogarten, J. P. (1998) The prokaryote-to-eucaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. *J. Mol. Evol.* **46**: 703-715

Hippe, H., Caspari, D., Fiebig, K. und Gottschalk, G. (1979) Utilization of trimethylamine and other methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 494-498

Hirata, R., Graham, L. A., Takatsuki, A., Stevens, T. H. und Anraku, Y. (1997) VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 4795-4803

Hirata, R., Ohsumk, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. und Anraku, Y. (1990) Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 6726-6733

Hisabori, T., Kondoh, A. und Yoshida, M. (1999) The γ -subunit in chloroplast F_1 -ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Lett.* **463**: 35-38

Hochstein, L. I. (1992) ATP synthesis in *Halobacterium saccharovorum* - evidence that synthesis may be catalysed by an F_0F_1 -ATP synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**: 155-159

Hochstein, L. I., Kristjansson, H. und Altekär, W. (1987) The purification and subunit structure of a membrane-bound ATPase from the archaeobacterium *Halobacterium saccharovorum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 295-300

Hochstein, L. I. und Lawson, D. (1993) Is ATP synthesized by a vacuolar-ATPase in the extremely halophilic bacteria. *Experientia* **49**: 1059-1063

Hochstein, L. I. und Stan-Lotter, H. (1992) Purification and properties of an ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**: 153-160

Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197

Höner zu Bentrup, K., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J. S. und Konings, W. N. (1997) An Na^+ -pumping V_1V_0 -ATPase complex in the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. *J. Bacteriol.* **179**: 1274-1279

Hungate, R. E. (1969) A role tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology* (Norris, J. R. und Ribbons, D. W., eds.) Academic Press, New York, U.S.A.

Ihara, K., Abe, T., Sugimura, K. I. und Mukohata, Y. (1992) Halobacterial A-ATP synthase in relation to V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **172**: 475-485

Ihara, K. und Mukohata, Y. (1991) The ATP synthase of *Halobacterium salinarium* (*halobium*) is an archaeobacterial type as revealed from the amino acid sequences of its two major subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 111-116

Ihara, K., Watanabe, S., Sugimura, K. und Mukohata, Y. (1997) Identification of proteolipid from an extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* as an N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide binding subunit of ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**: 267-272

Inatomi, K. I. (1986) Characterization and purification of the membrane-bound ATPase of the archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **167**: 837-841

Inatomi, K. I., Eya, S., Maeda, M. und Futai, M. (1989a) Amino acid sequence of the α and β subunits of *Methanosarcina barkeri* ATPase deduced from cloned genes. *J. Biol. Chem.* **264**: 10954-10959

Inatomi, K. I., Kamagata, Y. und Nakamura, K. (1993) Membrane ATPase from the acetoclastic methanogen *Methanothrix thermophila*. *J. Bacteriol.* **175**: 80-84

Inatomi, K. I. und Maeda, M. (1988) Isolation of subunits from *Methanosarcina barkeri* ATPase - nucleotide-binding site in the α -subunit. *J. Bacteriol.* **170**: 5960-5962

Inatomi, K. I., Maeda, M. und Futai, M. (1989b) Dicyclohexylcarbodiimide-binding protein is a subunit of the *Methanosarcina barkeri* ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 1585-1590

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

Jäger, H., Birkenhäger, R., Stalz, W. D., Altendorf, K. und Deckers-Hebestreit, G. (1998) Topology of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **251**: 122-132

Jones, P. C., Hermolin, J. und Fillingame, R. H. (2000a) Mutations in single hairpin units of genetically fused subunit *c* provide support for a rotary catalytic mechanism in F₁F₀ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 11355-11360

Jones, P. C., Hermolin, J., Jiang, W. und Fillingame, R. H. (2000b) Insights into the rotary catalytic mechanism of F₀F₁ ATP synthase from the cross-linking of subunits *b* and *c* in the *Escherichia coli* enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**: 31340-31346

Kaesler, B. und Schönheit, P. (1989) The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO₂ and 2 H₂ in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na⁺ translocation at a stoichiometry of 2-3 Na⁺/CO₂. *Eur. J. Biochem.* **184**: 223-232

Kaesler, B. und Schönheit, P. (1989) The sodium cycle in methanogenesis. CO₂ reduction to the formaldehyde level in methanogenic bacteria is driven a primary electrochemical potential of Na⁺ generated by formaldehyde reduction to CH₄. *Eur. J. Biochem.* **186**: 309-316

Kaibara, C., Matsui, T., Hisabori, T. und Yoshida, M. (1996) Structural asymmetry of F₁-ATPase caused by the γ subunit generates a high affinity nucleotide binding site. *J. Biol. Chem.* **271**: 2433-2438

Kakinuma, Y. (1987) Lowering of cytoplasmic pH is essential for growth of *Streptococcus faecalis* at high pH. *J. Bacteriol.* **169**: 4403-4405

Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1989) Sodium-translocating adenosine triphosphatase in *Streptococcus faecalis*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**: 679-692

Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1990) Some features of the *Streptococcus faecalis* Na⁺-ATPase resemble those of the vacuolar-type ATPases. *FEBS Lett.* **271**: 97-101.

Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1994) Purification and characterization of the catalytic moiety of vacuolar-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *J. Biochem. Tokyo* **116**: 1302-1308

Kakinuma, Y., Igarashi, K., Konishi, K. und Yamato, I. (1991) Primary structure of the α -subunit of vacuolar-type Na⁺-ATPase in *Enterococcus hirae* - amplification of a 1000-bp fragment by polymerase chain reaction. *FEBS Lett.* **292**: 64-68

Kakinuma, Y., Kakinuma, S., Takase, K., Konishi, K., Igarashi, K. und Yamato, I. (1993) A gene encoding the 16-kDa-proteolipid subunit of *Enterococcus hirae* Na⁺-ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 1063-1069

Kanazawa, H., Kayano, T., Kiyasu, T. und Futai, M. (1982) Nucleotide sequence of the genes for β and ϵ subunits of proton-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**: 1257-1264

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. und Kikuchi, H. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* **5**: 55-76

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

Klionsky, D. J., William, S. A., Brusilow, A. und Simoni, R. D. (1984) *In vivo* evidence for the role of the ϵ subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 1055-1060

Konishi, J., Wakagi, T., Oshima, T. und Yoshida, M. (1987) Purification and properties of the ATPase solubilized from membranes of an acidothermophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biochem. (Tokyo)* **102**: 1379-1387

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lai, S. P., Randall, S. K. und Sze, H. (1988) Peripheral and integral subunits of the tonoplast H^+ -ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* **263**: 16731-16737

Lemker, T. (1997) Untersuchungen zur Transkription und Verbreitung von ATPase-Genen in methanogenen Archaea. *Diplomarbeit, Georg-August-Universität, Göttingen*

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

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275

Lübber, M., Lünsdorf, H. und Schäfer, G. (1987) A plasma membrane ATPase of the thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification and immunological relationships to F₁-ATPases. *Eur. J. Biochem.* **167**: 211-219

Lübber, M. und Schäfer, G. (1989) Chemiosmotic energy conservation of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: oxidative phosphorylation and the presence of an F_O-related N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid. *J. Bacteriol.* **171**: 6106-6116

Lyons, L. B. und Zinder, N. D. (1972) The genetic map of the filamentous bacteriophage ϕ 1. *Virology* **49**: 45-60

Maloney, P. C. (1987) Coupling to an energized membrane: Role of ion-motive gradients in the transduction of metabolic energy. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. und Umberger, H.E., eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.

Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J. D., Pan, Y.-C. E., Nelson, H. und Nelson, N. (1988) cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 5521-5524

Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol* **3**: 208-218

McEnery, M. W., Hullihen, J. und Pedersen, P. L. (1989) F₀ "proton channel" of rat liver mitochondria. Rapid purification of a functional complex and a study of its interaction with the unique probe diethylstilbestrol. *J. Biol. Chem.* **264**: 12029-12036

McEnery, M. W. und Pedersen, P. L. (1986) Diethylstilbestrol, a novel type of F_O-directed probe of the mitochondrial proton ATPase. *J. Biol. Chem.* **261**: 1745-1752

Moriyama, Y. und Nelson, N. (1989) Cold inactivation of vacuolar proton-ATPases. *J. Biol. Chem.* **264**: 3577-3582

Müller, V. (1988) Der Na⁺-Kreislauf in *Methanosarcina barkeri*: Aufbau und Funktion eines transmembranen elektrochemischen Na⁺-Gradienten. *Doktorarbeit an der Georg-August-Universität zu Göttingen*

Müller, V., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1988a) The transmembrane electrochemical gradient of Na⁺ as driving force for methanol oxidation in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 601-606

Müller, V., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1993) Bioenergetics of methanogenesis. In: *Methanogenesis* (Ferry, J. G., ed.) Chapman & Hall, New York, U.S.A.

Müller, V., Blaut, M., Heise, R., Winner, C. und Gottschalk, G. (1990) Sodium bioenergetics in methanogens and acetogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 373-377

Müller, V., Ruppert, C. und Lemker, T. (1999) Structure and Function of the A₁A₀ ATPase from methanogenic archaea. *J. Bioenerg. Biomem.* **31**: 15-27

Müller, V., Winner, C. und Gottschalk, G. (1988b) Electron transport-driven sodium extrusion during methanogenesis from formaldehyde + H₂ by *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **178**: 519-525

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273

Nanba, T. und Mukohata, Y. (1987) A membrane-bound ATPase from *Halobacterium halobium*: purification and characterization. *J. Biochem.* **102**: 591-598

Nelson, H., Mandiyan, S. und Nelson, N. (1989) A conserved gene encoding the 57-kDa subunit of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **264**: 1775-1778

Nelson, H., Mandiyan, S. und Nelson, N. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* VMA7 gene encodes a 14-kDa subunit of the vacuolar H⁺-ATPase catalytic sector. *J. Biol. Chem.* **269**: 24150-24155

Nelson, H., Mandiyan, S. und Nelson, N. (1995) A bovine cDNA and a yeast gene (VMA8) encoding the subunit D of the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 497-501

Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ehardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. und DasSarma, S. (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 12176-12181

Nichols, N. N. und Harwood, C. S. (1997) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol* **179**: 5056-5061

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinosita, K. (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**: 299-302

Olendzenski, L., Hilario, E. und Gogarten, J. (1998) Horizontal gene transfer and fusing lines of descent: the Archaeobacteria - a chimera? In: *Horizontal gene transfer* (Syvanen, M. und Kado, C. I., eds.) Chapman & Hall, New York, U.S.A.

Pan, Y. X., Xu, J., Strasser, J. E., Howell, M. und Dean, G. E. (1991) Structure and expression of subunit A from the bovine chromaffin cell vacuolar ATPase. *FEBS Lett.* **293**: 89-92

Panke, O., Gumbiowski, K., Junge, W. und Engelbrecht, S. (2000) F-ATPase: specific observation of the rotating *c* subunit oligomer of EF₀EF₁. *FEBS Lett.* **472**: 34-38

Pedersen, P. L. und Amzel, L. M. (1993) ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J. Biol. Chem.* **268**: 9937-9940

Peinemann, S., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1989) ATP synthesis coupled to methane formation from methyl-CoM and H₂ catalyzed by vesicles of the methanogenic bacterial strain Gö1. *Eur. J. Biochem.* **186**: 175-180

Pfennig, G. N. und Lippert, K. D. (1966) Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* **55**: 245-256

Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P. und Cole, M. (1997) Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress Chaperones* **2**: 12-24

Radax, C., Sigurdsson, O., Hreggvidsson, G. O., Aichinger, N., Gruber, C., Kristjansson, J. K. und Stan-Lotter, H. (1998) F- and V-ATPases in the genus *Thermus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 12-22

Rahlfs, S. und Müller, V. (1997) Sequence of subunit *c* of the Na⁺-translocating F₁F₀ ATPase of *Acetobacterium woodii*: Proposal for determinants of Na⁺ specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS Lett.* **404**: 269-271

Rodgers, A. J. W. und Capaldi, R. A. (1998) The second stalk composed of the *b*- and δ -subunits connects F₀ to F₁ via an α -subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 29406-29410

Roth, R. und Bachofen, R. (1994) Characterization and partial purification of an ATPase and inorganic pyrophosphatase of the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1201**: 271-283

Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. und Müller, V. (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

Sabbert, D., Engelbrecht, S. und Junge, W. (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* **381**: 623-625

Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. und Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* **286**: 1722-1724

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

Schäfer, G., Engelhard, M. und Müller, V. (1999) Bioenergetics of the archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 570-620

Schäfer, G. und Meyering-Vos, M. (1992) F-Type or V-Type - The chimeric nature of the archaeobacterial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**: 232-235

Schägger, H., Cramer, W. A. und von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**: 220-230

Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 369-379

Scheel, E. und Schäfer, G. (1990) Chemiosmotic energy conservation and the membrane ATPase of *Methanobacterium tindarius*. *Eur. J. Biochem.* **187**: 727-735

Schmidt, K., Liaanen-Jensen, S. und Schlegel, H. G. (1963) Die Carotinoide der *Thiorodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **46**: 117-126

Schneider, D. L. (1987) The proton pump ATPase of lysosomes and related organelles of the vacuolar apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **895**: 1-10

Schobert, B. (1991) F₁-Like Properties of an ATPase from the archaeobacterium *Halobacterium saccharovorum*. *J. Biol. Chem.* **266**: 8008-8014

Schobert, B. und Lanyi, J. K. (1989) Hysteretic behavior of an ATPase from the archaeobacterium, *Halobacterium saccharovorum*. *J. Biol. Chem.* **264**: 12805-12812

Schönheit, P. und Beimborn, D. B. (1985) Presence of a Na⁺/H⁺ antiporter in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its role in Na⁺ dependent methanogenesis. *Arch. Microbiol.* **142**: 354-361

Senior, A. E. (1990) The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**: 7-41

She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. und van der Oost, J. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7835-7840

Shibui, H., Hamamoto, T., Yohda, M. und Kagawa, Y. (1997) The stabilizing residues and the functional domains in the hyperthermophilic V-ATPase of *Desulfurococcus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 341-345

Siegel, L. M. und Monty, K. J. (1966) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **112**: 346-362

Skakoon, E. N. und Dunn, S. D. (1993a) Location of conserved residue histidine-38 of the ϵ -subunit of *Escherichia coli* ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**: 272-278

Skakoon, E. N. und Dunn, S. D. (1993b) Orientation of the ϵ -subunit in *Escherichia coli* ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**: 279-284

Skulachev, V. P. (1994) Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**: 271-284

Smigan, P., Horovska, L. und Greksak, M. (1988) Na^+ -driven ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* can be modulated with sodium ion concentrations in the growth medium. *FEBS Lett.* **242**: 85-88

Smigan, P., Majernik, A. und Greksak, M. (1994) Na^+ -driven ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its differentiation from H^+ -driven ATP synthesis by rhodamine 6G. *FEBS Lett.* **347**: 190-194

Smigan, P., Majernik, A., Polak, P., Hapala, I. und Greksak, M. (1995) The presence of H⁺ and Na⁺-translocating ATPases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and their possible function under alkaline conditions. *FEBS Lett.* **371**: 119-122

Smigan, P., Rusnak, P., Greksak, M., Zhilina, T. N. und Zavarzin, G. A. (1992) Mode of sodium ion action on methanogenesis and ATPase of the moderate halophilic methanogenic bacterium *Methanohalophilus halophilus*. *FEBS Lett.* **300**: 193-196

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

Steinert, K. und Bickel-Sandkötter, S. (1996) Isolation, characterization, and substrate specificity of the plasma membrane ATPase of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Z. Naturforsch. C* **51**: 29-39

Steinert, K., Kroth-Pancic, P. G. und Bickel-Sandkötter, S. (1995) Nucleotide sequence of the ATPase A- and B-subunits of the halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii* and characterization of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1249**: 137-144

Steinert, K., Wagner, V., Kroth-Pancic, P. G. und Bickel-Sandkötter, S. (1997) Characterization and subunit structure of the ATP synthase of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and organization of the ATP synthase genes. *J. Biol. Chem.* **272**: 6261-6269

Stevens, T. H. und Forgac, M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**: 779-808

Stock, D., Leslie, A. G. und Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700-1705

Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130

Sumi, M., Sato, M. H., Denda, K., Date, T. und Yoshida, M. (1992) A DNA fragment homologous to F₁ ATPase β subunit was amplified from genomic DNA of *Methanosarcina barkeri* - indication of an archaeobacterial F-Type ATPase. *FEBS Lett.* **314**: 207-210

Sumi, M., Yohda, M., Koga, Y. und Yoshida, M. (1997) F₀F₁-ATPase genes from an archaeobacterium, *Methanosarcina barkeri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 427-433

Svergun, D. I., Aldag, I., Sieck, T., Altendorf, K., Koch, M. H., Kane, D. J., Kozin, M. B. und Grüber, G. (1998a) 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

Svergun, D. I., Konrad, S., Huss, M., Koch, M. H., Wiczorek, H., Altendorf, K., Volkov, V. V. und Grüber, G. (1998b) Quaternary structure of V₁ and F₁ ATPase: significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* **37**: 17659-17663

Tabor, S. (1990) Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. 16.2.1.-16.2.11, In: *Current protocols in molecular biology* (Ausubel, A. F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. , and Struhl, K., eds.) Green publishing and Wiley-Interscience, New York, U.S.A.

Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 1074-1078

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

Takase, K., Yamato, I. und Kakinuma, Y. (1993) Cloning and sequencing of the genes coding for the A-subunit and B-subunit of vacuolar-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae* - coexistence of vacuolar-type and F₀F₁-type ATPases in one bacterial cell. *J. Biol. Chem.* **268**: 11610-11616

Tang, C. L. und Capaldi, R. A. (1996) Characterization of the interface between gamma and ϵ subunits of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**: 3018-3024

Thauer, R. K., Hedderich, R. und Fischer, R. (1993) Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. In: *Methanogenesis* (Ferry, J. G., ed.) Chapman & Hall, New York, U.S.A.

Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr., Yoshida, M. und Capaldi, R. A. (2000) Observations of rotation within the F₀F₁-ATP synthase: deciding between rotation of the F₀ c subunit ring and artifact. *FEBS Lett.* **470**: 244-248

Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Yoshida, M. und Capaldi, R. A. (2001) Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₁F₀ ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 898-902

Ubbink-Kok, T., Boekema, E. J., van Breemen, J. F. L., Brisson, A., Konings, W. N. und Lolkema, J. S. (2000) Stator structure and subunit composition of the V₁V₀ Na⁺-ATPase of the thermophilic bacterium *Caloramator fervidus*. *J. Mol. Biol.* **296**: 311-321

Valiyaveetil, F. I. und Fillingame, R. H. (1998) Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 16241-16247

Van Hille, B., Vanek, M., Richener, H., Green, J. R. und Bilbe, G. (1993) Cloning and tissue distribution of subunit C, subunit D, and subunit E of the human vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 15-21

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 615-619.

Walker, J. E. und Gay, N. J. (1983) Analysis of *Escherichia coli* ATP synthase subunits by DNA and protein sequencing. *Methods Enzymol.* **97**: 195-218

Walker, J. E., Saraste, M. und Gay, N. J. (1984) The *unc* operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **768**: 164-200

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. und Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951

Waser, M., Hess-Bienz, D., Davies, K. und Solioz, M. (1992) Cloning and disruption of a putative Na⁺/H⁺-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 5396-5400

Weber, J. und Senior, A. E. (1997) Catalytic mechanism of F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1319**: 19-58

Weber, J. und Senior, A. E. (2000) ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1458**: 300-309

Weber, K. und Osborn, M. (1969) The reliability of the molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412

Wilkins, S. und Capaldi, R. A. (1998a) ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* **393**: 29

Wilkins, S. und Capaldi, R. A. (1998b) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochem. Biophys. Acta* **1365**: 93-97

Wilkins, S., Vasilyeva, E. und Forgac, M. (1999) Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **274**: 31804-31810

Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F. und Müller, V. (1996) Subunit structure and organization of the genes of the A₁A₀ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Go1. *J. Biol. Chem.* **271**: 18843-18852

Winner, C. und Gottschalk, G. (1989) H₂ and CO₂ production from methanol and formaldehyde by the methanogenic bacterium strain Gö1 treated with 2-bromoethansulfonic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 259-264

Winstedt, L., Frankenberg, L., Hederstedt, L. und von Wachenfeldt, C. (2000) *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome *bd*-type respiratory oxidase. *J. Bacteriol.* **182**: 3863-3866

Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Motojima, F. und Yoshida, M. (1997) Rotation of the γ subunit in F_1 -ATPase; evidence that ATP synthase is a rotary motor enzyme. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 207-209

Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr. und Yoshida, M. (1998) F_1 -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* **93**: 1117-1124

Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M. und Ohkuma, S. (1998) V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.* **273**: 20504-20510

Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, T., Wakabayashi, T. und Yoshida, M. (2000) V-Type H^+ -ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* **275**: 13955-13961

Yokoyama, K., Oshima, T. und Yoshida, M. (1990) *Thermus thermophilus* membrane-associated ATPase - indication of a eubacterial V-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**: 21946-21950

Zhang, J., Myers, M. und Forgac, M. (1992) Characterization of the V_O domain of the coated vesicle H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 9773-9778

Zhou, Y., Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Hutcheon, M. L. und Cross, R. L. (1996) ATP hydrolysis by membrane-bound *Escherichia coli* F_0F_1 causes rotation of the γ subunit relative to the β subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* **1275**: 96-100

Zhou, Y. T., Duncan, T. M. und Cross, R. L. (1997) Subunit rotation in *Escherichia coli* F_0F_1 -ATP synthase during oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 10583-10587

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Volker Müller für die Anregung zu diesem Thema, sein Interesse am Fortgang der Untersuchungen, die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und die Möglichkeit zu einem selbständigen Arbeiten. Weiterhin möchte ich ihm dafür danken, dass ich an mehreren nationalen und internationalen Tagungen teilnehmen konnte.

Herrn Dr. G. Grüber und Ünal Coskun (Universität des Saarlandes, Homburg) danke ich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und strukturellen Analysen der A₁-ATPase.

Herrn Dr. R. Schmidt danke ich für die Bestimmung der N-terminalen Sequenzen der A₁-ATPase-Untereinheiten.

Bei den „Alt-Göttingern“ Claudia, Smurf und Sascha bedanke ich mich für den stets vorhandenen guten Teamgeist. Das ist halt die alte Göttinger-Garde.

Den Diplomanden, Neu-Doktoranden und Ehemaligen des Müller'schen Labors (in alphabetical order: Andi - the Dark Lord, Andi - the Body, Anja, Astrid, Bärbel, Christiane, Frank, Holger, Iris, Kathi, Knulli, Konsti, Nadine, Petra, Sabine und Volker) danke ich für die gute Zusammenarbeit, interessanten Diskussionen und das angenehme Labor-Klima.

Unseren guten Laborgeistern Babsi, Brigitte, Heidi und Heike danke ich für die tatkräftigen Unterstützungen bei den täglichen Labortätigkeiten. TAs sind die Besten!

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik und Mikrobiologie (jetzt „Bereich: Genetik und Mikrobiologie des Department 1 der Fakultät für Biologie“) die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Werkstatt-Crew. Kein Gerät, das diese Zauberer nicht zu reparieren oder gar herzustellen vermochten!

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an Eva für die vielen wertvollen Hilfen, das geduldige Ertragen meiner Launen und eigenwilligen Ordnungsstrategien, sowie der so wichtigen Unterstützung im Leben außerhalb des Labors!

Schließlich möchte ich mich noch einmal ganz besonders bei meinen Eltern für ihre stets präsente Unterstützung danken, ohne die der Weg zum Ziel um ein Vielfaches schwerer gewesen wäre.

Danke!