

**Untersuchung der  
Strukturdynamik arbeitender  $F_1$ -ATPase  
und ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus***

in Einzelschuß-Experimenten  
mit Synchrotronstrahlung

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
am Fachbereich Chemie und Pharmazie der  
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Iris Lauer**  
geboren in Bad Kreuznach

Mainz 2001

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ATP-Synthasen.....	1
1.2	Strukturelle Aufbau der ATP-Synthasen, Nukleotid-Bindungsstellen und Ihre Kooperativität .....	2
1.2.1	Hinweis auf einen Rotationsmechanismus innerhalb der F <sub>1</sub> -ATPase .....	4
1.2.2	Der Protonentransport durch den F <sub>0</sub> -Teil der ATP-Synthasen induziert die Rotation.....	5
1.3	Stand der Vorarbeiten.....	8
1.3.1	Regulation der F <sub>1</sub> -ATPase und ATP-Synthase bei <i>Micrococcus luteus</i> .....	8
1.3.2	Synchronisation.....	9
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	12
<b>2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>13</b>
2.1	Enzympräparationen.....	13
2.1.1	Zucht von <i>Micrococcus luteus</i> ATTC 4698.....	13
2.1.2	Präparation der ATP-Synthase aus <i>Micrococcus luteus</i> ATTC 4698 .....	13
2.1.2.1	Präparation der Protoplasten-Membranfragmente	14
2.1.2.2	Vorextraktion der Membranen und Solubilisierung der ATP-Synthase	14
2.1.2.3	HPLC-Reinigung der ATP-Synthase am Tentakel-Ionenaustauscher	15
2.1.3	Biotechnologische Präparation der F <sub>1</sub> ATPase .....	16
2.1.3.1	Abbau der Zellwand mit Lysozym, Lyse der Zellen durch osmotischen Schock, DNase-Behandlung und Waschen der Protoplastenmembranen mit Mg-freiem Puffer	17
2.1.3.2	Extraktion der F <sub>1</sub> ATPase	17
2.1.3.3	Vorreinigung der F <sub>1</sub> ATPase durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällungen	17
2.1.3.4	24% Polyethylenglykol(PEG)-Fällung und Delipidisierung der F <sub>1</sub> ATPase	18
2.1.3.5	HPLC-Reinigung der F <sub>1</sub> ATPase	18
2.1.3.6	80% -ige Ammoniumsulfatfällung:	18

---

<b>2.2</b>	<b>ATP-Hydrolyseaktivität .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Proteinbestimmung.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Glycin-SDS-Gelelektrophorese.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Präparation von Liposomen .....</b>	<b>19</b>
2.5.1	Präparation von small unilamellar vesicles (SUV) .....	19
2.5.2	Präparation von Koeinbauliposomen .....	20
<b>2.6</b>	<b>ATP-Syntheseaktivität.....</b>	<b>20</b>
<b>2.7</b>	<b>Kleinwinkelstreuung.....</b>	<b>21</b>
2.7.1	Allgemeine Theorie.....	21
2.7.1.1	Bestimmung von Partikelparametern .....	22
2.7.2	Besonderheiten der Neutronenkleinwinkelstreuung.....	24
2.7.3	Statische Röntgenkleinwinkelstreuung .....	26
2.7.3.1	Aufbau der JUSIFA-Anlage .....	26
2.7.3.2	Durchführung der SAXS-Messungen .....	28
2.7.3.3	Probenmessungen .....	28
2.7.3.4	Auswertung und Datenanalyse .....	30
2.7.3.5	Zusammensetzung der Meßbereiche .....	34
<b>2.8</b>	<b>Zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung .....</b>	<b>36</b>
2.8.1	Aufbau der ID2-Kleinwinkelstreuanlage am ESRF in Grenoble .....	36
2.8.2	Durchführung der zeitaufgelösten SAXS-Messungen und Aufbau der Probenumgebung.....	38
2.8.3	Probenmessungen .....	40
2.8.4	Auswertung und Datenanalyse .....	41
<b>2.9</b>	<b>Statische Neutronenkleinwinkelstreuung .....</b>	<b>43</b>
<b>2.10</b>	<b>Modellberechnungen .....</b>	<b>44</b>
<b>2.11</b>	<b>Material.....</b>	<b>44</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Enzympräparationen aus dem Bakterium <i>Micrococcus luteus</i> .....</b>	<b>45</b>
3.1.1	Reinigung der F <sub>1</sub> -ATPase.....	45
3.1.2	UV-Absorptionsspektrum und Nukleotidgehalt der reinen F <sub>1</sub> -ATPase .....	45
3.1.3	Reinigung der ATP-Synthase.....	46
3.1.4	UV-Absorptionsspektrum und Nukleotidgehalt der reinen ATP-Synthase .....	48
<b>3.2</b>	<b>Enzymatische Untersuchungen .....</b>	<b>50</b>
3.2.1	ATP-Hydrolyseaktivität der F <sub>1</sub> -ATPase.....	50
3.2.2	Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Hydrolyseaktivität der F <sub>1</sub> -ATPase .....	51
3.2.3	ATP-Hydrolyseaktivität der ATP-Synthase.....	52
3.2.4	Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Hydrolyseaktivität der ATP-Synthase.....	53
3.2.5	Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Syntheseaktivität der ATP-Synthase.....	54
<b>3.3</b>	<b>Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase und ihres F<sub>1</sub>-Fragmentes .....</b>	<b>56</b>
3.3.1	Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der F <sub>1</sub> -ATPase.....	56
3.3.2	Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase.....	58
3.3.3	Statische Neutronenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase.....	59
3.3.4	Einfluß von Inhibitoren auf die Struktur der ATP-Synthase und ihres F <sub>1</sub> -Fragments .....	60
3.3.4.1	Einfluß von Azid auf die Struktur der F <sub>1</sub> -ATPase	61
3.3.4.2	Einfluß von Azid auf die Struktur der ATP-Synthase	62
<b>3.4</b>	<b>Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase und ATP-Synthase aus <i>Micrococcus luteus</i>.....</b>	<b>65</b>

3.4.1	Strukturmodelle der F <sub>1</sub> -ATPase .....	65
3.4.2	Strukturmodelle der ATP-Synthase.....	69
<b>3.5</b>	<b>Zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung .....</b>	<b>72</b>
3.5.1	Zeitauflösende Streuexperimente an ATP-Synthase und F <sub>1</sub> -ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei tiefer Temperatur.....	72
3.5.2	Experimentelle Probleme und Lösungen .....	76
3.5.3	Ergebnisse der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung zum Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die F <sub>1</sub> -ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> .....	81
3.5.3.1	Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die F <sub>1</sub> -ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei einer Temperatur von 20°C .....	81
3.5.3.2	Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die F <sub>1</sub> -ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei einer Temperatur von 15°C .....	87
3.5.4	Modellierung der Struktur- und Dynamik der F <sub>1</sub> -ATPase .....	90
3.5.5	Ergebnisse der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung zum Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei 20°C .....	96
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>99</b>
4.1	<b>Enzympräparation und Charakterisierung der ATP-Synthasen.....</b>	<b>99</b>
4.2	<b>Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthasen aus <i>Micrococcus luteus</i> .....</b>	<b>100</b>
4.2.1	Statische Röntgenkleinwinkelstreuung und Modellierung der F <sub>1</sub> -ATPase.....	100
4.2.2	Statische Kleinwinkelstreuung und Modellierung der ATP-Synthase.....	101
4.3	<b>Einfluß des Inhibitors Azid auf die Struktur und Funktion der ATP-Synthase und F<sub>1</sub>-ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> .....</b>	<b>103</b>
4.3.1	Einfluß von Azid auf die F <sub>1</sub> -ATPase .....	103
4.3.2	Einfluß von Azid auf die Funktion und Struktur der ATP-Synthase .....	106
4.4	<b>Zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung .....</b>	<b>108</b>

4.4.1	Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei einer Temperatur von 20°C.....	112
4.4.2	Modellierung der Struktur­dynamik der $F_1$ -ATPase im Reaktionszyklus.....	113
4.4.3	Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei einer Temperatur von 15°C.....	116
4.4.4	Ergebnisse der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung zum Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase aus <i>Micrococcus luteus</i> bei 20°C .....	117
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>121</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>VI</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
BCA	Bicinchonic Acid
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CaATP (5:1)	Ca <sup>2+</sup> -ATP-Komplex im molaren Verhältnis 5:1
CHAPS	3-[(3-Cholamidpropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonsäure
DEAE	Diethylaminoethyl-Gruppe
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DFP	Diisopropylflourophosphat
DMAE	Dimethylaminoethyl-Gruppe
DNase	Desoxyribonuklease
DORIS	Doppelringspeicher
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
F <sub>1</sub> ; F <sub>1</sub> -ATPase	F <sub>1</sub> -Teil der ATP-Synthase
F <sub>0</sub>	F <sub>0</sub> -Teil der ATP-Synthase
F <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	ATP-Synthase
FPLC	Mitteldruckchromatographie (Handelsname der Firma Pharmacia)
FVM	Finite Volumen Methode
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat

---

HASYLAB	Hamburger-Synchrotronstrahlungslabor
HCl	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
mBR	monomeres Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium halobium</i>
MgATP (1:1)	Mg <sup>2+</sup> -ATP-Komplex im molaren Verhältnis 1:1
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NaAc	Natriumacetat
PEG	Polyethylenglycol
SDS	Natriumdodecylsulfat
SBL	Sojabohnenlipid
TCA	Trichloressigsäure
TDOC	Taurodeoxycholol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 ATP-Synthasen

ATP-Synthasen besitzen eine Schlüsselrolle im Energiehaushalt aller Zellen. Dieser große, membranständige Proteinkomplex (500000 Masse) ist eine reversibel arbeitende Maschine. Das Protein nutzt eine durch oxidative Phosphorylierung (Atmung) oder Photosynthese entstehende elektrochemische Protonenpotentialdifferenz der biologischen Membran aus, um aus ADP und Phosphat das energiespeichernde Molekül ATP zu synthetisieren. Im Energiezyklus der Zelle wird ATP hydrolysiert und die dabei freiwerdende Energie wird zur Biosynthese von Proteinen, der Muskelkontraktion oder Gehirnfunktion zur Verfügung gestellt. Ferner kann das Enzym beim umgekehrten Prozeß zur ATP-Synthese, der Hydrolyse von ATP, Protonen wieder in die entgegengesetzte Richtung pumpen [1,2].

Abhängig vom Zelltyp treten unterschiedliche ATPase-Formen auf, die mit dem ATP-Synthase-Komplex, einer F-Typ-ATPase ( $F_0F_1$ ), im Energiezyklus der Zellen wechselwirken [3]. ATP-Synthasen sind in der Plasmamembran von Prokaryonten, in der inneren Mitochondrienmembran von Tierzellen, in der Thylakoidmembran von Chloroplasten und in der mitochondrialen inneren Membran von Pflanzen lokalisiert [4].

Die Energie zur Synthese von ATP aus ADP und Phosphat wird durch die elektrochemische Protonenpotentialdifferenz der Membran (proton motive force,  $\Delta p$ ) [5] oder einer Natrium-Potentialdifferenz ( $\Delta p_{Na}$ ) [6], abhängig von der Spezies, erzeugt. Das elektrochemische Potential ergibt sich aus der elektrischen Membrankomponente ( $\Delta\psi$ ) und der pH-Differenz ( $\Delta pH$ ) [7] (Gl. 1.1).

$$\Delta p = \Delta\psi - 2.3 \cdot RT \cdot \Delta pH / F$$

$$= \Delta\mu_{H^+} / F$$

R = Gaskonstante

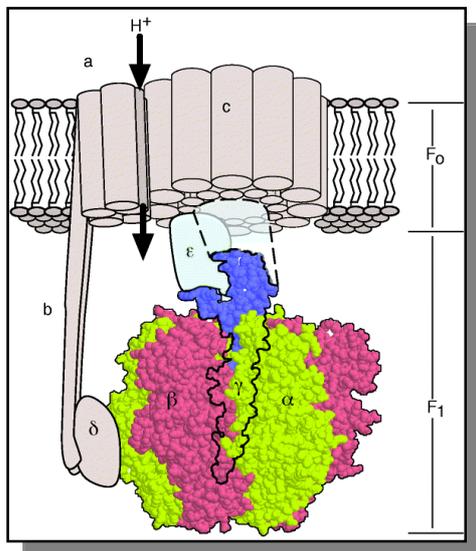
F = Faradaykonstante

T = Temperatur

$\Delta\mu_{H^+}$  = transmembrane Potentialdifferenz (Gl. 1.1)

## 1.2 Strukturelle Aufbau der ATP-Synthasen, Nukleotid-Bindungsstellen und Ihre Kooperativität

ATP-Synthasen bestehen aus zwei Subkomplexen, einem membranständigen, protonen-transportierenden  $F_0$ -Teil und einem peripheren  $F_1$ -Fragment, das 3 katalytische und 3 nicht-katalytische Nukleotidbindungsstellen besitzt. Der bakterielle Enzymkomplex setzt sich aus 8 verschiedenen Untereinheitentypen zusammen, fünf davon bilden den  $F_1$ -Teil ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) und 3 Untereinheiten den  $F_0$ -Teil (a,  $b_2$ ,  $c_{9-12}$ ) [2,8]. Das Enzym aus Mitochondrien ist ähnlich aufgebaut, nur etwas komplexer [9,10]. Elektronenmikroskopische Studien zeigen, daß beide Komplexe durch einen circa 45 Å langen Stiel, bestehend aus 2 parallelen Strukturen miteinander verbunden sind (E.coli [11], Chloroplasten [12] und Mitochondrien [13]). Im Enzym aus *Escherichia coli* wird der



**Abbildung 1: Struktur der ATP-Synthase aus *E. coli* nach Wang und Oster [37]**

zentrale Stiel von der  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit gebildet, wobei der periphere Stiel sich aus der  $\delta$ - und  $b$ -Untereinheit zusammensetzt [14](Abb.1).

Die Strukturen der isolierten  $\epsilon$ -Untereinheit [15,16] und eines Fragments der  $\delta$ -Untereinheit [17] aus *E. coli* wurden ermittelt. Das helikale  $b$ -Untereinheiten-Dimer verbindet die  $a$ -Untereinheit des  $F_0$ -Teils mit der  $\delta$ -Untereinheit (äquivalent zur Rinder-OSCP-Untereinheit [18]) und mit einer  $\alpha$ -Untereinheit des  $F_1$ -Teils der ATP-Synthase [19-21]. Der Ring aus  $c$ -Untereinheiten ist mit der  $a$ -Untereinheit in Kontakt [22]. Weiterhin ist der  $c$ -Ring mit der  $\gamma$ -Untereinheit direkt verbunden [23] und indirekt durch den beidseitigen Kontakt mit der  $\epsilon$ -Untereinheit [24] (äquivalent zur Rinder- $\delta$ -Untereinheit

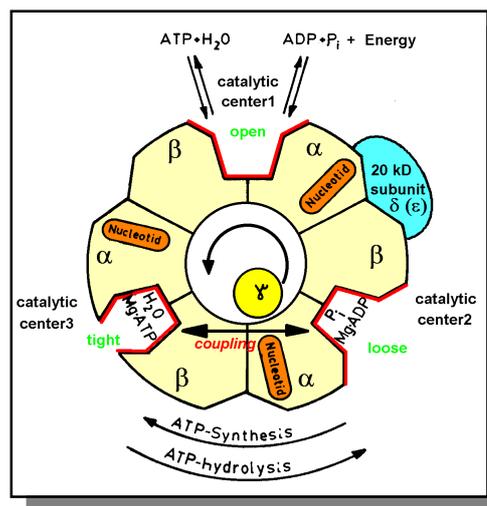
[18]). Die präzise Lokalisation und Funktion dieser Untereinheiten in ATP-Synthasen ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die nahezu kugelförmige  **$F_1$ -Domäne** kann von der Membran abgelöst und in wässriger Lösung untersucht werden. Die isolierte  $F_1$ -Domäne wird  $F_1$ -ATPase genannt und ist nur zur Hydrolyse von ATP in der Lage [25]. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind homolog, beide können Nukleotide binden, aber nur die  $\beta$ -Untereinheiten besitzen katalytische Aktivität. Es existieren nach dem Bindungs-Wechsel-Mechanismus von Paul Boyer [26] im Reaktionszyklus drei aktive Nukleotidbindungsta-

schen der  $\beta$ -Untereinheiten, wobei jede einzelne zyklusartig 3 verschiedene Zustände „open“, „loose“ und „tight“ durchläuft (Abb.2).

Dies entspricht einer leeren Bindungstasche, einem Zustand mit gebundenen ADP und Phosphat und einem Zustand mit locker gebundenen ATP, wobei zu jedem gegebenen Zeitpunkt jede Bindungstasche in einem anderen Zustand vorliegt. Es existiert eine funktionelle Kooperation untereinander, d.h. die lockere Bindung von ADP und Phosphat an einer Bindungstasche koppelt den Auslaß von ATP an der zweiten Bindungstasche. Boyer schlägt vor, daß die Reaktionen im  $F_1$ - und  $F_0$ -Teil der ATP-Synthase durch eine gemeinsame Achse miteinander gekoppelt werden. Der Protonenfluß durch den  $F_0$ -Teil läßt eine Achse rotieren, die daraufhin Konformationsänderungen in der  $F_1$ -Untereinheit, erkennbar auch anhand der unterschiedlichen Nukleotidbindungsaffinitäten, hervorruft. Die ATP-Hydrolyse jedoch bewirkt die Rotation des Schafts und den Fluß der Protonen in die entgegengesetzte Richtung.

Fünf Jahre nach dieser Hypothese von Paul Boyer wurde die Kristallstruktur eines großen Teils der Rinderherz- $F_1$ ATPase aus Mitochondrien von John Walker's Gruppe gelöst [27]. Nicht aufgelöst wurden die  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit und ein Teil der  $\gamma$ -Untereinheit (Abb.1). Durch die Existenz der zentralen  $\gamma$ -Untereinheit zeigt sich eine Asymmetrie des Enzyms, die den vorgeschlagenen Mechanismus von Boyer unterstützt und vermuten läßt, daß das Enzym unter Einbeziehung eines Rotationsmechanismus arbeitet. In der atomaren Kristallstruktur der  $F_1$ -ATPase sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten alternierend um die einzelne  $\gamma$ -Untereinheit, die aus zwei verdrillten, antiparallelen  $\alpha$ -Helices besteht, angeordnet. Bei der ATP-Synthese und bei dem dazu umgekehrten Prozeß, der ATP-Hydrolyse sind die katalytischen Bindungsstellen in den  $\beta$ -Untereinheiten an der Kontaktfläche zwischen den  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten lokalisiert. In der kristallinen, inhibierten Form des Enzyms ist eine der drei katalytischen Bindungstaschen leer, eine mit ADP und Phosphat und die dritte mit dem nicht-hydrolysierbaren AMP-PNP, einem ATP-Analogen, besetzt. Obwohl die Struktur nur eine einzelne



**Abbildung 2: Schematische Abbildung des Bindungswechsel-Mechanismus nach Boyer [1]**

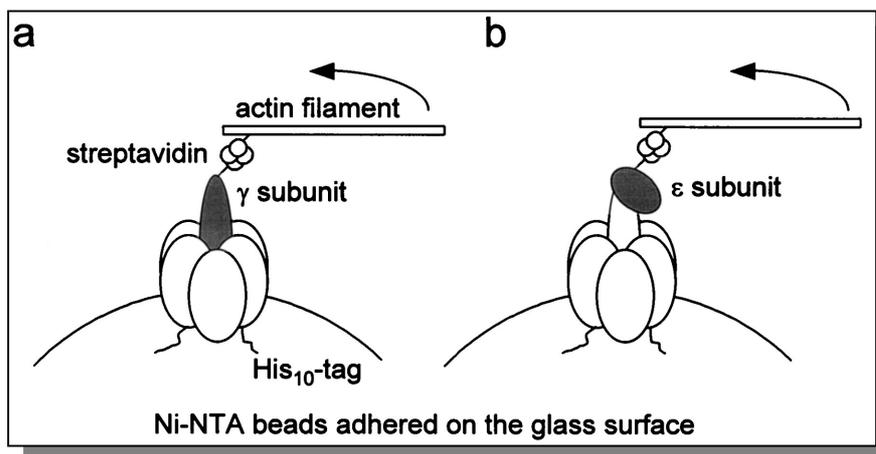
Angewendet für die  $F_1$ -ATPase aus *E. coli* mit der 20 kDa Untereinheit  $\delta$  ( $\epsilon$ -Untereinheit bei *Micrococcus luteus*)

statische Situation des inhibierten Enzyms darstellt, ist dies vermutlich ein Schnappschuß innerhalb des Rotationsmechanismus während der Katalyse und liefert wichtige Informationen auf atomarer Ebene.

Die Kontaktstellen zwischen der zentralen  $\gamma$ -Untereinheit und der  $\beta$ -Untereinheiten sind wichtige Faktoren bei der Entwicklung des Rotationsmodells. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind aus 3 verschiedenen Domänenstrukturen aufgebaut [28,29]. Ihre  $\text{NH}_2$ -terminale Domäne besteht aus  $\beta$ -Faltblättern, die das  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer zusammenhalten, wobei die Nukleotid-Bindungsstellen zwischen den beiden anderen Domänen liegen. Die zentrale  $\alpha$ -helicale  $\gamma$ -Untereinheit tritt mit der COOH-terminalen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit in Wechselwirkung. Bei der Rotation krümmt sich das Rückgrat der  $\gamma$ -Untereinheit in der Weise, daß ein Open- oder Closed-Übergang der Bindungstasche der  $\beta$ -Untereinheit entsteht, welche die Bindung der Substrate und den Auslaß des Produktes erleichtert.

### 1.2.1 Hinweis auf einen Rotationsmechanismus innerhalb der $F_1$ -ATPase

Chemische Crosslinking-Experimente zwischen der  $\gamma$ - und  $\beta$ -Untereinheiten [30,31] und spezielle Fluoreszenztechniken [32] ergaben einen starken Hinweis auf die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit innerhalb des  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers. Endgültig akzeptiert wurde der postulierte Rotationsmechanismus während der enzymatischen Katalyse im Jahre 1997, als Noji et al. [33,34,35] die Rotation auf direktem Wege zeigen konnte (Abb.3).



**Abbildung 3: Experimentelles System zur Beobachtung der Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit (a) und der  $\epsilon$ -Untereinheit (b) innerhalb der  $F_1$ -ATPase**

Dazu banden sie an der  $\gamma$ -Untereinheit der  $F_1$ ATPase, deren  $\beta$ -Untereinheiten auf einer nickelbeschichteten Oberfläche fixiert wurden, ein fluoreszierend markiertes Aktinfilament. Die Rotation des 1-3  $\mu\text{m}$  langen Aktinfilaments bei Zugabe von Substrat, ATP, gegen den Uhrzeigersinn wurde

mit einem Fluoreszenzmikroskop direkt nachgewiesen (Film). Die Rotationsrate betrug jedoch nur 1/5 der Rate des voll aktiven Enzyms, das mit der Länge des Aktinfilaments innerhalb des viskosen Mediums und mit der Abwesenheit der  $\delta$ - und  $\varepsilon$ -Untereinheit zusammenhängt. Die Rotation erfolgte in 120°-Schritten. Die nur in eine Richtung stattfindende Rotation ist ein Hinweis auf eine intrinsische Eigenschaft des  $F_1$ -Teils und wird auf den Bindungs-Wechsel-Mechanismus zurückgeführt.

Das mechanisch-chemische Verhalten des ATPase-Motors wurde von George Oster [36,37] modelliert. Dabei wurden hydrodynamische, mechanische und strukturelle Eigenschaften berücksichtigt. Diese Simulation stimmt mit den experimentellen Befunden von Noji überein und unterstützt die Effektivität des Motors. Das vorgeschlagene Drehmoment beweist, daß der Motor mit fast 100 %iger Effizienz arbeitet. Oster's Modell schlägt vor, daß die ATPase nicht wie ein Verbrennungsmotor arbeitet, sondern daß die Energie der Nukleotidbindung in elastische Energie umwandelt wird. Diese Energie, welche die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit bewirkt, ist innerhalb einer mechanischen Feder gespeichert, die sich als Scharnier zwischen den beiden bewegenden Lappen der  $\beta$ -Untereinheit befindet [37].

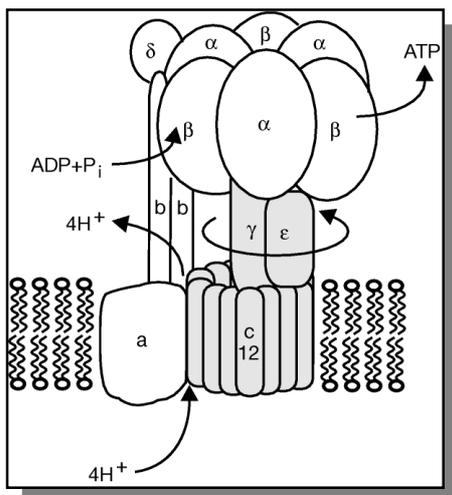
### 1.2.2 Der Protonentransport durch den $F_0$ -Teil der ATP-Synthasen induziert die Rotation

Die Struktur der cytosolischen  $F_1$ -ATPase und der Grundmechanismus der ATP-Hydrolyse durch die  $F_1$ -ATPase wurde gut untersucht. Wie jedoch die Konformationsänderungen in den katalytischen Bindungstaschen des  $F_1$ -Teils durch den Protonentransport über den transmembranen  $F_0$ -Teil der ATP-Synthasen hervorgerufen werden, ist noch weitgehend ungelöst.

Für den  $F_0$ -Teil der ATP-Synthasen existieren erst seit kurzem strukturelle Informationen. Crosslinking- und genetische Experimente [38,39], sowie evolutionäre Argumente [40] wurden so interpretiert, daß 12 c-Untereinheiten pro  $F_0$ -Teil der ATP-Synthase aus *E. coli* existieren. In Mitochondrien aus Hefe [41] fand man jedoch nur 10-c-Untereinheiten pro  $F_0$ -Teil, während die ATP-Synthase aus Chloroplasten [42] 14 Untereinheiten aufwies. Man spricht in diesem Zusammenhang von 3 verschiedenen Klassen - low, medium und high -gear. Durch biologische Studien und Mutationen in Bakterien [43,44] wurde bekannt, daß beide Untereinheiten a und c funktionelle Gruppen besitzen, die essentiell für den Protonentransport sind. Die Struktur eines c-Monomers von *E.coli* (NMR-Analyse) zeigt, daß das Protein aus 2  $\alpha$ -Helices besteht, die durch eine außerhalb der Membran liegende Schleife miteinander verbunden sind [45]. Die COOH-terminale  $\alpha$ -Helices enthält eine konservierte Aminosäure (Asp<sup>61</sup> in *E. coli*), die essentiell für den Protonentransport ist [43]. In Model-

len wird vorgeschlagen, daß die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten außerhalb einer multimeren Ringstruktur aus  $c$ -Untereinheiten innerhalb der Membran liegen, wobei der Weg für den Protonentransport sich an der Kontaktfläche zwischen den  $\alpha$ - und  $c$ -Untereinheiten befindet [22,46-49]. Protonierung und Deprotonierung an dieser Kontaktfläche wird als Teil des Mechanismus für die Konformationsänderungen im  $F_1$ -Teil vorgeschlagen [50]. Möglicherweise erfolgt dies durch die Rotation des  $c$ -Untereinheiten-Rings [51,52], dessen Existenz durch die Kristallstruktur der ATP-Synthase nach D. Stock [41] unterstützt wird (Abb.4).

Da die Bildung von jedem ATP die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit um  $120^\circ$  verlangt, muß eine Verbindung zwischen der Anzahl der Protonen, die pro synthetisiertem ATP transportiert werden müssen (3 oder 4 Protonen in verschiedenen Spezies [4,53]), und der Anzahl der  $c$ -Untereinheiten im Ring bestehen. Die Rotation von  $\gamma$  um  $120^\circ$  könnte entweder mit 9  $c$ -Untereinheiten im Ring und 3 transportierte Protonen oder mit 12  $c$ -Untereinheiten und 4 transportierte Protonen in Einklang gebracht werden [10]. Weiterhin ist ein peripherer „Stator“ notwendig, der das  $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer fixiert,



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau der ATP-Synthase aus *E. coli* [50]**

Untereinheiten, die in weiß dargestellt sind, werden durch die Membran fixiert, diejenigen in grau rotieren während der Katalyse als Einheit um die fixierten Untereinheiten

um die Rotation von  $\gamma$  im Inneren des Moleküls zu verfolgen [10]. Verschiedene Studien wie Rekonstitutions- und Crosslinking-Experimente [54,55] weisen darauf hin, daß die  $b$ -Untereinheiten von  $F_0$  ein Teil dieses Stators sind.

Das Rotationsmodell von Wang und Oster [26,27] schlägt die Untereinheiten  $a$ ,  $b$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  als STATOR (weiß) und die Untereinheiten  $c$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  als ROTOR (grau) vor. Durch die Protonenbewegung an der Kontaktfläche zwischen  $a$  und dem  $c$ -Untereinheiten-Oligomer kommt es zu einem Drehmoment, wobei Stator und Rotor sich in entgegengesetzte Richtungen bewegen (Abb.4).

In verschiedenen Studien [33,36,51,56] wurde bestätigt, daß die  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit (Abb.3) Teil des Rotors sind. Nun konnte mit Hilfe der selben Methode, wie bei der Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit, ein fluoreszierendes Aktinfilament, gebunden an einer  $c$ -Untereinheit, die mechanische Rotation des  $c$ -Untereinheiten-Oligomers in ATP-Synthase bei Zugabe von ATP direkt nachgewiesen werden [57,58]. Damit stellt

die **mechanische Rotation** der  $\gamma$ -Untereinheit und der c-Untereinheitenkomplex einen essenziellen Schritt für die Energiekopplung zwischen dem **Protonentransport** durch den  $F_0$ -Sektor und der **ATP-Hydrolyse** bzw. **ATP-Synthese** im  $F_1$ -Sektor dar.

### 1.3 Stand der Vorarbeiten

#### 1.3.1 Regulation der $F_1$ -ATPase und ATP-Synthase bei *Micrococcus luteus*

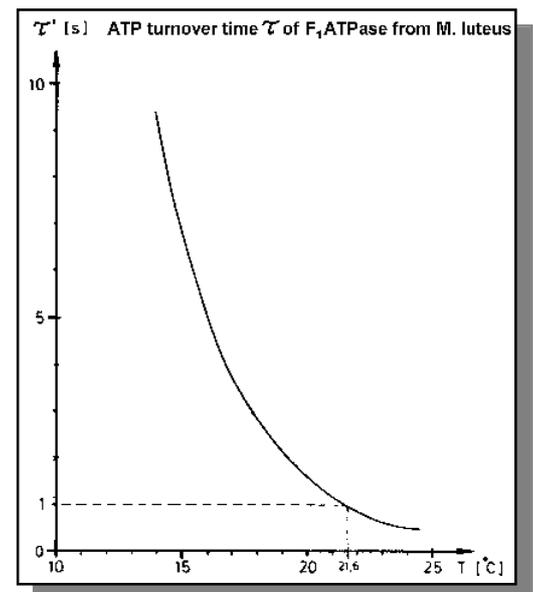
Die biologische Funktion der ATP-Synthasen, insbesondere die Kopplung der drei katalytischen Zentren, ist von verschiedenen Umgebungsfaktoren wie der elektrochemischen Protonenpotentialdifferenz der Membran, der Temperatur, der Nukleotidkonzentration und der Dissoziation von Inhibitorproteinen abhängig.

In früheren Arbeiten der Membranstrukturgruppe, Mainz, wurde gezeigt, daß bei *Micrococcus luteus* die  $\delta$ -Untereinheit als Inhibitor der  $F_1$ -ATPase und ATP-Synthase reagiert [59-62]. Im Falle der ATP-Synthasen aus *E. coli* und Chloroplasten ist jedoch die  $\epsilon$ -Untereinheit von  $F_1$  ein Inhibitor für die ATPase-Aktivität [63,64]. Weiterhin wurde eine funktionelle Homologie zwischen der  $\delta$ -Untereinheit aus *Micrococcus luteus* und den  $\epsilon$ -Untereinheiten aus Chloroplasten- und *E.coli*- $F_1$ -ATPase als Inhibitor der ATPase-Aktivität in ATP-Synthasen festgestellt [59], die anschließend durch Sequenzierung und Kreuzrekonstitution bestätigt wurde [65].

Im Falle der von der Membran ablösbaren  $F_1$ ATPase existiert das Protein in wenigstens fünf verschiedenen enzymatischen und strukturellen Zuständen, die zum einen abhängig von der Temperatur, reversibel und irreversibel, aber auch abhängig von der Dissoziation des Inhibitorproteins sind [59,60].

Die Kinetik, die Aktivierungsenergien und Entropien der  $F_1$ -ATPase wurde in früheren Arbeiten am Institut für Biochemie untersucht [60,66]. Es zeigte sich bei zeitaufgelösten Studien mit diesem Enzym eine extrem hohe Aktivierungsenergie von 205 kJ/mol für die

Hydrolyse von CaATP bei einer der Tieftemperaturformen der kompletten  $F_1$ ATPase. Dieses Verhalten kann für zeitaufgelöste strukturelle Untersuchungen des Reaktionszyklus des Enzyms ausgenutzt werden. Durch Kühlung wird die Zyklusdauer der  $F_1$ -ATPase um drei Größenordnungen von



**Abbildung 5: Zyklusdauer der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* in Abhängigkeit von der Temperatur [60]**

4 ms bei 37°C auf 20 s bei 13°C verlangsamt und liefert somit ein experimentell zugängliches Zeitfenster.

Im Falle der **ATP-Synthase** bewirkt die Bildung einer elektrochemischen Protonenpotentialdifferenz über die Membran sowohl bei der Hydrolyse als auch bei der ATP-Synthesereaktion die Dissoziation des Inhibitorproteins ( $\delta$ -Untereinheit bei *Micrococcus luteus*,  $\epsilon$ -Untereinheit bei *E. coli*) vom ATP-Synthase-Komplex [62,65].

Die biologische Funktion der ATP-Synthase und  $F_1$ -ATPase, insbesondere die Kopplung der drei katalytischen Zentren ist abhängig von der Nukleotidkonzentration. So erfolgt bei niedriger (unphysiologischer) Nukleotidkonzentration die Katalyse nur an einem Zentrum (Unisite-Katalyse). Wird die Konzentration an Nukleotid erhöht, ändern sich die kinetischen Parameter um Größenordnungen. Die Reaktion erfolgt dann an 2 oder 3 Zentren in kooperativer Weise (Multisite-Katalyse) [67]. Durch den Einsatz von Azid, einem reversiblen Inhibitor der funktionellen Kooperativität bei ATP-Synthasen, wird der Zustand der Einzentren-Katalyse auch in Gegenwart hoher Enzym- und Substratkonzentrationen erreicht [68].

### 1.3.2 Synchronisation

Nach der Hypothese von Boyer („Bindungswechselmechanismus“)[26] durchläuft jedes der 3 katalytischen Nukleotidbindungscentren der  $F_1$ -ATPase oder ATP-Synthase nacheinander bestimmte strukturelle Zustände im Laufe eines Reaktionszyklus (⊙ bis ⊙). Diese Zustände „tight“, „loose“ und „open“ mit unterschiedlicher Substratbindung sind in folgender Abbildung für ein einzelnes katalytisches Zentrum dargestellt. Bei einer hohen Nukleotidkonzentration findet die enzymatische Reaktion an allen 3 Zentren mit hoher Kooperativität untereinander statt (Multisite-Katalyse). Die möglichen Zwischenzustände im Reaktionszyklus, die in Abbildung als „?“ symbolisiert sind, sind unbekannt. Durch zeitaufgelöste Strukturuntersuchungen kann die Strukturodynamik während eines Reaktionszyklus untersucht werden.

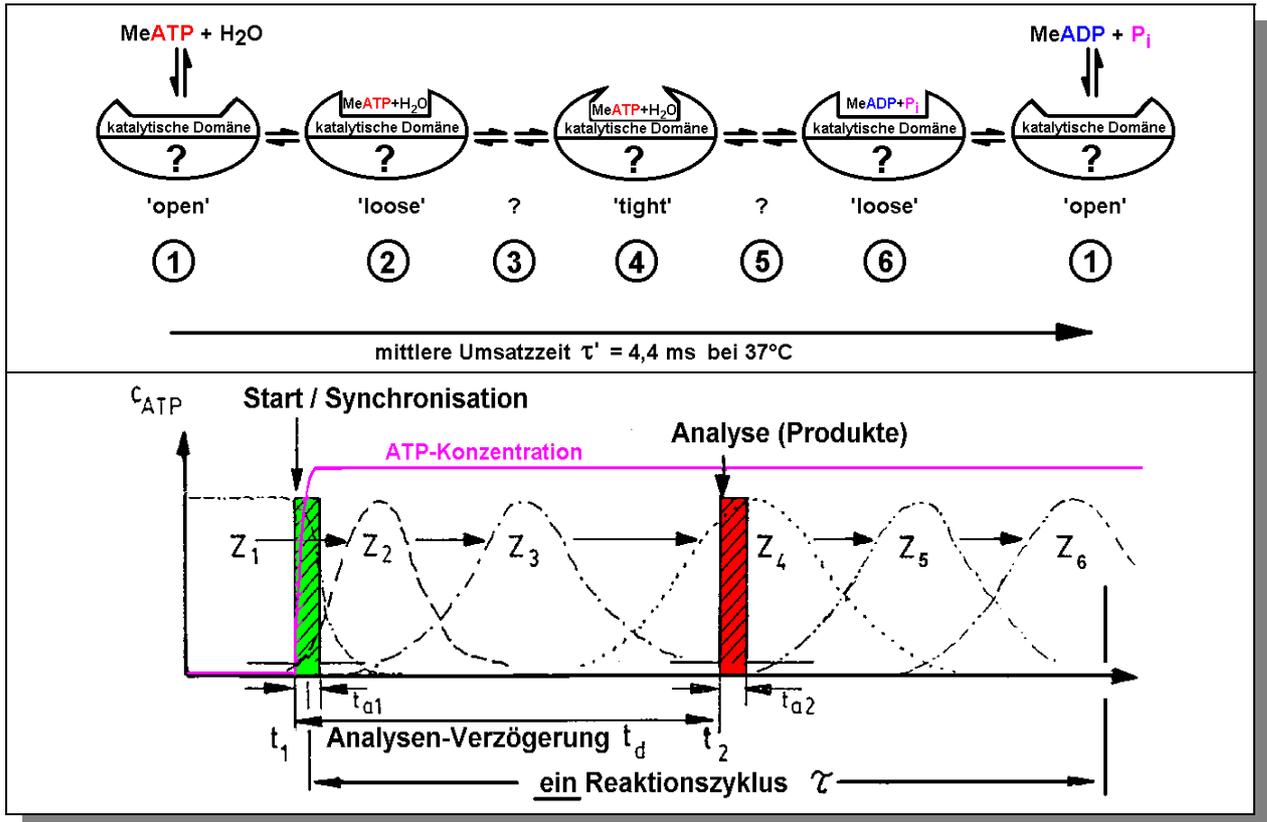


Abbildung 6:

- a) ATP-Synthasen und F<sub>1</sub>-ATPasen durchlaufen nach dem von Boyer postulierten Bindungswechselmechanismus im Reaktionszyklus sukzessive verschiedene Zustände
- b) Die Analyse der Nukleotidreaktionen erfolgt durch zeitauflösende enzymatische Analyse, der Nachweis transienter Strukturumwandlungen durch zeitaufgelöste Röntgenstreuung während der Reaktionszyklen. Als Startreaktion dient ein Konzentrationsprung an ATP (Stopped-flow-Technik)[60].

Das Grundprinzip solcher Untersuchungen besteht in der Synchronisation einer makroskopischen Probe durch ein Sprung-Ereignis. Im vorliegenden Fall wurde das System durch einen Konzentrationsprung an Substrat durch schnelles Mischen mit Hilfe der Stopped-flow-Technik aktiviert. Dadurch wird der größte Teil der Proteinpopulation in einer im Vergleich zur Dauer des Reaktionszyklus  $\tau$  kurzen Zeit in den aktiven E-S-Komplex (Michaelis-Menten-Theorie) befördert. Das System verhält sich dann für eine limitierte Zeit wie ein einzelnes Molekül. Die Probe wird synchronisiert und zeigt die Zustandsdichteverteilungen  $Z_1$ - $Z_6$ , die den einzelnen molekularen Konformationen ① bis ⑥ entsprechen.

Erste Versuche zur Strukturdynamik der F<sub>1</sub>-ATPase im Reaktionszyklus der enzymatischen Hydrolyse von CaATP wurden durch zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung am DESY, Hamburg

durchgeführt. Hier wurde durch Kühlung der Probe ein experimentell zugängliches Zeitfenster geschaffen. Bei einer Temperatur von 13°C war eine Expansion der F<sub>1</sub>-ATPase in der Mitte des Reaktionszyklus feststellbar [69]. Bedingt durch experimentelle Probleme und die beschränkte Quellenstärke konnten jedoch damals keine weiteren Struktur- und Dynamikdetails aufgeklärt werden.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur­dynamik der ATP-Synthase und ihres  $F_1$ -Fragmentes aus dem Bakterium *Micrococcus luteus* im Reaktionszyklus untersucht werden. Nach Isolierung der Enzyme erfolgte die Protein­strukturanalyse mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung. Die Charakterisierung des Reaktionszyklus fand durch zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung der Proteine unter nativen nahezu physiologischen Bedingungen statt.

Ziel war es, einen Zusammenhang zwischen räumlichen Verschiebungen einzelner Domänen innerhalb eines Enzymkomplexes und der biologischen Funktion und Regulation der ATP-Synthasen im Laufe eines Reaktionszyklus herauszufinden.

Ferner wurde die Abhängigkeit der biologischen Funktion der ATP-Synthasen von der Temperatur und von Inhibitoren untersucht. Durch den Vergleich der unterschiedlichen Verhaltensweisen dieser Enzyme war die Analyse von Teilschritten des Reaktionszyklus sowie der Untereinheitenkopplung möglich.

## 2 Methoden

### 2.1 Enzympräparationen

#### 2.1.1 Zucht von *Micrococcus luteus* ATTC 4698

Materialien und Reagenzien: 5 Standard I-Medium-Platten (2 % Agar)

Standard I Nährbouillon:    15 g Pepton  
                                      3 g Hefeextrakt  
                                      6 g NaCl  
                                      1 g D(+)-Glucose

Die *Micrococcus luteus* ATTC 4698 Stammkultur wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Braunschweig bezogen. Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen (-20°C) angelegt.

Frisch gewachsene Kolonien von *Micrococcus luteus* wurden von Standard I-Agar-Platten auf sieben 300 ml Standard I Nährmedium-Flüssigkulturen überimpft und 19 Stunden bei 30°C im Schüttelbad (230 UpM) inkubiert. Mit je 25 ml dieser 1.Vorkultur wurden dann sieben 1000 ml Schikanekolben angeimpft und 23 Stunden im Schüttelbad (230 UpM) inkubiert. Diese 2. Vorkulturen wurden am nächsten Tag auf 2 Fermenter (12 l und 15 l-Volumen; Standard I Nährmedium, je 1 ml Entschäumer) überimpft. Unter starker Belüftung (1 bar) und Rühren (80 UpM) wurde die Kultur für 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Geerntet wurden insgesamt 400-500g Bakterien mit Hilfe einer Durchflußzentrifuge (WKF) bei 14000 U/min, die im Anschluss bei -20°C in flachen Platten (0.5 cm Dicke) gelagert wurden [70].

#### 2.1.2 Präparation der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* ATTC 4698

Die Präparation der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* erfolgte nach einer erweiterten Methode von Dr. Zwicker [71] jedoch unter Anwendung auf präparativen Maßstab. Allen Puffern wurde 0.1 mM DFP zur Hemmung von Proteasen hinzugeführt.

### 2.1.2.1 Präparation der Protoplasten-Membranfragmente

Material und Reagenzien:

Puffer I	50 mM Tris/HCl , pH=7.5 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.6 M Sucrose
Puffer II	50 mM Tris/HCl , pH=7.5 10 mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer III	50 mM Tris/HCl , pH=7.5 50 mM MgCl <sub>2</sub> 10 % (v/v) Glycerin

230 g Bakterien wurden in 1000 ml Puffer I suspendiert und mit 0.5 g Lysozym 1 h im Eisbad gerührt. Zur Kontrolle der Zellwandabbaus wurden 50 µl der Suspension in 3 ml Puffer I gegeben und das Fortschreiten der Reaktion wurde über einen Zeitraum von 60 min durch Messen der Extinktion bei 450 nm verfolgt. Die nun entstandenen Protoplasten wurden abzentrifugiert (30 min, 4°C, 52000 g), das Pellet in 1150 ml Puffer II resuspendiert, mit 50 mg DNase I versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Suspension wurde 40 min bei 4°C und 52000 g zentrifugiert und das erhaltene Pellet noch 3 mal mit Puffer III gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde 30 min bei 4°C und 48000 g zentrifugiert. Die Protoplastenmembranfragmente der letzten Zentrifugation wurden in möglichst wenig Puffer III suspendiert und in 4.5 ml NUNC-Gefäße in flüssigen Stickstoff eingefroren.

### 2.1.2.2 Vorextraktion der Membranen und Solubilisierung der ATP-Synthase

Material und Reagenzien:

Solubilisierungspuffer:	50 mM Tris/HCl , pH=7.5 0.3 M KCl 10 % (v/v) Glycerin
Dialysepuffer:	0.1 % (w/v) Triton X-100 50 mM Tris/HCl , pH=7.5 10 % (v/v) Glycerin

Membranfragmente mit etwa 1200 mg Gesamtprotein wurden in 600 ml Solubilisierungspuffer suspendiert und mit 1.845 mg CHAPS im Eisbad 40 min gerührt. Anschließend wurde die Suspension 90 min bei 4°C und 150000 g zentrifugiert. Das Sediment und der Überstand wurde auf ein SDS-Minigel aufgetragen und auf ATP-Synthase untersucht. Das Sediment wurde in 300 ml Solubilisierungspuffer suspendiert und mit 6 g Triton X-100 für 4 h bei 4°C gerührt. Nach Detergenzbehandlung wurde erneut zentrifugiert ( 4°C, 150000 g, 90 min ) und der Überstand über Nacht gegen 9.5 Liter Dialysepuffer dialysiert.

### 2.1.2.3 HPLC-Reinigung der ATP-Synthase am Tentakel-Ionenaustauscher

Material und Reagenzien:

Puffer A:	50 mM Tris/Ac , pH=7.5 5 mM MgAc <sub>2</sub> 0.1 % (w/v) Triton X-100 (reduziert) 10 % (v/v) Glycerin
Puffer B:	Puffer A mit 1.5 M NaAc
Dialysepuffer:	Puffer A mit 0.1 % (w/v) Triton X-100
Puffer C:	50 mM Tris/Ac , pH=7.5 5 mM MgAc <sub>2</sub> 5 mM TDOC 10 % (v/v) Glycerin

300 ml des Solubilisats wurde über eine Probenschleife (Superloop, Pharmacia) auf eine Ionenaustauschersäule mit DEAE-Fractogel 650(M)-Material (Pharmacia XK 50/30, iD = 50 mm, L=20 cm) aufgetragen und mit einem Salzgradienten mit Puffer A und B bei einem Fluß von 9.99 ml/min eluiert. Das entsprechende Gradientenprogramm wurde mit Hilfe einer Merck-Hitachi L6200 Niederdruck-Gradienten-HPLC-Pumpe gesteuert. Die Chromatographie wurde bei 4-6°C durchgeführt, zur Detektion (280 nm) stand ein UV-Detektor (Knauer) und als Fraktionssammler ein Gerät der Firma ISCO zur Verfügung. Die nach elektrophoretischer Untersuchung (Glycin-SDS-Minigelsystem von Biorad) identifizierten ATP-Synthase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 3 Liter Puffer dialysiert. Der 2. Reinigungsschritt wurde analog zur 1. Ionenaustauschchromatographie an einem Fraktogel-EMD-650(M)-DMAE-Tentakelaustauscher (Merck) bei einem Fluß von 7 ml/min durchgeführt. Die ATP-Synthase enthaltenden Fraktionen (Mini-Gele)

wurden vereinigt, mit einer Amicon-Zelle ultrafiltriert und auf ein Volumen von weniger als 2 ml (10 mg Gesamtprotein) aufkonzentriert. Das Protein wurde in flüssigem Stickstoff in NUNC-Gefäßen zwischengelagert und anschließend einer Gelpermeationschromatographie unterzogen. Die Chromatographie wurde als FPLC mit Superose 6-prep-grade Material (Pharmacia XK 16/100) durchgeführt und ermöglichte gleichzeitig einen Detergensaustausch. Die Elution erfolgte mit Puffer C bei einem Fluß von 0.2 ml/min. Die ATP-Synthase-Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von ca. 5 g/l eingestellt und in flüssigem Stickstoff in NUNC-Gefäßen gelagert.

### 2.1.3 Biotechnologische Präparation der F<sub>1</sub>ATPase

Material und Reagenzien:

Puffer A	30 mM Tris/HCl pH=7.5 0.6 M Sucrose 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer B	30 mM Tris/HCl pH=7.5 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer C	30 mM Tris/HCl pH=7.5
Puffer D	1 mM Tris/HCl pH=7.5 0.5 mM EDTA-Na <sub>2</sub>
	50% (w/w) PEG 6000 in 50 mM Tris/HCl pH=7.5, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
	Ammoniumsulfat
Chromatographiepuffer A	50 mM Tris/Ac , pH=7.5 5 mM MgAc <sub>2</sub>
Chromatographiepuffer B	50 mM Tris/Ac , pH=7.5 5 mM MgAc <sub>2</sub> 1.5 M NaAc <sub>2</sub>
Puffer E	100 mM Tris/HCl pH=8 10 % (v/v) Glycerin

### **2.1.3.1 Abbau der Zellwand mit Lysozym, Lyse der Zellen durch osmotischen Schock, DNAse-Behandlung und Waschen der Protoplastenmembranen mit Mg-freiem Puffer**

230 g Bakterien wurden in 1000 ml Puffer A suspendiert und mit 0.5 g Lysozym 1 h im Eisbad gerührt. Zur Kontrolle der Zellwandabbaus wurden 50 µl der Suspension in 3 ml Puffer A gegeben und das Fortschreiten der Reaktion wurde über einen Zeitraum von 60 min durch Messen der Extinktion bei 450 nm verfolgt. Die nun entstandenen Protoplasten wurden bei 52000 g 30 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 1150 ml Puffer B resuspendiert, mit 50 mg DNAse I versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Suspension wurde 45 min bei 4°C und 52000 g zentrifugiert und das erhaltene Pellet noch 3 mal mit Puffer C gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde 45 min bei 4°C und 48000 g zentrifugiert. Zu den Pellets wurden je 5 ml Puffer D gegeben und darauf über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### **2.1.3.2 Extraktion der F<sub>1</sub>ATPase**

Die Pellets wurden in 600 ml Extraktionspuffer D suspendiert und 1 h im Eisbad gerührt. Die Ultrazentrifugation fand bei 19000 UpM, 45 min. lang und bei 4°C statt. Der Überstand wurde in ein 500 ml Meßzylinder dekantiert und die Lösung durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH=7.5 und 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung auf 50 mM Tris/HCl pH=7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> gebracht. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt (2. Extraktion) und beide Extrakte vereinigt.

### **2.1.3.3 Vorreinigung der F<sub>1</sub>ATPase durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällungen**

40 % Ammoniumsulfat-Fällung:

Das F<sub>1</sub>-Extrakt wurde in ein 2l-Becherglas mit Eiskühlung überführt und die Lösung mit einem großem Edelstahl-Propellerrührer durchmischt. Insgesamt 243 g Ammoniumsulfat pro Liter Anfangsvolumen wurde durch langsames Einstreuen während des Rührens im Eisbad innerhalb einer halben Stunde hinzugegeben und noch 20 min weitergerührt. Die Fällung wurde noch 60-90 min im Eisbad (0°C) gelagert und dann abzentrifugiert (13000 UpM, 45 min bei 4°C).

60 % Ammoniumsulfat-Fällung:

Der Überstand der 40 %-Ammoniumsulfat-Fällung wurde nach der obigen Vorgehensweise einer 60 %-igen Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Dabei wurde insgesamt 120 g Ammoniumsulfat pro Liter Anfangsvolumen verwendet. Die Fällung wurde bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert.

#### 2.1.3.4 24% Polyethylenglykol(PEG)-Fällung und Delipidisierung der F<sub>1</sub>ATPase

Die nach der Zentrifugation (13000 UpM, 45 min bei 4°C) der 60%-igen Ammoniumsulfat-Fällung entstandenen Pellets wurde mit 60 ml Chromatographiepuffer A gelöst. Die Proteinlösung wurde darauf im Eisbad unter Rühren langsam mit einer 24%-igen PEG-Lösung versetzt und stand noch 5 min im Eisbad. Ausgefallene Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation entfernt (30 min bei 21000 UpM).

#### 2.1.3.5 HPLC-Reinigung der F<sub>1</sub>ATPase

Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit der 4-fachen Menge an Chromatographiepuffer A verdünnt. 500 ml Proteinlösung wurde entweder über eine Probenschleife (Superloop, Pharmacia) oder direkt durch eine Büchi 681 Pumpe auf eine Ionenaustauschersäule mit DEAE-Fractogel 650(M)-Material (Pharmacia XK 50/30, iD = 50 mm, L = 20 cm) aufgetragen und mit einem Salzgradienten mit Chromatographiepuffer A und B bei einem Fluß von 9.99 ml/min eluiert. Das entsprechende Gradientenprogramm wurde mit Hilfe einer Merck-Hitachi L6200 Niederdruck-Gradienten-HPLC-Pumpe gesteuert. Die Chromatographie wurde bei 4-6°C durchgeführt, zur Detektion (280 nm) stand ein UV-Detektor der Firma Knauer und als Fraktionssammler ein Gerät der Firma ISCO zur Verfügung. Die nach elektrophoretischer Untersuchung (Glycin-SDS-Minigelsystem von Biorad) und Kontrolle der enzymatischen ATP-Hydrolyseaktivität identifizierten F<sub>1</sub>ATPase enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt.

#### 2.1.3.6 80%-ige Ammoniumsulfatfällung:

Die F<sub>1</sub>ATPase-Lösung wurde zur Entsalzung und Konzentrierung einer 80%-igen Ammoniumsulfat-Fällung nach obiger Vorgehensweise unterworfen. Dabei wurde 436 g Ammoniumsulfat pro Liter Ausgangsvolumen verwendet. Die Fällung lagerte noch 2 h im Eisbad. Nach dessen Zentrifugation (30 min, 21000 UpM, 4°C) wurde das Pellet mit sehr wenig Puffer E gelöst, dadurch auf eine Endkonzentration von 8-13 g/l F<sub>1</sub>ATPase eingestellt und in flüssigem Stickstoff in NUNC-Gefäßen gelagert.

## 2.2 ATP-Hydrolyseaktivität

Reagenzien:                    0.1 M Tris/HCl, pH=8  
                                      0.1 M CaATP [5:1] im Fall von F<sub>1</sub>ATPase  
                                      0.1 M MgATP [1:1] im Fall von ATP-Synthase

Die Hydrolyse von ATP mittels ATP-Synthase und  $F_1$ ATPase wurde durch den Nachweis von freigesetztem Phosphat nach Fiske und Subbarow [72] bestimmt. Das bei der Hydrolyse von ATP freigesetzte Phosphat reagiert dabei mit Molybdat und Ascorbinsäure zu einem blauen Farbkomplex, dessen Extinktion bei 578 nm der Phosphatkonzentration proportional ist. Die Messungen wurden an einem kontinuierlich arbeitenden Durchflußphotometer nach Arnold [73] durchgeführt. 1-10  $\mu$ g Enzym wurde 5 min in 5 ml Puffer bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l 0.1 M CaATP ( $F_1$ ATPase) bzw. MgATP (ATP-Synthase) wurde die Hydrolyse gestartet. Die in einem Zeitintervall von 5 min freigesetzte Phosphatmenge wurde aus der Steigung der mit einem Y/t -Schreiber protokollierten Extinktion abgeleitet. Als Maß für die spezifische enzymatische Aktivität [U] wurde die freigesetzte Menge an Phosphat [ $\mu$ mol] pro Minute und Milligramm Enzym festgelegt. Bei dieser Methode liegt der Meßfehler einer Einzelmessung bei 5-10 % der spezifischen enzymatischen Aktivität [U]. Die Aktivität eines Enzympräparates wurde in der Regel durch wiederholtes Messen überprüft (Fehler: 5 %).

### 2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels BCA-Test nach der Methode von Smith et al.[72] durchgeführt. Dabei wurde als Kalibrierungsstandard Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Die Konzentration an Bakteriorhodopsin wurde spektroskopisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient bei 540 nm beträgt  $58000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [75].

### 2.4 Glycin-SDS-Gelelektrophorese

Zur Reinheitskontrolle und Untereinheitenanalyse wurden Flachgel-Elektrophoresen unter denaturierten Bedingungen nach Lämmli [76] mit Hilfe eines Mini-Gelsystems von Biorad durchgeführt. Die Gele (9×7 cm) setzten sich zusammen aus einem Trenngel (12 %-Polyacrylamid) und einem Sammelgel (4 %-Polyacrylamid). Gefärbt wurden die Gele in Coomassieblau (Serva Blue G in Methanol/ Eisessig/ Wasser-Gemisch) und anschließend in 25 %-igen Methanol und 10 %-iger Essigsäurelösung entfärbt.

### 2.5 Präparation von Liposomen

#### 2.5.1 Präparation von small unilamellar vesicles (SUV)

Material und Reagenzien:

Sojabohnenlipid (SBL)

Rekonstitutionspuffer:      20 mM Tris/HCl, pH= 7.9  
    50 mM KCl  
    0.2 mM EDTA

Zur Ko-Rekonstitution der Proteine wurden kleine unilamellare Vesikel ( $SUV \leq 120$  nm) durch Ultraschallbehandlung hergestellt. Es wurden 50 mg SBL in 2 ml Rekonstitutionspuffer suspendiert und im Eisbad für 30 min unter  $N_2$ -Begasung beschallt (B12-Ultraschallgerät, Branson, Connecticut, USA). Die Schalleistung des Stab-Beschallgerätes betrug 70 W. Titansplitter, die sich vom Schallkopf ablösten, wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 12000 g (Eppendorf 5412) abgetrennt. Die Größe der Vesikel wurde durch Laserautokorrelationsspektroskopie (dynamische Lichtstreuung) mit einem Nanosizer (Coulter-Electronics, Krefeld) gemessen. Die relative Breite der Größenverteilung der Vesikel wurde durch einen Polydispersitätsindex (0-9) angegeben. Die Temperatur, die Viskosität und der Brechungsindex der Lösung wurden über einen Normierungsfaktor berücksichtigt.

### 2.5.2 Präparation von Koeinbauliposomen

Die Ko-Rekonstitution von monomeren Bakteriorhodopsin (mBR) mit ATP-Synthase erfolgte nach der Methode der Detergenzinkubation vorgeformter Liposomen [77,78]. Dabei wurden kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit TDOC-haltiger Proteinlösung in Rekonstitutionspuffer gemischt und etwa 30 min inkubiert. Das Vesikel zu ATP-Synthase/ (mBR) betrug bei der Ko-Rekonstitution 20:1:1 (w/w). Die Abtrennung des Detergens erfolgte durch Zentrifugationschromatographie.

Glaszentrifugationsröhrchen wurden mit vorgequollenem Gelfiltrationsmaterial (Sephadex-G 25-medium) gefüllt, 1 min bei 900 g (Hettich Universal Tischzentrifuge) zentrifugiert und mehrmals mit je 1 ml Rekonstitutionspuffer, zum Schluß ohne EDTA, äquilibriert und zentrifugiert. Die Inkubationsansätze (250  $\mu$ l/Säule) wurden 1 min bei 900 g zentrifugiert, wobei die Proteoliposomen unverdünnt eluiert wurden.

### 2.6 ATP-Syntheseaktivität

ADP/ Phosphat/  $Mg^{2+}$  [1:1:0.4]

Meßreagenz                      0.5 M Tris/Acetat, pH=7.75  
    0.1 mM Na-EDTA  
    0.25 mM DTT  
    50 mg BSA

---

	83 µg Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i>
	1 mg Luciferin
Puffer	50 mM Tris/Ac, pH=7.75

Die Versuche zur lichtgetriebenen ATP-Synthese in ko-rekonstituierten Liposomen (siehe 3.5) wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Küvette, die mit 500 µl ko-rekonstituierten Liposomen-Lösung gefüllt ist, befindet sich in einem thermostatisierten (30°C) Küvettenhalter, der oberhalb eines Magnetrührers montiert ist. Der Nachweis und die Quantifizierung des durch die ATP-Synthase synthetisierte ATP erfolgte durch die Luciferin/ Luciferase-Reaktion [79] in einem LUMAC M 2000 Biocounter (Abimed, Düsseldorf). Die Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 10- 350 nM ATP durchgeführt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl ADP/Phosphat/Mg<sup>2+</sup>-Lösung, wobei die Endkonzentration des Substrats- bezogen auf ADP- 1 mM betrug. Nach 4-minütiger Dunkelmessung wurde die Küvette mit der Probe mit Licht der Wellenlänge 505-590 nm bestrahlt und die ATP-Synthesereaktion bis zu 90 min lang verfolgt. Im Abstand von 1-2 min wurden 10 µl Aliquote entnommen, zur Unterbrechung der enzymatischen Reaktion mit 390 µl Puffer verdünnt, 50 µl Meßreagenz zugegeben und die erzeugten Photonen im Biocounter gemessen. Die Kalibrierung der Zählwerte erfolgte mittels ATP-Eichlösungen. Der Meßfehler dieser Methode liegt bei 3 % der ATP-Syntheseaktivität.

## 2.7 Kleinwinkelstreuung

### 2.7.1 Allgemeine Theorie

Die Kleinwinkelstreuung ist eine Untersuchungsmethode, mit deren Hilfe die Struktur größerer Biomoleküle auch in Lösung untersucht werden kann. Moleküle der Größenordnung 1-100 nm weisen in Lösung bei kleinen Streuwinkeln ein diffuses Streubild auf, was auf die Beweglichkeit und die verschiedenen Orientierungen in verdünnten Lösungen zurückzuführen ist. Aus dem diffusen Streubild lassen sich wertvolle Informationen über die Größe und Form der gelösten Makromoleküle gewinnen. Im Gegensatz zur klassischen Proteinkristallographie erzielt man jedoch keine atomare Auflösung (nur etwa 1 nm). Oft scheitert diese Methode jedoch am Fehlen geeigneter Proteinkristalle, besonders im Falle von multimeren Membranproteinen mit flexibler Struktur, z.B. der ATP-Synthase.

Der Vorteil der Kleinwinkelstreuung gegenüber der Kristallstrukturanalyse liegt jedoch in der Tatsache, daß unter nativen nahezu physiologischen Bedingungen gearbeitet werden kann und auch

Konformationsänderungen eines Enzyms z.B. Substratbindung oder Allosterien sichtbar gemacht werden können.

Die folgende kurze Zusammenfassung der Theorie der Kleinwinkelstreuung erfolgt in Anlehnung an Feigin [80]. Dabei wird auf Herleitungen wie sie in Lehrbüchern dargestellt sind, verzichtet. (Glatter [81], Cantor und Schimmel [82]).

Bei allen Beugungsvorgängen stehen Beugungswinkel und die Größe des zu beugenden Teilchens zueinander im umgekehrten Verhältnis. Da Makromoleküle im Vergleich zur verwendeten Wellenlänge groß sind, findet man die Streuung bei kleinen Winkeln (daher der Name „Kleinwinkelstreuung“ [83]). Der Zusammenhang zwischen räumlicher Struktur des Objekts und dessen Abbild im Kleinwinkelstreuexperiment ist für die Neutronen- und Röntgenkleinwinkelstreuung, trotz der unterschiedlichen Wechselwirkung der Strahlung mit Materie gleich. In beiden Fällen wird die Winkelabhängigkeit der gestreuten Strahlung, die von einem Partikel ausgeht, durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Gl. 2.1})$$

wobei  $\lambda$  die Wellenlänge,  $d$  der Abstand zwischen zwei Streuzentren innerhalb eines Partikels und  $2\theta$  der Streuwinkel zwischen Primärstrahl und Streustrahlung ist. Die Wechselwirkung zwischen Strahlung und Molekül läßt sich am besten durch den Streuvektor  $q$  (Impulsübertrag) beschreiben.

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Die „Partikelstreuung“ in Lösung ist vom Streuvermögen des Makromoleküls und der geometrischen Anordnung der einzelnen Streuzentren innerhalb des Moleküls abhängig. Diese Streueigenschaften eines Moleküls werden in der Debye'schen Streugleichung (1915) [82] zusammengefaßt:

$$I(q) = \sum \sum f_m \cdot f_n \cdot \sin(rq)/rq \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Der Term  $I(q)$  entspricht der Intensität der Streukurve.  $f_m$  und  $f_n$  sind die Atomformfaktoren und geben das Streuvermögen an den Punkten  $n$  und  $m$  im Molekül an.  $r$  ist der Abstand zwischen diesen zwei Punkten. Zur Berechnung des Streuprofiles ist die Amplitude jedes Atoms mit jedem anderen (auch mit sich selbst) zu kombinieren und über alle Paare zu summieren. Die Gleichung 2.3 geht unter Annahme einer homogenen Elektronendichte im Molekül in Gleichung 2.4 über:

$$I(q) = 4\pi \int \rho(r) \sin(rq) / rq \quad dq \quad (\text{Gl. 2.4})$$

wobei  $\rho(r)$  die Abstandsfunktion, d.h. die Häufigkeitsverteilung der Elektronenabstände im Molekül darstellt.

### 2.7.1.1 Bestimmung von Partikelparametern

Der **Streumassenradius**  $R_g$  eines Teilchens ist ein Maß für seine räumliche Ausdehnung. Er ist analog zum Trägheitsradius in der Mechanik definiert als die Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat aller Elektronen vom Molekülschwerpunkt.

Der innerste Teil der Partikelstreuung bei monodispersen Lösungen verläuft nach einer Gauß'schen Kurve. Da dieser Teil der Streukurve experimentell durch den Beamstop nicht bestimmt werden kann, beschreibt man ihn mit Hilfe der Guinier-Näherung [84]:

$$I(q) = I(0) \exp(-q^2 \cdot R_g^2 / 3) \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Durch logarithmische Auftragung der Streuintensität  $I(q)$  gegen das Quadrat des Streuvektors  $q^2$  erhält man aus der Steigung der Geraden den Streumassenradius und aus dem Achsenabschnitt die Nullwinkelstreuung  $I(0)$  (Guinier-Plot). Das Molekulargewicht steht über die Gleichung  $M \sim I(0)/c$  mit der Nullwinkelstreuung in direktem Zusammenhang.

Die oben erwähnten Beziehungen sind streng genommen nur bei unendlicher Verdünnung exakt. Bei endlichen Verdünnungen kann ein interpartikulärer Interferenzeffekt auftreten. Es empfiehlt sich, eine Konzentrationsreihe herzustellen und die scheinbaren Streumassenradien auf die Konzentration null zu extrapolieren.

Viele Makromoleküle haben eine langgestreckte Gestalt. Aus der Streukurve läßt sich die **Länge** und der Querschnitt des Moleküls berechnen.  $I(q)$  kann in 2 Komponenten aufgeteilt werden. In Anlehnung an Gleichung 3.5 ist der Verlauf der Streukurve des Querschnitts für kleine Winkel ebenfalls gaußförmig. Für den Querschnittsfaktor  $I_a(q)$  gilt:

$$I_a(q) = I_a(0) \exp(-q^2 \cdot R_a^2 / 2) \quad (\text{Gl. 2.6})$$

wobei  $I_a(q) = I(q) \cdot q$  ist. Die logarithmische Darstellung (Kratky-Plot [81]) führt analog zum Guinier-Plot zu einer Geraden, dessen Steigung den Streumassenradius des Querschnitts  $R_a$  enthält. Die Länge des Teilchens  $L$  ergibt sich aus dem Streumassenradius und dem Streumassenradius des Querschnitts  $R_a$ .

$$L = \sqrt{12 (R_g^2 - R_a^2)} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Aus der Gleichung 2.4 erhält man, wie oben schon erwähnt, durch Fourier-Transformation die **Abstandsfunktion**:

$$\rho(r) = r^2 / 2\pi^2 \int I(q) q^2 \sin(rq) / rq \, dq \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Bei der graphischen Auftragung von  $\rho(r)$  gegen  $r$  ist aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse die maximale, innerhalb des Partikels vorkommende Distanz ablesbar. Weiterhin stellt das Maximum der Kurve den häufigsten im Molekül vorkommenden Abstand dar.

Zur Durchführung der Fourier-Transformation muß die Streukurve im Bereich kleiner Winkel durch die Guinier-Näherung (Gleichung 3.5) und im Bereich großer Winkel durch das Porod'sche Gesetz (Gleichung 3.9) angenähert und ergänzt werden.

$$I(q) \sim 1/q^4 \quad (\text{Gl. 2.9})$$

### 2.7.2 Besonderheiten der Neutronenkleinwinkelstreuung

In der SANS werden thermische bzw. kalte Neutronen im Wellenlängenbereich von 5-20 Å eingesetzt. Die Wellenlängen der benutzten Strahlung sind daher um ca. eine Größenordnung größer, was Neutronen in Kombination großer Anlagenlängen besonders zur Charakterisierung großer molekularer Strukturen bis etwa 1000 Å eignet.

Für die Streuung von Neutronen in Lösung gelten die gleichen allgemeinen Gesetzmäßigkeiten wie für die Streuung von Photonen in Lösung. Da Neutronen jedoch elektrisch neutral sind, können sie im Gegensatz zu Photonen die Elektronenschale ungehindert durchdringen und in den Atomkern eindringen. Bei der Streuung an Materie verhalten sich Neutronen komplementär zur Röntgenstrahlung. Der Streuvorgang findet nicht an den Elektronen, sondern an den Spinnmomenten der Atomkerne statt.

Der differenzielle Streuquerschnitt, d.h. die Anzahl der pro Sekunde und  $\text{cm}^2$  in einem Raumwinkelement  $d\Omega$  gestreute Neutronen, ergibt sich aus

$$d\sigma/d\Omega = b^2 \quad (\text{Gl. 2.10})$$

wobei  $b$  die Streulänge der Streuer ist.

Der gesamte Streuquerschnitt kann dann durch

$$\sigma = 4\pi b^2 \quad (\text{Gl. 2.11})$$

ausgedrückt werden. Er setzt sich aus zwei verschiedenen Beiträgen zusammen, dem kohärenten und dem inkohärenten Streuanteil.

$$\sigma = \sigma_{\text{coh}} + \sigma_{\text{incoh}} \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Bei wässrigen Lösungen überwiegt der inkohärente Streuanteil, der durch die Protonen im Wasser bestimmt wird ( $\sigma_{\text{incoh}}(^1\text{H}) = 80.26 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ ). Der inkohärente Streuanteil ist nicht interferenzfähig, erzeugt einen isotropen Streuuntergrund und enthält keine Strukturinformation. Er kommt durch die unterschiedlichen Streulängen der beiden Gesamtspinzustände des Neutronen-Protonen-Compoundkerns zustande.

Zur Verbesserung des Signal/Untergrundverhältnisses wird daher bei SANS-Experimenten der Kontrast durch Deuterierung des Lösungsmittels variiert. In diesem Fall ist der inkohärente Streuanteil von Deuterium im Gegensatz von  $^1\text{H}$  klein ( $\sigma_{\text{incoh}}(^2\text{H}) = 2.05 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ ). Weiterhin lassen sich auch die sehr hohen Transmissionen von deuterierten Proteinlösungen vorteilhaft nutzen (Schichtdicke  $1_{\text{mm}} T=95\%$ ).

Für die Strukturforschung an biologischen Systemen ist besonders der große Unterschied zwischen den kohärenten Streulängen des Wasserstoffs ( $b_{\text{coh}} = -0.374 \times 10^{-12} \text{ cm}$ ) und Deuterium ( $b_{\text{coh}} = 0.667 \times 10^{-12} \text{ cm}$ ) von Bedeutung. Chemisch unterscheidet sich das Wasserstoffatom nicht von seinem Isotop, dem Deuterium. Deshalb können in einem Protein Wasserstoffatome gegen Deuteriumatome ausgetauscht werden, ohne daß das Protein seine Funktion verliert oder nennenswert verändert. Deuterierte Proteine zeigen nur ein unterschiedliches Streuverhalten gegenüber protonierten Proteinen in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Lösungen. Dies ermöglicht durch selektive Deuterierung einzelner Teilbereiche, spezielle Molekülbereiche innerhalb eines Protein-Komplexes voneinander zu unterscheiden.

Aufgrund der unterschiedlichen Streulängen ergibt sich auch ein deutlicher Unterschied in den Streulängendichten von Wasser ( $\rho(\text{H}_2\text{O}) = b/V = -0.56 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ ) und deuteriertem Wasser ( $\rho(\text{D}_2\text{O}) = b/V = +6.4 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ ). Durch Einsatz von  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Gemischen lassen sich damit verschiedene mittlere Streulängendichten des Lösungsmittels einstellen.

Für Proteine liegt die Streulängendichte immer im Bereich von  $\rho_{\text{prot}} = (1.8-2.5) \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$  [80]. Die Überschußstreulängendichte, d.h. die Differenz  $\Delta\rho = (\rho_{\text{prot}} - \rho_{\text{p}})$  zwischen der mittleren Streulängendichte des Proteins und des Lösungsmittels, kann daher durch die Messung in verschiedenen Puffern stark variiert werden.

Dies bildet die Grundlage der sogenannten Kontrastvariationsmethode in der Neutronenkleinwinkelstreuung, die es erlaubt, Fluktuationen in der Streulängendichte und somit Inhomogenitäten innerhalb des streuenden Moleküls zu detektieren. Ferner läßt sich durch geschickte Wahl des  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Mischungsverhältnisses ein Kontrast  $\Delta\rho = 0$  einstellen. Für diesen sogenannten Matchpoint kann aus der bekannten Streulängendichte des  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Gemisches die mittlere Streulängendichte des Proteins bestimmt werden. Speziell bei einem  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösungsmittelgehalt von ca. 40 % trägt bei einem aus mehreren Domänen bestehenden Protein, das unterschiedlich deuteriert ist, nur der deuterierte Anteil des Proteins zur Streukurve bei. Der protonierte Anteil des Proteins bleibt jedoch unsichtbar ("maskiert").

### 2.7.3 Statische Röntgenkleinwinkelstreuung

#### 2.7.3.1 Aufbau der JUSIFA-Anlage

Statische Experimente zur Röntgenkleinwinkelstreuung wurden an der JUSIFA-Kleinwinkelanlage am HASYLAB in Hamburg durchgeführt. Als Synchrotronstrahlungsquelle dient in diesem Fall ein Biegemagnet am DORIS III-Speicherring. Der Photonenfluß am Ablenkmagneten beträgt  $8 \cdot 10^{12} \text{ Ph/s.mrad}$ , 0.01 % ( $\Delta E/E$ ) bei 8 keV. Es handelt sich um eine Synchrotronstrahlungsquelle der zweiten Generation mit relativ schwacher Intensität. Die JUSIFA-Anlage eignet sich zur Charakterisierung von stabilen Modifikationen von Enzymen und liefert durch ihre hohe Präzision gute Referenzspektren.

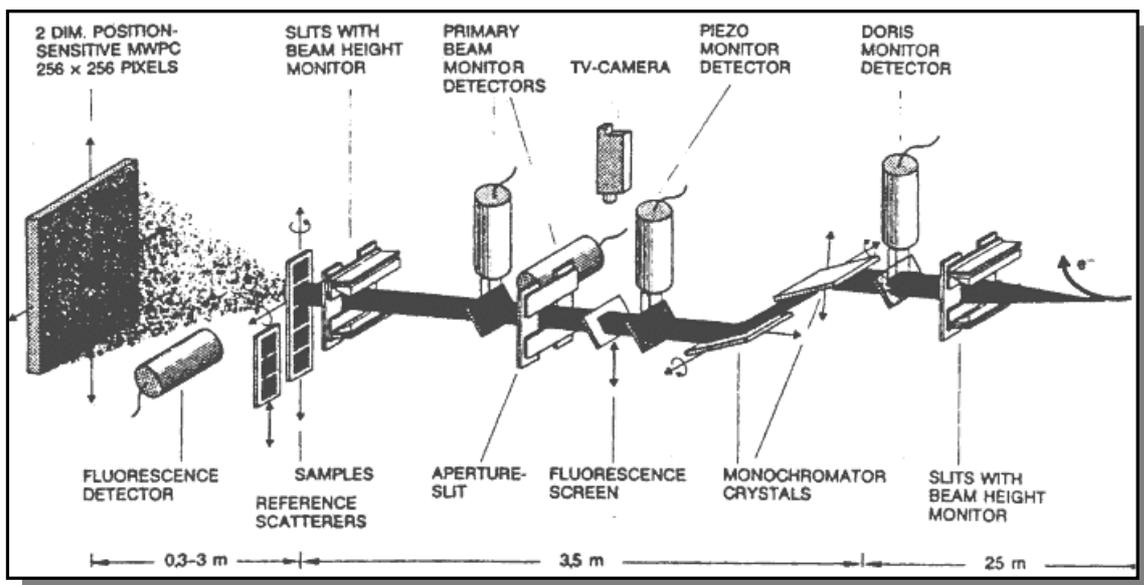


Abbildung 7: Aufbau des JUSIFA-Kleinwinkelstreuungsanlage in Hamburg (HASYLAB) [85]

Die Strahlung tritt durch ein Berylliumfenster in die Anlage ein. Diese Fenster begrenzen durch ihre Absorption die in der Anlage verfügbare Energie der Strahlung nach unten auf 4.8 keV. Nach einer 25 m langen Vakuumstrecke wird der Strahl durch eine Blende (Blende 1) auf einen Querschnitt von  $5 \times 1.4 \text{ mm}^2$  begrenzt. Diese Blende wird von dem Beamlinebetreuer festgelegt und kann nicht vom Benutzer verändert werden. Direkt nach dieser Blende erfolgt die Monochromatisierung des Strahls mittels eines Si-311 Kristalls. Durch Einstellung des Kristalldrehwinkels können Energien von 4.5 bis 35 keV mit einer Energiebreite von  $\Delta E/E = 1 \cdot 10^{-4}$  kontinuierlich ausgewählt werden. Zur Filterung höherer harmonischer Wellenlängen wird ein zweiter Kristall leicht aus der Parallelstellung gekippt. Zwischen Blende 1 und Monochromator befindet sich eine Kapton-Folie ( $45^\circ$ ), deren Streuung von einem Scintillationszähler (NaJ) detektiert wird. Dieses System bildet den Monitor für die weiße Synchrotronstrahlung (DORIS counter). Vor und hinter dem Monochromator befinden sich Strahllagemonitore. Diese steuern einen Translationsantrieb, der den ersten Kristall bei Strahllageschwankungen vertikal verfährt. Der Strahllagemonitor und damit der Translationsantrieb spricht jedoch nur bei Anfahren einer neuen Energie an. So kann es im Fall von Messungen mit konstanter Energie oder bei Aufnahme von längeren Zeitscheiben zu vertikalen Strahllageschwankungen kommen. In horizontaler Richtung existiert an der Anlage keine Strahllagesteuerung.

Das benutzergesteuerte Kollimationssystem schließt sich an den Monochromator an, das aus einer strahldefinierenden Rechteckblende (Blende 2) und einem „guard Slit“ (Blende 3) besteht. Die Blende 3 befindet sich 30 cm vor der Probe und dient zur Ausblendung der von Blende 2 hervorgerufenen parasitären Streustrahlung. Die Blenden werden mittels PC über ein IEC Bussystem zur Strahldimensionierung (hier:  $0.6 \text{ mm} \times 1.1 \text{ mm}$ ) verfahren. Zwischen den Blenden befindet sich wiederum eine Kapton-Folie mit NaJ-Detektor als Monitorzähler für die monochromatische Strahlung. Der Photonenfluss auf der Probe beträgt bei dieser Anlage  $2 \cdot 10^8 \text{ mm}^{-2}$  bei einer Energie von 8 keV [85].

Die Streustrahlung der Proteinproben wird mit einem 2-dimensionalen Vieldraht-Proportionalzähler mit Ar/CO<sub>2</sub>-Gemisch nachgewiesen. Die aktive Fläche des Detektors beträgt  $180 \times 180 \text{ mm}^2$  und ist in  $256 \times 256$  Pixel unterteilt. Der maximal detektierbare Photonenfluss des Detektors liegt bei  $10^6 \text{ s}^{-1}$ . Der Primärstrahl wird aus diesem Grund durch einen Strahlfänger (Beamstop) vom Detektor abgehalten. Bei den Meßreihen wurde ein Beamstop von 8 mm verwendet.

Um einen großen Winkelbereich zu erreichen, kann der Proben-Detektorabstand bei der JUSIFA-Anlage variabel auf 4 verschiedene Abstände eingestellt werden: 0.9 m, 1.8 m, 2.7 m, 3.6 m. Zur Reduktion der Streuverluste befindet sich der Probenhalter in einer Probenkammer, die zusammen mit der ganzen Anlage über Turbopumpen auf  $10^{-4}$  mbar evakuiert wird. Die Datenaufnahme und die Steuerung der Experimente erfolgt über eine DEC- $\mu$ -VAX II GPX Workstation unter VMS. Zur Automatisierung können hier Meßsequenzen programmiert werden und zwar Einzelmessungen für Proben in Serie mit Eichmessungen und Untergrundmessungen.

### 2.7.3.2 Durchführung der SAXS-Messungen

Für die Messung an Proteinen und Puffer wurde eine Quarz-Durchflußkapillare mit einem Durchmesser von 1.1 mm und einer Wandstärke von ca. 30  $\mu$ m verwendet. Diese wurde auf einer Aluminiumplatte mit einer in einer  $15 \times 3$  mm<sup>2</sup> großen Öffnung befestigt. Die Aluminiumplatte konnte mittels eines aufgeschraubten Kupferrohres gekühlt werden. Somit wurde die Probentemperatur über einen Thermostaten eingestellt und konstant gehalten. Die Quarzkapillare war vakuumdicht mit 0.3 mm FPLC-Teflonschläuchen verbunden, die durch einen Flansch aus der Probenkammer geführt wurden. Die Proben konnten dadurch gewechselt werden ohne das Vakuum zu brechen.

Nach Einbau der Quarzkapillare in die Probenkammer wurde der Strahl durch Verfahren der Blenden auf die Probe justiert. Zunächst wurde der Strahl auf ein Fadenkreuz eingestellt, das fest in einen fahrbaren Halter 20 cm vor der Kapillare eingebaut ist. Das Kreuz wirft einen Schatten auf einen zwischen Probe und Detektor eingefahrenen Fluoreszenzschirm. Nun wurden die Blenden so justiert, daß in x- und y-Richtung der „Strahl“ zentralsymmetrisch auf dem Fadenkreuz zu sehen war. Die Kapillarenposition wurde mittig auf das Fadenkreuz eingestellt (Blende 2  $0.6 \times 1.1$  mm, Blende 3  $1.0 \times 1.5$  mm).

### 2.7.3.3 Probenmessungen

Die Quarzkapillare wurde über die Teflonschläuche mit einem Volumen von 350  $\mu$ l je Probe gefüllt. Dieses Volumen reichte aus, um die Kapillare vollständig zu füllen, was durch ein Sichtfenster kontrolliert wurde. Die Temperatur der Probe wurde über einen Thermostaten bei allen Meßreihen konstant auf 15°C gehalten.

Die Messungen der Proben wurden in mehreren 15-minütigen Einzelmessungen durchgeführt, die später zur Erreichung einer guten Statistik addiert wurden. Die Unterteilung einer Gesamtmessung in kürzere Zeitabschnitte war notwendig, um eventuelle Strahlschwankungen während der Meßrei-

he ausfindig zu machen. Zusätzlich wurde, um die Strahllagestabilisierung zu aktivieren, die Energie nach jeder 15-minütigen Messung alternierend um 1 eV erhöht bzw. erniedrigt.

Die Auswahl der Photonenenergie ist ein Kompromiß zwischen angestrebtem, kleinsten Impulsübertrag und Streuintensität. Die maximale Streuintensität wird bestimmt durch

$$I_{\text{str}} \sim d_s \cdot \exp(-\mu_s \cdot d_s) \quad (\text{Gl. 2.13})$$

bei einer Probendicke von  $d_s = 1/\mu$  und somit bei einer Transmission von  $\approx 37\%$ . Eine gute Transmission geht allerdings mit der Beschränkung im kleinstmöglichen  $q_{\text{min}}$  einher. Als bester Kompromiß zwischen Transmission und Streuwinkel erwiesen sich Energien um 9 keV. In diesem Fall lagen die gemessenen Transmissionen der Proben noch bei 26 %; die Transmission der leeren Quarzkapillare betrug bei dieser Energie 45 %.

Jede Einzelmessung setzte sich aus mehreren Sequenzen zusammen. Vor jeder neuen Meßsequenz und nach jeder neuen Injektion des Positronen-Strahls wurde eine 100 Sekunden lange Messung einer geeichten amorphen Kohlenstoffprobe (Glassy Carbon) mit einer Dicke von 500  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Sie diente bei der Auswertung zur Bestimmung der absoluten Intensität. Außerdem wurde jeweils vor jeder Einzelmessung die Transmission bestimmt. Dazu wurde die Strahlintensität mit und ohne Probe im Strahlengang jeweils für 10 s mit einer Photodiode gemessen. Die Transmission wurde direkt durch das Meßprogramm mit der VAX Workstation berechnet. Eine Leerstrahlmessung (100 s) kontrollierte die Blendenstreuung; sie ging aber nicht in die spätere Auswertung ein. Eine 100 Sekunden dauernde Messung von Bornitrid diente zur Mittelpunktbestimmung bei einem Abstand von 3.618 m, wobei bei 0.9 m Abstand die „Glassy Carbon“-Probe zur Mittelpunktbestimmung herangezogen wurde.

Für beide Enzyme,  $F_1\text{ATPase}$  und  $\text{ATP-Synthase}$ , wurden zwei Detektorabstände 0.918 m und 3.618 m gewählt. Damit wurde ein Winkelbereich von  $0.01 \text{ \AA}^{-1}$  und  $0.44 \text{ \AA}^{-1}$  abgedeckt. Die Meßzeit bei 0.918 m Abstand wurde aufgrund der geringeren Proteinstreuintensität bei großen Winkeln im Vergleich zum 3.618 m Abstand verdoppelt.

Zur Wellenlängeneichung des Instruments wurde eine 10  $\mu\text{m}$  Cu-Folie in die Probenkammer eingebaut. Es wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 8960 eV und 9020 keV in 1 eV Schritten gemessen und die Lage der Cu-K-Kante bestimmt. Experimentell ergab sich z.B. eine Energie von 8993 eV. Dies entspricht einem instrumentellen Versatz  $\Delta E$  von 14 eV gegenüber dem Literaturwert.

Um Inhomogenitäten der Detektorempfindlichkeit herauszufiltern, wurde die Cu-Fluoreszenzstrahlung aufgrund ihrer guten Homogenität eingesetzt. Dazu wurde eine 10  $\mu\text{m}$  Cu-Folie bei 9 KeV in kurzer Geometrie (0.918 m) 13 h lang bestrahlt und die Fluoreszenz gemessen. Zusätzlich wurde die Kleinwinkelstreuung der Cu-Folie, die durch die Metallstruktur der Folie bedingt ist, getrennt gemessen. Die Messung der reinen Kleinwinkelstreuung wurde ca. 50 eV unterhalb der Anregungsenergie der  $K_{\alpha}$ -Strahlung bei 8.98 keV durchgeführt. Zur Erreichung einer ähnlichen Zählstatistik für die schwächere Kleinwinkelstreuung wurde 21 h lang gemessen. Beide Messungen wurden später pixelweise voneinander abgezogen.

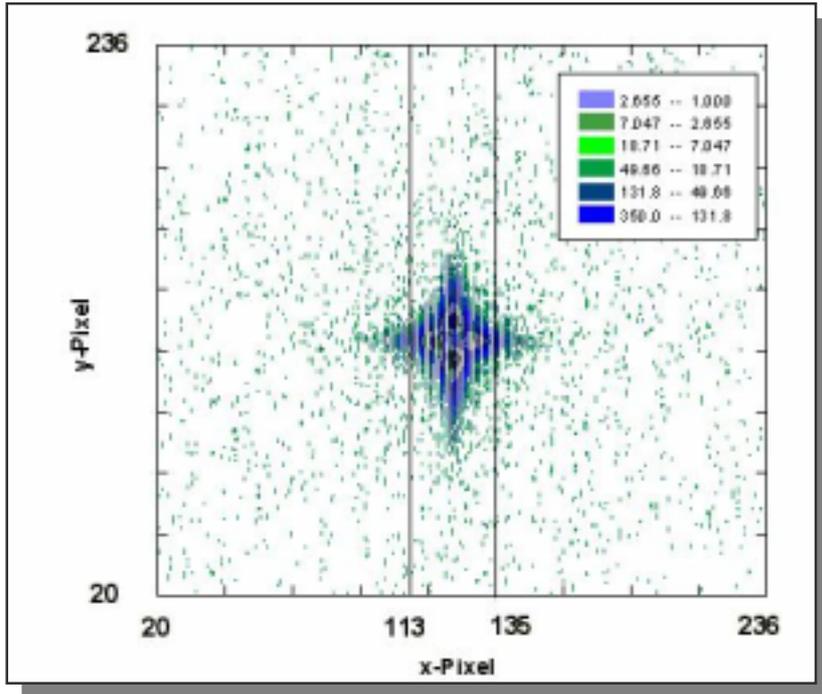
#### 2.7.3.4 Auswertung und Datenanalyse

Die Datenauswertung der 2-dimensionalen Detektorbilder fand in Hamburg statt. Dort stand das Programm „SAS“ zur Verfügung, das zur Bestimmung des Mittelpunktes, zur Addition der einzelnen Streubilder, für die radiale Mittelung unter Berücksichtigung aller Referenzstreuer verwendet wurde. Die erhaltenen radial gemittelten 1D-Daten konnten dann per Internet nach Mainz zur endgültigen Auswertung transferiert werden.

In den 2-dim. Datensätzen des Leerstrahls zeigte sich, wie schon während der Messung festgestellt, starke Primärstrahlstreuung an den Blenden. Der parasitäre Untergrund wurde durch Einfahren der Kapillare in y-Richtung noch verstärkt. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf die Totalreflexion des Strahls an den Kapillarwänden und der Blendenstreuung. Zusätzlich schwankten diese kreuzförmigen Ausläufer bei unterschiedlichen Detektorbildern. Dies ist auf die Strahlwanderung auf der Kapillare in y-Richtung zurückzuführen. Bei der Auswertung wurde die Blendenstreuung ausmaskiert, d.h. der Teil in der Nähe des Beamstops wurde relativ großzügig nicht in der radialen Mittelung berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte in zwei Halbbildern.

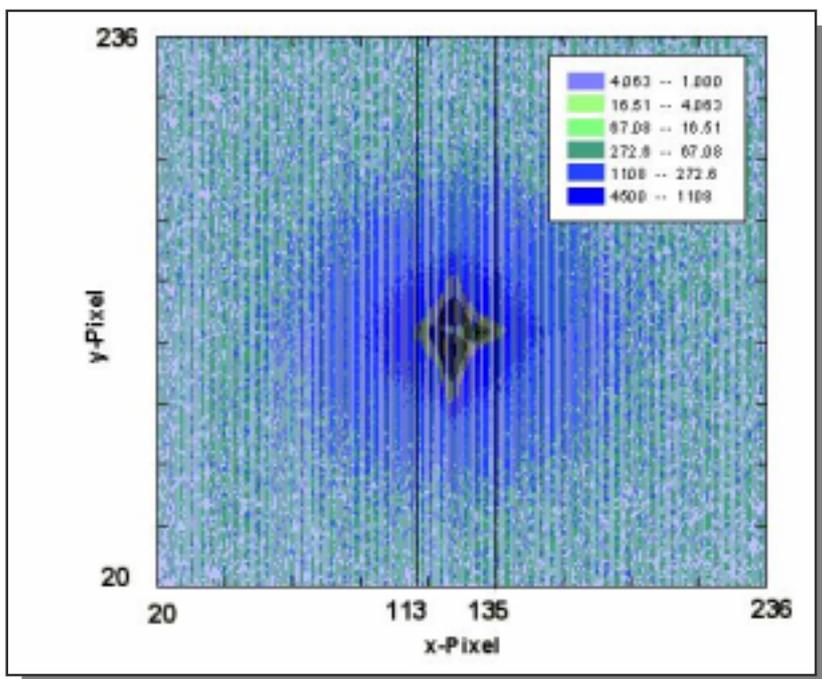
Zur Verdeutlichung der gewählten Maskierung ist in Abb.8 ein 2-dimensionales Detektorbild einer 5-minütigen Leerstrahlungsmessung in logarithmischer Darstellung gezeigt. Die Ausläufer um den Beamstop stammen von der Streuung an Blende 2 und Blende 3. Aufgrund von Strahlschwankungen zeigten einzelne Bilder unsymmetrische Ausläufer nach rechts bzw. links. Die eingezeichneten Linien deuten die Auswertungsmaske an.

Die Abbildung 9 zeigt die logarithmische Auftragung einer 15-minütigen Einzelmessung der  $F_1$ ATPase in der Quarzkapillare. Die Ausläufer sind in y-Richtung erkennbar. Ansonsten ist die Streuung sehr gut radialsymmetrisch und man kann schwach das 1. Nebenminimum der  $F_1$ -ATPase erkennen.



**Abbildung 8: 2-dimensionale Darstellung des Streubildes ohne Probe bei einem Detektorabstand von 3.6 m**

Die Abbildung zeigt eine 900s- Aufnahme des Proteinsignals ohne jegliche Korrektur in logarithmischer Darstellung.



**Abbildung 9: Streubild der  $F_1$ -ATPase bei einem Detektorabstand von 3.6 m**

Die Abbildung zeigt eine 300 s- Aufnahme des Streubildes in logarithmischer Darstellung.

- **Untergrundabzug**

Der Untergrundabzug erfolgte vor der radialen Mittelung pixelweise mit dem Programm "SAS". Im Programm werden die Untergrundmessungen zunächst auf Monitorcounts bzw. Zeit normiert und dann nach folgender Gleichung voneinander abgezogen [85].

$$dI_s = (dI - t_s / t_{\text{dark}} \cdot dI_{\text{dark}}) - T_s \cdot M_s / M_{\text{EB}} (dI_{\text{EB}} - t_{\text{EB}} / t_{\text{dark}} \cdot dI_{\text{dark}}) \quad (\text{Gl. 2.14})$$

Dabei stellen die  $dI$  jeweils die Einzelpixel der Probenmessung (**sample**), Leerstrahlungsmessung (**empty beam**) und Detektorrauschen (**dark current**) dar.  $T_s$  entspricht der Probenstrahlungstransmission. Für das Detektorrauschen  $I_{\text{dark}}$  wird zunächst der Mittelwert über den Gesamtdetektor berechnet und dann auf Meßzeit normiert abgezogen, wobei die Probenstrahlung jeweils in Einzelpixeln monitornormiert ( $M$ = Monitorcounts) abgezogen wird.

Bei der Auswertung der einzelnen Zeitscheiben in unterschiedlichen Injektionsphasen zeigte sich, daß es mittels Monitornormierung nicht möglich war, die Zeitscheiben auf gleiche Intensität zu normieren. Dies ist vermutlich auf Strahllageschwankungen zurückzuführen. Aus diesem Grunde erfolgte die Normierung der einzelnen Zeitscheiben auf die Streuung einer geeichten amorphen Kohlenstoffprobe (500  $\mu\text{m}$  glassy carbon, GC). Der Vorteil besteht darin, daß aus der Streuung dieser Proben auf die Primärstrahlintensität direkt am Probenort geschlossen werden kann. Der Monitorzähler befindet sich 2 m von der Probe entfernt. Zur Bestimmung der Normierungsfaktoren wurde ein  $q$ -Integrationsbereich ( $I_{\text{GC}} \cdot dq^2$ ) von 0.05-0.09  $\text{\AA}$  verwendet und mit dem Referenzwert korreliert. Dies wurde für jede 15 minütige Probenmessung mit den entsprechenden zuvorgemessenen Glassy Carbon-Standardprobe durchgeführt.

- **Mittelpunktsbestimmung (Radiale Mittelung)**

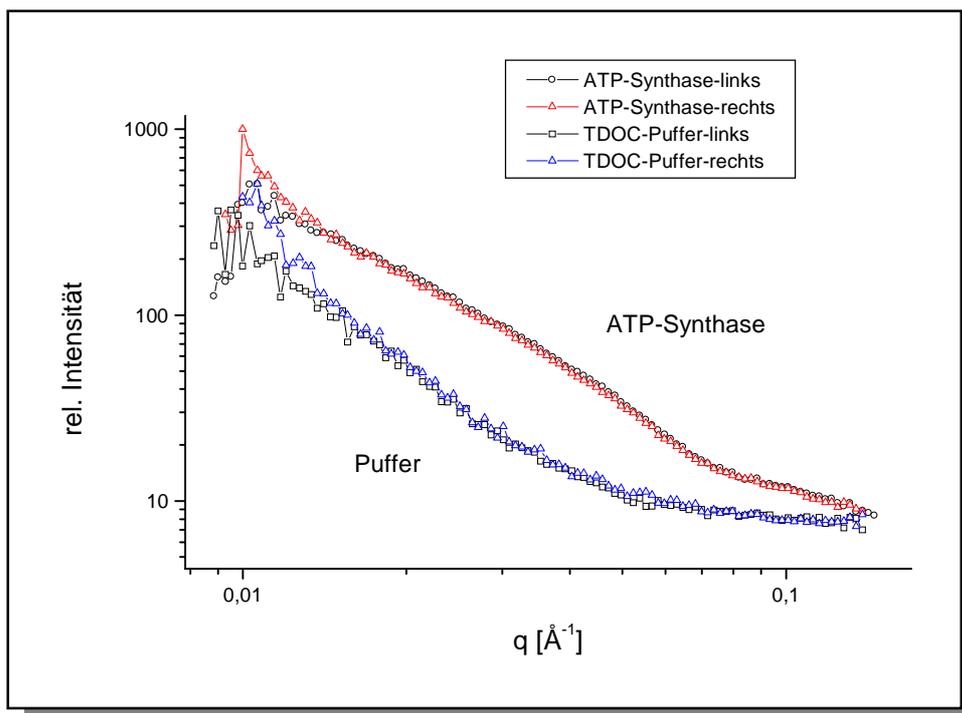
An dieser Anlage werden zur Strahlmittelpunktsbestimmung Bornitrid-Proben vermessen., die im Kleinwinkelbereich eine radial sehr stark abfallende Streuung zeigen. Durch Ermittlung von Ringen konstanter Intensität innerhalb der zentralsymmetrischen Streubilder kann die Strahlage bestimmt werden. Da dieser Algorithmus sehr empfindlich auf Asymmetrien im Streubild wie z.B. durch die parasitäre Blendenstreuung reagiert, muß ein großer Bereich um das Zentrum ausmaskiert werden. Bei einem Detektorabstand von 3.6 m lagen die Ungenauigkeiten im Mittelpunkt bei maximal 2 Pixel.

Bei kurzem Detektorabstand, 0.918 m, kann Bornitrid nicht verwendet werden, da die stark abfallende Flanke der Streuung im unzugänglichen Winkelbereich liegt. In diesem Fall wird zur Strahlmit-

telpunktsbestimmung die Streuung des Classy Carbon-Standards verwendet. Hier lagen die Ungenauigkeiten bei maximal 0.2 Pixeln bei Verwendung des o.g. Algorithmus.

- **Hälftenauswertung**

Die radiale Mittelung der Streukurven erfolgte für jede Bildhälfte (Fenster rechts, Fenster links) einzeln für jede 15-minütige Messung in jeweils 113, 1 Pixel breite Ringe bis in die Ecken des aktiven Bereichs des Detektors unter Ausschluß der oben bestimmten Maske. Die beiden Fensterhälften wurden dann miteinander kombiniert und die einzelnen Probenmessungen wiederum aufsummiert.



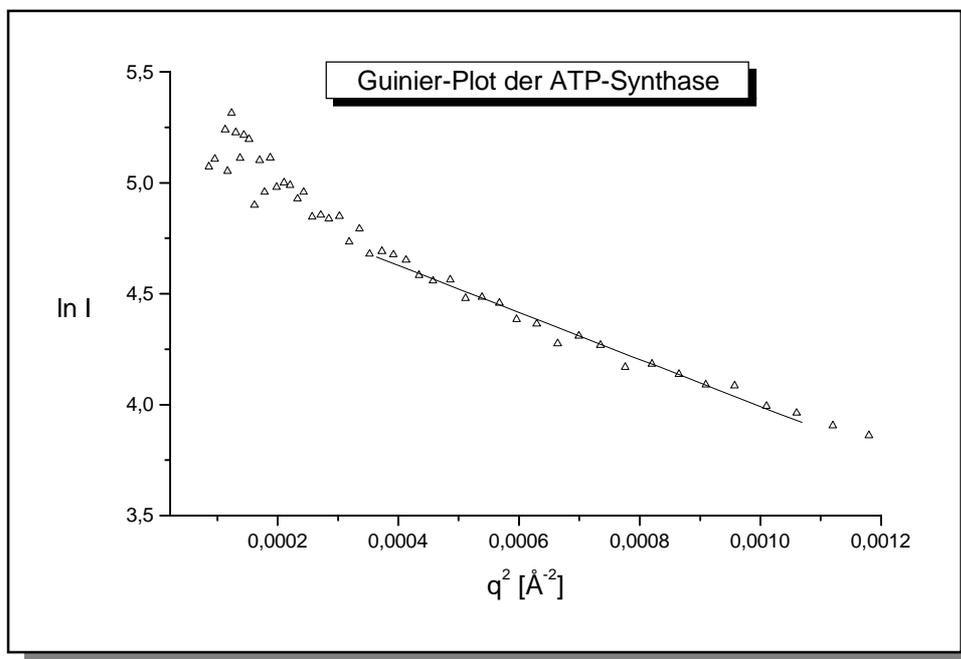
**Abbildung 10: Fensterhälftenauswertung der ATP-Synthase und des zugehörigen Puffers für lange Detektorgeometrie.**

Im vorderen Meßbereich zeigt sich ein Rest der Blendenstreuung und eine systematische Abweichung der rechten Detektorhälfte nach oben.

Die Abbildung 10 zeigt die radiale Mittelung der aufsummierten Einzelmessungen der ATP-Synthase ohne Pufferabzug für das rechte und linke Fenster und das Äquivalent für den Puffer. Im Bereich kleiner Impulsüberträge ist ein Rest der Blendenstreuung sichtbar, die durch Strahlschwankungen hervorgerufen wird. Weiterhin ist eine systematische Abweichung der rechten Hälfte nach oben feststellbar. Dieser Bereich der Impulsüberträge kann jedoch im Falle der  $F_1$ -ATPase und der ATP-Synthase bei der Bestimmung des Streumassenradius aufgrund ihrer relativ geringen Größe

vernachlässigt werden. Nach Abzug des Puffers von der Proteinstreukurve ergab sich für die ATP-Synthase durch die Guinier-Näherung (Abb.11) einen Streumassenradius von  $R_g = 56.32 \text{ \AA} \pm 0.9 \text{ \AA}$ . Der Gyrationradius ergibt sich anhand der Steigung  $m$ , im Bereich von  $q^2 = 0.0037 - 0.001 \text{ \AA}^{-2}$ , durch folgende Beziehung  $R_g = \sqrt{3 \cdot m}$ . Der Bereich sehr kleiner Impulsüberträge (Blendenstreuung) wurde hier nicht verwendet.

Obwohl versucht wurde, die auftretenden Strahlschwankungen durch relativ kurze Einzelmessungen ( $\approx 15 \text{ min}$ ) zu vermindern, entsteht ein Fehler bis zu  $\pm 1 \text{ \AA}$  bei der Bestimmung des Streumassenradius durch lineare Regression. Demnach lassen sich die Strahlschwankungen nicht vollständig eliminieren, da diese am Doris-III-Synchrotron völlig statistisch erscheinen.

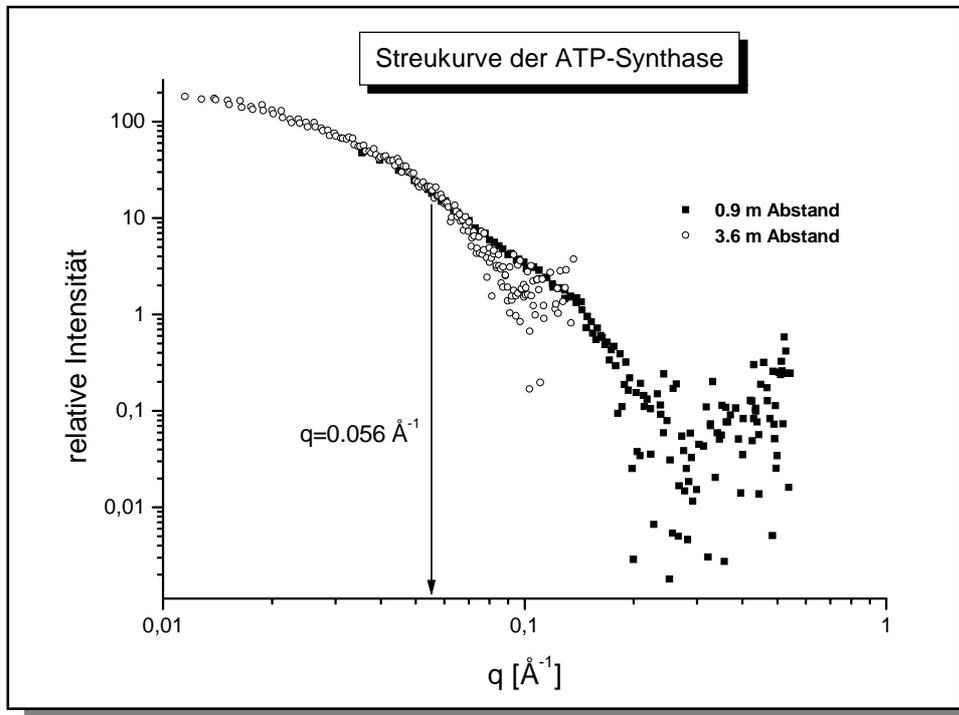


**Abbildung 11:** Die Guinier-Auftragung der nativen ATP-Synthase ergibt einen Gyrationradius von  $56.32 \pm 0.9 \text{ \AA}$  im Bereich von  $q^2 = 3.7E^{-4}$  bis  $0.001 \text{ \AA}^{-2}$

### 2.7.3.5 Zusammensetzung der Meßbereiche

Die radial gemittelten Streukurven des 0.9 m und 3.6 m-Abstands wiesen trotz Prod- und Konzentrationsnormierung Unterschiede in der relativen Skalierung auf. Um beide Abstände zu kombinieren, wurde die Streukurve des 0.9 m Abstands mit Hilfe eines Normierungsfaktors der Intensität der 3.6 m-Streukurve angepaßt. Die Abbildung 12 zeigt am Beispiel der ATP-Synthase die unterschiedlichen Meßbereiche. Der kurze Detektorabstand (0.9 m) deckt den Bereich größerer Impulsüberträge ab. Der bei einem Detektorabstand von 3.6 m äußere  $q$ -Bereich weist statistische Schwankungen auf und wird durch den bei 0.9 m experimentell genauer bestimmbareren  $q$ -Bereich

ersetzt. Beide Meßbereiche wurden bei einem bestimmten  $q$ -Wert miteinander kombiniert. In diesem Falle fand der Schnitt bei  $q = 0.056 \text{ \AA}^{-1}$  statt.



**Abbildung 12: SAXS-Messung der ATP-Synthase: Kombination der Meßdaten für kurzen und langen Detektorabstand.**

Dargestellt ist das Streuprofil der ATP-Synthase im gesamten abgedeckten Meßbereich. Die 0.9 m Messung wurde durch einen Normierungsfaktor auf die Intensität der 3.6 m Daten skaliert.

## 2.8 Zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung

Die zeitaufgelösten Messungen zur Enzymkinetik, an hydrolytisch aktiver  $F_1$ -ATPase und ATP-Synthase, fanden an der **ESRF** (**E**uropean **S**ynchrotron **R**adiation **F**acility) in Grenoble, Frankreich, statt. Hierbei handelt es sich um ein Synchrotron der 3. Generation. Es zeichnet sich durch den weiten Wellenlängenbereich der Synchrotronstrahlung, seinen hohen Fluß, hervorgerufen durch den Einbau verschiedener magnetische Systeme innerhalb des Speicherrings, wie Biegemagneten, Wiggler und Undulatoren, und die lange Strahlstabilität im Speicherring von ca. 10 Stunden aus. Aus diesem Grunde eignet es sich hervorragend zur Studie schneller Reaktionen. Im Vergleich zum JUSIFA-Instrument in Hamburg beträgt die Intensität der ID2 Kleinwinkelstreuanlage des ESRF's in Grenoble bei voller Strahlöffnung etwa das 200 000-fache.

### 2.8.1 Aufbau der ID2-Kleinwinkelstreuanlage am ESRF in Grenoble

Das ID2-Instrument besitzt eine sehr hohe Brillianz (Photonen/(s/mm<sup>2</sup>/mrad<sup>2</sup>), die durch einen Doppelundulator als magnetisches System und einen fokussierenden Spiegel erzeugt wird. In diesem Fall wechseln sich die Ablenkmagneten von unterschiedlicher Polarität sehr schnell miteinander ab. Dadurch wird der Elektronenstrahl nur schwach von seiner Bahn abgelenkt, die durch jeden einzelnen Magneten entstehenden Lichtbündel überlappen und interferieren miteinander. So wird bei bestimmten Wellenlängen auf Kosten der Bandbreite ein Spektrum mit einer Brillianz erzeugt, die im Vergleich zu einem Biegemagneten um den Faktor 10000 größer ist. Der Fluß am Undulator beträgt hier  $1.42 \cdot 10^{17}$  Photonen s<sup>-1</sup> mrad<sup>-2</sup> mm<sup>2</sup> bei 12 keV ( $\Delta E/E=0.1$  %).

Die Synchrotronstrahlung tritt durch ein 500 µm dickes gekühltes Berylliumfenster ein, das sich zwischen dem Speicherring und der Beamline befindet und zwei 250 µm dicke Kohlenstofffilter absorbieren Wellenlängen größer als 0.25 nm. Mit Hilfe eines mit flüssigen Stickstoff gekühlten Si (111)- Doppelmonochromators kann ein Wellenlängenbereich von 0.073 nm bis 0.155 nm (8-17 keV) eingestellt werden. Dem Monochromator folgt ein mit Rhodium beschichteter toroidaler Spiegel zur Fokussierung des Strahls. Für den Photonenfluß an der Probenposition ergibt sich eine Größe von  $10^{13}$  Photonen/s bei einer Energie von 12.5 keV und einer Strahldimension von 0.3 mm x 0.8 mm; die Energiebreite  $\Delta E/E$  beträgt in diesem Fall  $2 \times 10^{-4}$ . Zur Strahldimensionierung und zur Eliminierung diffuser parasitärer Strahlung sind mehrere Blenden und einen „guard-slit“, direkt vor der Probe, eingebaut.

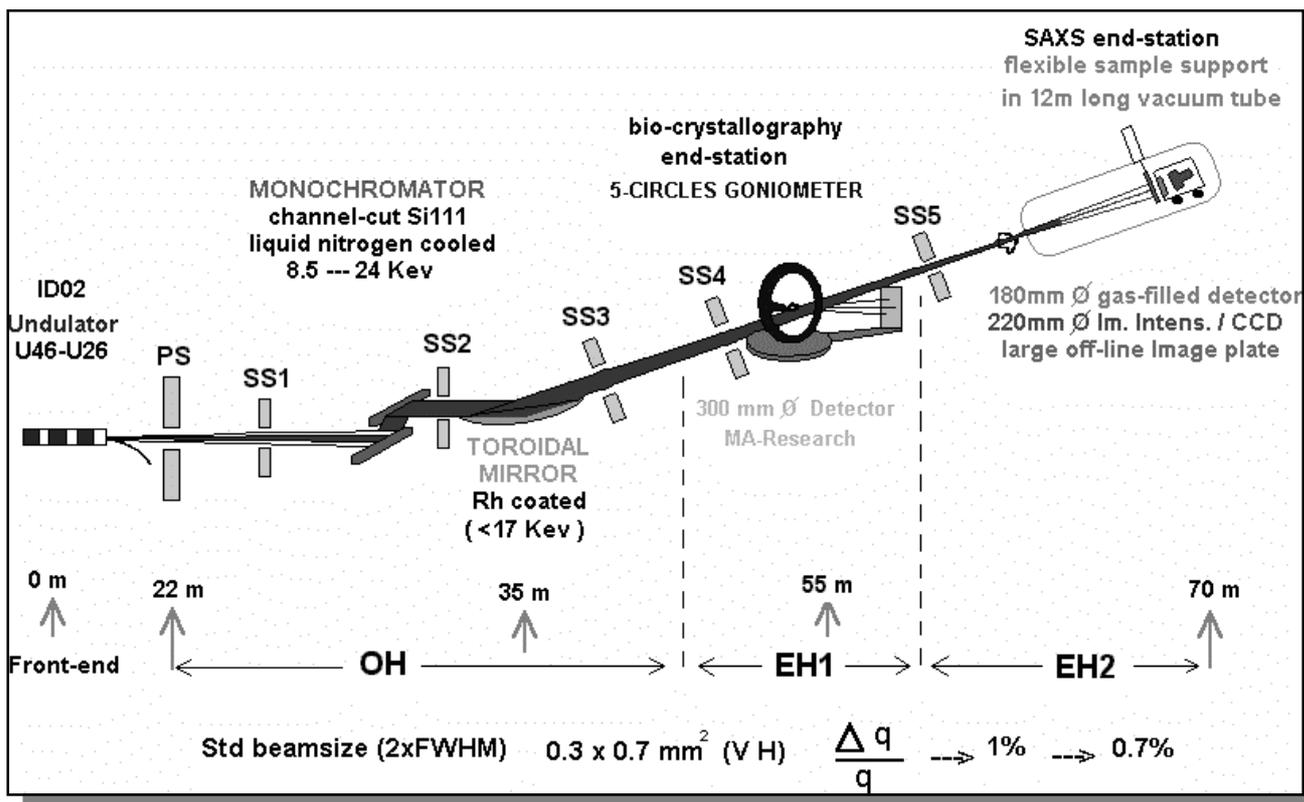


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der ID02 Beamline am ESRF in Grenoble, Frankreich [86]

In der Abbildung 13 ist der schematische Aufbau der ID2-Beamline dargestellt. An dieser Einrichtung können so wohl Messungen zur Kleinwinkelstreuung als auch zur Röntgenkristallographie an Biomolekülen durchgeführt werden.

Im Falle der Kleinwinkelstreuung an Proteinproben wurde zur Detektion der Streustrahlung eine 2-dimensionale **CCD-Kamera** verwendet. Es handelt sich um einen integrierenden Detektor, der im Gegensatz zu einem Gasdetektor kein Limit in Bezug auf die detektierbare Zählrate besitzt. Dadurch kann man den vollen Fluß des Instrumentes auf die Probe ausnutzen. Ein Nachteil jedoch besteht in der notwendigen Auslesezeit. Nach jeder Belichtung der Probe schließt sich jeweils eine Auslesezeit von minimal 150 ms an, während der Strahl ausgeblendet wird (Shutter). Dadurch ist man bei einer Belichtung von je 150 ms die Hälfte der Zeit eines Reaktionszyklus „blind“. Anfangs wurde mit einem CCD-Prototyp gearbeitet, der eine Auslesezeit von minimal 400 ms besaß und eine Auflösung von 512×512 Pixeln. Mit dem neuesten Modell der CCD-Kamera (Frelon-XR II [87]) lassen sich Aufnahmen von 150 ms mit der gleichen Auslesezeit durchführen. Ein weiterer Nachteil der CCD-Kamera besteht durch die Existenz eines relativ hohen Untergrunds, hervorgerufen durch das elektronische Rauschen, das speziell bei schwach streuenden 1 %-igen Proteinlösungen zu Schwierigkeiten führen kann. Durch eine Dunkelmessung direkt vor jeder Messung wurde der Un-

tergrund vom belichteten Streubild direkt abgezogen und dadurch weitgehend eliminiert. Die aktive Fläche der CCD-Kamera beträgt ca. 230 mm mit einer Raumauflösung von ca. 0.25 mm bei einer Auflösung von 1024×1024 Pixeln.

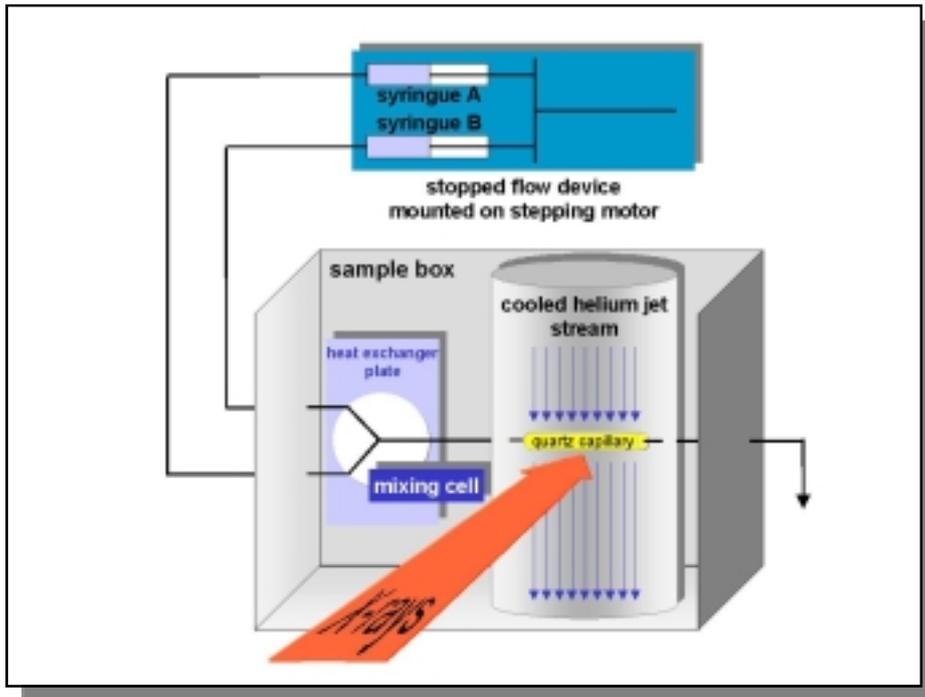
Der Detektor kann in einer Vakuumkammer variabel von einem Abstand von 0.75 bis 10 Metern von der Probe positioniert werden und wird auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Dabei ergibt sich ein theoretisch erreichbarer  $q$ -Bereich von 0.0015 bis  $0.75 \text{ \AA}^{-1}$  bezogen auf eine Wellenlänge von  $1 \text{ \AA}$ .

### **2.8.2 Durchführung der zeitaufgelösten SAXS-Messungen und Aufbau der Probenumgebung**

Für die zeitaufgelösten Messungen wurde eine Quarz-Durchflußkapillare mit einem Durchmesser von 1.3 mm und einer Wandstärke von ca. 30  $\mu\text{m}$  verwendet. Diese wurde in eine Probenbox eingebaut, die von PD Dr. Thomas Nawroth speziell für Hochfluß-Röntgenexperimente entwickelt und gebaut wurde [88]. Sie ist schematisch in Abbildung 14 gezeigt.

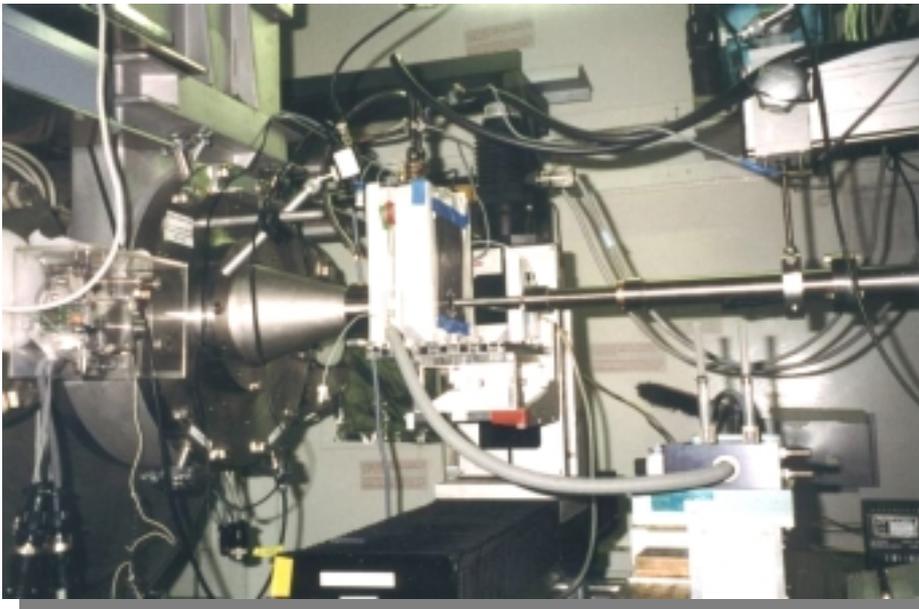
Die Konstruktion der Probenumgebung bestand neben einer mit einem Helium-Jet (neuste Weiterentwicklung) gekühlter Quarz-Durchflußkapillare aus einem Dreikreis-Wärmetauscher, Thermostatisierschleifen und einer Mischzelle. Die Temperaturmessung am Wärmetauscher übernahm ein externer Fühler (PT 100), der den Umwälzthermostaten (Julabo HC 20) steuert. Damit war gewährleistet, daß alle Lösungen auf eine einstellbare Temperatur vortemperiert werden konnten. Weiterhin war durch das Helium eine gute Wärmeübertragung innerhalb der Probenbox gewährleistet und die Luftstreuung aufgrund seiner geringen Dichte minimiert worden.

Verbunden wurde die Probenbox mittels FPLC-Schläuche mit einer „stopped-flow“ Mischgerät mit Schrittmotoren [89]. Die Mischung von Enzym und Substrat im „stopped-flow“ Verfahren wurde mit Hilfe eines PC's unter dem Programm LABVIEW gesteuert. Ausgelöst wurde der Mischvorgang durch Bedienung eines Triggers, der sich außerhalb des Sperrgebietes (Interlock) im Kontrollraum befand. Die temperierten Lösungen (je 75  $\mu\text{l}$  pro Spritze) gelangten bei Aktivierung der Schrittmotoren in die bestrahlte Quarzkapillare und verdrängten die vorangegangene Mischung. Programmiert wurde die Meßsequenz der Schrittmotormaschine von Manfred Rößle, MPI für Biochemie, Martinsried im Laufe seiner Doktorarbeit. Während der ersten Experimente wurde noch die in [69] beschriebene Doppel-stopped-flow-Mischanlage mit Schrittmotoren verwendet.



**Abbildung 14:** Schematische Abbildung der Probenbox zur zeitaufgelösten Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Abbildung 15 zeigt den apparativen Aufbau des Experiments an der ID2-Beamline am ESRF. Von rechts tritt der monochromatische Röntgenstrahl in die Probenbox (weiß) ein, in der sich die Quarzkapillare mit Protein-Substrat-Mischung befindet. Die gestreute Strahlung wird im Anschluß von dem Detektorrohr (linke Seite) aufgenommen und mit einer CCD-Kamera detektiert (nicht



**Abbildung 15:** Meßaufbau für zeitaufgelöste Streuexperimente im Interlockbereich ( ID2-Beamline, ESRF)

sichtbar).

Im unteren, rechten Bereich des Bildes befindet sich die Stopped-flow-Mischgerät (hellblau) mit den beiden Vorratspritzen für Enzym und Substrat, die den Mischvorgang beider Lösungen auslöst.

### 2.8.3 Probenmessungen

Für beide Enzyme,  $F_1$ ATPase und ATP-Synthase, wurden zwei Detektorabstände, 3m und 1m, gewählt. Damit wurde zum einen der Guinier-Bereich (3m-Abstand) als auch der Außenbereich der Streukurven mit den Nebenmaximas (1m-Abstand) zeitaufgelöst untersucht. Bei allen Experimentserien wurde eine Wellenlänge von 1 Å ( $E = 12.5 \text{ keV}$ ) verwendet. Damit ergab sich eine Transmission von 59 % für die Proteinlösungen. Die Konzentration der Proteinproben betrug im Fall der  $F_1$ -ATPase 10 mg/ml (in 100 mM Tris/HCl, pH=8, 10 % Glycerin) und bei der ATP-Synthase 5 mg/ml (in 5 mM TDOC, 50 mM Tris/Ac, pH=7.5, 10 % Glycerin). Zur Substratsättigung der Enzyme wurde eine Konzentration von 2 mM ATP, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw.  $\text{MgCl}_2$  gewählt.

Beide verwendeten Pufferlösungen wurden ebenfalls zeitaufgelöst gemessen und später die einzelnen Zeitscheiben aufaddiert.

Am Anfang jeder Experimentserie wurden folgende **Kalibrierungen** einmalig aufgrund der hohen Stabilität des Röntgenstrahls durchgeführt:

1. Räumliche Verzerrungen wurden mit Hilfe einer mechanischen Standards korrigiert (Distortion)
2. Das sogenannte „flat field“ wurde mit Hilfe der Wasserstreuung und einer Leerküvette ermittelt und diente bei der späteren Auswertung zur Beseitigung der Schwankungen der Detektorempfindlichkeit hervorgerufen durch den Fluoreszenzschirm in der CCD-Kamera
3. Silberbehenat als Referenzstreuer liefert bei Bestrahlung mit Röntgenlicht aufgrund seines periodischen Aufbaus mehrere ringförmige Reflexe unterschiedlicher Größe um den Beamstop, die zur Mittelpunktbestimmung verwendet wurden (Strahllage)
4. Lupolen als geeichter Referenzstreuer dient hier zur Bestimmung der absoluten Intensität

Als Kontrollmessungen wurden zeitaufgelöste Stopped-flow-Experimente mit Enzym ( $F_1$ ATPase und ATP-Synthase) und Puffer durchgeführt. Durch Temperaturvariationen von 13°C bis 20°C wurde der ATP-Hydrolyse-Reaktionszyklus der  $F_1$ ATPase und der ATP-Synthase zeitaufgelöst charakterisiert. Zur Entfernung von Sauerstoff wurden alle Lösungen direkt vor jeder Meßreihe bei 15 Torr 1 Stunde lang entgast. Zusätzlich wurde den Lösungen 10 % Glycerin als Radikalfänger hinzugefügt.

### 2.8.4 Auswertung und Datenanalyse

Die radiale Mittelung der 2D-CCD-Kamerabilder fand in Grenoble am NICE-Cluster der ESRF per Telnet unter UNIX statt. Als Auswerteprogramm wurde ein von Peter Boesecke [90] entwickeltes Programmpaket verwendet. Mit Hilfe von Steuerungs-Makroprogrammen wurden damit die einzelnen zeitaufgelösten CCD- Aufnahmen, bei denen schon die Dunkelmessung abgezogen war, durch folgende Schritte bis hin zu den 1-dimensionalen Daten bearbeitet:

1. flat field –Korrektur (Intensitätsverzerrung hervorgerufen durch Fluoreszenzschirm)
2. absolute Kalibrierung der Intensität
3. Ausmaskierung von nicht benötigten Regionen (Beamstop-Bereich, Kamera-Ränder))
4. radiale Mittelung durch Integration
5. Ausgabe als ASCII-Daten:  $q$  in  $s$  [ $\text{nm}^{-1}$ ] (ohne Fehlerangabe)

Die erhaltenen radial gemittelten 1D-Datensätze der einzelnen zeitaufgelösten Stopped-flow-Experimente („Schüsse“) à 110 Zeitscheiben („frames“) konnten dann per FTP nach Mainz zur endgültigen Auswertung transferiert werden. Von den pro Zeitfenster erhaltenen rohen Streukurven der Proteine in Lösung wurde nun die Streukurve des entsprechenden, aufaddierten Puffers abgezogen. Durch technische Unzulänglichkeiten der CCD-Kamera und Strahlschwankungen, die meistens direkt nach der Injektion auftraten, ergaben sich gelegentlich Abweichungen im Untergrund  $U$  der Streukurven. In diesem Fall wurde der Untergrund mit Hilfe des Porod'schen Gesetzes multiplikativ korrigiert. Es gilt für den Weitwinkelbereich:

$$I(q^4) = (I(q) + U) \cdot q^4 = \text{const} + U \cdot q^4 \quad (\text{Gl. 2.15})$$

Durch Auftragung von  $I(q) \cdot q^4$  gegen  $q^4$  erhält man eine Gerade, aus dessen Steigung sich im Weitwinkelbereich ( $q = 0.1\text{-}0.14 \text{ \AA}^{-1}$ ) der Untergrund  $U$  ergibt. Die Steigung wurde für die aufaddierte Pufferstreuung  $m_{\text{buffer}}$  einmalig ermittelt. Für jedes einzelne zeitaufgelöste Streubild (110 frames) des Proteins wurde ebenfalls die Steigung  $m_{\text{proteine}}$  in dem oben erwähnten Außenbereich bestimmt. Anhand der folgenden Beziehung (Gl. 3.13) wurden die einzelnen Streukurven der Proteine mit Hilfe eines Normierungsfaktors (eckige Klammer) nach Abzug der Pufferstreuung vom Untergrund befreit.

$$I_{\text{proteine}} = [ (1.003 \cdot (1 + m_{\text{buffer}}) / (1 + m_{\text{proteine}}) ) ] - I_{\text{buffer}} \quad (\text{Gl. 2.16})$$

$I_{\text{proteine}}$  = Intensität der Proteinstreukurve

$I_{\text{buffer}}$  = Intensität der Pufferstreukurve

Faktor 1.003 = Empirischer Skalierungsfaktor für den Unterschied in der Intensität von Puffer- und Kapillarenstreuung und in derjenigen von Protein- und Kapillarenstreuung im Porodbereich (gilt speziell bei ATP-Synthase und  $F_1$ -ATPase)

Zur weiteren Auswertung wurde der Streumassenradius  $R_g$  anhand der Guinier-Näherung (Gl. 2.5) abgeschätzt. Dieser Teil der Auswertung, d.h. Abzug der Untergrundes und Bestimmung des Streumassenradius  $R_g$ , konnte mit Hilfe eines Makros (s.Anhang), programmiert mit IGOR PRO [91], für die anfallenden 110 Zeitscheiben automatisiert werden.

Die nach Porod-Normierung resultierenden Streukurven der Proteine wurden nun doppelt-logarithmisch dargestellt. Nebenmaxima und Schultern, die bei einem bestimmten Streuvektor  $q$  in der Streukurve auftraten, wurden anhand der Bragg'schen Beziehung als Abstände  $d$  zwischen getrennten Domänen innerhalb des Proteins interpretiert:

$$d = 2\pi / q \quad (\text{Gl. 2.17})$$

Die Abstandsverteilungsfunktion (Gl. 2.8) der Enzyme wurde durch eine semidirekte Fourier-Transformation der Streukurve ermittelt. „Semidirekt“ heißt, das fehlende Kurventeil der Streukurve im Bereich des Strahlfängers wurde durch die Guinier-Näherung (Gl. 2.5) ergänzt. Mit Hilfe von Igor Pro [91] wurde dieser Teil der Auswertung für 110 Zeitscheiben in Form eines Makros (s.Anhang) automatisiert.

Im Falle der ATP-Synthase, die eine langgestreckte Form besitzt, wurde zusätzlich anhand des Kratky-Plots [81] die Stäbchenlänge  $L$  (Gl. 2.7) des Moleküls analysiert.

## 2.9 Statische Neutronenkleinwinkelstreuung

Die statische Neutronenkleinwinkelstreuung an ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* erfolgte am ILL-Hochflußreaktor (58 MW) in Grenoble (Frankreich) am Institut Max von Laue-Paul Langevin. Das Instrument D22 besitzt den höchsten Neutronenfluß direkt auf der Probe ( $1.2 \cdot 10^8 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), bedingt durch die brillante, horizontale kalte Quelle. Durch einen Geschwindigkeitsselektor kann ein relativ schmaler Wellenlängenbereich von 4-40 Å eingestellt werden. Der optimale Quelle-Proben-Abstand wird durch ein Kollimatorsystem erreicht, das aus 8 Einzelteilen besteht. Die Probemessungen finden in Küvetten der Größe 10-300 mm<sup>2</sup> statt. Das D22-Instrument besitzt den größten 2D-Gasdetektor (<sup>3</sup>He) aller Kleinwinkelstreuanlagen. Der Detektor hat eine aktive Fläche von 96 · 96 cm mit einer Pixelgröße von 7.5 x 7.5 mm. Er kann in einem Detektorrohr (Vakuum) frei bewegt werden, woraus ein Proben-Detektorabstand von 1.35 m to 18 m resultiert. Die D22-Kleinwinkelstreuanlage in Grenoble deckt in Folge dessen einen weiten q-Bereich von 1.5 Å<sup>-1</sup> bei einer Wellenlänge von 2.6 Å und 0.85 Å<sup>-1</sup> bei  $\lambda = 4.6 \text{ Å}$  ab ( $\Delta\lambda / \lambda = 10 \%$ ). Die Datenauswertung erfolgte analog zu der bereits dargestellten Methodik der Röntgenkleinwinkelstreuung direkt vor Ort in Grenoble.

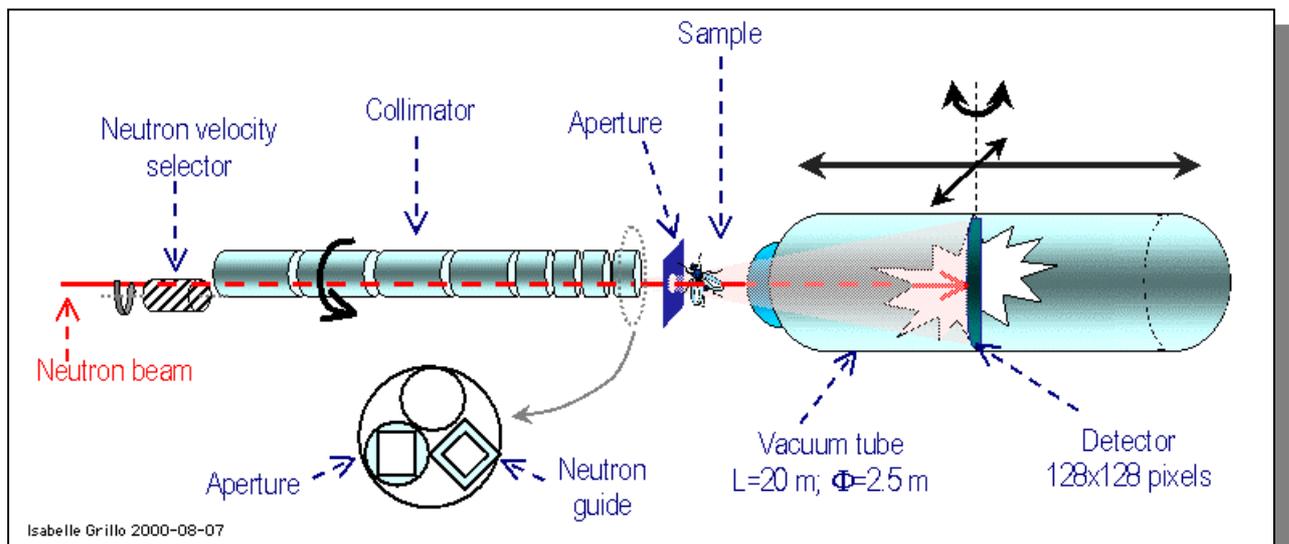


Abbildung 16: Neutronenkleinwinkelstreuanlage D22 am Institut Max von Laue-Paul Langevin in Grenoble, Frankreich [92]

## 2.10 Modellberechnungen

- Zur Interpretation der experimentellen Kleinwinkelstreudaten der Enzyme aus *Micrococcus luteus* wurden Molekülmodellberechnungen herangezogen. Die Molekülmodellberechnungen basierten auf der Finite Volumen Methode (FVM) [93], bei der sich die Proteinuntereinheiten aus einer Sammlung von Würfелеlementen zusammensetzen. Diese können ihrerseits in Subwürfel unterteilt werden. Die Abstandsverteilungen und Streumassenradien der FVM-Modelle wurden mit den Programmen FINEX 3 und KINEX 1.9 [60] mit einem PC unter Windows durchgeführt. Zur Darstellung der FVM-Modelle wurde das Programm DTMM (Desktop Molecular Modeller) verwendet, das die Würfelmodelle in Form von Kugelmodellen darstellt und die Speicherung der Bilder unter Windows zum Transfer in Graphik- und Textverarbeitungsprogramme ermöglichte.
- Zur Ermittlung der theoretischen Kleinwinkelstreu曲ven aus verschiedenen Kristallstrukturen wurde das Programm Multibody [94] verwendet. Dabei wird jedes  $C_{\alpha}$ -Atom der Aminosäurekette einer Kristallstruktur wie eine Kugel mit einem Radius von 3.3 Å behandelt. Durch Superposition der einzelnen Kugeln kann die Streukurve aus den Debye Gleichungen ermittelt werden.

## 2.11 Material

### Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten mindestens p.a. -Qualität. Die Chemikalien und Labormaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich, (Steinheim), Boehringer (Mannheim), Fluka, (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (München)

### Chromatographiematerialien

Das Ionenaustauschermaterial DEAE-Fractogel 650(M) und der Tentakel-Ionenaustauscher Fractogel-EMD-650(M)-DMAE und das dazugehörige Glastuschen- System wurde freundlicherweise von der Firma Merck zur Verfügung gestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Enzympräparationen aus dem Bakterium *Micrococcus luteus*

##### 3.1.1 Reinigung der F<sub>1</sub>-ATPase

Zur Charakterisierung von strukturellen und funktionellen Strukturumwandlungen des Enzyms wurde ein Produkt in hoher Reinheit und großer Menge benötigt. Nach der Ionenaustauschchromatographie wurden nur die Fraktionen vereinigt, die nach elektrophoretischer Untersuchung (Glycin-SDS-Minigelsystem von Biorad) als F<sub>1</sub>-ATPase identifiziert werden konnten. Randfraktionen des Peaks, die wenig Enzym (< 0.1 mg/ml) oder zusätzlich geringe im Gel sichtbare Verunreinigungen (> 5 %) enthielten, wurden als 2. Wahl (Pool B) isoliert. Die allgemeine Verfahrensweise ist am Beispiel der ATP-Synthase (Kapitel 3.1.3., S. 47) genauer erklärt. Zur Überprüfung der Funktionalität des Enzyms wurde im Anschluß die ATP-Hydrolyseaktivität (Kapitel 3.2.1.1) mit CaATP als Substrat bestimmt.

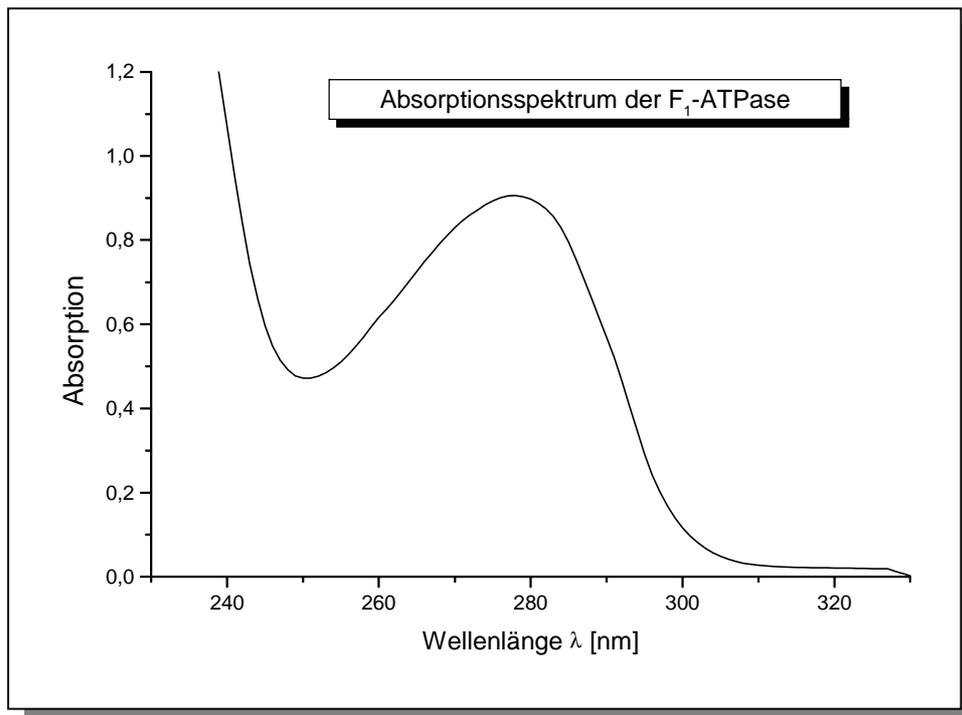
Es ergab sich eine Produktreinheit von >98 % (Pool A) nach SDS-Elektrophorese und Densitometrie, was allerdings eine etwas verminderte Ausbeute zufolge hatte. Aus 250 g Bakterien konnte nach diesem Verfahren typisch 100 mg F<sub>1</sub>-ATPase (Pool A) und 10 mg (Pool B) isoliert werden.

##### 3.1.2 UV-Absorptionsspektrum und Nukleotidgehalt der reinen F<sub>1</sub>-ATPase

Das UV-Absorptionsspektrum der gereinigten F<sub>1</sub>-ATPase ist in Abbildung 17 dargestellt. Durch Vergleich der UV-Spektren des Enzyms mit der Proteinbestimmung nach der BCA-Methode ergab sich ein spezifischer Extinktionskoeffizient von  $E_{280} = 0.65 \text{ cm}^{-1} \text{ ml mg}^{-1}$  ( $\pm 10 \%$ ). Nun konnte nach der Methode von Garret und Penefsky [95] der Nukleotidgehalt des Enzyms ermittelt werden:

$$n = (q - 0.54054) \cdot (M_r \cdot \epsilon' / \epsilon_{\text{ATP}}) \quad (\text{Gl. 3.1})$$

q ist das experimentell ermittelte Absorptionsverhältnis  $E_{260}/E_{280}$ , 0.54054 ist das Verhältnis des nukleotidfreien Enzyms,  $M_r$  das Molekulargewicht,  $\epsilon'$  der spezifische Extinktionskoeffizient der F<sub>1</sub>-ATPase und  $\epsilon_{\text{ATP}}$  der molare Extinktionskoeffizient des Nukleotids. Die Anzahl der im Enzym gebundenen Nukleotidmoleküle betrug bei verschiedenen Präparationen  $n = 2.8 \pm 0.5$ . Man kann annehmen, daß pro Proteinmolekül drei Moleküle Purin-Nukleotid (ATP/ADP+GTP/GDP), vermutlich an den 3 nicht-katalytischen Bindungsstellen, gebunden sind.



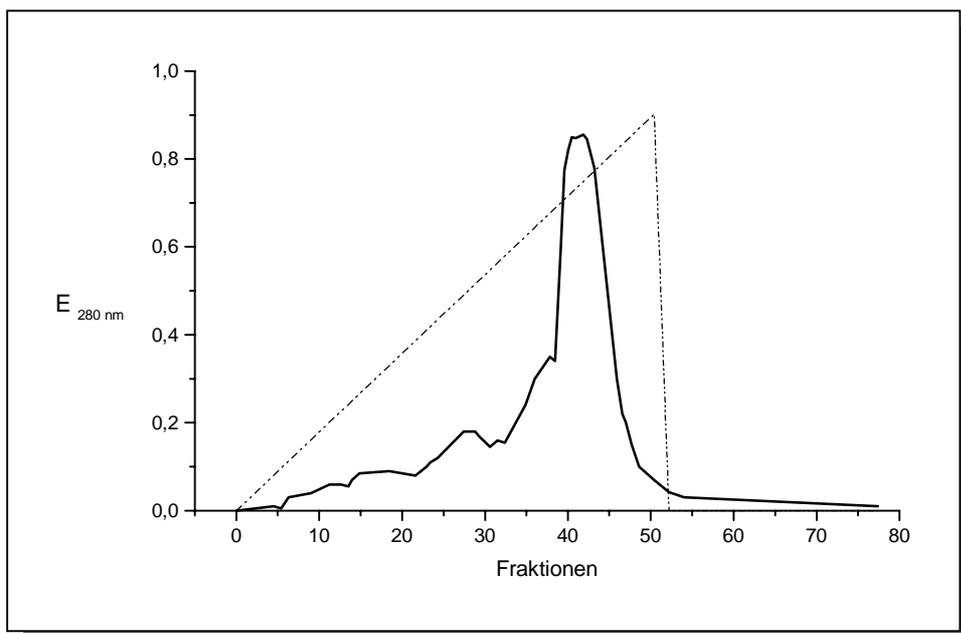
**Abbildung 17:** UV-Absorptionsspektrum der F<sub>1</sub>-ATPase (c = 13.5 mg/ml) in 100 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

### 3.1.3 Reinigung der ATP-Synthase

Die Reinigung der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* nach Extraktion mit CHAPS/Triton X-100 erfolgte durch drei Chromatographieschritte und in Gegenwart von 10 % Glycerin zur Stabilität des Enzyms. Die 1. Ionenaustauschchromatographie in Gegenwart des Detergens Triton RX-100 (reduziert) diente zur Entfernung der Carotinoide (HPLC in 5 h). Die weitere Reinigung des Membranproteins fand durch Ionenaustausch am Tentakelaustauscher DMAE-Fractogel statt (HPLC). Der letzte Schritt wurde hauptsächlich zum Detergenzaustausch von Triton RX-100 gegen die Gallensäure TDOC durch Gelpermeationschromatographie an Superose-6 (FPLC in 12 h) durchgeführt.

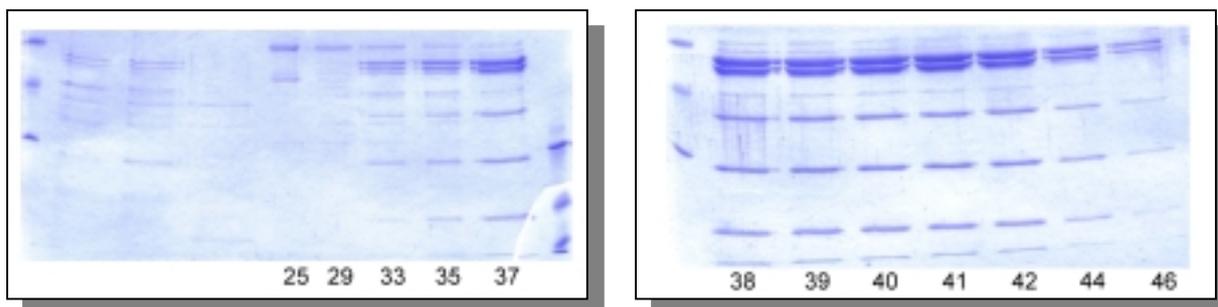
Auch im Falle der ATP-Synthase wurde zur Charakterisierung von strukturellen und funktionellen Strukturumwandlungen ein Produkt in hoher Reinheit und Menge benötigt. Nach jeder einzelnen Chromatographie wurden anhand einer elektrophoretischen Untersuchung (Glycin-SDS-Minigelsystem von Biorad) nur diejenigen Fraktionen vereinigt, die als ATP-Synthase identifiziert werden konnten. Fraktionen, die sehr wenig Enzym (< 0.1 mg/ml) oder zusätzlich geringe im Gel sichtbare Verunreinigungen (> 5 %) enthielten, wurden als 2. Wahl isoliert.

Am Beispiel der 2. Ionenaustauschchromatographie der ATP-Synthase wurde die Prozedur zur Vereinigung der Fraktionen mit Hilfe von Mini-Gelen genauer erläutert. Dieses Verfahren gilt für alle Reinigungsschritte, auch im Falle der  $F_1$ -ATPase. Der Vorteil bei der Verwendung von Mini-Gelen liegt in der sehr schnellen Analyse, d.h. circa 3 Stunden nach Elution des Enzyms liegt das gefärbte Minigel vor. Die ATP-Synthase enthaltenen Fraktionen können direkt vereinigt werden und somit ist ein schnelles Weiterarbeiten zur Schonung des empfindlichen Proteins möglich.



**Abbildung 18: Elutionsprofil der ATP-Synthase bei der Trennung an einem Tentakelaustauscher DMAE-Fractogel-Material mit reduzierten Triton-Puffer (0.1 % RX-100)**

---- Na-Acetat-Gradient (0-1.5 M)

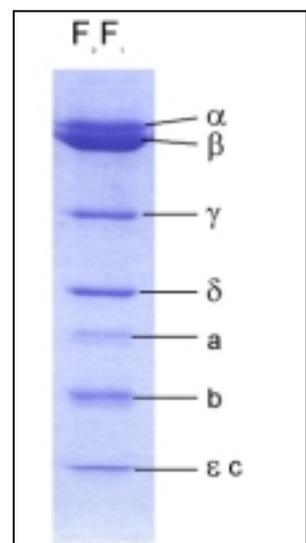


**Abbildung 19: Zwei SDS-Minigele (12 %-Polyacrylamid) zur Charakterisierung der ATP-Synthase enthaltenen Fraktionen 33-46 (2. Ionenaustauschchromatographie)**

In Abbildung 18 ist das Elutionsprofil der 2. Ionenaustauschchromatographie der ATP-Synthase dargestellt. Wenn man das Elutionsprofil mit den entsprechenden Fraktionen im Mini-Gel (Abb. 19)

vergleicht, befindet sich die ATP-Synthase mit ihren Untereinheiten,  $\alpha : \beta : \gamma : \delta : a : b : \epsilon : c$ , in den Fraktionen 33-46. Bei der Herstellung des Mini-Gels wurde in jede Geltasche dasselbe Volumen der einzelnen Fraktionen aufgetragen, so konnte direkt die Konzentration der Probe abgeschätzt werden. Die Untereinheiten  $\epsilon$  und  $c$  laufen mit der Front und sind in einem Trenngel mit 12 %-Polyacrylamid nicht einzeln aufgetrennt. Vereinigt wurden nach dieser Chromatographie die Fraktionen 38-41 als Pool 1, 42-46 als Pool 2 und 33-37 als Pool 3, die einzeln weiterverarbeitet wurden. Die Hauptverunreinigung hier waren Cytochrom-Oxidase (Cytochrom-c- und Chinoloxidase) und Aggregate bzw. Membranfragmente höherer Masse, die jedoch in der anschließenden Gelpermeationchromatographie zum größten Teil von der ATP-Synthase abgetrennt werden konnten. Typische Ausbeuten nach der 2. Ionenaustauschchromatographie waren 160 mg ATP-Synthase bei Verwendung von 200 g Bakterien als Ausgangsmaterial.

Abbildung 20 zeigt das Endprodukt der ATP-Synthase, das nach der Gelpermeationchromatographie des Pool 1 aufkonzentriert wurde. Sichtbar ist sogar die hydrophobe a-Untereinheit des  $F_0$ -Teils der ATP-Synthase aufgrund der erhöhten, aufgetragenen Proteinmenge (nicht-lineares Färbeverhalten). Es ergab sich am Präparationsende der ATP-Synthase eine Produktreinheit von  $\sim 98\%$ , was allerdings eine verminderte Ausbeute zufolge hatte. Aus insgesamt 200 g Bakterien konnte nach diesem Verfahren in zwei Subpräparationen je 30 mg (Pool A) und je 10 mg (Pool B) ATP-Synthase isoliert werden. Die Funktionalität der ATP-Synthase wurde im Anschluß durch Messung der ATP-Hydrolyseaktivität mit MgATP als Substrat und durch Messung der ATP-Syntheseaktivität des Enzyms überprüft. (Kapitel 3.2.1)



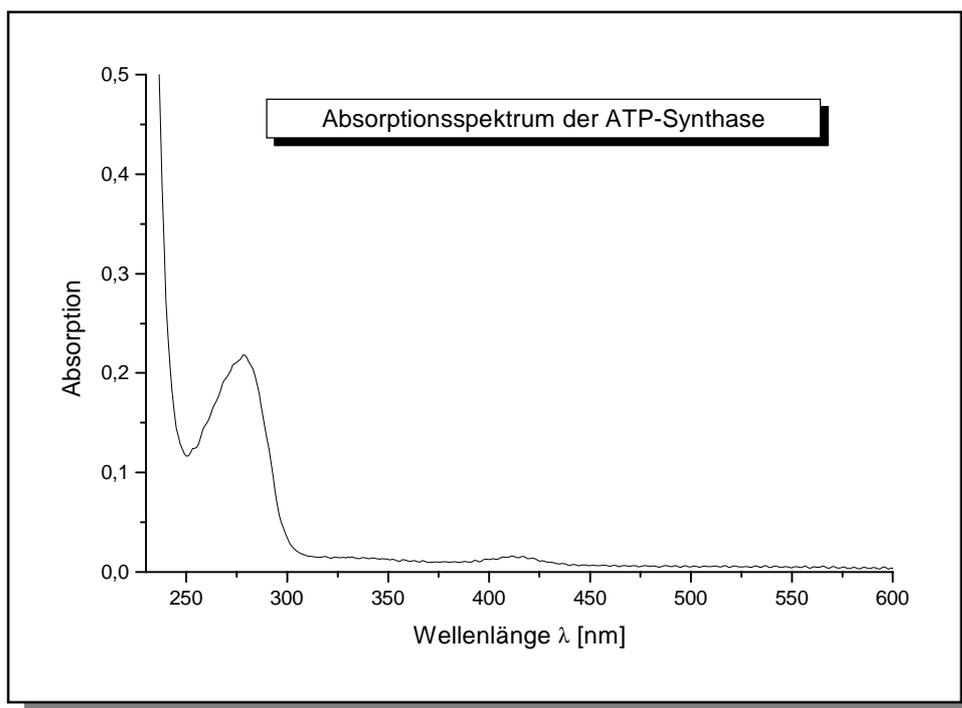
**Abbildung 20:** SDS-Gel zur Charakterisierung der gereinigten ATP-Synthase (Endprodukt in TDOC-Puffer)

### 3.1.4 UV-Absorptionsspektrum und Nukleotidgehalt der reinen ATP-Synthase

Das UV-Absorptionsspektrum der ATP-Synthase nach Reinigung durch Gelpermeationchromatographie ist in Abbildung 21 dargestellt. Im Falle der ATP-Synthase ergab sich zusammen mit der Proteinbestimmung nach der BCA-Methode [72] ein spezifischer Extinktionskoeffizient von  $E_{280} = 0.511 \text{ cm}^{-1} \text{ ml mg}^{-1}$  ( $\pm 10\%$ ). Nun konnte nach der Methode von Garret und Penefsky [95] der Nukleotidgehalt des Enzyms ermittelt werden:

$$n = (q - 0.54054) \cdot (M_r \cdot \epsilon' / \epsilon_{\text{ATP}}) \quad (\text{Gl. 3.2})$$

$q$  ist das experimentell ermittelte Absorptionsverhältnis  $E_{260}/E_{280}$ , 0.54054 ist das Verhältnis des nukleotidfreien Enzyms,  $M_r$  das Molekulargewicht,  $\epsilon'$  der spezifische Extinktionskoeffizient der  $F_1$ -ATPase und  $\epsilon_{\text{ATP}}$  der molare Extinktionskoeffizient des Nukleotids. Die Anzahl der im Enzym gebundenen Nukleotidmoleküle betrug bei verschiedenen Enzympräparaten  $n = 2.66 \pm 0.5$ . Man kann annehmen, daß pro Proteinmolekül drei Moleküle Purin-Nukleotid (ATP/ADP+GTP/GDP), vermutlich an den 3 nicht-katalytischen Bindungsstellen, gebunden sind.



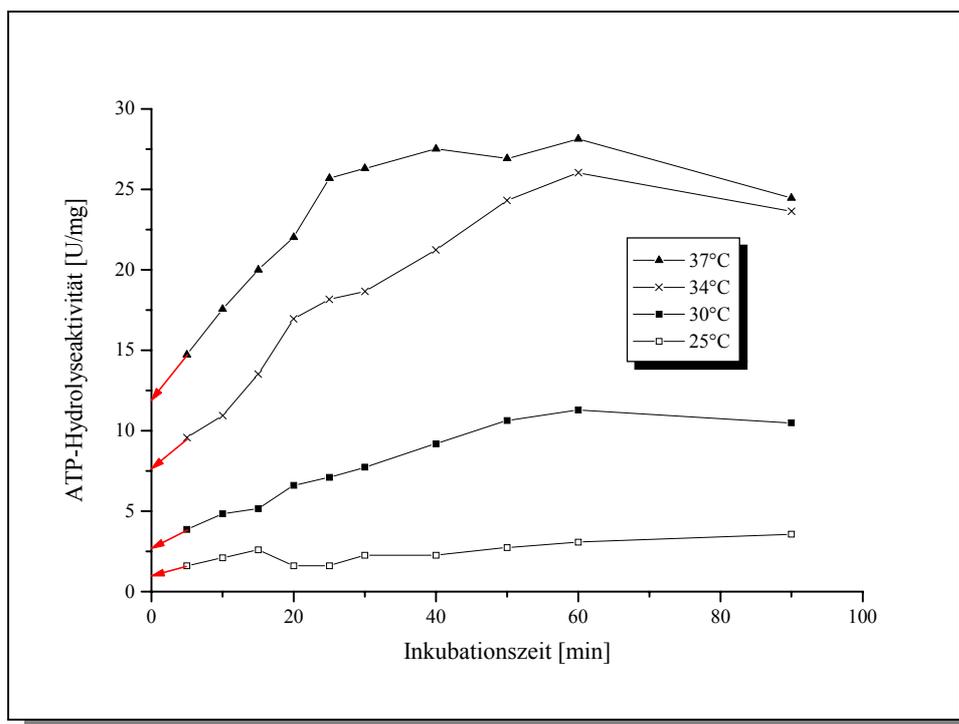
**Abbildung 21: UV-Absorptionsspektrum der ATP-Synthase ( $c = 4.1 \text{ mg/ml}$ ) in TDOC-Puffer (5mM) pH = 7.5, 10 % Glycerin**

Die vernachlässigbare Absorption bei 311-600 nm zeigt die Abtrennung der Cytochrom-Enzyme und der NADH-Dehydrogenase

## 3.2 Enzymatische Untersuchungen

### 3.2.1 ATP-Hydrolyseaktivität der F<sub>1</sub>-ATPase

Nach der Aufreinigung zeigt die F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* die schon bekannte Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität von der Temperatur und der Inkubationszeit nach Verdünnung mit temperierten 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH=8) auf eine Konzentration von 0.2 mg/l. Das folgende Diagramm zeigt bis 40°C einen Anstieg der Aktivität mit der Inkubationszeit. Dieses Verhalten ist auf die Dissoziation der inhibitorischen  $\delta$ -Untereinheit des Enzyms zurückzuführen. Oberhalb einer Temperatur von 40°C findet eine thermische Denaturierung des Enzyms statt (nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dissoziation als Indikator für die kinetische Integrität des Enzyms bestimmt. Geschädigtes Protein zeigt eine veränderte Aktivierungskinetik und /oder eine reduzierte spezifische Aktivität im Dissoziationsgleichgewicht ( $t \sim 60$  min).

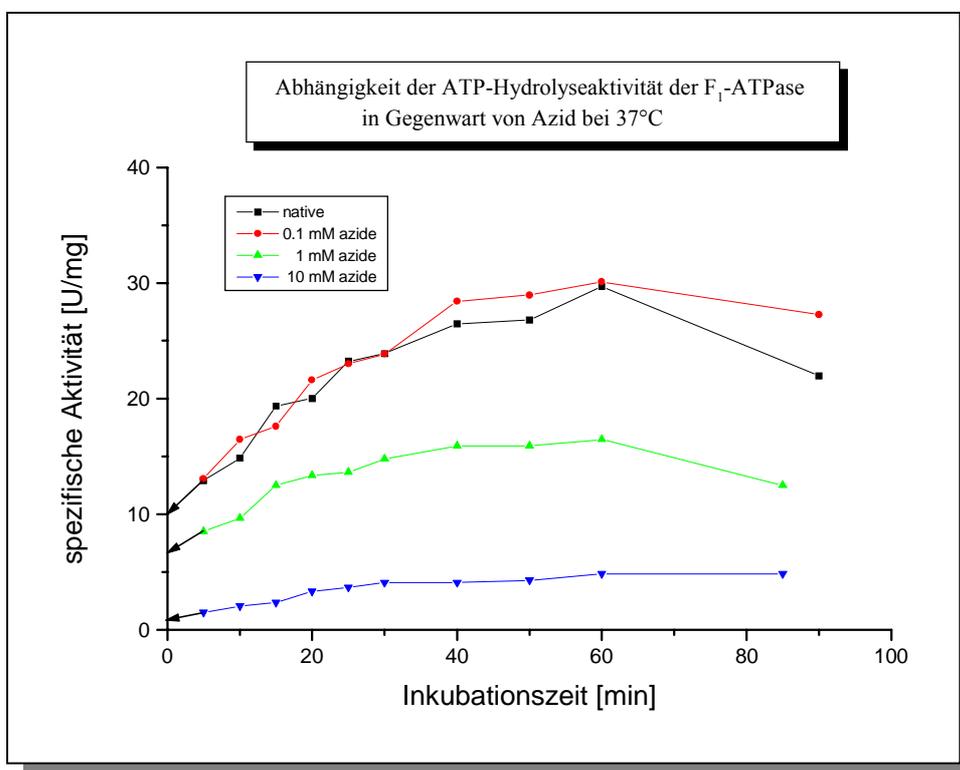


**Abbildung 22: Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* von der Inkubationszeit in 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH = 8) und der Temperatur**

Zum Startzeitpunkt wurde die Stammlösung (10 g/l) auf eine Konzentration von 0.2 mg/l verdünnt. Die ATP-Hydrolyse wurde nach der angegebenen Inkubationszeit durch Zugabe von 1 mM CaATP (5:1) ausgelöst. Der typische Meßfehler einer Einzelmessung liegt bei 5-10 % der ATP-Hydrolyseaktivität.

### 3.2.2 Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Hydrolyseaktivität der $F_1$ -ATPase

Die Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität der  $F_1$ -ATPase in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an Azid als kooperativer Inhibitor ist in der folgenden Abbildung gezeigt. Während bei einer geringen Konzentration von 0.1 mM Azid kein wesentlicher Unterschied zur Inkubationsreihe der nativen  $F_1$ -ATPase bei einer Temperatur von 37°C zu erkennen ist, nimmt die spezifische Aktivität der  $F_1$ -ATPase bei weiterer Zugabe von Azid schrittweise ab. Bei einer Konzentration von 10 mM Azid ist nur noch ein sechstel der ursprünglichen spezifischen Hydrolyseaktivität der  $F_1$ -ATPase vorhanden.



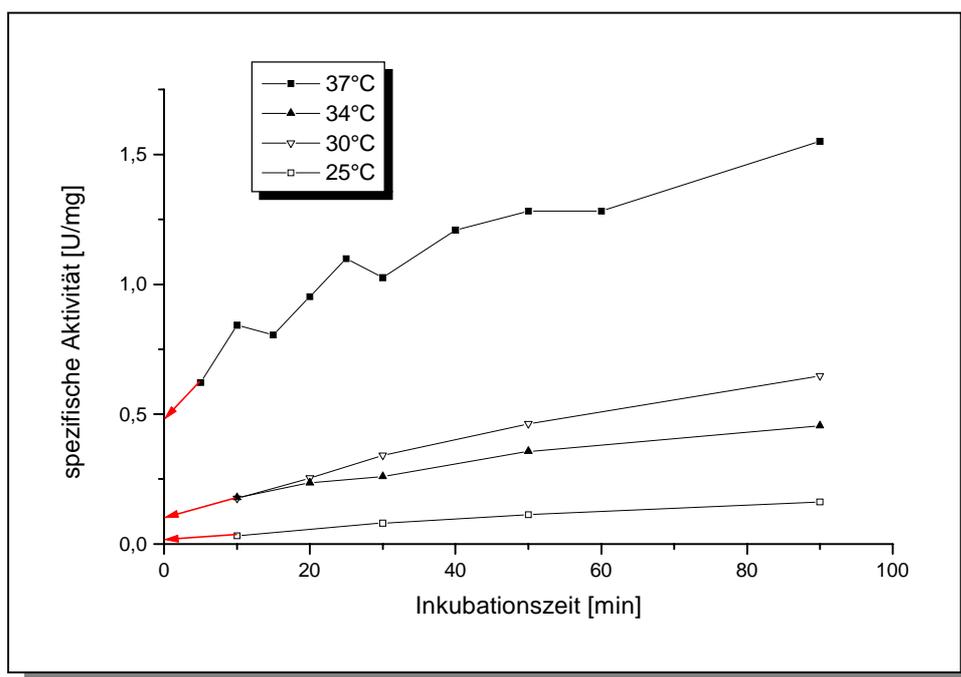
**Abbildung 23: Einfluß des kooperativen Inhibitors Azid auf die ATP-Hydrolyseaktivität der  $F_1$ -ATPase nach Verdünnung von 10 g/l auf 0.2 mg/l**

Die  $F_1$ -ATPase wurde von 10 g/l auf 0.2 mg/l in 100 mM Tris/HCl (pH=8) mit unterschiedlichem Gehalt an Azid verdünnt. Die ATP-Hydrolyse wurde nach der angegebenen Inkubationszeit durch Zugabe von 1 mM CaATP (5:1) ausgelöst. Der typische Meßfehler einer Einzelmessung beträgt 5-10 % der ATP-Hydrolyseaktivität.

### 3.2.3 ATP-Hydrolyseaktivität der ATP-Synthase

Die Temperaturabhängigkeit der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* war nur teilweise bekannt [71,96]. Die spezifische Aktivitäten der  $F_1$ -ATPase-freien ATP-Synthase stiegen mit Zunahme der Temperatur und der Inkubationszeit stetig an. Bei einer Temperatur von 37°C betrug die spezifische Hydrolyseaktivität im Fall der reinen ATP-Synthase nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten nur 1.5 U/mg.

Anhand der Steigung des Arrhenius-Plots für diese vier verschiedenen Temperaturen und der spezifischen Aktivitäten ergab sich eine Aktivierungsenergie von 277 kJ/mol  $\pm$  3 % für die ATP-Hydrolyse der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus*. Aus der Reaktionsrate je Molekül ATP-Synthase und Sekunde ( $k_{\text{kat}}$ ) von 8 s<sup>-1</sup> folgte bei einer Temperatur von 20 °C eine Dauer des Reaktionszyklus von circa  $\tau = 20$  s.

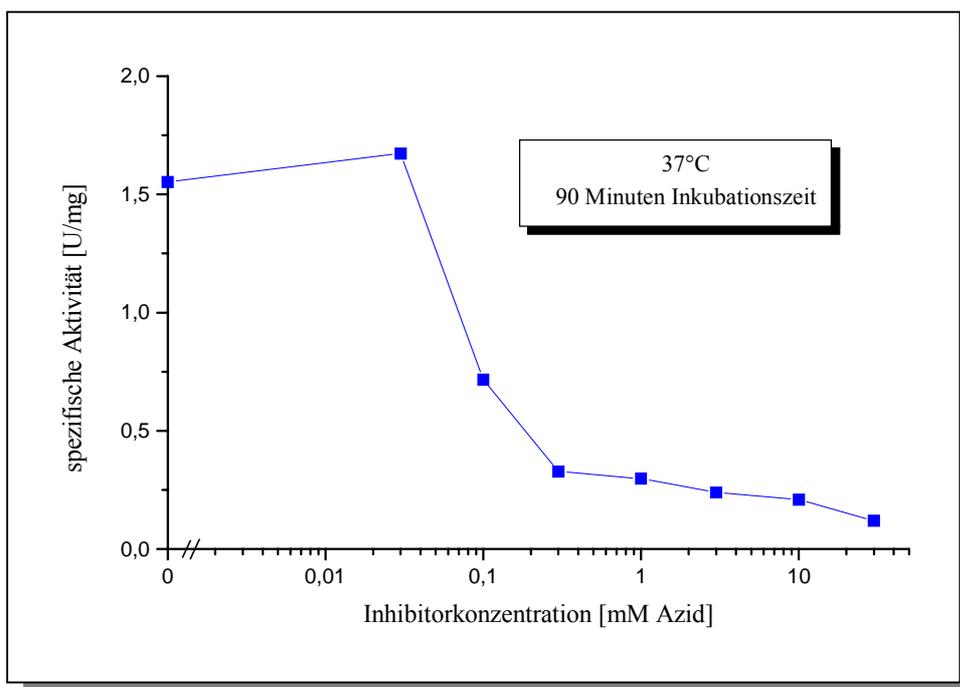


**Abbildung 24: Effekt der Temperatur und Inkubationszeit auf die ATP-Hydrolyseaktivität der ATP-Synthase**

Die ATP-Synthase wurde von 5 g/l auf eine Konzentration vom 4 mg/l verdünnt und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Das Enzym wurde im Aktivitätstest mit Substrat 1 mM MgATP (1:1) gesättigt. Der Meßfehler einer Einzelmessung beträgt 5-10 % der ATP-Hydrolyseaktivität.

### 3.2.4 Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Hydrolyseaktivität der ATP-Synthase

Die spezifische Hydrolyseaktivität der nativen ATP-Synthase betrug bei einer Temperatur von 37°C nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten 1.5 U/mg. Der Einfluß von Azid auf die spezifische Hydrolyseaktivität der Inhibitorprotein-freien ATP-Synthase bei einer Temperatur von 37°C nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten ist in Abbildung 25 dargestellt. Die spezifische Aktivität der ATP-Synthase nahm bei einer Azid-Konzentration von 0.1 mM drastisch ab. Die spezifische Aktivität erreichte ein konstant niedriges Niveau und betrug im Bereich der Unisite-Katalyse (1 mM Azid) [68] nur noch 10-19 % des nativen Zustandes.

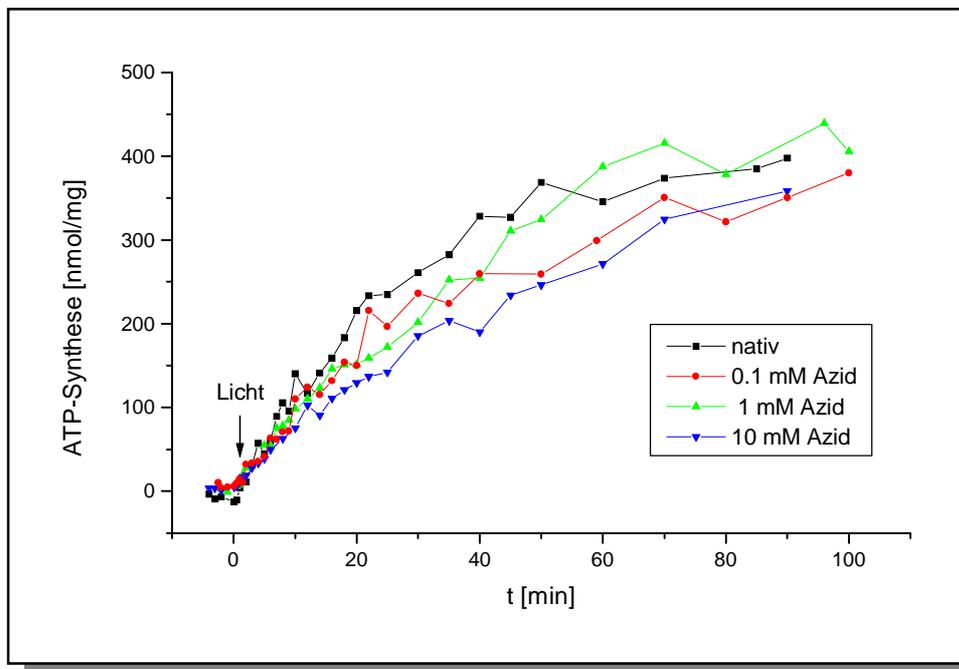


**Abbildung 25: Einfluß des kooperativen Inhibitors Azid auf die ATP-Hydrolyseaktivität der Inhibitorprotein-freien ATP-Synthase nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten**

Die ATP-Synthase wurde von 5 g/l auf eine Konzentration von 4 mg/l in 100 mM Tris/HCl (pH=8) mit unterschiedlichem Gehalt an Azid verdünnt und bei 37°C 90 Minuten inkubiert. Die ATP-Hydrolyse wurde im Aktivitätstest durch Zugabe von 1 mM MgATP (1:1) als Substrat ausgelöst.

### 3.2.5 Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Syntheseaktivität der ATP-Synthase

Die Fähigkeit der in Liposomen rekonstituierten ATP-Synthase aus ADP und Phosphat ATP zu synthetisieren, war das entscheidende Kriterium dafür, daß das beschriebene Präparationsverfahren zu einem strukturell und funktionell intaktem Enzym führte. Dazu wurden Studien mit einem ko-rekonstituiertem System, bestehend aus ATP-Synthase, monomerem Bakteriorhodopsin (mBR) und SBL-Liposomen (1:1:20) bei 30°C durchgeführt. Die mit Licht (505-590 nm) angeregte Protonenpumpe mBR baute eine elektrochemische Protonenpotentialdifferenz an der Lipidmembran auf. Dieses Potential wird von der ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt, wobei gleichzeitig Protonen von innen nach außen transportiert werden. Die Quantifizierung des synthetisierten ATP erfolgte durch die freigesetzten Photonen der Luciferin/Luciferase-Reaktion.



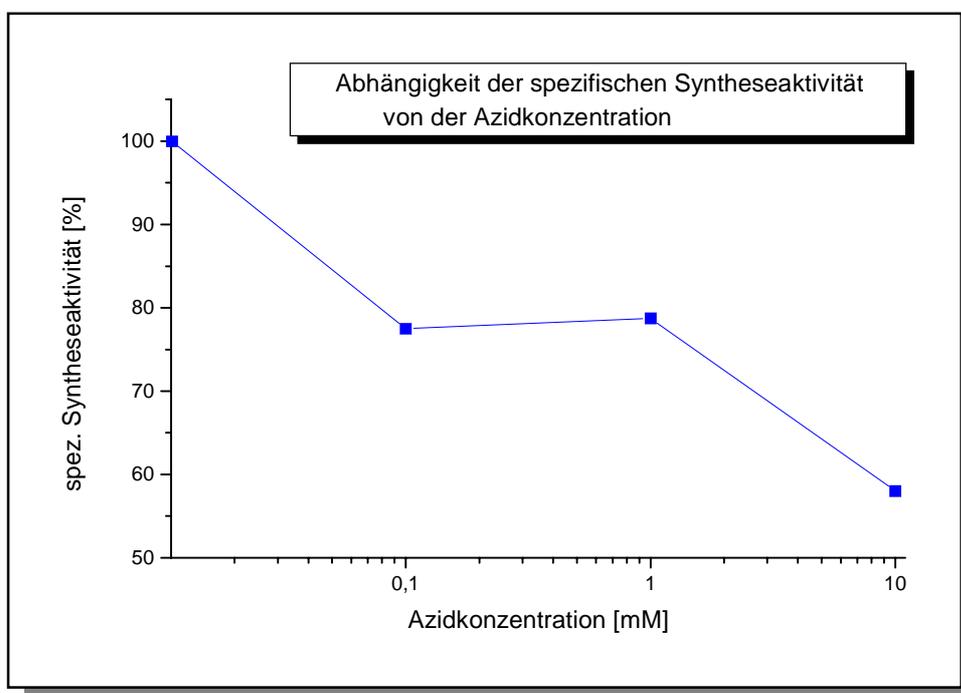
**Abbildung 26: Einfluß von Azid auf die lichtgetriebene ATP-Synthesereaktion der ATP-Synthase in Proteoliposomen mit monomeren Bakteriorhodopsin**

ATP-Synthase (14 µg/ml) wurde mit mBR und SBL-Liposomen in einem Verhältnis von 1:1:20 ko-rekonstituiert. Die Membranenergetisierung erfolgte durch Licht der Wellenlänge 505-590 nm (600 mW/cm<sup>2</sup>) bei 30°C. Die Meßansätze mit Azid wurden zuvor eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Abbildung 26 zeigt die lichtgetriebene ATP-Synthese der nativen lipidgebundenen ATP-Synthase und den Einfluß von Azid als kooperativer Inhibitor auf die ATP-Syntheseaktivität der ATP-Synthase. Die ATP-Synthesereaktion der nativen ATP-Synthase zeigt das schon bekannte

Verhalten [71]. Nach Aktivierung mit Licht (Zeitpunkt  $t = 0$ ) und Aufbau der Potentialdifferenz setzt die ATP-Synthese ein. Anhand der Anfangssteigung der Synthesekurve läßt sich die spezifische Syntheseaktivität ( $10.78 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min} \pm 3 \%$ ) bestimmen. Für das gezeigte Experiment betrug die maximale ATP-Konzentration im Synthesegleichgewicht für die native ATP-Synthase  $0.82 \text{ mM}$  bei einer anfänglichen Substratkonzentration von  $1 \text{ mM ADP}$ . Dieser Teil des Experiments zeigte, daß das Enzym während der Präparation nicht beschädigt wurde.

Die ATP-Synthesereaktion wird nach Aktivierung mit Licht mit steigender Azidkonzentration gehemmt. Die Abbildung 27 zeigt die spezifische Syntheseaktivität in Abhängigkeit der Azidkonzentration. Während bei einer Konzentration von  $0.1 - 1 \text{ mM}$  Azid die spezifische Syntheseaktivität noch  $78 \%$  der nativen Syntheseaktivität betrug, war bei weiterer Erhöhung der Azidkonzentration nur noch  $58 \%$  der Aktivität meßbar.



**Abbildung 27: Spezifische Syntheseaktivität der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in Abhängigkeit der Azidkonzentration (100 % =  $10.78 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min}$ )**

### 3.3 Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase und ihres F<sub>1</sub>-Fragmentes

#### 3.3.1 Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der F<sub>1</sub>-ATPase

Die statische Kleinwinkelstreckurve des F<sub>1</sub>- Fragmentes der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* war durch Vorarbeiten in ihrem ungefähren Verlauf bekannt [60]. Die Abbildung 28 zeigt die Röntgenkleinwinkelstreuung des Enzyms in hoher Auflösung nach Experimenten am JUSIFA –Instrument am DESY-HASYLAB in Hamburg. Die Streukurve ist bis zu einem Fehler von  $5 \cdot 10^{-4} \cdot I(0)$  aufgelöst und zeigt eine Reihe von signifikanten Nebenmaxima (1-4). Die Position des Nebenmaximums  $q_s$  repräsentiert den Abstand  $d$  der Untereinheiten innerhalb des hohlen Proteins über die Bragg'sche Beziehung  $d = 2\pi/q$ , wobei  $q$  der Streuvektor ist, definiert durch  $q = 4\pi/\lambda \sin(\theta/2)$ . So korrespondiert das 1. Nebenmaximum bei  $q = 0.11 \text{ \AA}^{-1}$  mit einem Abstand von  $57 \text{ \AA}$ . Nach molekularer Modellierung ist dies der Abstand zwischen den beiden großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  im Enzymkomplex. Das Doppelmaximum in der Streukurve (2,3) weist auf die Präsenz unterschiedlicher Abstände der großen Untereinheiten im Molekülkomplex hin. Die weitere Auswertung des Streuprofiles durch die Guinier-Näherung ergab einen Streumassenradius von  $R_g = 45.0 \pm 0.2 \text{ \AA}$ .

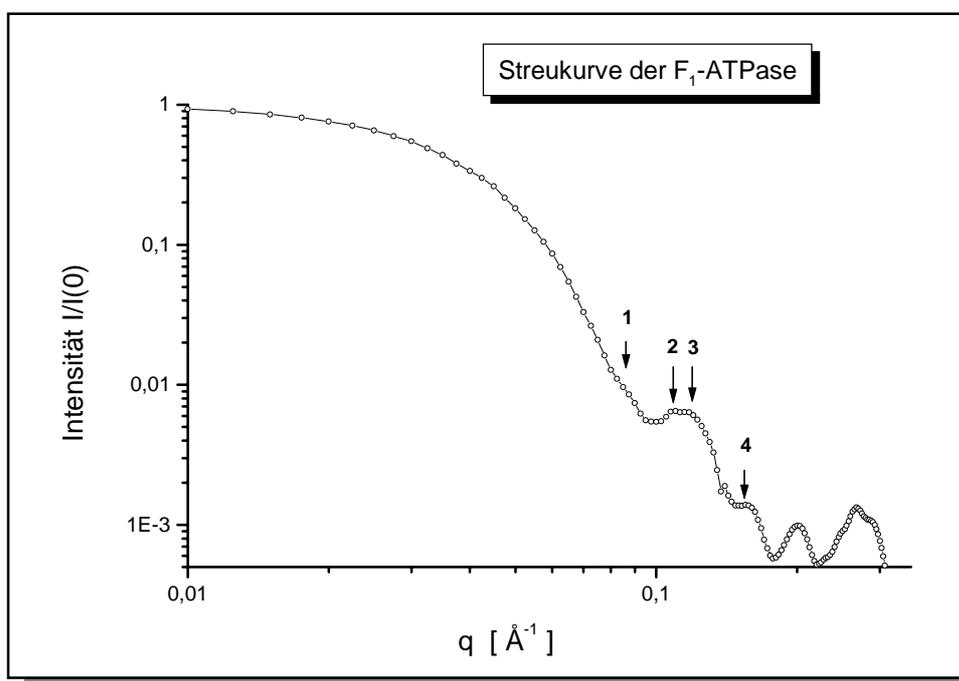
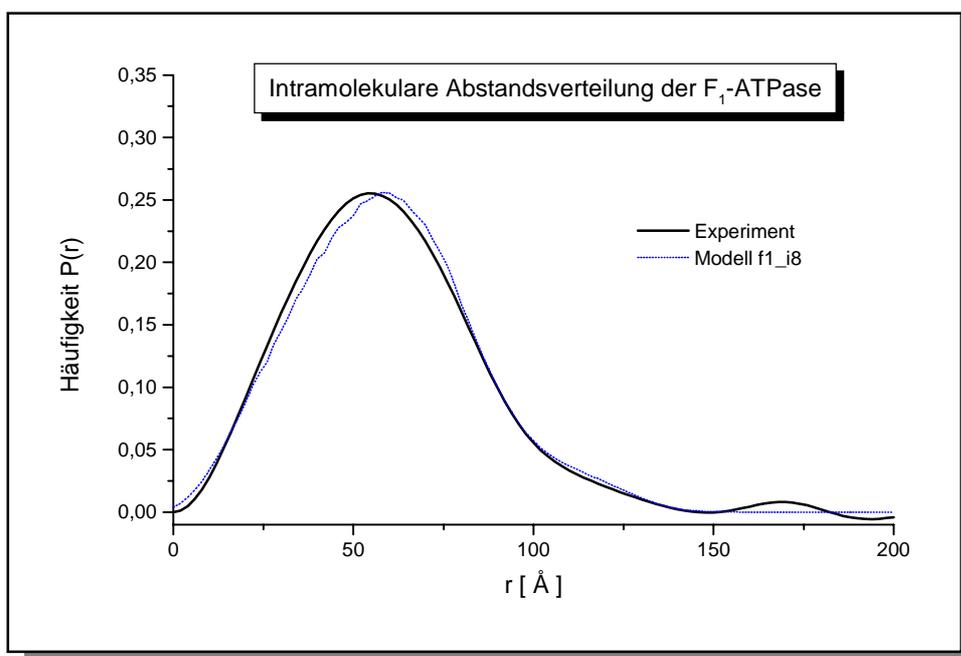


Abbildung 28: Röntgenkleinwinkelstreuung des F<sub>1</sub>-Fragmentes der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in Lösung ( 10 g/l, pH=8, 20 % Glycerin)

Die Teilprofile beider Detektorabstände (1m, 3.6m) wurden miteinander kombiniert. Der Untergrund wurde mit Hilfe des Porod'schen Gesetz skaliert und anhand der Pufferstreuung abgezogen und eine Interpolation der experimentellen Daten durchgeführt.

Die semidirekte Fourier-Transformation der Streukurve (Ergänzung der fehlenden Kurventeile für  $q < 0.03 \text{ \AA}^{-1}$  und  $q > 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ ) ergab die in Abbildung 29 gezeigte intramolekulare Abstandsverteilung des Proteins mit zwei sichtbaren Extrema. Der häufigste Atomabstand im Molekül betrug  $55 \text{ \AA}$ , das dem Maximum der  $P(r)$ -Kurve entspricht. Die Extrapolation für große Abstände ergab die schon früher ermittelte maximale Dimension  $r_{\text{max}1} = 107 \text{ \AA} \pm 2 \text{ \AA}$ . Nach dem Kurvenausläufer läßt sich eine um  $33 \text{ \AA}$  aus dem Molekül herausstehende kleinere Domäne postulieren, die somit zu einer maximalen Moleküldimension der  $F_1$ -ATPase von  $r_{\text{max}2} = 140 \text{ \AA} \pm 5 \text{ \AA}$  führt. Die Signifikanz dieses Ergebnisses wird durch den flachen Verlauf der Abstandsverteilung im Bereich  $r = 100 \text{ \AA}$  bis  $150 \text{ \AA}$  belegt.



**Abbildung 29: Intramolekulare Abstandsverteilung der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* mit sichtbaren Extrema bei  $107 \text{ \AA}$  und  $140 \text{ \AA}$**

### 3.3.2 Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase

Die ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* wurde in Gegenwart von Detergenzien in reiner, homodisperser Form (98 %) gewonnen. Die Strukturuntersuchung des Membranproteins fand in Abwesenheit von Lipiden in Gegenwart des Detergenz Taurodesoxycholat (TDOC) statt. Der schwache Streubeitrag der Mizellen aus TDOC kann durch Subtraktion der Puffer-Referenzkurve vollständig eliminiert werden, da die Mizellen eine extrem geringe Masse besitzen (Tetramer;  $M = 2100$  g/mol). Die Röntgenkleinwinkelstreucurve der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in Gegenwart von 5 mM TDOC und 10 % Glycerin (Radikalfänger und Proteinstabilisator), aufgenommen am JUSIFA-Instrument des HASYLAB in Hamburg, ist in Abbildung 30 dargestellt (Meßzeit:  $4 \cdot 3$ h incl. Puffer).

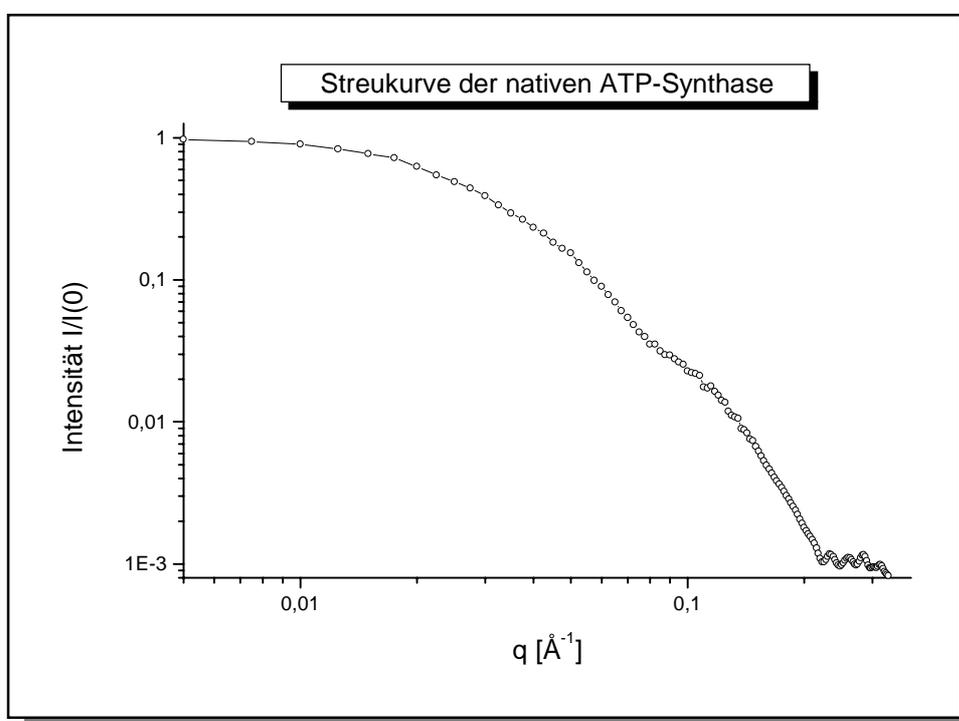
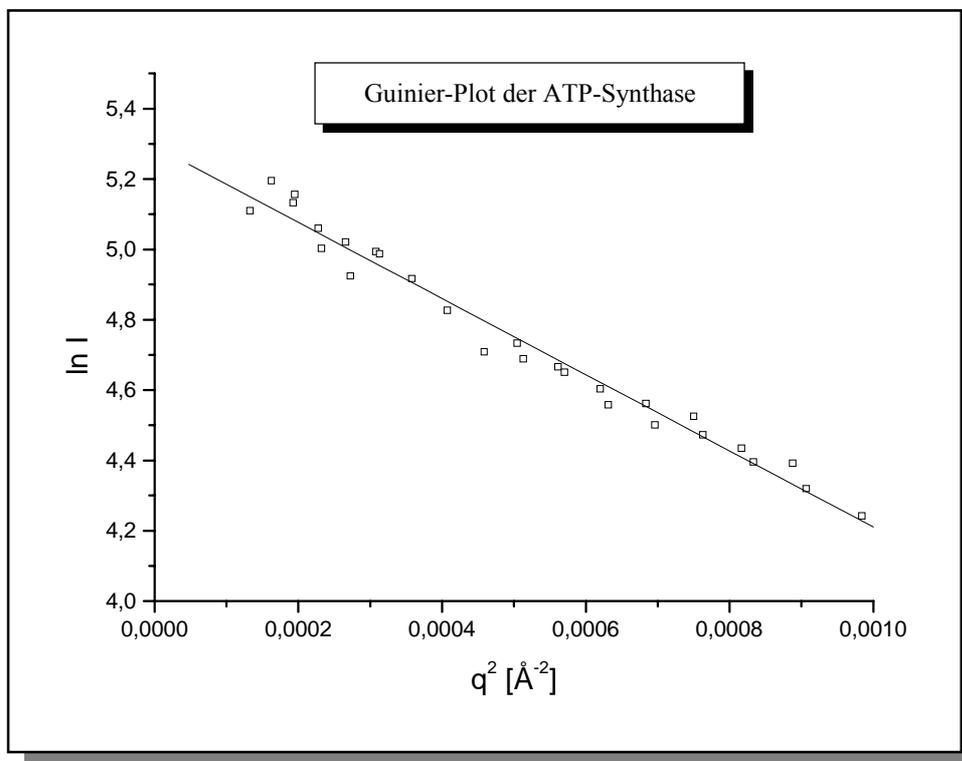


Abbildung 30: Röntgenkleinwinkelstreuung der nativen ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (5 g/l in 5 mM TDOC, 10% Glycerin, 50 mM Tris-Ac, pH =7.5)

Die Streukurve zeigte eine verwaschene Mehrfachschulter bei  $q = 0.11 \text{ \AA}^{-1}$ , hervorgerufen durch den zusätzlichen membranständigen  $F_0$ -Teil im Enzym. Die Guinier-Näherung (Abbildung 31) ergab einen Streumassenradius von  $R_g = 57.0 \text{ \AA} \pm 0.85 \text{ \AA}$  anhand der Steigung  $m$  durch folgende Beziehung  $R_g = \sqrt{3 \cdot m}$ . Das Enzympräparat war außerdem aggregatfrei. Die intramolekulare Abstandverteilung der ATP-Synthase (Abb.36, S.64) zeigt durch seine Extrema eine ausgeprägte Strukturie-

zung des Moleküls eine Gliederung des Moleküls in 2 große Domänen an. Die Extrapolation der Abstandsverteilung führte zu einer maximalen Moleküldimension von  $r_{\text{max}} = 200 \text{ \AA} \pm 5 \text{ \AA}$ .

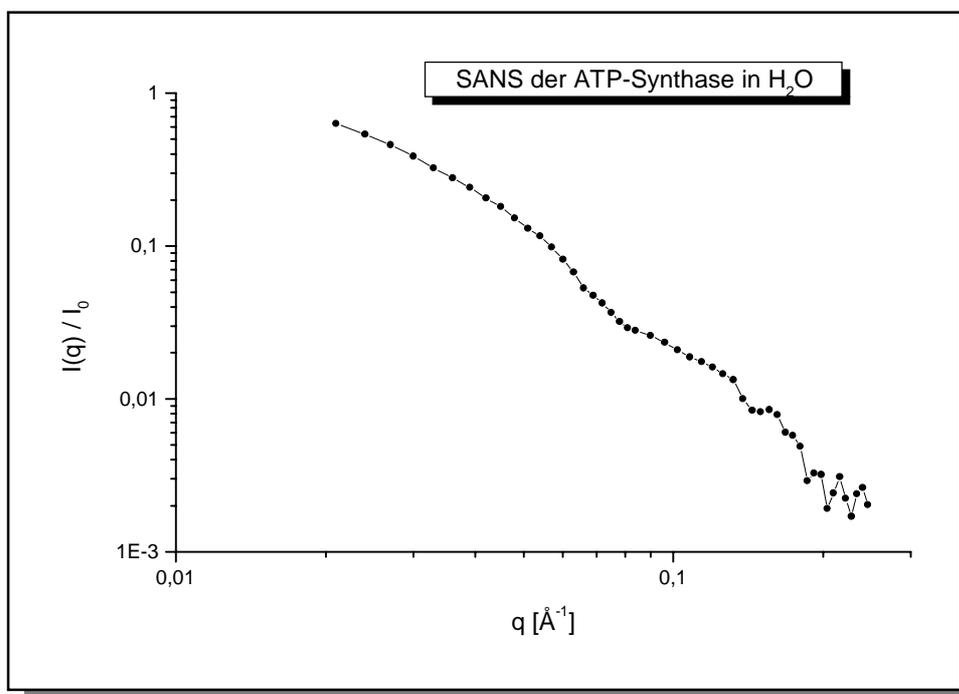


**Abbildung 31:** Die Guinier-Auftragung der Röntgenkleinwinkelstreuung der nativen ATP-Synthase (5 g/l) ergibt einen Gyrationradius von  $56.98 \pm 0.85 \text{ \AA}$  im Bereich von  $q^2 = 1.34E^{-4}$  bis  $0.001 \text{ \AA}^{-2}$

### 3.3.3 Statische Neutronenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase

Abbildung 32 zeigt das Neutronenstreuprofil der ATP-Synthase in  $\text{H}_2\text{O}$  und die entsprechende Guinier-Darstellung, aufgenommen am ILL-Neutronenreaktor der D22- Anlage bei einer Meßzeit von je 1 Stunde in einer 1mm- Küvette bei einem Detektorabstand von 2 Metern. Das Streubild der statischen Neutronenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in  $\text{H}_2\text{O}$  ähnelt der Streukurve der Röntgenkleinwinkelstreuung desselben Proteins. Der Streumassenradius der ATP-Synthase beträgt  $56.43 \text{ \AA} \pm 0.77 \text{ \AA}$  im Bereich von  $q^2 = 4.41 \text{ E}^{-4}$  bis  $0.001 \text{ \AA}^{-2}$ . Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Daten der Röntgenkleinwinkelstreuung. Die Messung der ATP-Synthase (4 g/l in 50 mM Tris-Ac, pH = 7.5) fand in Gegenwart von 5 mM TDOC und 10 % Glycerin statt und zeigte im Streubild die charakteristische verwaschene Mehrfachschulter bei einem Impulsübertrag von  $0.11 \text{ \AA}^{-1}$ .

Bei der Untersuchung zur Kontrastvariation der ATP-Synthase zeigte sich bei Erhöhung des D<sub>2</sub>O-Lösungsmittelgehaltes eine zunehmende Aggregation des Proteins. Dadurch kam es bei der Bestimmung des Gyrationradius zu erheblichen Problemen, so daß speziell bei einer Konzentration von 100 %-D<sub>2</sub>O keine Auswertung mehr möglich war.



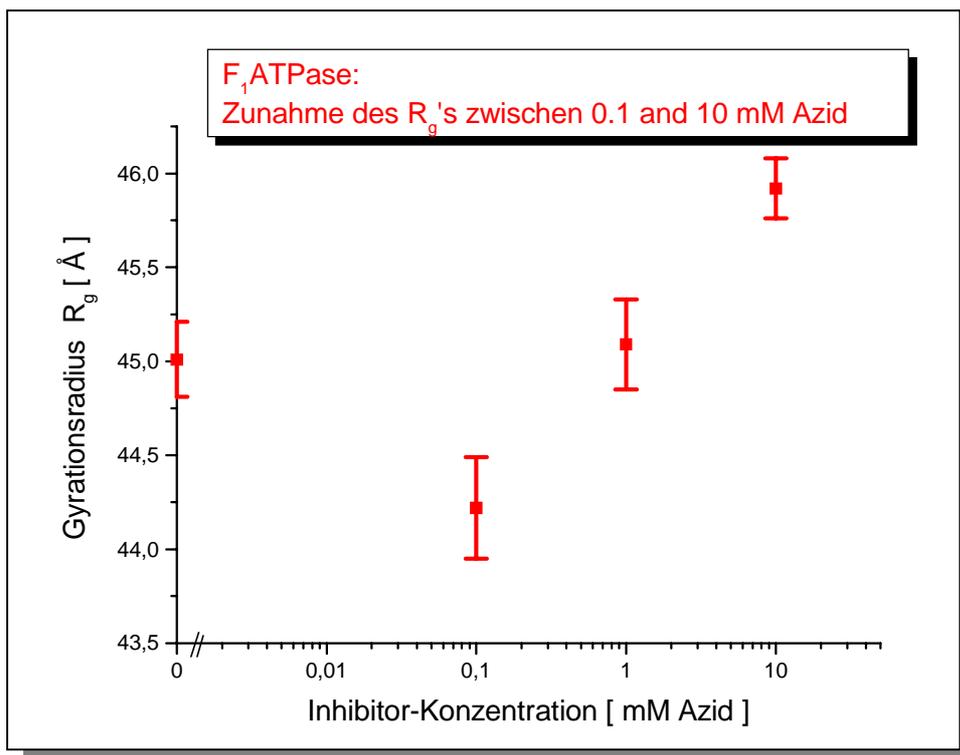
**Abbildung 32: Neutronenkleinwinkelstreuung der nativen ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (4 g/l in 5 mM TDOC, 50 mM Tris-Ac, pH =7.5, 10% Glycerin) in H<sub>2</sub>O**

### 3.3.4 Einfluß von Inhibitoren auf die Struktur der ATP-Synthase und ihres F<sub>1</sub>-Fragments

Azid ist ein bekannter Inhibitor der funktionellen Kooperativität bei ATP-Synthasen [68]. In einer Menge von 1 mM hemmt es auch bei ATP-Synthasen aus *Micrococcus luteus* die kooperative Katalyse am Multidomänen-Enzym (Multisite-Katalyse). Bei der F<sub>1</sub>-ATPase aus *E.coli* inhibiert Natriumazid die ATPase-Aktivität der Multisite-Katalyse um mehr als 90 %, währenddessen es keine Wirkung auf die Unisite-Katalyse besitzt. In großer Menge wird auch die restliche Aktivität einzelner Domänen unterdrückt. Daher ist Azid ein möglicher Schlüssel zur Aufklärung der funktionellen und energetischen Kopplung der ATP-Synthasen.

### 3.3.4.1 Einfluß von Azid auf die Struktur der F<sub>1</sub>-ATPase

Die konzentrationsabhängige Wirkung des Inhibitors Azid auf die Struktur der F<sub>1</sub>-ATPase ist in Abbildung 33 gezeigt. Die Guinier-Näherung der einzelnen Streukurven zur Bestimmung des Gyrationradius zeigte, daß bei geringer Azid-Konzentration zunächst eine Kontraktion des Moleküls eintritt. Im Bereich bei  $c = 1$  mM Azid zur Untersuchung der Unisite-Katalyse kommt es zu einer Expansion der F<sub>1</sub>-ATPase. Die Expansion bei  $c = 10$  mM Azid beträgt  $\Delta R_g = 2 \%$ .



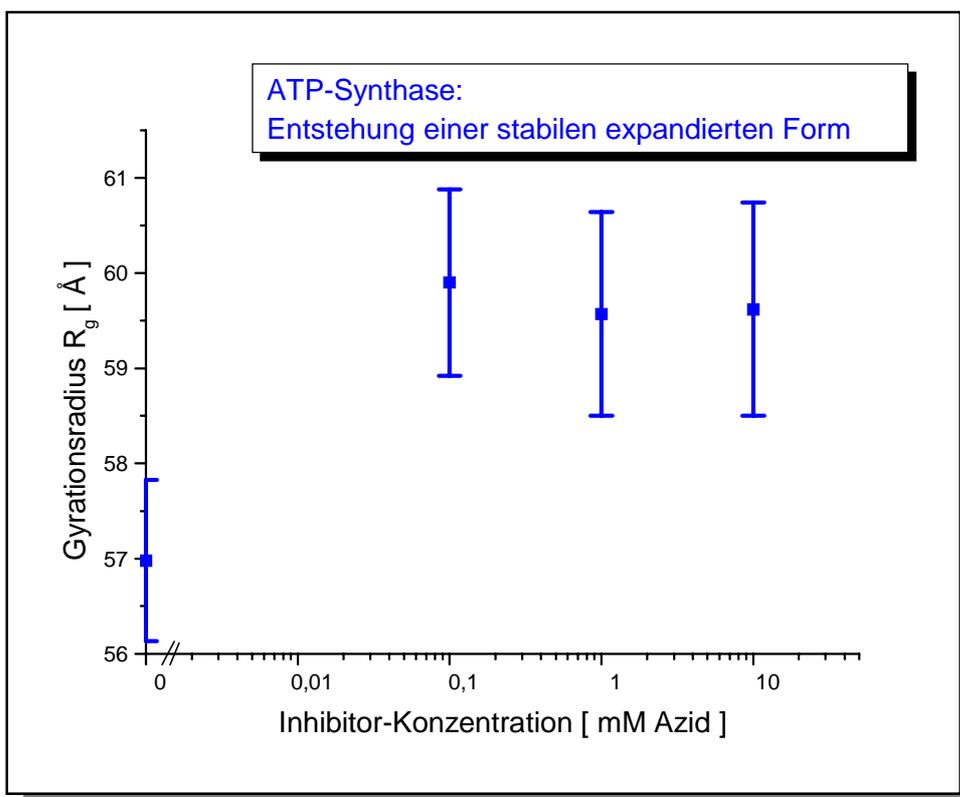
**Abbildung 33: Der Kooperativitätsinhibitor Azid bewirkt bei der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* im Bereich um 1 mM Azid eine Expansion des Moleküls nach Guinier-Auswertung**

Experimente am JUSIFA-Instrument, HASYLAB in Hamburg

Enzymkonzentration: 5 g/l in 50 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

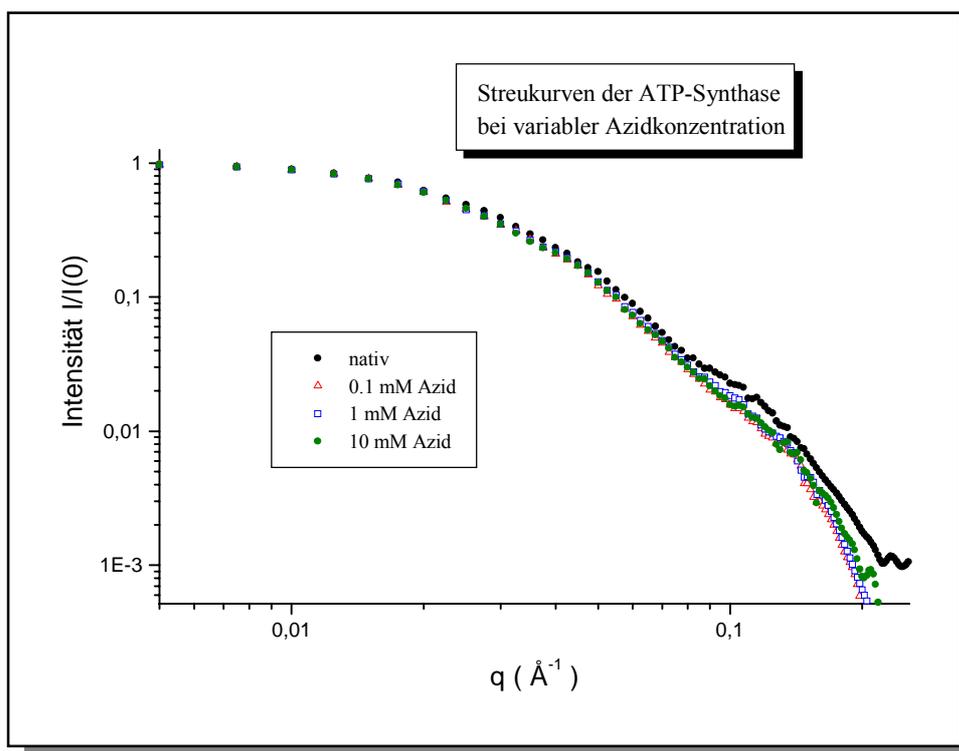
### 3.3.4.2 Einfluß von Azid auf die Struktur der ATP-Synthase

Experimente zur strukturellen Azid-Titration der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* wurden ebenfalls an der JUSIFA-Kleinwinkelstreuanlage in Hamburg [85] durchgeführt. Die Guinieranalyse der statischen Streukurven zeigte bei vollständiger ATP-Synthase in einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 10 mM Azid die Ausbildung eines Plateaus. Es erfolgt im Vergleich zur nativen ATP-Synthase eine Expansion des Moleküls um  $\Delta R_g = 2.6 \text{ \AA}$  (4.6 %). Bei einer Konzentration von 20 mM Azid tritt eine Kontraktion des Moleküls ein. Der Gyrationradius beträgt in diesem Fall  $R_g = 52.05 \text{ \AA} \pm 1.02 \text{ \AA}$  (nicht gezeigt).



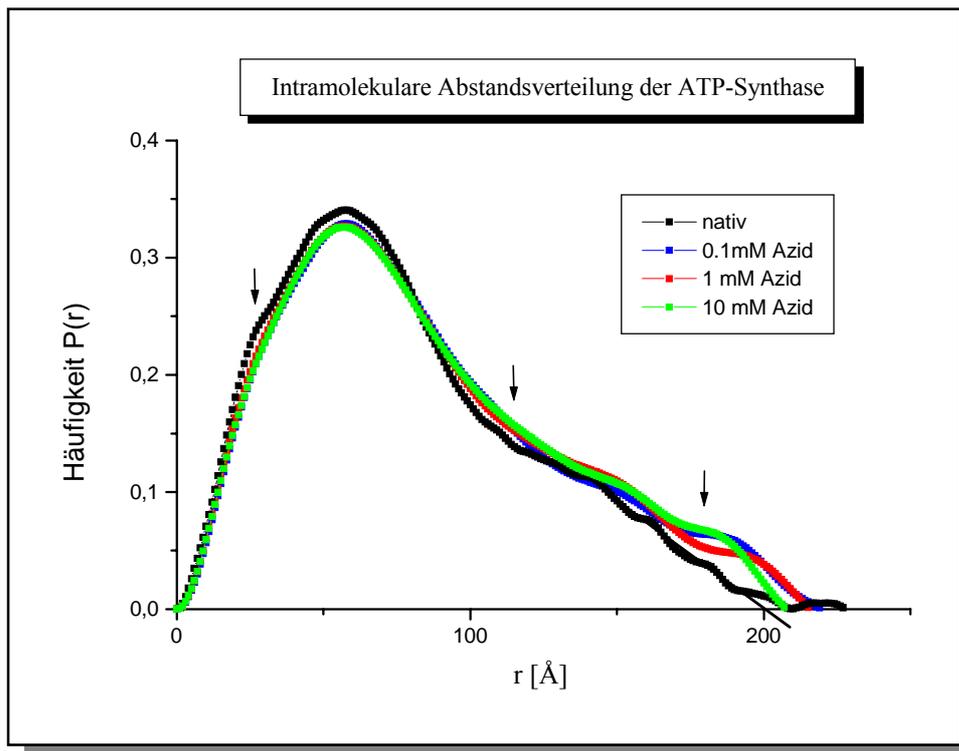
**Abbildung 34: Der Inhibitor Azid induziert eine Expansion der ATP-Synthase (5 g/l in 50 mM Tris-Ac, pH = 7.5, 5 mM TDOC, 10 % Glycerin) über einen breiten Konzentrationsbereich**

Der Vergleich der Streukurven der ATP-Synthase bei unterschiedlichen Azidkonzentrationen ist in Abbildung 35 gezeigt. Es fällt auf, daß die Streukurve der nativen ATP-Synthase eine ausgeprägtere Mehrfachschulter besitzt als diejenigen mit verschiedenen Azidkonzentrationen. Es findet eine Verschiebung des Nebenmaximums bei  $q = 0.11 \text{ \AA}^{-1}$  zu kleineren  $q$ -Werten statt. Dies bedingt eine Vergrößerung des Domänenabstands innerhalb des Enzyms entsprechend der Beziehung  $d = 2\pi / q$ . Nach molekularer Modellierung verschiebt sich die Distanz zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der ATP-Synthase von  $57 \text{ \AA}$  auf  $80 \text{ \AA}$  nach Inkubation mit Azid.



**Abbildung 35: Röntgenstreukurven der ATP-Synthase (5 g/l, 50 mM Tris-Ac, pH = 7.5, 5 mM TDOC, 10 % Glycerin) bei verschiedenen Azidkonzentrationen**

In den Abstandsverteilungen der ATP-Synthase, die in der Abbildung 36 gezeigt sind, ist in Anwesenheit des Inhibitors Azid das erste Extrema, das auf einen ausgeprägten Hohlraum im Molekül schließen läßt, weniger ausgeprägt. Weiterhin verminderte sich die Einsattelung ( $r \approx 110 \text{ \AA}$ ) unter leichter Vergrößerung der maximalen Moleküldimension von  $r_{\max} = 200 \text{ \AA}$  um circa  $10 \text{ \AA}$ .



**Abbildung 36: Intramolekulare Abstandsverteilung der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in Abhängigkeit von der Azidkonzentration**

Die hochfrequente Welligkeit der Abstandsverteilungsfunktion oberhalb von  $r = 150$  Å ist auf Meßfehler zurückzuführen und erlaubt eine Abschätzung der Signifikanz ( $\pm 0.01$  in  $P(r)$  bzw.  $\pm 5$  Å für  $r_{\max}$ ).

### 3.4 Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase und ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus*

#### 3.4.1 Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase

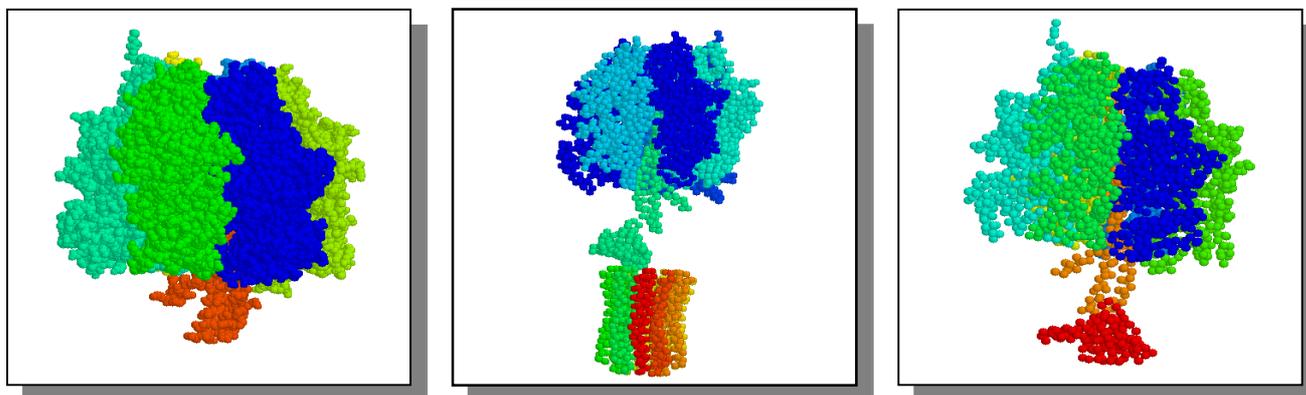
Zur Interpretation der Struktur der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* wurde ein Strukturmodell nach der FVM-Methode (Finite Volume Method [93]) erstellt. Durch den Vergleich der experimentellen und theoretischen Streukurve bzw. Abstandsverteilungsfunktionen lassen sich Aussagen über die Molekülform des untersuchten Proteins treffen. Im Falle der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* wurde ein Molekülmodell konstruiert, dessen kleinste Einheit aus Würfeln mit der Kantenlänge von 9,4 Å und einem Molekulargewicht von 412 000 g/mol bestand. Die Grundlage zur Anordnung der einzelnen Untereinheiten lieferte die Röntgenstrukturanalyse der F<sub>1</sub>-ATPase aus Rinderherzmitochondrien [27] und zusätzlich diejenige der ATP-Synthase aus Hefemitochondrien [41], wobei der F<sub>0</sub>-Teil des Enzyms nicht berücksichtigt wurde. Die Anzahl von 606 Würfelementen wurde aus den Molmassen der Untereinheiten des Enzyms aus *Micrococcus luteus* abgeleitet [60]. Bei der Berechnung der theoretischen Streukurve wurde ein einzelnes Würfelement in 27 Subwürfel (Splitfaktor=3) unterteilt.

Anfangs wurde bei der Konstruktion des F<sub>1</sub>-ATPase-Komplexes als Vorlage ein Modell verwendet, daß der F<sub>1</sub>-ATPase nach Walker [27] ähnelte und für den Organismus *Micrococcus luteus* modifiziert wurde (F<sub>1</sub>ml8). Da in der Kristallstruktur der F<sub>1</sub>-ATPase nach Walker die Untereinheiten  $\delta$  und  $\epsilon$  und ein Großteil der  $\gamma$ -Untereinheit nicht aufgelöst werden konnten, war unklar, wo diese Untereinheiten im Enzymkomplex lokalisiert sind. Dies mußte anhand von Aussagen in der Literatur, geltend für andere Organismen, abgeschätzt werden.

Im Fall des ersten Modells (F<sub>1</sub>ml8) zeigte sich, daß die Lage der Nebenmaximas der experimentelle Streukurve der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* weitgehend mit denjenigen der theoretischen, bestimmten Streukurve aus diesem Modell übereinstimmte. Jedoch die berechnete Abstandsverteilung wich deutlich von der experimentell ermittelten Verteilung der intramolekularen Atomabstände ab. Unterschiede waren besonders im Bereich größerer Atomabstände und bei der Bestimmung des maximalen Atomabstandes des Moleküls ( $r_{\max}$ ) feststellbar [60].

Nach Veröffentlichung der Kristallstruktur der ATP-Synthase aus *S. cerevisiae* (Hefemitochondrien) im November 1999 ließ sich ein genaueres Modell erstellen, weil in diesem Fall die Untereinheiten  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und 10 c-Untereinheiten des Enzyms aufgelöst werden konnten. Die folgende Abbildung zeigt die Kristallstruktur der F<sub>1</sub>-ATPase aus Rinderherzmitochondrien von Walker (A)

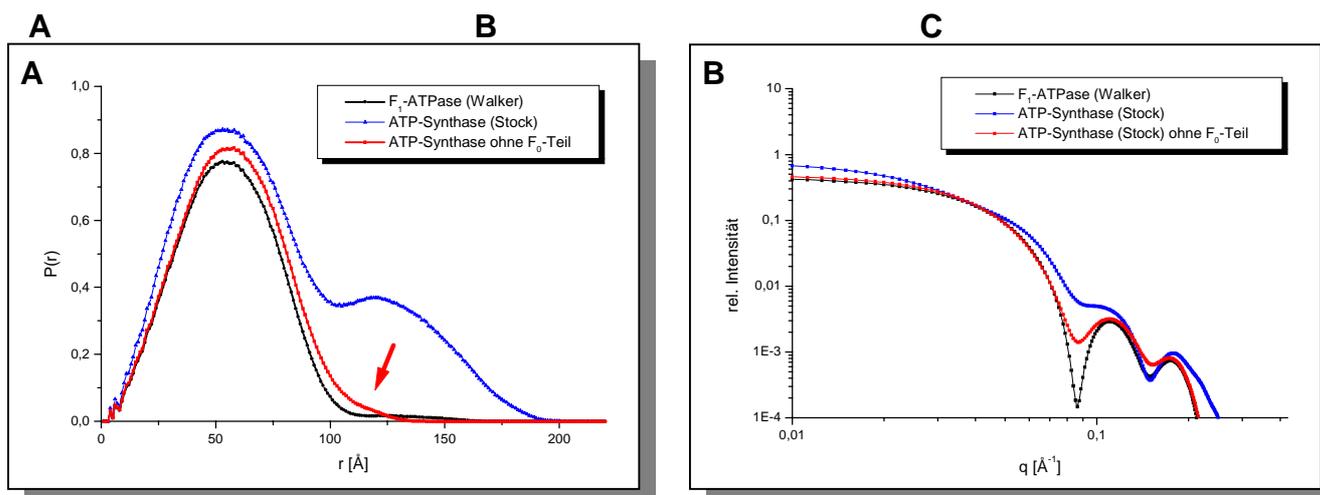
[27] und die Struktur der ATP-Synthase aus *S. cerevisiae* (Hefemitochondrien) (B) [41]. In der Abbildung C wurden 10 c-Untereinheiten der ATP-Synthase entfernt, um allein den F<sub>1</sub>-Kopf der ATP-Synthase zu erhalten. Der Unterschied in der Kristallstruktur von A und C liegt in der Existenz der  $\delta$ -Untereinheit und in der Auflösung der kompletten  $\gamma$ -Untereinheit, die im Gegensatz zur F<sub>1</sub>-



ATPase-Struktur nach Walker 25 Å weiter aus dem  $\alpha_3\beta_3$ -Hohlkörper herausragt.

**Abbildung 37:** A Kristallstruktur der F<sub>1</sub>-ATPase nach Walker [27]  
 B Kristallstruktur der ATP-Synthase nach Stock [41]  
 C Kristallstruktur der ATP-Synthase nach Stock ohne F<sub>0</sub>-Teil

Nun wurden mit Hilfe des Programms Multibody [94] die entsprechenden Abstandsverteilungsfunktionen der drei unterschiedlichen Kristallstrukturen und die daraus resultierende theoretischen



Streukurven ermittelt (Abb.38).

**Abbildung 38:**

A Intramolekulare Abstandsverteilungsfunktionen der 3 verschiedenen Kristallstrukturen A B C

### B Streukurven der 3 verschiedenen Kristallstrukturen A B C aus Abb. 20

Die Abstandsverteilungsfunktionen der Kristallstruktur A und C differieren im Ausläufer bei großen Atomabständen bis 130 Å, in Abbildung 38A durch einen roten Pfeil markiert. Dieser Ausläufer wird durch den verlängerten und verdickten Stiel der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit erzeugt.

Der zweite Ausläufer in der Abstandsverteilungsfunktion der Struktur B bei 130 Å läßt sich darauf zurückführen, daß sich der  $F_0$ -Teil mit seinen 10 c-Untereinheiten frei im Raum befindet. Solch ein Zustand ist im nativen Enzym nicht möglich. Da sich die Untereinheiten a und b beim Kristallisieren vom restlichen Enzymkomplex abgelöst haben [41], fand möglicherweise eine strukturelle Umordnung im Kristall statt. Die 10 c-Untereinheiten können einen anderen Platz als im nativen Enzym einnehmen.

Anhand der drei in Abbildung 38 B dargestellten Streukurven ist ersichtlich, daß mit zunehmender Zahl von Untereinheiten unterhalb des  $F_1$ -Hohlkörpers das 1. Nebenmaximum der Streukurve schwächer ausgeprägt ist.

Nach diesen Ergebnissen wurde das ursprüngliche Modell ( $F_1ml8$ ) für die  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* [60] im Bereich des Stiels in der Weise modifiziert, daß es große Ähnlichkeit mit Kristallstruktur C besaß. Die folgende Abbildung zeigt das Modell ( $F_1ml8$ ) und das weiterentwickelte Modell der  $F_1$ -ATPase ( $F_1-i8$ ).

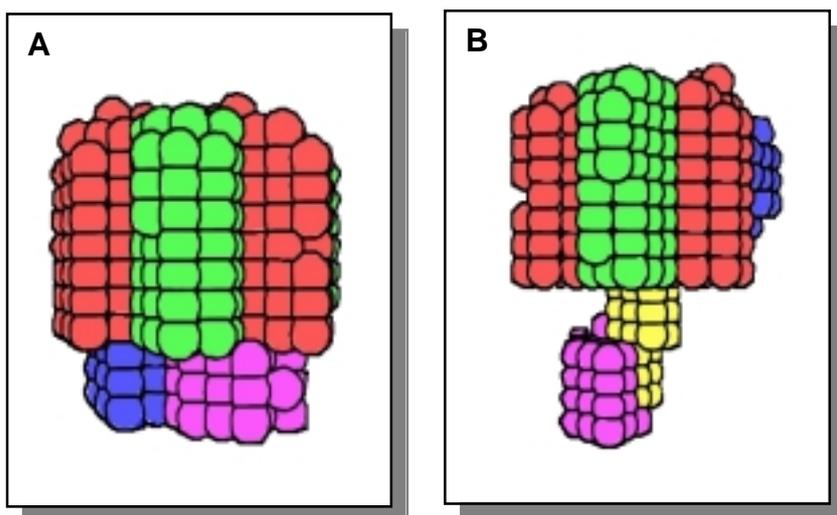


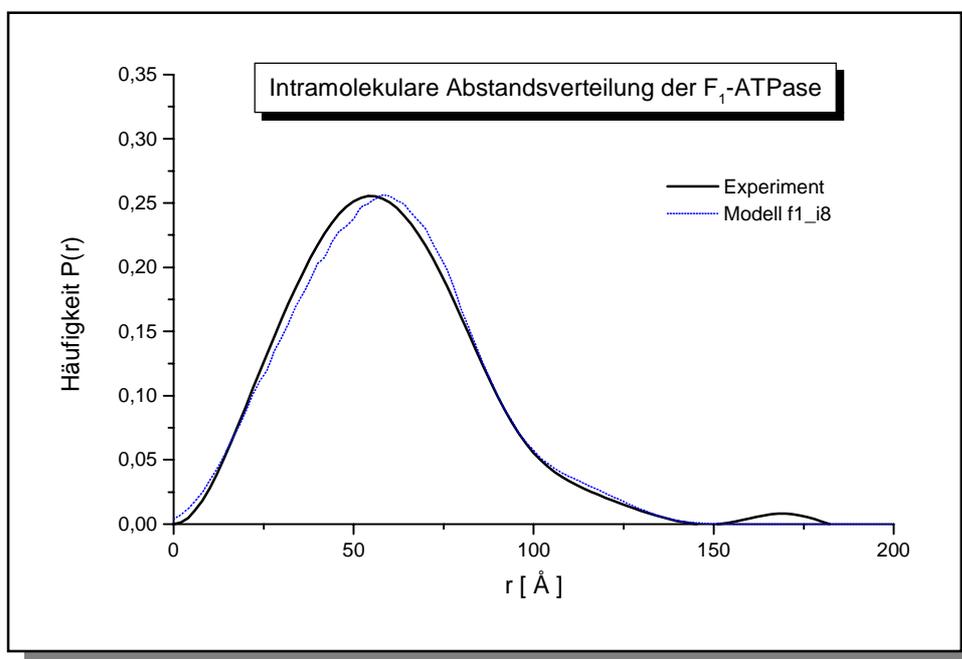
Abbildung 39: Strukturmodelle der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus*

A Modell  $F_1ml8$  [60]

B Weiterentwickeltes Modell  $F_1-i8$

Im Modell F<sub>1</sub>m18 befanden sich die  $\delta$ - und  $\varepsilon$ -Untereinheiten beide am Fuße des  $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes, weil die Position der  $\varepsilon$ -Untereinheit im Enzymkomplex nicht bekannt war (Abb.39). Da auch in der Kristallstruktur der ATP-Synthase aus *S. cerevisiae* (Hefemitochondrien) die genaue Position der  $\varepsilon$ -Untereinheit nicht aufgelöst werden konnte, wurde anhand von verschiedenen Aussagen in der Literatur die  $\varepsilon$ -Untereinheit in den Zwischenraum eines  $\alpha,\beta$ -Paares des F<sub>1</sub>-Kopfes modelliert (blau). ber die genaue Lokalisation der  $\varepsilon$ -Untereinheit am F<sub>1</sub>-Kopf ist man in der Literatur jedoch unterschiedlicher Meinung. Die Position der  $\varepsilon$ -Untereinheit bzw. der  $\delta$ -Untereinheit im Falle von *E. coli* wurde entweder in der Nähe des Fußes [97] oder am Kopf [98] des  $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes der F<sub>1</sub>-ATPase diskutiert. Im Falle der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* wurde die  $\varepsilon$ -Untereinheit in den Mittelbereich der F<sub>1</sub>-Hohlkörpers modelliert.

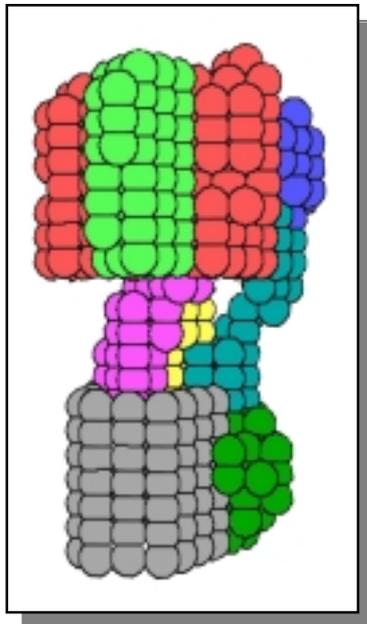
Zur Kontrolle der Weiterentwicklung des Modells der F<sub>1</sub>-ATPase wurde die intramolekulare Abstandsverteilungsfunktion des Modellkomplexes mit der aus den experimentellen Daten ermittelte Abstandsverteilungsfunktion verglichen. Es kam erwartungsgemäß zu einer guten Übereinstimmung der beiden Abstandsverteilungsfunktionen insbesondere bei großen Atomabständen. Der Gyrationradius des Modells beträgt 45.58 Å gegenüber 45.0 Å im Experiment.



**Abbildung 40: Intramolekulare Abstandsverteilungsfunktion des Molekülmodells F<sub>1</sub>-i8 im Vergleich zum Profil aus der Röntgenkleinwinkelstreuung der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* (DESY-HASYLAB/ Jusifa)**

### 3.4.2 Strukturmodelle der ATP-Synthase

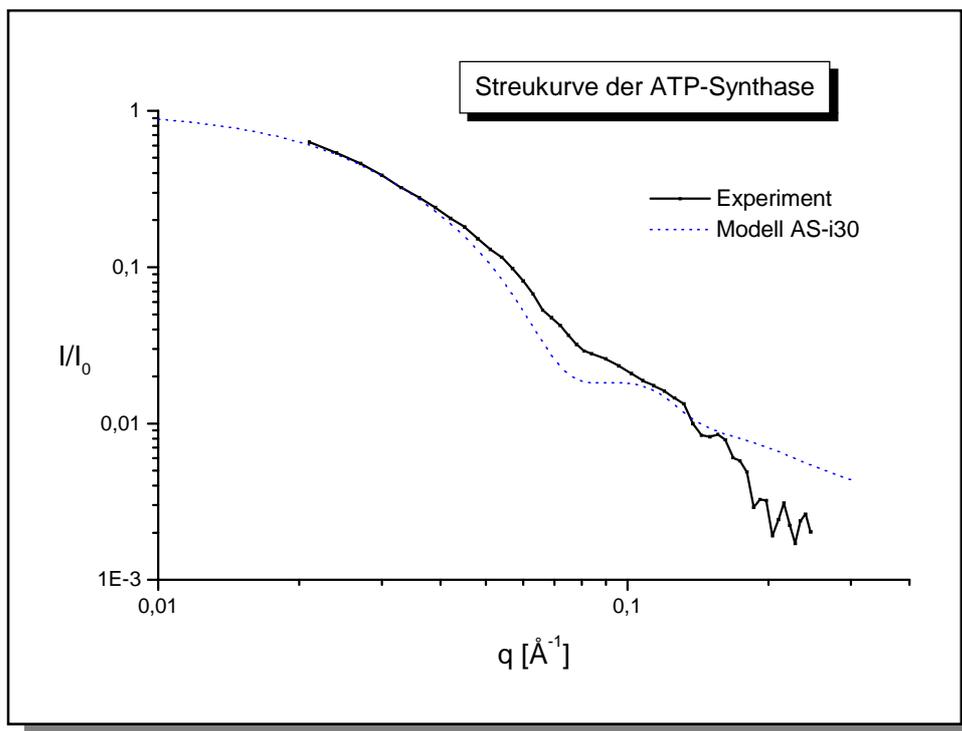
Der Vergleich experimenteller und theoretischer Streukurven gibt annähernd Informationen über die Molekülform des untersuchten Proteins. Zur Interpretation der Struktur der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* wurde ein Molekülmodell nach der FVM-Methode (Finite Volume Method [93]) konstruiert, dessen kleinste Einheit aus Würfeln mit der Kantenlänge von 9.4 Å und einem Molekulargewicht von 542 600 g/mol bestand. Die Grundlage zur Anordnung der einzelnen Untereinheiten lieferte das weiterentwickelte Modell der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* (F1-i8) und die Röntgenstrukturanalyse der ATP-Synthase aus *Hefemitochondrien* [41]. Die Lokalisation der Untereinheiten a, b und c wurde in Anlehnung an das von Wang und Oster [50] postulierte Modell



für die ATP-Synthase aus *E. coli* im Enzymkomplex durchgeführt. Die Anzahl der 806 Würfelemente wurde aus den Molmassen der Untereinheiten des Enzyms abgeleitet [96]. Das aus 21 Schichten bestehende Modell der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* mit einer Stöchiometrie von  $\alpha_3 : \beta_3 : \gamma : \delta : \epsilon : a : b_2 : c_{12}$  wurde mit dem Programm Finix [60] erstellt.

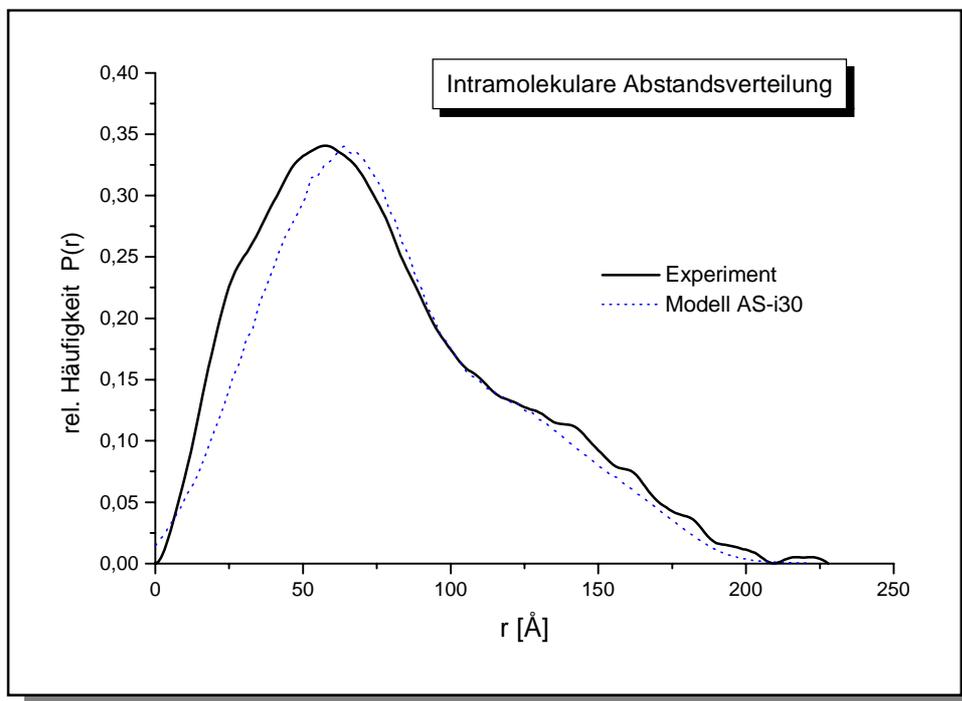
Abbildung 41 zeigt das Modell der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (AS-i30). Bei der Konstruktion wurde die a-Untereinheit (grün) außerhalb des multimeren Rings aus c-Untereinheiten (grau) lokalisiert, das b-Dimer (blaugrün) diente als Verbindung zwischen der a-Untereinheit des membranständigen Teils und  $\epsilon$ -Untereinheit des F<sub>1</sub>-Kopf des Enzyms.

Abbildung 41: Strukturmodell der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (AS-i30)



**Abbildung 42: Vergleich der experimentellen und theoretischen Röntgenstreu- kurven der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus***

Der Vergleich der experimentellen Streukurve mit der theoretischen Streukurve ist in der Abbildung 42 dargestellt. Bei der Berechnung der theoretischen Streukurve wurde ein einzelnes Würfelement in 27 Subwürfel (Splitfaktor = 3) unterteilt. Die beiden Kurven zeigen im Bereich kleiner Impulsüberträge einen nahezu identischen Verlauf. Nur die verwaschene Mehrfachschulter im Außenbereich der Streukurven ließ sich mit diesem Strukturmodell nicht nachweisen. Der Streumassenradius ( $R_g$ ) des Modells ergab einen Wert von  $58.98 \text{ \AA}$  gegenüber eines experimentellen Wertes von  $R_g = 57.0 \pm 0.8 \text{ \AA}$ .



**Abbildung 43: Vergleich der Abstandsverteilungsfunktion des Molekülmodells (AS-i30) mit der experimentell ermittelten Abstandsverteilungsfunktion der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (Röntgenstreuung)**

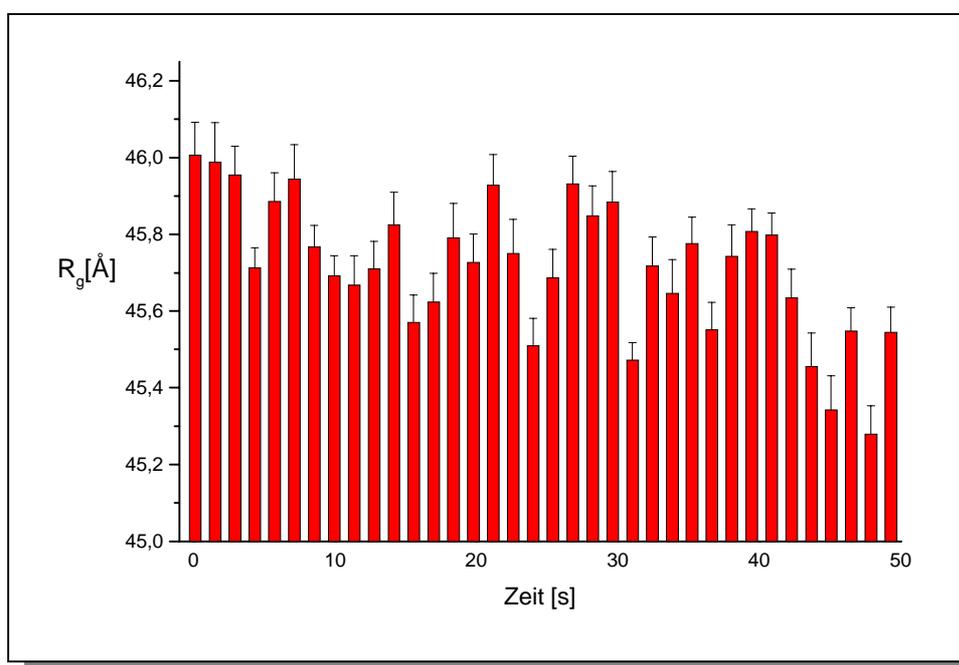
Der zur experimentellen Abstandsverteilung ähnliche Verlauf des Molekülmodells (AS-i30) zeigt eine leichte Verschiebung vor und im Maximum der Abstandsverteilungsfunktion, d.h. bei dem im Molekülkomplex am häufigsten vorkommenden Abstand (Abb.43). Im Bereich der maximalen Ausdehnung des Moleküls ( $r_{\max} = 200 \text{ \AA}$ ) stimmte das Modell wiederum gut mit den Daten des Experiments überein.

### 3.5 Zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung

#### 3.5.1 Zeitauflösende Streuexperimente an ATP-Synthase und $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* bei tiefer Temperatur

Seit 1997 konnten Experimente an Hochstromsynchrotrons zur Untersuchung der Struktur- und Dynamik der ATP-Synthase und ihres  $F_1$ -Fragmentes in den Reaktionszyklen der enzymatischen ATP-Hydrolyse durchgeführt werden. Nach anfänglichen Versuchen bei ELETTRA, Triest, wurde dazu die Quelle des ESRF in Grenoble genutzt, die den für die zeitaufgelösten Experimente erforderlichen Fluß besitzt ( $10^{13}$  Photonen/s bei 12.5 KeV am Probenort des Instruments ID2 [86]).

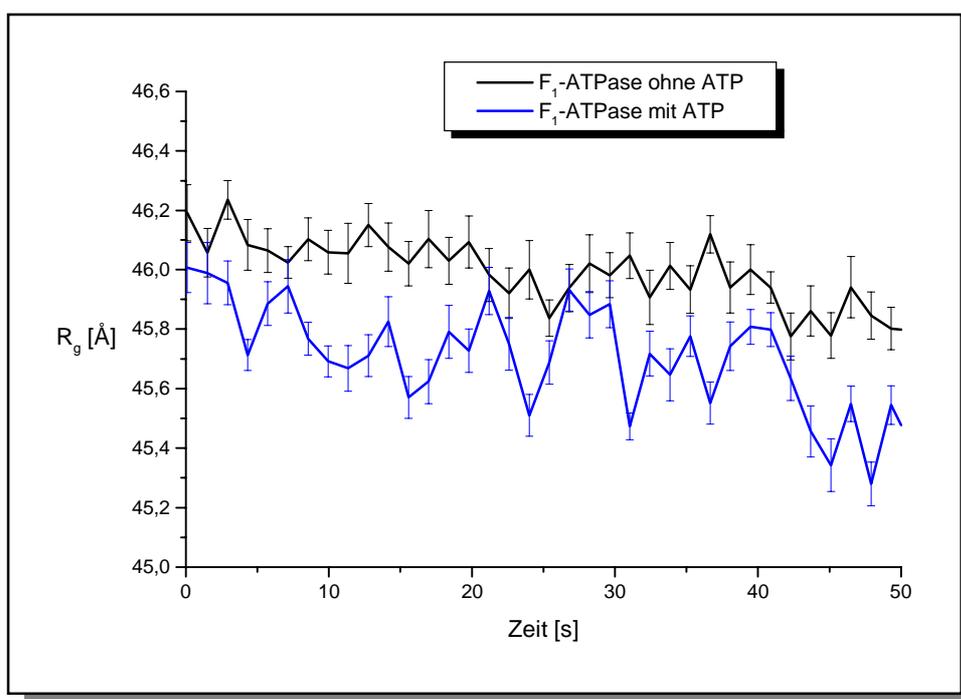
Die Abbildung 44 zeigt einen "strukturellen Film" der arbeitenden  $F_1$ -ATPase nach rascher Vermischung mit CaATP als Substrat bei einer Temperatur von 13°C. Benutzt wurde ein Fluoreszenz-Detektor (Prototyp XRII-CCD), wobei in diesem Fall die Belichtungszeit 1 Sekunde und die Auslesezeit 400 ms betrug. Im Gegensatz zu bekannten Vorarbeiten [60,66,69] konnten die Untersuchungen ohne Repetition (single shot) und über einen Zeitraum, der mehrere Reaktionszyklen mit hoher Zeitauflösung abdeckte, durchgeführt werden.



**Abbildung 44:** Änderung des Gyrationradius  $R_g$  der  $F_1$ -ATPase (5 mg/ml) nach Zugabe von CaATP (5:1 mM) als Substrat bei einer Temperatur von 13°C

Die Belichtungszeit betrug 1 Sekunde bei einer Auslesezeit von 400 ms (Prototyp XRII-CCD-Fluoreszenz-Detektor)

Der Gyrationradius ( $R_g$ ), der sensitive Informationen über die Gestalt des Proteins liefert, wurde verwendet um den zeitlichen Ablauf des Reaktionszyklus zu verfolgen. Nur in Gegenwart von Substrat konnte eine Änderung der Ausdehnung des Moleküls mit der Zeit festgestellt werden. Die molekulare Änderung wurde von alternierenden Expansionen ( $+\Delta R_g$ ) und Kompressionen ( $-\Delta R_g$ ) begleitet. Zum Vergleich ist die  $F_1$ -ATPase ohne ATP als Substrat in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Änderungen in Gegenwart von ATP betragen bei einer Belichtungszeit von 1 s maximal  $0.44 \text{ \AA}$ , während das Enzym ohne ATP Schwankungen im  $R_g$  von  $0.15 \text{ \AA}$  (bei einem Fehler von maximal  $0.1 \text{ \AA}$  bei der Bestimmung des Gyrationradius durch lineare Regression) zeigte. Als besondere Schwierigkeit erwies sich hier die zyklische Unterbrechung der Datenerfassung während der Auslesepausen jedes Bildes (readout-gap). Die Verwendung einer CCD-Kamera mit Fluoreszenzschirm erwies sich jedoch als unverzichtbar, da der hohe Röntgenfluß ( $10^8$  gestreute Ph/s) in Testexperimenten (1997) mit einem Gasdetektor in Sekunden zur Photolyse des Zählgases führte.

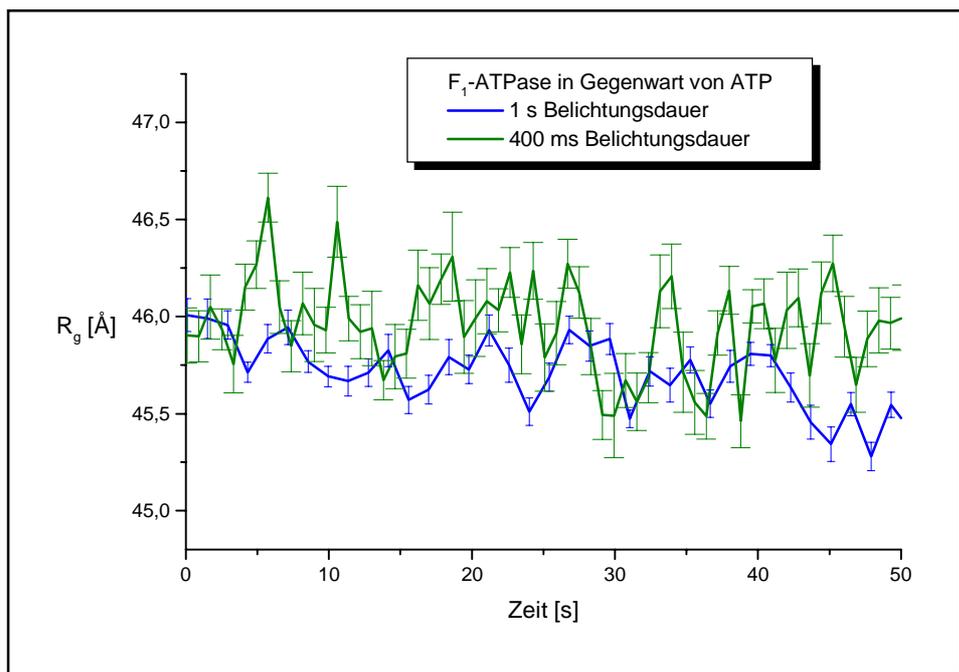


**Abbildung 45: Änderung des Gyrationradius  $R_g$  der  $F_1$ -ATPase mit einer Belichtungszeit von 1s bei einer Temperatur von  $13^\circ\text{C}$**

Bedingungen: 5 g/l Enzym in 100 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

Aufnahmen: 1s Belichtungsdauer (400 ms Auslesezeit) bei einem Röntgenfluß von  $10^{13}$  Ph/s in  $0.15 \text{ mm}^2$  Focus

- ohne Zugabe von CaATP
- nach Zugabe von CaATP (5:1 mM) als Substrat



**Abbildung 46: Änderung des Gyrationradius  $R_g$  der arbeitenden  $F_1$ -ATPase mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und einer Temperatur von  $13^\circ\text{C}$**

Bedingungen: 5 g/l Enzym in 100 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

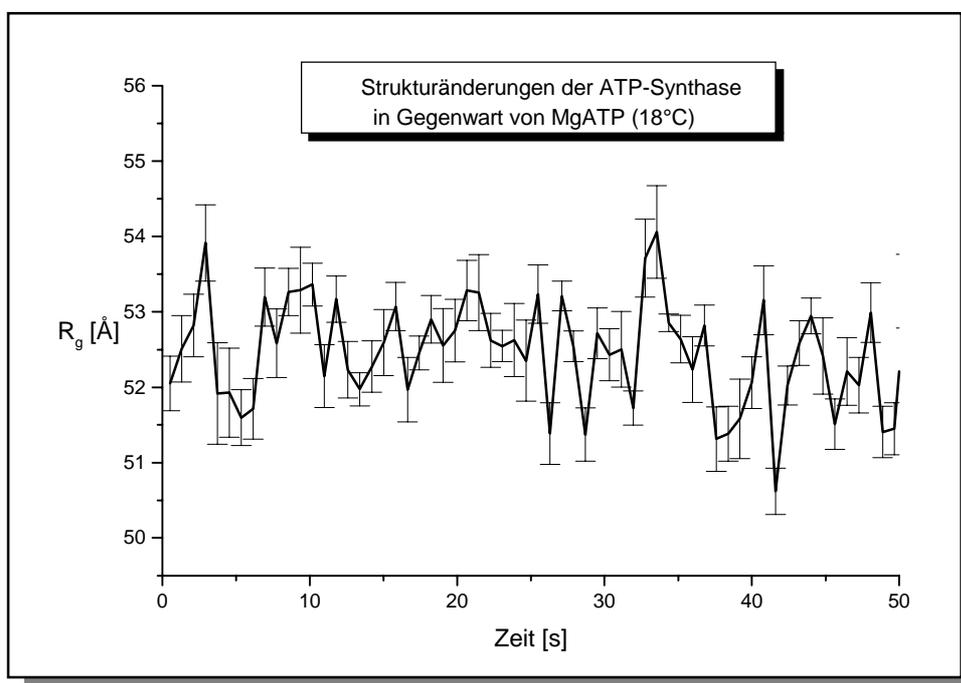
Aufnahmen: 400 ms/1s Belichtungsdauer (400 ms Auslesezeit) bei einem Röntgenfluß von  $10^{13}$  Ph/s in  $0.15\text{ mm}^2$  Focus

Bei Verkürzung der Belichtungszeit auf 400 ms bei weiterhin 400 ms Lesepause pro Bild konnten in Gegenwart von ATP Änderungen der  $F_1$ -ATPase im Gyrationradius ( $R_g$ ) von maximal  $0.8\text{ \AA}$  beobachtet werden. Die Strukturänderungen erschienen unerwartet kurz, da viele Strukturänderungen, die bei einer Belichtungszeit von 400 ms vorhanden sind, bei einer Belichtungszeit von 1 s durch zeitliche Mittelung der Ereignisse nicht sichtbar waren. Hinzu kommt noch die notwendige Auslesezeit der CCD-Kamerabilder, die dazu führt, daß man die Hälfte der zu untersuchenden Zeit blind ist und dadurch kurzlebige Strukturereignisse in diese Lesepausen hineinfallen können.

Bei dieser Experimentserie sollte die Strukturodynamik der arbeitenden  $F_1$ -ATPase in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. Durch Kühlung auf  $13^\circ\text{C}$  wurde die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von ATP anhand der Ergebnisse der thermokinetischen Studie [60] von 4 ms bei  $37^\circ\text{C}$  auf 20 s ( $13^\circ\text{C}$ ) verlängert. Leider ließ sich aufgrund der aufgeführten Detektoreigenschaften die Dauer eines Reaktionszyklus bei verschiedenen Temperaturen nur erahnen. Dennoch ist ein Gang in der Strukturänderung mit der Temperatur zu erkennen. Je höher die gewählte Temperatur des Enzyms, desto größer wurden zum einen die relativen Änderungen im  $R_g$  und desto schneller wechselten Expansionen und Kompressionen miteinander ab. Zusätzlich ergab

sich bei allen Messungen nach Normierung der Streukurven eine leichte Expansion des Enzyms um  $0.5 \text{ \AA}$  bei einer Temperaturerhöhung um  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dabei wurden die einzelnen Streukurven auf gleiche Intensität mit Hilfe der Porod-Darstellung ( $I \cdot q$  gegen  $q^4$ ) scaliert und auf die Anfangsintensität  $I_0$  nach Pufferabzug normiert.

Mit vollständiger ATP-Synthase wurden ebenfalls erste Experimentserien bei tiefen Temperaturen durchgeführt. Aufgrund der geringeren Proteinkonzentration, die bei Membranproteinen zur Vermeidung von Aggregaten nötig ist, und der gestreckten Gestalt des Moleküls wurde ein unschärferes Streuprofil erhalten. Bei der Bestimmung des Gyrationradius wurde aufgrund der schlechteren Statistik auch der Fehler größer. Dieser Fehler lag im Falle der ATP-Synthase bei einer Belichtung von 1s bei maximal  $0.35 \text{ \AA}$ , bei einer Belichtung von 400 ms vergrößerte er sich auf  $0.66 \text{ \AA}$ . Die relativen Änderungen im Gyrationradius der ATP-Synthase in Gegenwart von ATP betrug maximal  $2 \text{ \AA}$  (400 ms Belichtungsdauer). Durch den recht hohen Fehler war das stärkste Signal gerade noch erkennbar, d.h. der „Strukturpuls“ tritt aus einem Fehlerschlauch hervor. In der Abbildung 47 kann man zwei Strukturpulse erkennen, die nicht in die Lesezeiten der CCD-Kamera fallen, und zwar finden die Expansionen bei circa 3 s und 33 s statt.



**Abbildung 47: Strukturänderungen der vollständigen ATP-Synthase nach rascher Zugabe von MgATP als Substrat bei einer Temperatur von  $18 \text{ }^\circ\text{C}$**

Bedingungen: 3 g/l Enzym in 50 mM Tris-Ac, pH = 7.5, 50 mM TCOC, 10 % Glycerin

Aufnahmen: 400 ms Belichtungsdauer/ 400 ms Auslesezeit bei einem Röntgenfluß von  $10^{13} \text{ Ph/s}$  in  $0.15 \text{ mm}^2$  Focus

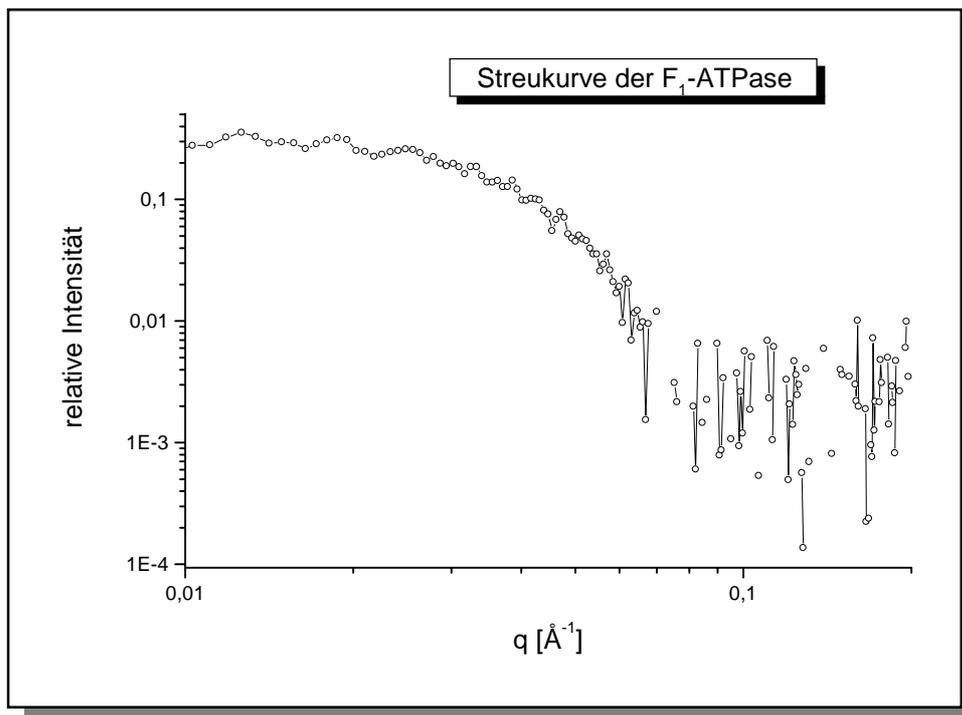
### 3.5.2 Experimentelle Probleme und Lösungen

Bei den Zeitaufgelösten Röntgenstudien entstehen nach Tabelle 1 erhebliche Probleme, die in den vergangenen Jahren zu einem großen Teil gelöst werden konnten. Die zeitauflösenden Röntgenstreuexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe Heumann (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Die Studien waren am Instrument ID2 der ESRF die ersten Versuche mit Proteinlösungen überhaupt. Weiterhin bestanden keinerlei Berichte in der Literatur zu Streuexperimenten mit Lösungen nativer Proteine in diesem Flußbereich ( $10^{12}$  -  $10^{14}$  Photonen/s·mm<sup>2</sup>).

1) Detektion der intensiven Streustrahlung
2) Verlangsamung der Protein-Reaktion in ein experimentell zugängliches Zeitfenster
3) Aufheizung der Probe durch den intensiven Röntgenstrahl (beam heating)
4) Bildung von Gasblasen in der Lösung unter intensiver Bestrahlung
5) Strahlenschädigung der Proteine (radiation damage)

**Tabelle 1: Probleme der zeitaufgelösten Röntgenstreuung an Proteinen an der Hochfluß-Synchrotronstrahlungsquelle ESRF**

Am Instrument ID2 der ESRF wurde anfangs zur **Detektion der intensiven Streustrahlung** ein 2D-Gasdetektor eingesetzt (18 cm Durchmesser; Argon-Ethan-Zählgas). Ab 0.5 % Strahlöffnung (400 000 counts bei 60% Totzeitverlust) wurden lokale Totzeiteffekte und lokale Photolyse des Zählgases festgestellt. Dieses Detektionsproblem führt zu sehr verrauschten Streukurven der ansonsten schon schwach streuenden Proteinproben. Die Abbildung 48 zeigt die radial gemittelte Röntgenstreu Kurve der F<sub>1</sub>-ATPase bei 1s-Belichtungsdauer und einem Detektorabstand von 3 m aufgenommen mit dem 2D-Gasdetektor. Das Nebenmaximum der F<sub>1</sub>-ATPase bei großen Impulsüberträgen ist nicht zu erkennen. Dieser Detektortyp ist daher zur Studie schneller Reaktionen an wässrigen Proteinproben mit hohem Röntgenfluß ungeeignet.

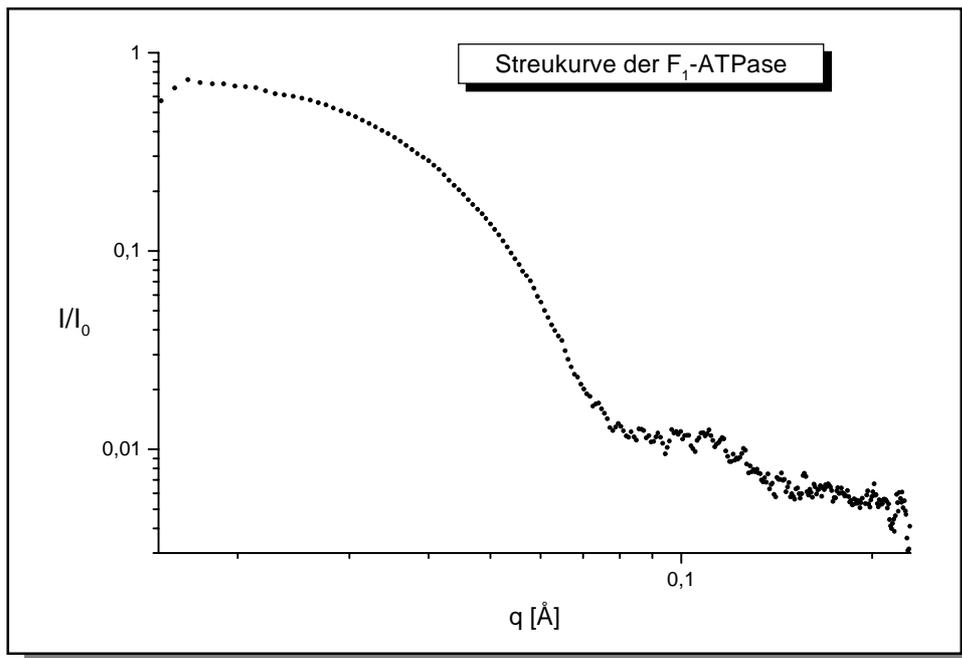


**Abbildung 48: Röntgenkleinwinkelstreuung der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* aufgenommen mit einem 2 dim. Gasetektor bei einem Detektorabstand von 3m**

1s Belichtungszeit bei einer Strahlöffnung von 0.5 % am ESRF

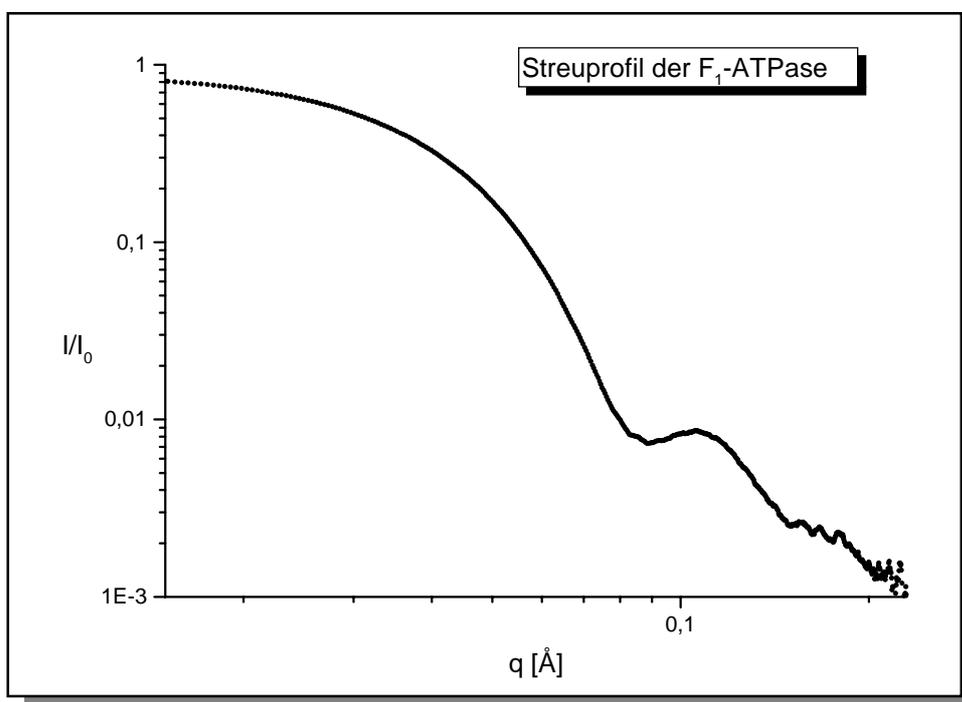
( $\sim 5 \cdot 10^{10}$  ph/s in  $0.15 \text{ mm}^2$  Focus)

Ab September 1997 wurde ein neuartiger Kameraprototyp, ein XR11-CCD Fluoreszenz-Detektor, der ESRF mit einer Auflösung von  $512 \times 512$  Pixeln eingesetzt. Dadurch konnte erstmalig der volle Fluß des ESRF- Instrumentes ID2 genutzt werden. Nachteilig war die limitierte Zeitauflösung durch die Auslesepausen zwischen den Bildern des strukturellen Films, wie die Abbildung 44 (S.72) zeigt. Zeitlich gesehen ist man in einem Teil des Reaktionszyklus „blind“. Ab Januar 1999 stand dann eine weiterentwickelte CCD-Kamera zur Verfügung, die Messungen mit einer minimalen Belichtungszeit von 150 ms (Auslesezeit: 150 ms) erlaubte und die doppelte räumliche Auflösung besaß ( $1024 \times 1024$  Pixel). Die folgenden Abbildungen zeigen den Vergleich der ersten CCD-Kamera mit dem zweiten Modell anhand einer  $F_1$ -ATPase-Streukurve bei gleicher Belichtungszeit (1s). Das Nebenmaximum der  $F_1$ -ATPase ist mit Hilfe des neueren Modells bei gleicher Belichtungsdauer sehr detailliert zu erkennen.



**Abbildung 49: Radial gemitteltetes Streuprofil der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* aufgenommen mit dem 2-dimensionalen XRII-CCD Fluoreszenz-Detektor der ESRF**

Auflösung von  $512 \times 512$  Pixel bei einem Detektorabstand von 3m und 1 s-Belichtungsdauer



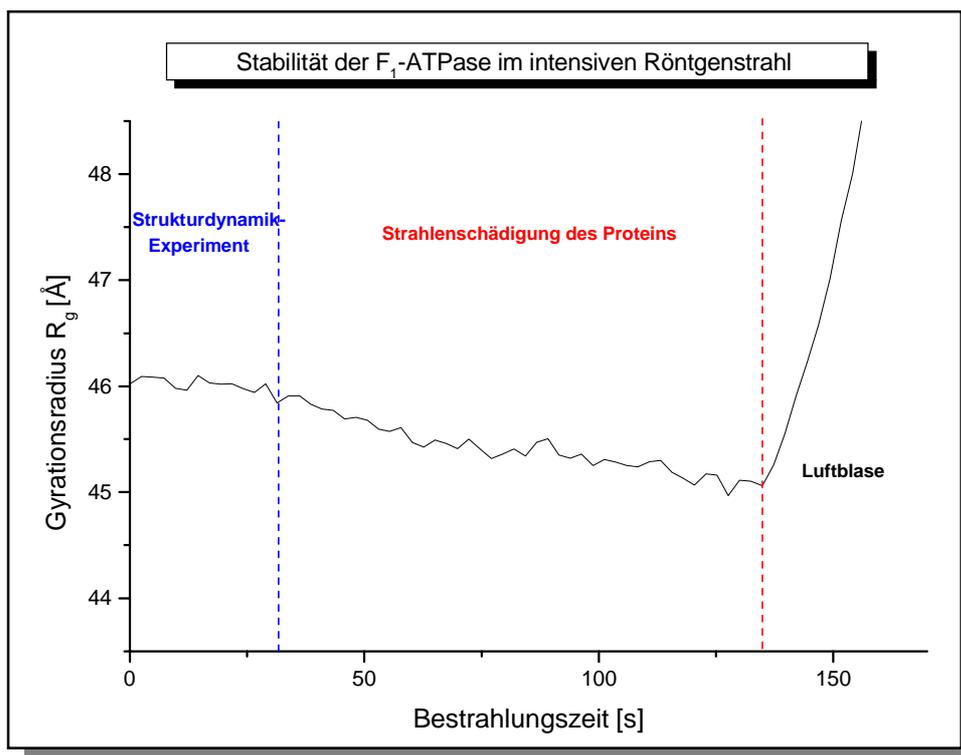
**Abbildung 50: Radial gemitteltetes Streuprofil der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* aufgenommen mit dem verbesserten 2-dimensionalen XRII-CCD Fluoreszenz-Detektor der ESRF und optimaler Instrumenteneinstellung**

Auflösung von  $1024 \times 1024$  Pixel bei einem Detektorabstand von 3m und 1 s-Belichtungsdauer

Eine **technische Schlüsselentwicklung** war die Konstruktion einer Probenumgebung (Probenbox) [88] mit Helium-Jet gekühlter Quarz-Durchflußkapillare, Dreikreis-Wärmetauscher und Mischzelle für Hochfluß-Röntgenexperimente (Abbildung 14/ S.39). Durch den Dreikreiswärmetauscher konnte die Proteinreaktion in situ durch Kühlung soweit verlangsamt werden, um ein experimentell zugängliches Zeitfenster zu erhalten. Weiterhin wurde die Aufheizung der Probe durch den intensiven Röntgenstrahl durch das Anblasen der Kapillare mit Helium vermindert ( $\Delta T < 1\text{K}$ ).

Die Probleme der unerwarteten **Gasblasenentwicklung** und der **Strahlenschädigung der Proteine**, die bei den ersten Messungen bei ESRF und ELETTRA festgestellt worden waren, konnten zum einen durch Entgasen der Proben und durch Zusatz von Radikalfängern weitgehend gelöst werden. Durch die intensive Röntgenstrahlung werden aus wässrigen Lösungen Radikale erzeugt, die dann in Folgereaktionen neben Wasserstoff auch Wasserstoffperoxid als sehr reaktionsfähiges Produkt bilden. In Gegenwart von Sauerstoff wird dieser Vorgang noch verstärkt [99]. Wasserstoffperoxid kann Proteine durch Oxidation in Bezug auf ihre funktionelle Aktivität schädigen. Durch Entgasen der Proben direkt vor jeder Meßreihe bei 15 Torr (1 h) wurde der zuvor in den Lösungen enthaltene Sauerstoff weitgehend entfernt.

Weiterhin wurde 10 % Glycerin als Radikalfänger den Puffer- und Protein-Lösungen zugesetzt. In Bezug auf die Partikelkonzentration ist dies ein circa 100-facher Überschuß gegenüber dem Protein. Unter diesen Bedingungen wurde die in Abbildung 51 gezeigte Stabilität der  $F_1\text{ATPase}$  unter Bestrahlung mit dem vollen Fluß der ESRF ermittelt.



**Abbildung 51: Stabilität der  $F_1$ -ATPase im intensiven Röntgenstrahl**

Bedingungen: 10 g/l Protein in 10 % Glycerinpuffer

Das Zeitfenster der strukturellen Biologie beträgt im Falle der  $F_1$ -ATPase bei vollem Strahl der ID2-ESRF-Beamline circa 30 s. Erst danach findet eine Strahlenschädigung des Proteins statt, die durch eine Verminderung des Streumassenradius  $R_g$  angezeigt wird. Die Belichtungszeit betrug jeweils 2 s bei einer Auslesezeit von 400 ms.

Danach steht das Protein für circa 30 s Bestrahlungszeit ungeschädigt der Untersuchung zur Verfügung. Danach erfolgt eine Proteinschädigung durch geringe Fragmentierung des Proteins und erst später nach zwei Minuten Belichtungszeit die Entstehung einer Luftblase. Nach diesen Ergebnissen besteht also ein genügend langes Zeitfenster zur Strukturuntersuchung am ungeschädigten Protein.

Zusätzlich wurde der Einfluß des Strahlungs-Reaktionsproduktes  $H_2O_2$  auf die ATP-Hydrolyseaktivität der  $F_1$ -ATPase überprüft. Dies konnte jedoch nicht direkt nach Bestrahlung der Proteinprobe durchgeführt werden, da das bestrahlte Volumen der Probe mit circa 1  $\mu$ l zu klein war und nicht isoliert werden konnte. Die bekannte Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität von der Temperatur und der Inkubationszeit nach Verdünnung wurde in diesem Fall ausgenutzt (siehe Kapitel 3.2.1.1). Die Messung erfolgte durch Zusatz von  $H_2O_2$  in den Inkubationspuffer. Es zeigte sich bis zu einer Konzentration von 1 mM  $H_2O_2$  in den Inkubationspuffer keine signifikante Änderung in der Aktivierungskinetik (Dissoziation der  $\delta$ -Untereinheit) oder der spezifischen Enzymaktivität der  $F_1$ -ATPase.

### 3.5.3 Ergebnisse der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung zum Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus*

Ab 1999 wurden die experimentellen Bedingungen durch den Einsatz der weiterentwickelten XRIFREELON CCD-Kamera soweit verbessert, daß ein detaillierter Einblick in den Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* möglich war. Dies wurde durch eine erhöhte räumlichen Auflösung von  $1024 \times 1024$  Pixel und die verkürzte Belichtungszeit und Auslesezeit von je 150 ms ermöglicht.

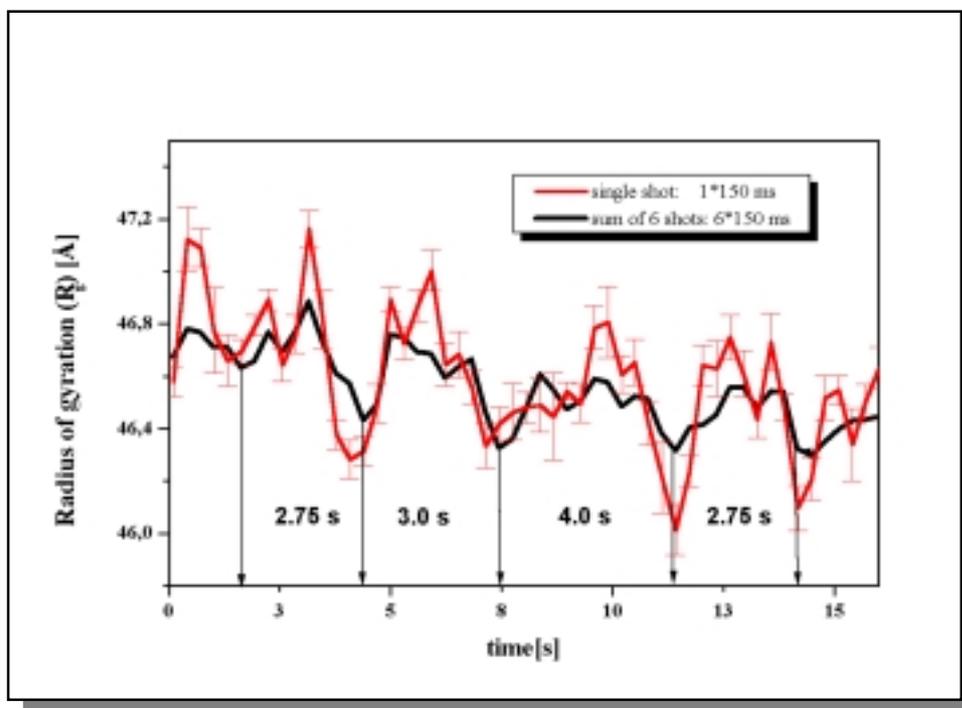
#### 3.5.3.1 Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* bei einer Temperatur von 20°C

Bei einer Temperatur von 20°C war die Lebensdauer der arbeitenden  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* im intensiven Röntgenstrahl lang genug, um Strukturänderungen während mehreren Reaktionszyklen zu beobachten. Der Gyrationradius ( $R_g$ ), der sensitive Informationen über die Gestalt des Proteins liefert, wurde verwendet um den zeitlichen Ablauf des Reaktionszyklus zu verfolgen. Nach Synchronisation des Reaktionszyklus der  $F_1$ -ATPase, ausgelöst durch einen schnellen Konzentrationssprung mit CaATP mittels Stopped-flow-Technik, wurden Strukturänderungen des Enzyms mit der Zeit festgestellt (Abbildung 52).

Diese Änderungen im Gyrationradius ( $R_g$ ) zeigten sich sowohl in Einzelschüssen (150 ms Belichtungszeit) als auch nach Addition von 6 Schüssen ( $6 \times 150$  ms). Nach der Synchronisation der Probe konnte eine Serie von Expansionen beobachtet werden, die von typischen „Schrumpfpulsen“ terminiert wurden. In Einzelschüssen betrug die maximale Änderung im  $R_g$  bis zu  $0.82 \text{ \AA} \pm 0.16 \text{ \AA}$  beim Erscheinen eines Schrumpfpulses. Die Änderung im  $R_g$  verkleinerte sich bei der Summe von 6 Einzelschüssen auf  $0.45 \text{ \AA}$ . Nach einer Experimentdauer von ungefähr 15 s nahm das Rauschen zu. Kontrollmessungen, bei denen anstatt CaATP Puffer mit Enzym gemischt wurde (nicht abgebildet), zeigten diesen Effekt nicht.

Im Laufe der enzymatischen ATP-Hydrolyse durch  $F_1$ -ATPase konnte man fast alle 3 Sekunden einen „Schrumpfpuls“ beobachten, währenddessen der Dritte erst nach 4 s erschien. Weil diese Zeit der enzymatisch bestimmten Zyklusdauer  $\tau$  der ATP-Hydrolysedauer durch  $F_1$ -ATPase bei 20°C ähnelt [60], kann die Zeit zwischen 2 Schrumpfpulsen als die Dauer eines Reaktionszyklus angenommen werden. Da der Dritte der drei Reaktionszyklen circa 1/3 mehr Zeit im Vergleich der ersten zwei Zyklen von 3 s Dauer benötigt, ist dies ein Hinweis auf die Existenz eines kinetischen Überzyklus, der aus 3 Unterzyklen im ATP-Hydrolysemechanismus der  $F_1$ -ATPase besteht. Dieses

spezielle Verhalten kann durch die Asymmetrie der arbeitenden  $F_1$ -ATPase erklärt werden. Die Existenz einer der drei großen Untereinheitenpaare ( $\alpha, \beta$ ) im  $F_1$ -Kopf mit einer zusätzlichen kleinen Untereinheit ( $\delta$  bei *Micrococcus luteus* ;  $\epsilon$  bei *E. coli*) (siehe Abb. 2, S. 3) könnte dieses Verhalten hervorrufen.



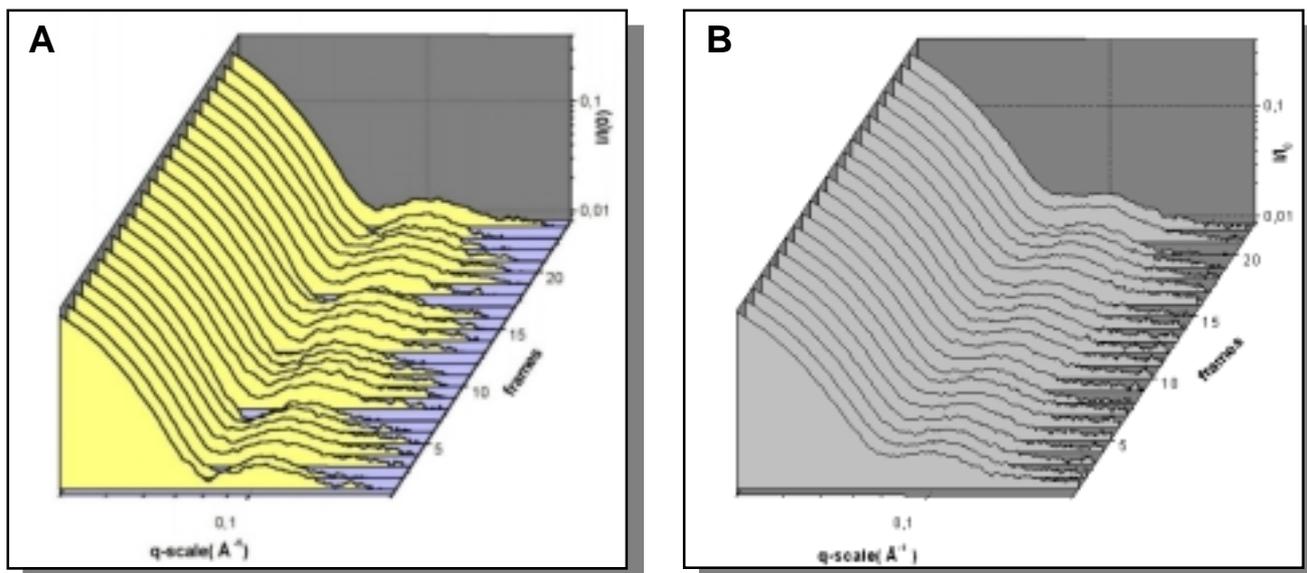
**Abbildung 52:** Die Änderung des Gyrationradius der arbeitenden  $F_1$ -ATPase im Laufe mehrerer Reaktionszyklen der ATP-Hydrolyse bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$

Bedingungen: 5 g/l  $F_1$ -ATPase in 100 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

Aufnahmen: 150 ms Belichtungsdauer (150 ms Auslesezeit) bei einem Röntgenfluß von  $10^{13}$  Ph/s in  $0.15 \text{ mm}^2$  Focus

### Genauere Betrachtung der Nebenmaximas der Streukurven

Außer den Expansionsänderungen ( $\Delta R_g$ ) sind molekulare Bewegungen innerhalb der arbeitenden  $F_1$ -ATPase in den schwachen Nebenmaxima der Streukurven ( $I/I_0 \sim 1\%$ ) zu erkennen. Abbildung 53 zeigt die zyklische Änderung der charakteristischen Extrema der arbeitenden  $F_1$ -ATPase nach Subtraktion der Pufferstreuung als Funktion der Zeit.



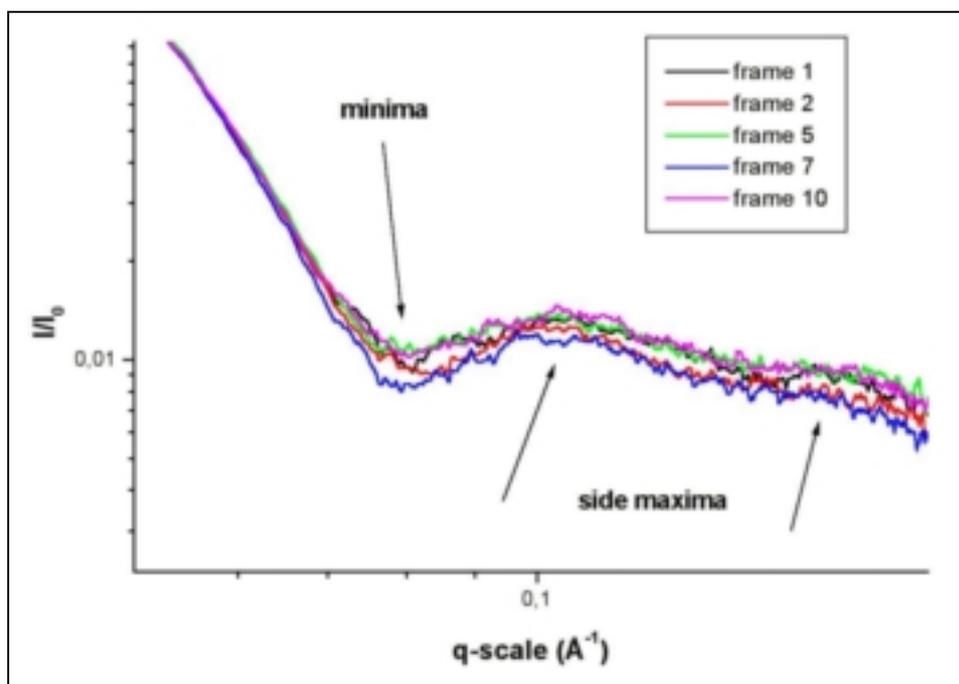
**Abbildung 53:** Die Nebenmaximas der Streukurven der arbeitenden  $F_1$ -ATPase bei  $20^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit von der Zeit (Belichtung 300 ms/Auslesezeit 150 ms)

A: Mischung mit CaATP bei  $t = 0$

B: Mischung mit Puffer (Kontrollexperiment)

Die Änderungen im Minimum und im Nebenmaximum der Streukurven in A repräsentieren direkt die Bewegung der Untereinheiten innerhalb des Enzyms

In Kontrollmessungen mit Puffer anstatt ATP wurden keine vergleichbaren Änderungen im Außenbereich der Streukurven detektiert (Abbildung 53 B).



**Abbildung 54:** Vergrößerung des Außenbereichs einzelner Streukurven des zeit-aufgelösten ATP-Hydrolysezyklus der  $F_1$ -ATPase bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$

Einzelne ausgewählte Streuprofile des zeitaufgelösten Reaktionszyklus sind zur besseren Unterscheidung in Abbildung 54 vergrößert dargestellt. Die 1. Zeitscheibe (frame 1 - schwarz dargestellt) ähnelt dem Streuprofil der  $F_1$ -ATPase im substratfreien Zustand. Charakteristische Extrema sind dabei der Wendepunkt bei  $q = 0.073 \text{ \AA}^{-1}$ , das Doppelmaximum bei  $q = 0.0863/0.1 \text{ \AA}^{-1}$  und das deutlich erkennbare 2. Nebenmaximum bei  $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ . Während des ATP-Hydrolysezyklus jedoch trat das Doppelmaximum ( $q = 0.086 \text{ \AA}^{-1}$ ) und das 2. Nebenmaximum nicht mehr so ausgeprägt hervor.

Nach Zugabe von CaATP ändert sich das Minimum bei  $q \sim 0.08 \text{ \AA}^{-1}$  im Laufe des Reaktionszyklus in Bezug auf Lage und Streuintensität deutlich. Dabei ist die Position des Minimums beim Auftreten der ausgeprägten „Täler“ nicht immer gleich, z.B. wenn man die 2. Zeitscheibe mit der 7. Zeitscheibe vergleicht. Es scheint sich um zwei unterschiedliche Konformationen im Hydrolysezyklus der  $F_1$ -ATPase zu handeln. Im Vergleich dazu ähneln sich wiederum die Zeitscheiben 5 und 10, was auf ähnliche Konformationen des Enzyms hindeutet.

Zur Interpretation wurden Experimente mit molekularer Modellierung (nach der FVM-Methode [93]) durchgeführt. Danach stellt das Minimum der Streukurve den „Schaft“ zwischen den  $\alpha, \beta$ -Untereinheiten und der zentralen  $\gamma$ -Untereinheit dar. Möglicherweise korreliert hier die zyklische Änderung in der Tiefe und der Position des Minimums mit der Änderung des Hohlraums zwischen diesen Untereinheiten.

Parallel zu der zyklischen Änderung in der Tiefe und der Position des Minimums verschiebt sich auch das 1. Nebenmaximum der Streukurve in geringem Maße. Diese Änderungen im Nebenmaximum korrespondieren nach der molekularen Modellierung mit der Verschiebung der großen Untereinheiten im  $F_1$ -Kopf des Enzyms. Die Position des Nebenmaximums  $q_s$  repräsentiert den Abstand  $d$  der Untereinheiten innerhalb des hohlen Proteins über folgende Beziehung  $d = 2\pi/q$ , wobei  $q$  der Streuvektor ist. So ist das 1. Nebenmaximum bei  $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  der Abstand zwischen den beiden großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  im Enzymkomplex.

Während sich das Minimum der Streukurve zu kleineren  $q$ -Werten verschob, kam es gleichzeitig auch zu einer Verschiebung des 1. Nebenmaximums zu kleineren  $q$ -Werten. Nach obiger Beziehung vergrößerte sich der  $\alpha, \beta$ -Untereinheitenabstand von  $59.8 \text{ \AA}$  im Anfangszustand der  $F_1$ -ATPase auf  $61.6 \text{ \AA}$  im Laufe eines Reaktionszyklus. Nach Glätten der Streukurve wurde die genaue Position des Nebenmaximums durch Bestimmung des Achsenabschnitts der  $x$ -Achse anhand der 1. Ableitung ermittelt. In der folgenden Tabelle ist die Position des Nebenmaximums und des daraus resultieren-

den  $\alpha,\beta$ -Untereinheitenabstands  $d$  der in Abbildung 54 gezeigten Zeitscheiben aufgeführt. Daraus ergab sich nach Zugabe von CaATP eine maximale Abstandsänderung der  $\alpha,\beta$ -Untereinheiten von 1.8 Å und im Laufe des Reaktionszyklus eine Abstandsänderung von 0.9 Å.

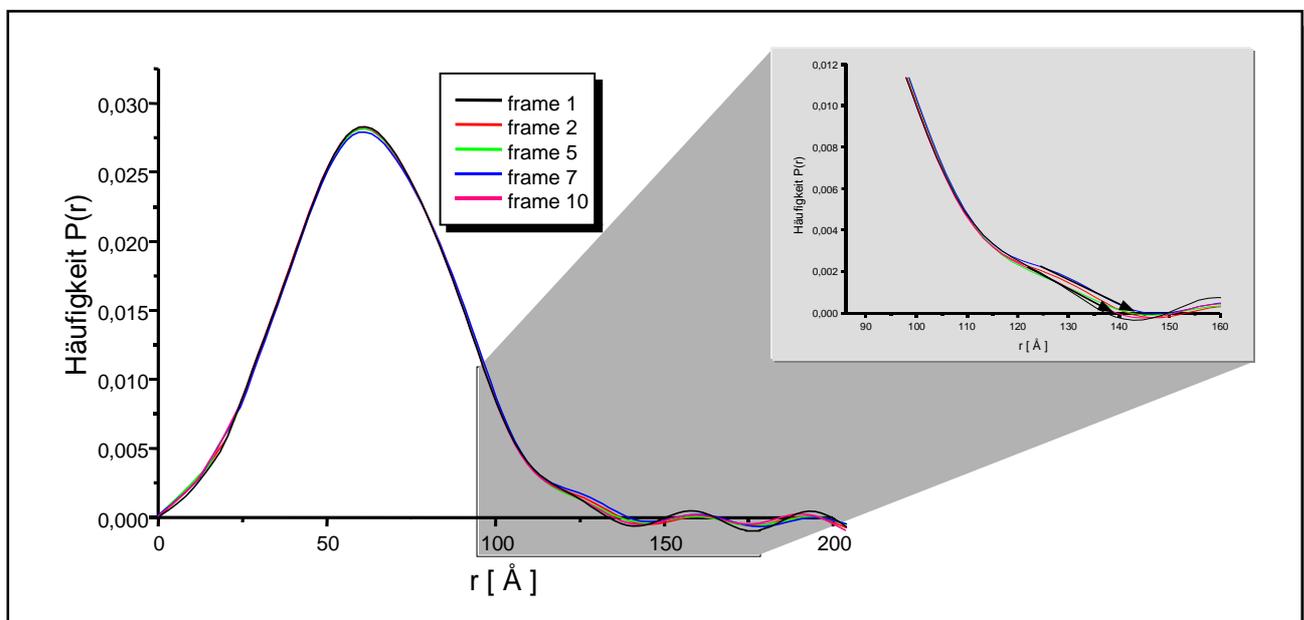
Zeitscheibe	q-Wert [Å <sup>-1</sup> ]	Abstand $d_{\alpha\beta}$ [Å]
Frame 1	0.1050	59.8
Frame 2	0.1020	61.6
Frame 5	0.1035	60.7
Frame 7	0.1020	61.6
Frame 10	0.1035	60.7

**Tabelle 2: Änderungen der  $\alpha,\beta$ -Untereinheitenabstände während des zeitaufgelösten Reaktionszyklus der  $F_1$ -ATPase**

Die strukturellen Änderungen der arbeitenden  $F_1$ -ATPase werden durch eine Bewegung der Untereinheiten oder Domänen im Molekülkomplex hervorgerufen. Molekulare Modellierung (FVM-Methode [93]) zeigte, daß diese Bewegung nicht durch die Rotation der zentralen  $\gamma$ -Untereinheit entsteht. Offenbar verschieben sich im Laufe eines Reaktionszyklus die großen Untereinheiten ( $\alpha,\beta$ ) oder zumindest der membranseitige Teil davon wesentlich. Genauere Aussagen lassen sich erst durch Modellierung einzelner ausgewählter Zwischenzustände treffen.

Zum Schluß wurde die Abstandsverteilungsfunktion der  $F_1$ -ATPase für einzelne Zeitscheiben ermittelt. Dabei wurde eine semidirekte Fourier-Transformation für jede einzelne Streukurve durchgeführt, wobei das fehlende Kurventeil ab  $q < 0.02 \text{ Å}^{-1}$  durch Guinier-Extrapolation ergänzt wurde und die Streukurve bis zu einem q-Wert von  $0.2 \text{ Å}^{-1}$  in diese Berechnung einging. In der Abbildung 55 sind einzelne intramolekulare Abstandsverteilungen des Proteins der in Abbildung 54 aufgeführten Zeitscheiben dargestellt. Während der häufigste Atomabstand im Molekül und die maximale Dimension des Moleküls  $r_{\max 1}$  bei circa  $107 \text{ Å}$  im Laufe des Reaktionszyklus konstant blieben, war eine Veränderung in der zweiten maximalen Dimension des Moleküls ( $r_{\max}$ ) bei  $140 \text{ Å}$  erkennbar. Nach Extrapolation konnten Änderungen der herausstehenden Domäne von bis zu  $7.6 \text{ Å}$  im Reaktionszyklus ermittelt werden.

Da die zweite maximale Dimension des Moleküls ( $r_{\max 2}$ ) nach Konstruktion des Strukturmodells ( $F_1$ -i8) durch die aus dem  $F_1$ -Kopf herausragende  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit hervorgerufen wird, könnten diese Änderungen durch die Rotation der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit hervorgerufen werden, die asymmetrisch im Hohlkörper lokalisiert sind (siehe Kristallstruktur S.66, Abb.37C)

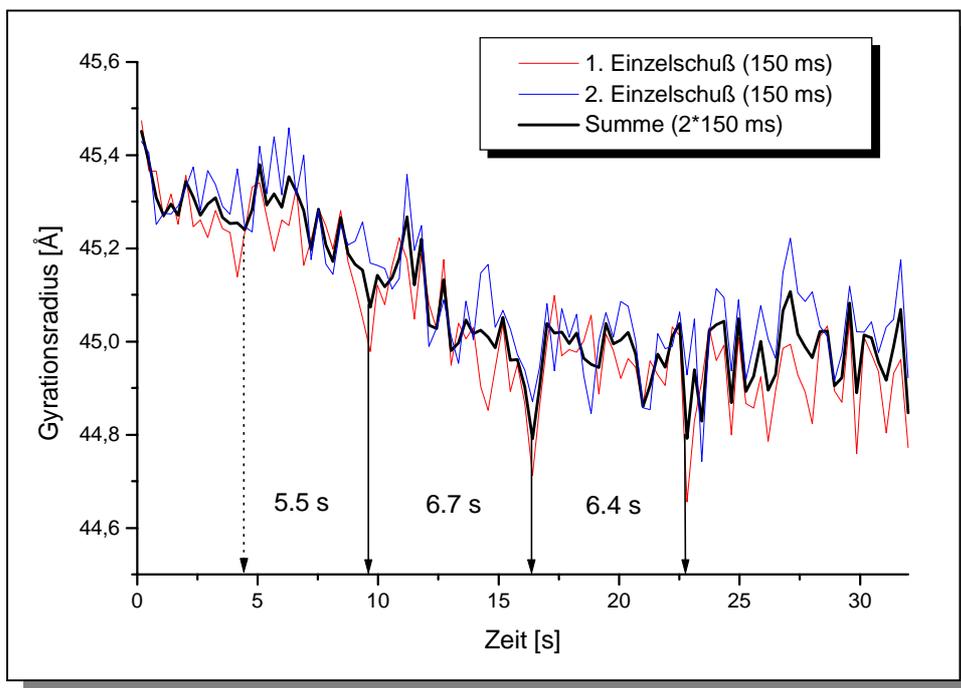


**Abbildung 55: Intramolekulare Abstandsverteilung der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* im Laufe des ATP-Hydrolysezyklus bei 20°C (Belichtungszeit 300 ms)**

Dieses Experiment bei einer Temperatur von 20 °C wurde in einem anderen Meßtermin mit einer anderen Enzympräparation und in einem anderen Synchrotronmodus (16-Bunch-Modus statt 2/3-Fill-Modus) der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle (ESRF) reproduziert.

### 3.5.3.2 Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* bei einer Temperatur von 15°C

Um den zeitlichen Ablauf des Reaktionszyklus zu verfolgen, wurde der Gyrationradius ( $R_g$ ), der sensitive Informationen über die Gestalt des Proteins liefert, verwendet. Nach Synchronisation des Reaktionszyklus der  $F_1$ -ATPase, ausgelöst durch einen schnellen Konzentrationsprung mit CaATP mittels Stopped-flow-Technik, wurden auch bei dieser Temperatur Strukturänderungen des Enzyms mit der Zeit festgestellt. Nach der Synchronisation der Probe konnte bei einer Temperatur von 15 °C eine Serie von Expansionen beobachtet werden, die von den typischen „Schrumpfpulsen“ terminiert wurden. Die folgende Abbildung zeigt zwei Einzelschüsse mit einer Belichtungszeit von je 150 ms (Auslesezeit 150 ms), die eine große Ähnlichkeit besitzen (Abb.56). Nach einer bestimmten Anfangsphase erschienen die Schrumpfpulse in Abständen von circa 6.5 Sekunden. Diese Zeit korrelierte gut mit den enzymatischen Messungen der ATP-Hydrolyse durch  $F_1$ -ATPase [60,66]. Allgemein betrug jedoch bei einer Temperatur von 15°C im Einzelschuß (150 ms-Belichtungsdauer) die maximale Änderung im  $R_g$  nur noch  $0.4 \text{ \AA} \pm 0.16 \text{ \AA}$  beim Erscheinen eines Schrumpfpulses.



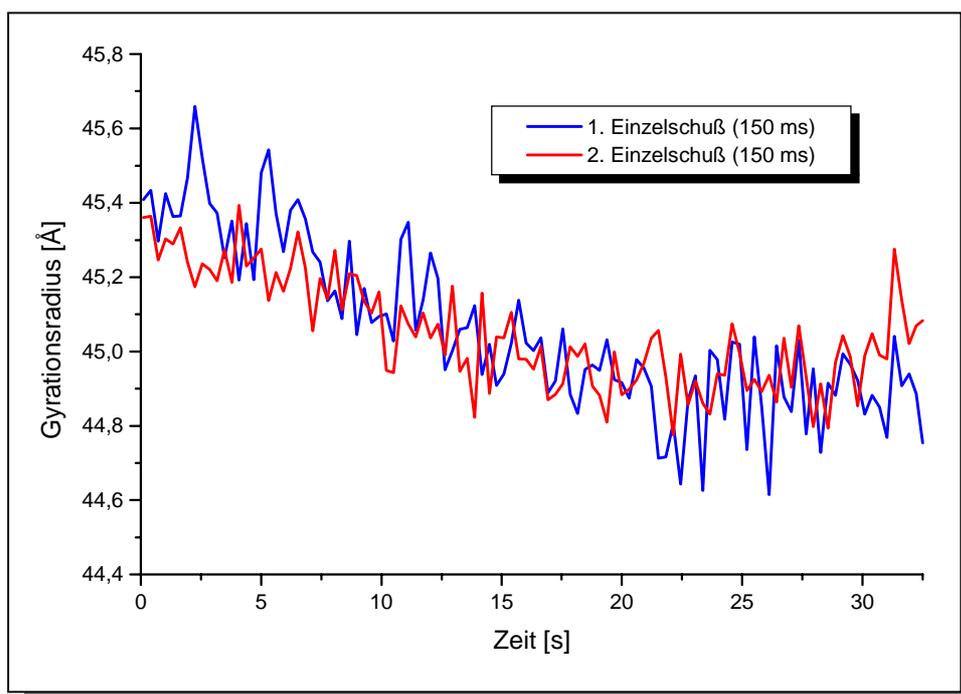
**Abbildung 56:** Die Änderung des Gyrationradius der  $F_1$ -ATPase im Laufe der ATP-Hydrolyse bei einer Temperatur von 15°C

Bedingungen: 5 g/l  $F_1$ -ATPase in 100 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

Aufnahmen: 150 ms Belichtungsdauer (150 ms Auslesezeit) bei einem Röntgenfluß von  $10^{13}$  Ph/s in  $0.15 \text{ mm}^2$  Focus

Bei einer Temperatur von 15°C kam es zu unerwarteten Problemen mit der Reaktionsführung. Die folgende Abbildung 57 zeigt beispielhaft 2 Schüsse, die zeitlich nicht gut übereinstimmen. Im allgemeinen konnte man feststellen, daß die Dauer der Anfangsphase von Schuß zu Schuß variiert. Dadurch und durch die geringeren Änderungen im Gyrationradius von 0.4 Å speziell bei dieser Temperatur war es schwierig Strukturpulse zu erkennen. Dieses Beispiel zeigt, daß sich die einzelnen Schüsse sich nicht mehr einfach addieren ließen, d.h. die Schüsse besaßen einen zeitlichen Versatz zueinander (delay). Mit Hilfe eines Korrelationsprogramms, das den zeitlichen Versatz innerhalb der einzelnen Schüsse analysiert, könnten diese Probleme eliminiert werden. Es stand jedoch keines für diesen speziellen Fall (nicht zyklische Ereignisse) geeignetes Korrelationsprogramm zur Verfügung.

Dieses Verhalten wurde auch bei noch tieferen Temperaturen (12°C) festgestellt. Die Kühlung des Systems scheint noch unbekannte Auswirkungen auf die Startreaktion des ATP-Hydrolysezyklus der F<sub>1</sub>-ATPase zu besitzen, z.B. die ATP-Beladung vor Beginn der Reaktion.

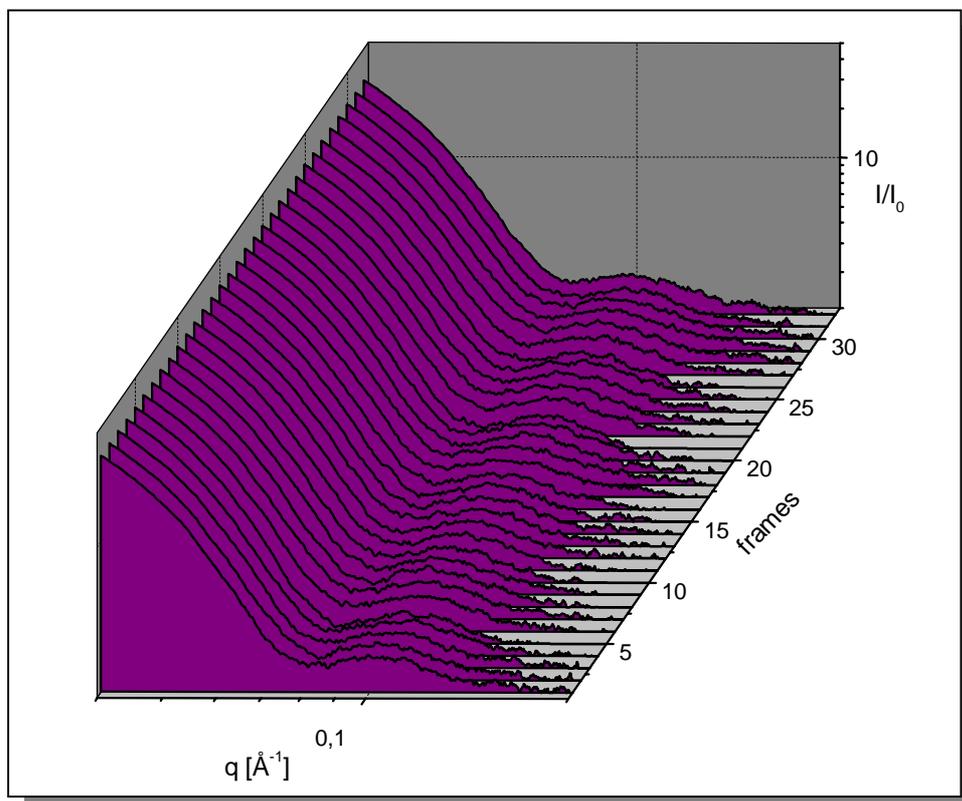


**Abbildung 57: Die Änderung des Gyrationradius der F<sub>1</sub>-ATPase im Laufe der ATP-Hydrolyse bei einer Temperatur von 15°C**

Bedingungen: 5 g/l F<sub>1</sub>-ATPase in 100 mM Tris/HCl, pH = 8, 10 % Glycerin

Aufnahmen: 150 ms Belichtungsdauer (150 ms Auslesezeit) bei einem Röntgenfluß von 10<sup>13</sup> Ph/s in 0.15 mm<sup>2</sup> Focus

Molekulare Bewegungen innerhalb der  $F_1$ -ATPase sind auch bei einer Temperatur von 15 °C in den schwachen Nebenmaxima der Streukurven ( $I/I_0 \sim 1\%$ ) qualitativ zu erkennen. Sie sind jedoch bei 15 °C nicht so ausgeprägt wie bei einer Temperatur von 20°C. Abbildung 58 zeigt die zyklische Änderung der charakteristischen Extrema der arbeitenden  $F_1$ -ATPase nach Subtraktion des isotropen Puffers als Funktion der Zeit.



**Abbildung 58:** Die Nebenmaximas der Streukurven der  $F_1$ -ATPase bei 15°C in Abhängigkeit von der Zeit (Belichtung : 150 ms/Auslesezeit 150 ms)

Um mehrere Zyklen der ATP-Hydrolyse durch synchronisierte  $F_1$ -ATPase verfolgen zu können, mußte die Meßdauer verlängert werden. Dies erfolgte durch Erhöhung der Belichtungsdauer auf 300 ms bei einer Auslesezeit von 150 ms, weil die maximale Anzahl der Zeitscheiben bei diesem Modell der CCD-Kamera auf 110 beschränkt war. Jedoch viele Strukturänderungen, die bei einer Belichtungszeit von 150 ms vorhanden sind, sind bei 300 ms- Belichtungsdauer durch zeitliche Mittelung der Ereignisse nicht sichtbar. Die Änderungen im Gyrationradius verkleinerten sich dadurch auf maximal  $\Delta R_g = 0.3 \text{ \AA}$  bei einem Fehler von  $0.07 \text{ \AA}$ . Bei einer Temperatur von 15°C konnten weitere Aussagen über den Reaktionszyklus aus diesen Gründen nicht getroffen werden.

### 3.5.4 Modellierung der Struktur- und Dynamik der F<sub>1</sub>-ATPase

Zur Interpretation der Struktur- und Dynamik der F<sub>1</sub>-ATPase wurden Strukturmodelle nach der FVM-Methode (Finite Volume Method [93]) erstellt. Einzelne Zwischenzustände des zeitaufgelösten Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse mittels der F<sub>1</sub>-ATPase wurden durch Vergleich der experimentellen Streukurven mit den theoretischen Modellstreukurven charakterisiert. Ursprungsmodell war das Strukturmodell F<sub>1</sub>-i8 für *Micrococcus luteus*, das der Kristallstruktur von ATP-Synthase aus *Hefemitochondrien* [41] nachempfunden wurde (Kapitel 3.4.1, S.65). Bei der Berechnung der theoretischen Streukurve wurden die 606 Modellelemente à 9.4 Å in 27 Subwürfel (Splitfaktor=3) unterteilt.

In Anlehnung an das Bewegungsmodell von Wang und Oster [37], die eine Kippbewegung des unteren Teils der katalytischen  $\beta$ -Untereinheit während des Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse vorschlugen, wurde der Hohlraum zwischen der  $\gamma$ -Untereinheit und des unteren Drittels einer  $\beta$ -Untereinheit geschlossen (Modell F<sub>1</sub>-i14). Dabei wurden einzelne Würfel der 3 untersten Schichten, die sich im Außenbereich der  $\beta$ -Untereinheit befanden, in diesen Hohlraum verschoben. Die Abbildung 59 zeigt den Unterschied der Anordnung der Würfelemente im Außenbereich einer  $\beta$ -Untereinheit, im rechten Bildbereich, anhand der erstellten Modelle F<sub>1</sub>-i8 und F<sub>1</sub>-i14.

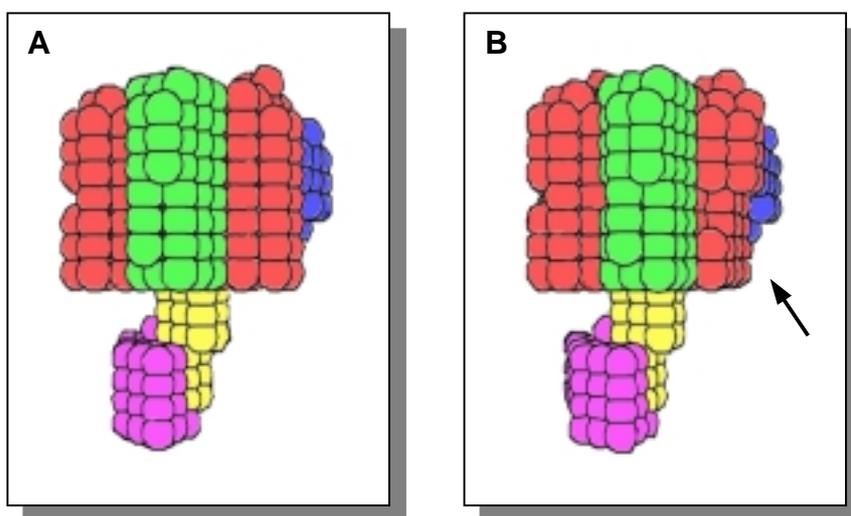


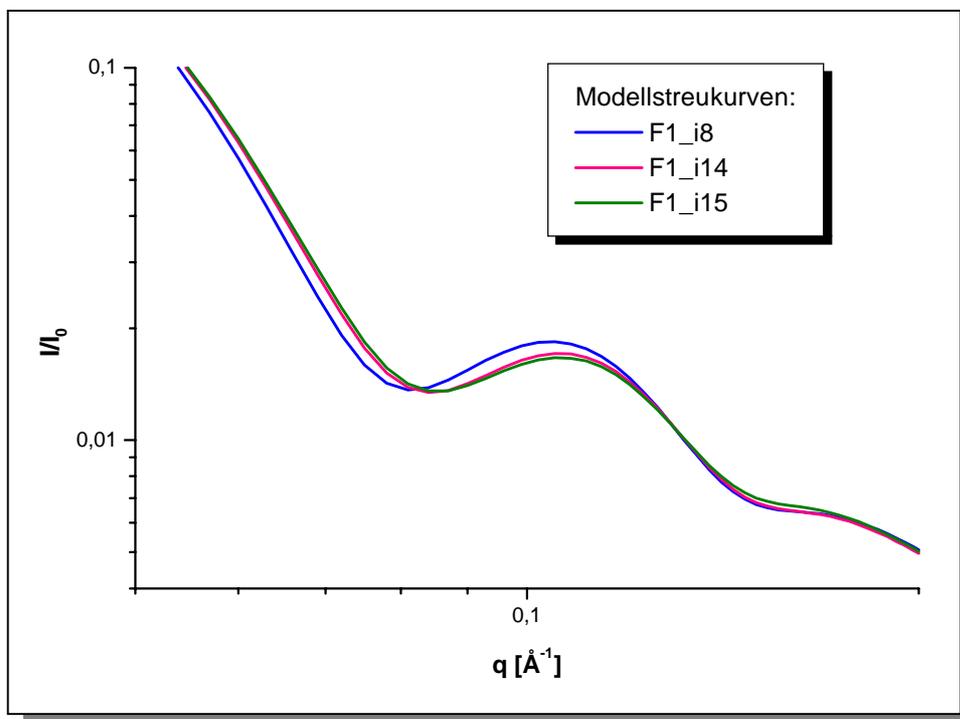
Abbildung 59: Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* im Ruhezustand (A) und mit eingeschobener membranseitiger  $\beta$ -Domäne (B)

A F<sub>1</sub>-i8

B F<sub>1</sub>-i14

Diese Modifizierung des Strukturmodells wurde von einer Änderung der daraus resultierenden Streukurve begleitet, jedoch wies die entsprechende Abstandsverteilungsfunktion keine signifikan-

ten Unterschiede auf. Im Modell F<sub>1</sub>-i15 (hier nicht gezeigt) wurde dieser direkte Kontakt der  $\gamma$ -Untereinheit zu zwei  $\beta$ -Untereinheiten hergestellt. In der folgenden Abbildung sind die theoretischen Streukurven dieser 3 Modelle abgebildet. Dabei unterscheiden sich die theoretischen Streukurven der Modelle 14 und 15 kaum.



**Abbildung 60: Theoretische Streukurven einzelner Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase zur Charakterisierung der einzelnen Zwischenzustände im ATP-Hydrolysezyklus**

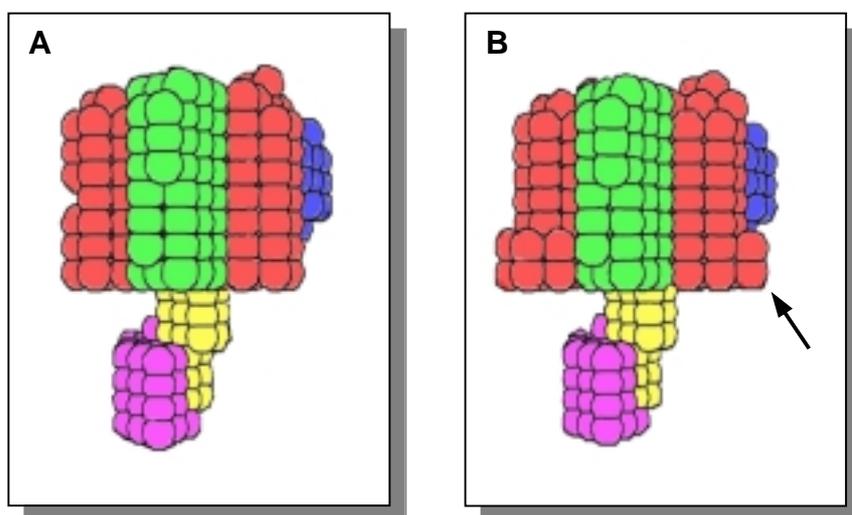
Allgemein konnte man festzustellen, daß je geringer der Hohlraum zwischen der  $\gamma$ -Untereinheit und den  $\beta$ -Untereinheiten im unteren Bereich der F<sub>1</sub>-Kopfes war, desto größer war auch die Verschiebung des Minimums und des 1. Nebenmaximums in der berechneten Streukurve zu größeren Impulsüberträgen, d.h. der  $\alpha,\beta$ -Untereinheitenabstand zueinander wurde immer kleiner. Weiterhin war das 1. Nebenmaximum schwächer ausgeprägt, je weniger Hohlraum im  $\alpha,\beta$ -Kopf des Enzyms vorhanden war.

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den experimentell ermittelten molekularen Bewegungen innerhalb der F<sub>1</sub>-ATPase, die in den schwachen Nebenmaxima der Streukurven bei einer Temperatur von 20°C sichtbar waren (siehe Abbildung 54, S.83). Wie der Vergleich mit dem Modell F<sub>1</sub>-i8 zeigt, entspricht demnach die Zeitscheibe 7 des Experiments einem Zustand des Enzyms, indem die  $\gamma$ -Untereinheit frei im Hohlraum des F<sub>1</sub>-Kopfes lokalisiert ist. Die Streukurve der Zeitscheiben 5

und 10 des Reaktionszyklus ähnelt derjenigen des Modells F<sub>1</sub>-i14, in der eine oder zwei  $\beta$ -Untereinheiten in direktem Kontakt zur  $\gamma$ -Untereinheit stehen. Weiterhin stimmt die im Experiment erhaltene Streukurve der Zeitscheibe 1 mit derjenigen des Modells F<sub>1</sub>-i14 gut überein. Nur das zusätzliche Doppelmaximum bei  $q = 0.0863 \text{ \AA}^{-1}$ , das nach der Aktivierungsphase (50 ms) während des ganzen Reaktionszyklus nicht mehr erscheint, ließ sich nicht in einem Molekülmodell nachweisen.

Diese Verschiebung des unteren Drittels der  $\beta$ -Untereinheiten in den Hohlraum zwischen der  $\gamma$ -Untereinheit und den  $\beta$ -Untereinheiten bewirkt jedoch keine signifikanten Änderungen im Gyrationradius der F<sub>1</sub>-ATPase. Maximale Änderungen waren in diesem Fall  $\Delta R_g = 0.3 \text{ \AA}$  zwischen den oben abgebildeten Modellen.

Um größere Veränderungen im Gyrationradius zu erreichen, wurde nun ein kleiner Teil der  $\beta$ -Untereinheit im unteren Drittel nach außen modelliert. Ausgehend vom Modell F<sub>1</sub>-i8, indem die  $\gamma$ -Untereinheit frei im Hohlraum des F<sub>1</sub>-Kopfes liegt, wurden jeweils zwei Würfel der untersten 2 Schichten einer  $\beta$ -Untereinheit nach außen verschoben. Dieser Vorgang wurde an einer bzw. zwei  $\beta$ -Untereinheiten (F<sub>1</sub>-i26) durchgeführt. Abbildung 61 zeigt den Unterschied der Anordnung der Würfelemente anhand der Modelle F<sub>1</sub>-i8 und F<sub>1</sub>-i26.



**Abbildung 61: Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* im Ruhezustand (A) und mit ausgeschobener membranseitiger  $\beta$ -Domäne (B)**

A F<sub>1</sub>-i8

B F<sub>1</sub>-i26

In der folgenden Tabelle sind resultierenden Gyrationradien aller entwickelten Strukturmodelle zur Charakterisierung des Reaktionszyklus der F<sub>1</sub>-ATPase aufgeführt. Erwartungsgemäß war eine Ver-

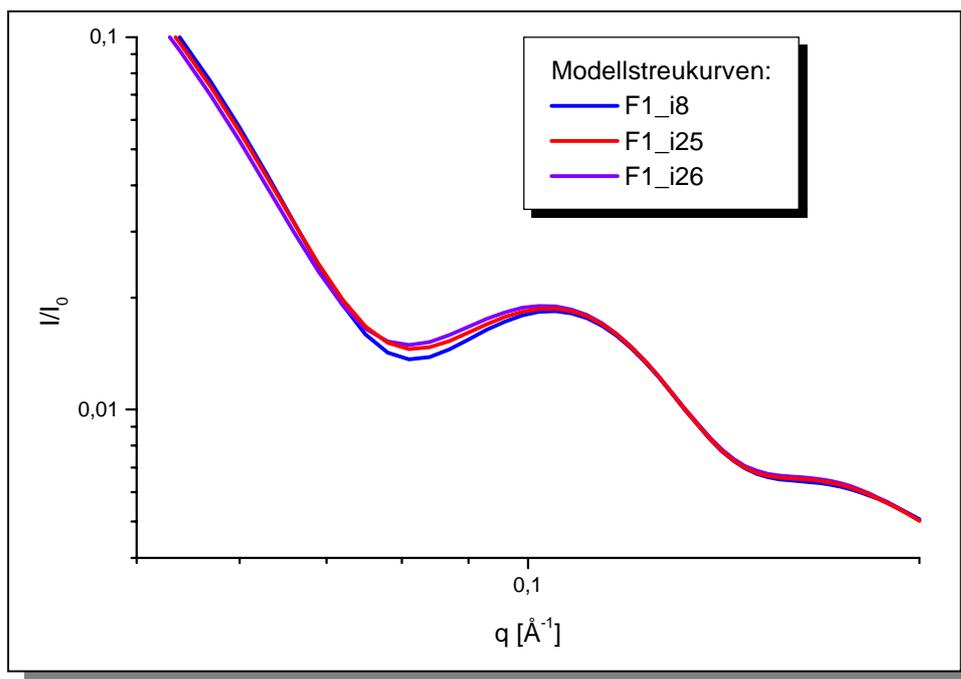
größerung des Gyrationradius festzustellen, je weiter die  $\beta$ -Untereinheiten in ihrem unteren Drittel (membranseitige Domäne) von der  $\gamma$ -Untereinheit entfernt waren.

Modell	Gyrationradius [Å]	Membranseitige $\beta$ -Domänen	
		eingeklappt	ausgeklappt
<b>F<sub>1</sub>-i8</b>	47.92	–	–
<b>F<sub>1</sub>-i14</b>	47.61	1	–
<b>F<sub>1</sub>-i15</b>	47.63	2	–
<b>F<sub>1</sub>-i25</b>	48.28	–	1
<b>F<sub>1</sub>-i26</b>	48.63	–	2

**Tabelle 3:** Gyrationradien der entwickelten Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase (FVM-Methode [93])

Neben einer Erhöhung des Gyrationradius für die Modelle F<sub>1</sub>-i25 und F<sub>1</sub>-i26 war auch eine Veränderung in den entsprechenden Streukurven erkennbar. Das Minimum der Streukurven dieser Modelle war weniger stark ausgeprägt, währenddessen sich die Streuintensität des 1. Nebenmaximums nicht ändert (Abb.62).

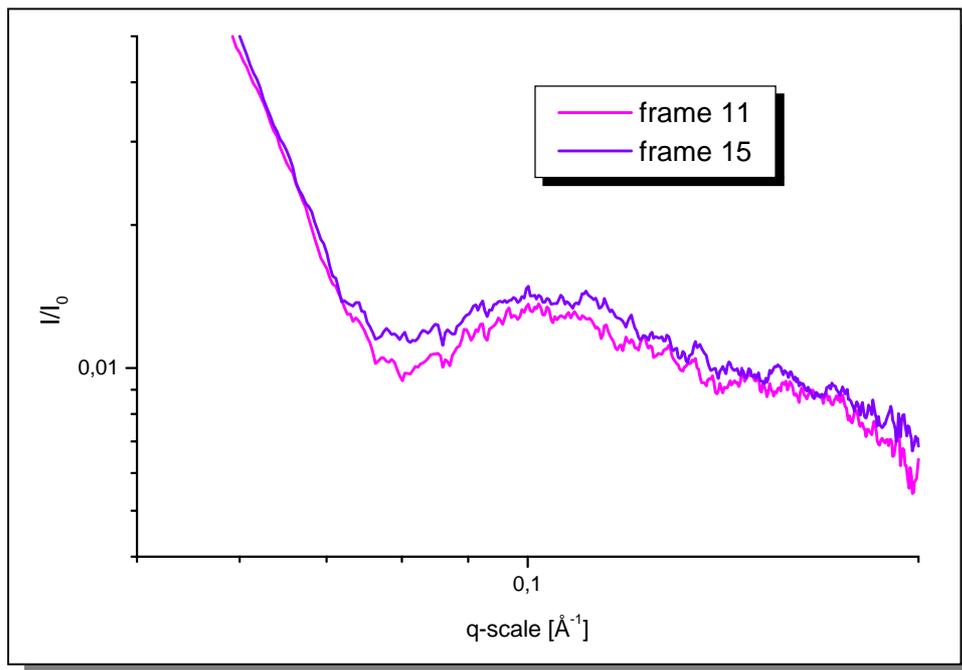
Der Vergleich der Streukurven dieser beiden Modelle mit den im Experiment ermittelten Änderungen im Nebenmaximum zeigte weitere Übereinstimmungen. Die Zeitscheibe 2 war vergleichbar mit dem Modell F<sub>1</sub>-i25, bei dem ein Teil des unteren Drittels einer einzelnen  $\beta$ -Untereinheit in den Außenbereich des Enzyms modelliert wurde (ausgeklappte membranseitige  $\beta$ -Domäne).



**Abbildung 62: Theoretische Streukurven berechnet für verschiedene Strukturmodelle der F<sub>1</sub>-ATPase**

Nach der molekularen Modellierung scheint im Laufe des ATP-Hydrolysezyklus eine Art Kippbewegung des unteren Drittels der  $\beta$ -Untereinheit stattzufinden. Dabei kann anhand der Streukurven nicht klar unterschieden werden, ob während des Hydrolysezyklus eine oder zwei  $\beta$ -Untereinheiten gleichzeitig herausklappen oder im anderem Extrem in direktem Kontakt zur  $\gamma$ -Untereinheit stehen; der Unterschied in den Streukurven der jeweiligen Modelle ist zu gering.

Zum Schluß wurde überprüft, ob die Kippbewegungen der membranseitigen Domänen der  $\beta$ -Untereinheiten auch mit der experimentellen Änderung des Gyrationradius im Reaktionsmechanismus korreliert. Dazu wurden zwei Zeitscheiben des Reaktionszyklus ausgewählt, die eine Änderung im Gyrationradius um  $\Delta R_g = 0.8 \text{ \AA}$  („Schrumpfpuls“) aufwiesen (Abb.52, S.82). Die entsprechenden experimentellen Streukurven der Zeitscheiben 11 und 15 sind in der Abbildung 63 dargestellt. Die Streukurven unterscheiden sich hauptsächlich in der Ausprägung des Minimums und in der Höhe des 1. Nebenmaximums. Nach Vergleich der Streukurven mit denjenigen der erstellten Modelle entspricht die Zeitscheibe 15 dem Modell F<sub>1</sub>-i14/15 und die Zeitscheibe 11 dem Strukturmodell F<sub>1</sub>-i25/26. Diese beiden Modelle unterscheiden sich nach der Tabelle 3 im Gyrationradius um  $1 \text{ \AA}$ .



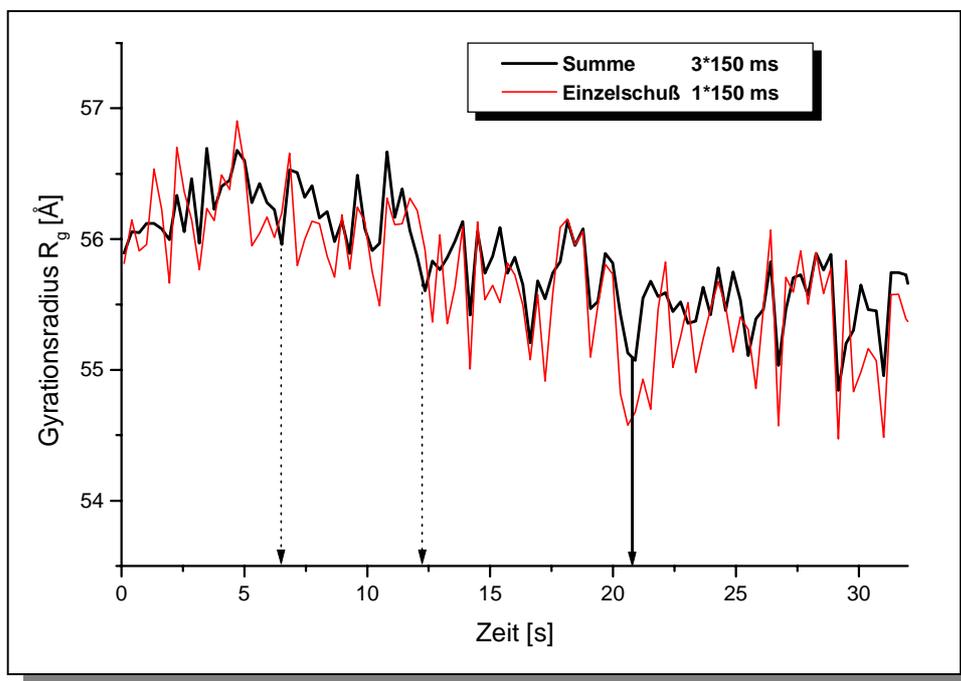
**Abbildung 63: Experimentell ermittelte Streukurven der Zeitscheiben 11 und 15 des ATP-Hydrolysezyklus der F<sub>1</sub>-ATPase bei einer Temperatur von 20 °C**

Durch die Konstruktion der obigen Strukturmodelle konnte der ATP-Hydrolysezyklus der F<sub>1</sub>-ATPase anhand der Streukurven charakterisiert werden. Die Veränderungen im Nebenmaximum der einzelnen Streukurven wiesen auf eine Art Kippbewegung der  $\beta$ -Untereinheiten in ihrem unteren Drittel hin, die zu einem direkten Kontakt zur  $\gamma$ -Untereinheit führte. Ob im Laufe des Reaktionszyklus die membranseitige Domäne von einer oder zwei  $\beta$ -Untereinheiten diese Kippbewegung durchführen, konnte anhand der erstellten Modelle nicht unterschieden werden. Diese molekularen Bewegungen korrelieren gut mit den festgestellten Änderungen im Gyrationradius ( $R_g$ ), d.h. in der Ausdehnung des Moleküls.

### 3.5.5 Ergebnisse der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung zum Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* bei 20°C

Durch zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung, die zur Charakterisierung der Größe und Konformation gelöster biologischer Makromoleküle besonders geeignet ist, konnten Strukturänderungen der arbeitenden ATP-Synthase im Laufe eines ATP-Hydrolysezyklus beobachtet werden. Nach enzymatischen Untersuchungen der ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* ergab sich bei einer Temperatur von 20 °C für die Dauer eines Reaktionszyklus eine Zeit von circa  $\tau = 20$  s (siehe Kapitel 3.2.1.3). Um einen einzelnen Reaktionszyklus der ATP-Synthase zeitaufgelöst verfolgen zu können, war im Gegensatz zur F<sub>1</sub>-ATPase zur Verlängerung des Reaktionszyklus keine weitere Kühlung notwendig.

Der **Gyrationsradius ( $R_g$ )**, der sensitive Informationen über die Gestalt des Proteins liefert, wurde auch hier verwendet um den zeitlichen Ablauf des Reaktionszyklus zu verfolgen. Nach Synchronisation des Reaktionszyklus der ATP-Synthase, ausgelöst durch einen schnellen Konzentrationsprung mit MgATP als Substrat mittels Stopped-flow-Technik, wurden Strukturänderungen des Enzyms mit der Zeit festgestellt (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Die Änderung des Gyrationsradius der ATP-Synthase im Laufe eines einzelnen Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse bei einer Temperatur von 20°C

Bedingungen: 3 g/l ATP-Synthase in 50 mM Tris-Ac, pH = 7.5, 5 mM TDOC, 10 % Glycerin

Aufnahmen: 150 ms Belichtungsdauer (150 ms Auslesezeit) bei einem Röntgenfluß von  $10^{13}$  Ph/s in 0.15 mm<sup>2</sup> Focus

Diese Änderungen im Gyrationradius ( $R_g$ ) zeigten sich sowohl in Einzelschüssen (150 ms Belichtungszeit) als auch nach Addition von 3 Schüssen ( $3 \times 150$  ms), wenn auch mit im Vergleich zur  $F_1$ -ATPase vergrößerten Fehler. Nach der Synchronisation der Probe konnte eine Serie von Expansionen beobachtet werden, die von typischen „Schrumpfpulsen“ terminiert wurden. Besonders der „Schrumpfpuls“ nach circa 22 Sekunden Zyklusdauer ist deutlich zu erkennen. Die maximale Änderung im  $R_g$  betrug hier bis zu  $1.5 \text{ \AA} \pm 0.36 \text{ \AA}$ , währenddessen sich die Änderung im  $R_g$  bei der Summe von 3 Einzelschüssen auf  $0.8 \text{ \AA}$  verkleinerte. Der erhöhte Fehler bei der Bestimmung des Gyrationradius resultiert zum einen aus der geringeren Proteinkonzentration des Enzyms (3 g/l) und dem verkürzten auswertbaren Guinierbereich der ATP-Synthase. Da der Schrumpfpuls nach 22 Sekunden Zyklusdauer gut mit der enzymatisch bestimmten Zyklusdauer der ATP-Synthase korreliert, kann man die Zeit bis zu diesem Schrumpfpuls als die Dauer ein Reaktionszyklus vermuten.

Aufgrund der langgestreckten Gestalt der ATP-Synthase wurde neben der Bestimmung des Gyrationradius ( $R_g$ ) auch die **Stäbchenlänge**  $L$  ermittelt, um den Reaktionszyklus zu verfolgen. Die Stäbchenlänge  $L$  des Enzyms wurde mit Hilfe der Kratky-Darstellung und Gleichung 2.7 bestimmt. Dabei zeigte sich eine maximale Änderung der Stäbchenlänge von  $3.4 \text{ \AA}$  im Reaktionsverlauf. Ferner korrelierten die Änderungen der Stäbchenlänge  $L$  mit den Änderungen des Gyrationradius. Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich der zeitlichen Änderungen der Stäbchenlänge  $L$  und des Gyrationradius ( $R_g$ ) für einen Einzelschuß mit einer Belichtungszeit von 150 ms je Bild. Anhand der Änderungen der Stäbchenlänge der ATP-Synthase kommt es im Laufe des Reaktionszyklus zu einer Art Kontraktion in der Längenausdehnung der ATP-Synthase um circa  $3 \text{ \AA}$  (2 %).

Dieser weitere Bewegungsmodus der ATP-Synthase tritt vermutlich zusätzlich zu den Strukturänderungen im  $F_1$ -Kopf des Enzyms auf. Jedoch im Falle der ATP-Synthase waren bei Betrachtung der schwachen Nebenmaxima der Streukurven keine Änderungen zu erkennen. Hervorgerufen durch den zusätzlichen membranständigen  $F_0$ -Teil im Enzym zeigen die Streukurven der ATP-Synthase nur eine verwaschene Mehrfachschulter, die keine detaillierte Aussage über molekulare Bewegungen innerhalb des Enzyms zuläßt. In der Abbildung 66 sind die Nebenmaximas der Streukurven der ATP-Synthase bei  $20^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

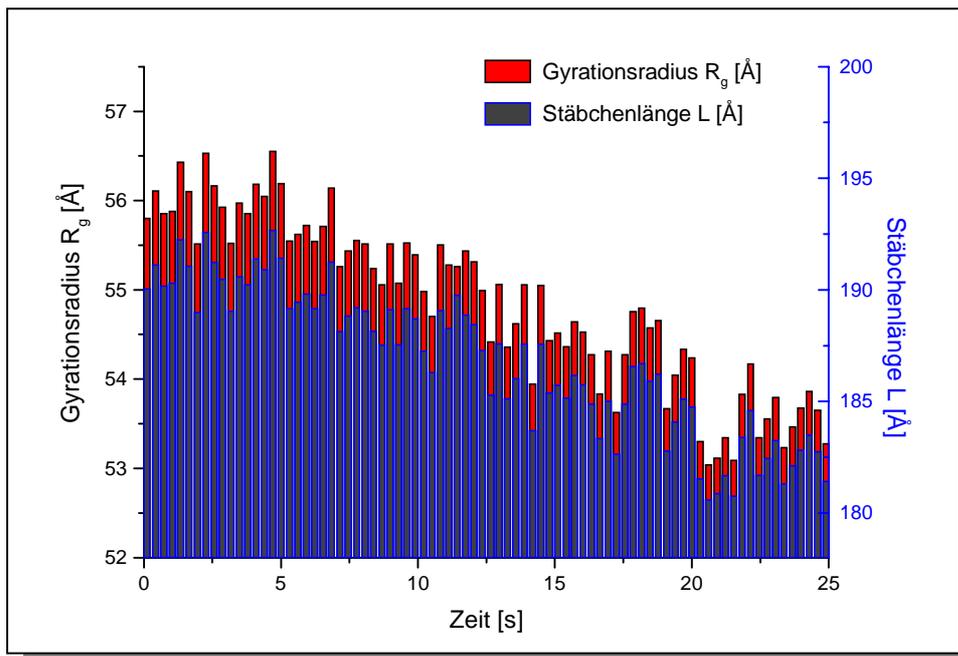


Abbildung 65: Die Änderung des Gyrationradius ( $R_g$ ) und der Stäbchenlänge ( $L$ ) der arbeitenden ATP-Synthase im Laufe eines einzelnen Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$

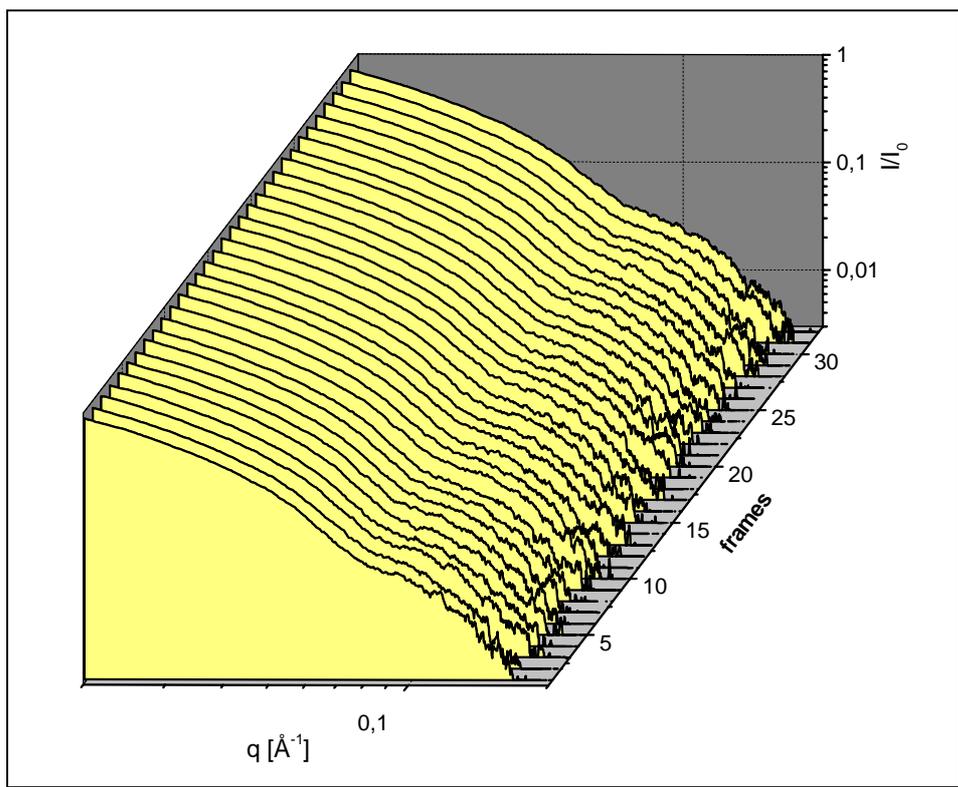


Abbildung 66: Die Nebenmaximas der Streukurven der ATP-Synthase bei  $20^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit von der Zeit (Belichtung 300 ms/Auslesezeit 150 ms)

## 4 Diskussion

### 4.1 Enzympräparation und Charakterisierung der ATP-Synthasen

Die Reinigung der ATP-Synthasen aus *Micrococcus luteus*, der  $F_1$ -ATPase und der ATP-Synthase, mittels chromatographischer Trennmethode wurde auf präparativen Maßstab übertragen. Zur Analyse von Strukturumwandlungen der Enzyme im Laufe des Reaktionszyklus mittels zeitaufgelöster Röntgenkleinwinkelstreuung wurde ein Produkt in großer Menge und hoher Reinheit benötigt. Der Start des ATP-Hydrolysezyklus erfolgte durch Substratsättigung der ATP-Synthasen mit Hilfe des „stopped-flow“-Mischverfahrens (Konzentrationsprung). Pro hergestellter Reaktionsmischung wurden je 80  $\mu$ l Enzym- ( $c = 5-10$  g/l) und Substratlösung ( $c_{\text{ATP}} = 16$  mM) eingesetzt.

Wie im Kapitel 3.1 gezeigt ist, konnte bei den Präparationen neben der großen Menge auch die für Streuversuche notwendige Reinheit von 98 % erzielt werden. Hilfreich war die Verwendung von SDS-Mini-Gelen (Biorad-System) im Lauf der Präparationen zur Analyse der einzelnen Reinigungsschritte. Der Vorteil lag in der schnellen Herstellung, d.h. 3 Stunden nach Elution des jeweiligen Enzyms lag das gefärbte Mini-Gel vor. Die empfindlichen Proteine konnten durch dieses schnelle Verfahren während der Präparation geschont und ohne mehrtägige Salz-Inkubation in ihrer aktiven Form isoliert werden. Der Zusatz von 10 %-Glycerin zu den Enzymlösungen erfüllte zwei wichtige Aufgaben. Zum einen besitzt Glycerin eine stabilisierende Wirkung auf Proteine und fungiert zusätzlich als Radikalfänger während der zeitaufgelösten Strukturuntersuchung der Proteine mittels Röntgenstrahlung zur Vermeidung von Strahlenschäden. Der Nukleotidgehalt beider Enzympräparate wurde nach der Methode von Garret und Penefsky [95] ermittelt. Die Präparate ließen auf einen Anfangszustand des ATP-Hydrolysezyklus schließen, der 3 Purinnukleotid-Moleküle (ATP/ADP+GTP/GDP) enthält, die vermutlich an den 3 nicht-katalytischen Bindungsstellen lokalisiert sind (Kapitel 3.1.2, 3.1.4).

Die Überprüfung der Funktionalität der Enzyme erfolgte mittels enzymatischer Methoden. Durch Vorarbeiten in den vergangenen Jahren waren die Funktionsänderungen beider Enzyme in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur analysiert worden [60,66,69]. So konnte im Fall der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* die langsame Dissoziation des Inhibitorsproteins und die Umwandlung in eine andere Enzymmodifikation gut beobachtet werden, da der Prozeß bei 37 °C 90 Minuten dauert (Abb.22, S.50). Die ATP-Synthase zeigte als charakteristisches Merkmal einen Anstieg der ATP-Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und der Inkubationszeit

(Abb.24, S.52). Im Fall der ATP-Synthase konnte zusätzlich zur ATP-Hydrolyseaktivität die ATP-Syntheseaktivität des Enzyms überprüft werden (Abb.26, S.54), um ein strukturell und funktionell intaktes Enzym nachzuweisen.

## 4.2 Statische Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthasen aus *Micrococcus luteus*

### 4.2.1 Statische Röntgenkleinwinkelstreuung und Modellierung der F<sub>1</sub>-ATPase

Die Experimente am Synchrotron DESY-HASYLAB in Hamburg führten zu einem Röntgenkleinwinkelstreuoprofil des Enzyms in hoher Auflösung. Dies wurde durch die sehr gute Kalibrierung der Meßeinrichtung des JUSIFA-Instruments [85] und die Verwendung eines hochreinen Enzympräparats möglich. Wegen der geringen Strahlstärke am Instrument B1-Jusifa (1/200000 des ID2-Instrumentes, ESRF in Grenoble) konnten Artefakte durch Strahlenschädigung des Proteins in 10 % Glycerin ausgeschlossen werden. Die am JUSIFA-Instrument ermittelten Daten dienen daher als Referenz für die weiteren zeitaufgelösten Experimente.

Die Genauigkeit des Streuprofiles der nativen F<sub>1</sub>-ATPase bildete die Grundlage zur Erstellung des Molekülmodells der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* mit der FVM-Methode [93]. Anhand der in der Literatur aktuell vorliegenden Kristallographiedaten für die F<sub>1</sub>-ATPasen aus anderen Organismen [27,41] wurde das bis dato vorliegende Molekülmodell der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* [60] modifiziert. Insbesondere im Bereich des Stiels, der im F<sub>1</sub>-Hohlkörper rotiert und aus dem F<sub>1</sub>-Hohlkörper herausragt, war die Kristallstruktur der ATP-Synthase aus *Hefemitochondrien* [41] bei der Weiterentwicklung des Modells sehr hilfreich. In der Kristallstruktur konnte 1999 erstmals die vollständige  $\gamma$ -Untereinheit und die  $\delta$ -Untereinheit aufgelöst werden, die gemeinsam um 25 Å aus dem F<sub>1</sub>-Hohlkörper herausragen. Mit Hilfe des Programms Multibody [94] wurden aus den Kristallographiedaten mit atomarer Auflösung die zugehörigen theoretischen Kleinwinkelstreuoprofile und die Abstandsverteilungsfunktionen ermittelt. Dadurch konnten beide Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen direkt miteinander verglichen werden.

Die Lokalisation der  $\epsilon$ -Untereinheit innerhalb des F<sub>1</sub>-Komplexes wurde anhand von verschiedenen Aussagen in der Literatur in den Zwischenraum eines  $\alpha$ , $\beta$ -Paares des F<sub>1</sub>-Kopfes modelliert. Über die genaue Lokalisation der  $\epsilon$ -Untereinheit am F<sub>1</sub>-Kopf ist man in der Literatur jedoch unterschiedlicher Meinung. Die Position der  $\epsilon$ -Untereinheit bzw. der  $\delta$ -Untereinheit im Falle von *E. coli* wurde entweder in der Nähe des Fußes [97] oder am Kopf [98] des  $\alpha_3\beta_3$ -Komplexes der F<sub>1</sub>-ATPase disku-

tiert. Im Falle der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* wurde die  $\epsilon$ -Untereinheit in den Mittelbereich der  $F_1$ -Hohlkörpers modelliert.

Die Modifizierung des Strukturmodells der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* ( $F_1$ -i8) in Bezug auf die veränderten Positionen der  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ -Untereinheit im Enzymkomplex führte beim Vergleich der experimentellen mit der theoretisch ermittelten intramolekularen Abstandsverteilung zu einer sehr guten Übereinstimmung (Abb.40, S.68). Dies trifft insbesondere bei großen Atomabständen im Bereich des Stiels zu. Weiterhin korrelierte der im Experiment ermittelte Streumassenradius ( $R_g = 45.0 \text{ \AA}$ ), der ein Maß für die Ausdehnung des Moleküls ist, mit demjenigen des weiterentwickelten Strukturmodells ( $R_g = 45.58 \text{ \AA}$ ).

Weiterhin wurden statischen Kleinwinkelstreuexperimente zur Charakterisierung der Strukturänderungen der  $F_1$ -ATPase, die in Abhängigkeit von dem Inhibitor Azid auftraten, durchgeführt. Diese Ergebnisse werden in Abschnitt 4.3 diskutiert.

#### 4.2.2 Statische Kleinwinkelstreuung und Modellierung der ATP-Synthase

Im Falle der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* wurden zur Charakterisierung der Größe und Form des Membranproteins zwei unterschiedliche Streumethoden angewendet. Es ergab sich bei Streuversuchen mit Röntgenlicht sowie mit Neutronen ein einheitlicher Gyrationradius von  $R_g = 57 \text{ \AA}$ . Obwohl verschiedene Enzympräparationen eingesetzt und die Kleinwinkelstreuprofile des Enzyms an zwei verschiedenen Einrichtungen ermittelt worden sind, kam es zu dieser guten Übereinstimmung.

Die Röntgenkleinwinkelstreucurve der ATP-Synthase, die am Synchrotron DESY-HASYLAB in Hamburg ermittelt wurde, besaß eine hohe Auflösung. Die gute Kalibrierung der Meßeinrichtung des JUSIFA-Instruments [85] und die Verwendung eines hochreinen Enzympräparats machte es möglich. Diese Genauigkeit des Profils bildete die Grundlage zur Erstellung des Molekülmodells der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* mit der FVM-Methode [93].

Die Konstruktion dieses Strukturmodells der ATP-Synthase erwies sich schwieriger als im Falle der  $F_1$ -ATPase. Zwar war die Form des katalytischen Kopfes, der  $F_1$ -ATPase, durch das vorliegende Modell ( $F_1$ -i8) bekannt, jedoch war die Lokalisation der kleineren Untereinheiten  $a$ ,  $b_2$  und  $c_{10-14}$  des membranständigen  $F_0$ -Teils unklar.

In der Kristallstruktur der ATP-Synthase aus *Hefemitochondrien* [41] konnten nur die Untereinheiten  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und 10 c-Untereinheiten des Enzyms aufgelöst werden. In verschiedenen Arbeiten

wurde die Anordnung der c-Untereinheiten in Form eines Ringes [22,46-49] vermutet, was nach Erscheinen der Kristallstruktur der ATP-Synthase bestätigt wurde. Jedoch befindet sich im Kristall der F<sub>0</sub>-Teil mit seinen 10 c-Untereinheiten relativ frei im Raum. Solch ein Zustand ist im nativen Enzym nicht möglich. Da sich die Untereinheiten a und b beim Kristallisieren vom restlichen Enzymkomplex abgelöst haben, fand möglicherweise eine strukturelle Umordnung im Kristall statt und die 10 c-Untereinheiten können einen anderen Platz als im nativen Enzym einnehmen. Die genaue Lokalisation der c-Untereinheiten im Enzymkomplex bleibt jedoch unklar. Hinzu kommt, daß nach aktuellem Wissensstand abhängig vom Organismus eine unterschiedliche Anzahl der c-Untereinheiten existiert, was sich in der Größe des F<sub>0</sub>-Teils bemerkbar macht. Im Fall von *E. coli* existieren 12 c [38], bei Hefemitochondrien 10 c-[41] und bei Chloroplasten 14 c-Untereinheiten [42]. Diese unterschiedliche Untereinheitenstöchiometrie wird auch als low-, medium- und high-gear bezeichnet. Nach Aussagen der Literatur liegen die a- und b-Untereinheiten der ATP-Synthase außerhalb des multimeren Rings aus c-Untereinheiten [22,46-49].

Die Konstruktion des Strukturmodell für der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* wurde in Anlehnung an das Modell für *E. coli* nach Wang und Oster (siehe Abb.4) [50] durchgeführt. Hierbei wurde die a-Untereinheit außerhalb des multimeren Rings aus c-Untereinheiten lokalisiert und das b-Dimer diente als Verbindung zwischen der a-Untereinheit des membranständigen Teils und  $\epsilon$ -Untereinheit des F<sub>1</sub>-Kopf des Enzyms.

Durch den Vergleich der experimentellen und theoretischen Streukurve bzw. Abstandsverteilungsfunktionen lassen sich Aussagen über die Molekülform des untersuchten Proteins treffen. Es führte zu einer leidlichen Übereinstimmung beim Vergleich der intramolekularen Abstandsverteilungsfunktionen des Modells und des Experiments im Gegensatz zur F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus*. In der Abstandsverteilung bestehen restliche Differenzen bei kleinen Abständen, während die maximale Dimension eine recht gute Übereinstimmung aufwies (Abb.43, S.71). Die verwaschene Mehrfachschulter des Nebenmaximums der experimentellen Streukurve ließ sich nicht mit Hilfe dieses Modells darstellen (Abb.42, S.70). Der Gyrationradius des Strukturmodells ( $R_g = 58.98 \text{ \AA}$ ) der ATP-Synthase wich um  $2 \text{ \AA}$  von dem experimentell ermittelten Wert von  $57 \text{ \AA}$  ab.

Zur Charakterisierung der Strukturänderungen der ATP-Synthase, die in Abhängigkeit von dem Inhibitor Azid auftraten, wurden ebenfalls Kleinwinkelstreuungsmessungen durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden in Abschnitt 4.3 diskutiert.

### 4.3 Einfluß des Inhibitors Azid auf die Struktur und Funktion der ATP-Synthase und F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus*

Azid ist ein bekannter Inhibitor der funktionellen Kooperativität bei ATP-Synthasen [68]. In einer Menge von 1 mM hemmt es die kooperative Katalyse am Multidomänen-Enzym (Multisite-Katalyse). Bei der F<sub>1</sub>-ATPase aus *E. coli* inhibiert Natriumazid die ATPase-Aktivität der Multisite-Katalyse um mehr als 90 %, währenddessen es keine Wirkung auf die Unisite-Katalyse besitzt. Bei hoher Azid-Konzentration wird auch die restliche Aktivität, die an einer einzigen katalytischen Domäne stattfindet, unterdrückt. Aus diesem Grund kann Azid ein möglicher Schlüssel zur Aufklärung der funktionellen und energetischen Kopplung der ATP-Synthasen sein.

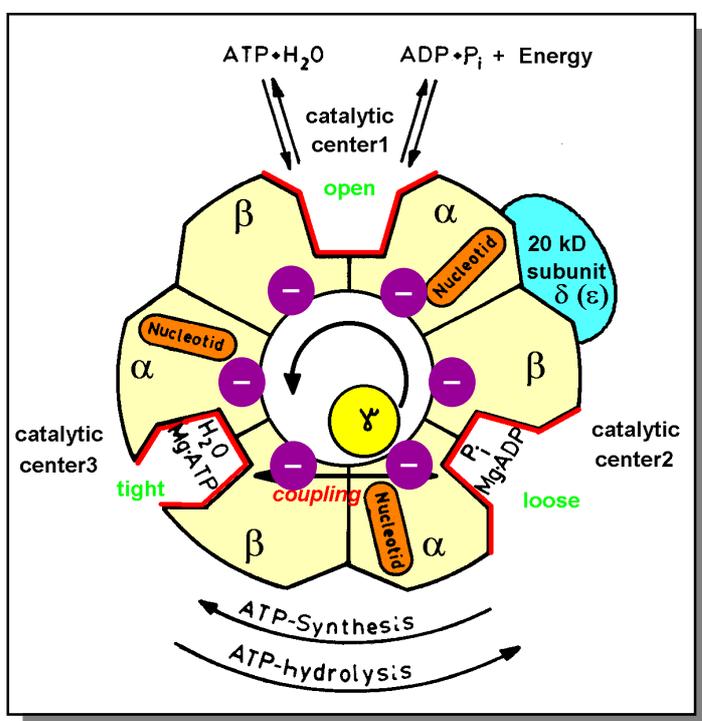
Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Azidhemmung zeigten, daß ein qualitativer Zusammenhang zwischen den kooperativitätsabhängigen Strukturänderungen beider Enzyme, der ATP-Synthase und dem katalytischen Kopf (F<sub>1</sub>-ATPase), und ihrer Funktion besteht. Die Strukturänderungen der Enzyme wurden durch strukturelle Inhibitor titration mit statischer Röntgenkleinwinkelstreuung ermittelt.

#### 4.3.1 Einfluß von Azid auf die F<sub>1</sub>-ATPase

Im Falle der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus* kommt es bei der Inkubierung mit einer geringen Menge Azid strukturell zu einer Kontraktion des Moleküls um 0.7 Å, das verbunden ist mit einer leichten Erhöhung der ATP-Hydrolyseaktivität des inhibitorfreien Proteins. Die weitere Zugabe von Azid als nicht-kovalenter Inhibitor führte zu einer stetigen Expansion der F<sub>1</sub>-ATPase um maximal 1 Å, was von einer stetigen Abnahme der ATP-Hydrolyseaktivität begleitet wurde (Abb.33, S.61/Abb.23, S.51).

Es ließ sich eine allgemeine Tendenz bei der Azidhemmung der F<sub>1</sub>-ATPase feststellen, obwohl bei diesen Untersuchungen zwei verschiedene Enzymformen (strukturell:  $\delta$ -haltiges Enzym, enzymatisch:  $\delta$ -freies Enzym) miteinander verglichen wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Unterschied in der Temperaturabhängigkeit beider Enzymformen nicht sehr groß ist. Um genauere Aussagen zur Azidhemmung treffen zu können, müßten die Untersuchungen unter exakt denselben Reaktionsbedingungen stattfinden, da die Enzyme von vielen Umgebungsfaktoren abhängig sind, wie z.B. der Konzentration und der Temperatur. Zusätzlich besteht eine Abhängigkeit der Azidhemmung von der Temperatur und von der Dauer der Einwirkung. Diese Faktoren machen eine Studie extrem aufwendig. Eine derartige Analyse war nicht Gegenstand der Arbeit.

Allgemein könnte sich im Fall der ATP-Synthasen der Inhibitor Azid als negativ geladenes Molekül an die Peptidkette der  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten des Enzymkomplexes anlagern. Da diese Untereinheiten zu mehr als 90 % homolog sind, findet die Azidinhibierung an den einzelnen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in gleicher Weise statt. Eine ähnliche Anlagerung eines Azid-Moleküls an die Peptidbindung wurde für eine Mutante des Bakteriorhodopsins [101] und für das Halorhodopsin in der Literatur beschrieben [102]. Die Asp-Mangelmutante (Asp gegen Asn) des Bakteriorhodopsins wurde durch Zugabe von Azid wieder in ihre funktionsfähige, protonentransportierende Form überführt. Im Fall des Halorhodopsins wurde durch Einsatz von Azid die Clorid-Pumpe zu einer Protonenpumpe umgewandelt. Durch Austausch einer einzigen Aminosäure (Thr gegen Asp) wurde diese Ionenspezifität hervorgerufen.



**Abbildung 67: Mögliche Inhibierung der Kooperativität der ATP-Synthasen durch Anlagerung von Azid an die großen  $\alpha$ , $\beta$ -Untereinheiten**

Die zusätzlichen negativen Ladungen im Enzymkomplex (Abb.67) rufen zusätzliche elektrostatische Kräfte zwischen den  $\alpha$ , $\beta$ -Untereinheiten hervor, die zu einer Einschränkung der Beweglichkeit untereinander ( $\alpha$ , $\beta$ ) führen könnten. Diese Kräfte sind abhängig von der Anzahl der Ladungen und der direkten Umgebung innerhalb des Enzymkomplexes. Da die Kooperativität der 3 katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten über die  $\alpha$ -Untereinheiten geregelt wird [103], hat die durch Azid hervorgerufene „Versteifung“ des Enzyms einen direkten Effekt auf die Kooperativität der  $\beta$ -Untereinheiten.

Bei einer Konzentration von 10 mM Azid fand die ATP-Hydrolyse durch  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* nur noch an einem einzelnen Zentrum statt (Unisite-Hydrolyse), da die Signalübertragung zwischen den  $\alpha,\beta$ -Untereinheiten unterbrochen ist. Eine Resthydrolyseaktivität der  $F_1$ -ATPase von 15 % war bei dieser Konzentration noch meßbar.

Die Wirkung von Azid auf den Hydrolysezyklus der  $F_1$ -ATPase wird in der Literatur unterschiedlich interpretiert ( $c = 10$  mM). Die Gruppe von Allison [104] vertritt die These, daß Azid im Laufe des Reaktionszyklus den Mg-ADP-Zustand stabilisiert. Der Auslaß von MgADP aus dieser Bindungstasche ist danach der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATP-Hydrolyse. Dadurch entstehen inaktive Moleküle, die nicht mehr in der Lage sind, ATP zu hydrolysieren. Weber und Senior [105] schließen auf eine Blockierung der konformationellen Signalübertragung zwischen den 3  $\beta$ -Untereinheiten, wodurch gar kein ADP gebildet werden kann. Die enzymatisch bestimmte Restaktivität wird danach durch Enzymmoleküle erzeugt, die kein Azid angelagert haben.

Im Falle der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* spricht jedoch die relativ hohe gemessene Restaktivität von 15 % bei einer Konzentration von  $c = 10$  mM Azid für die erste Interpretation, in der der Mg-ADP-Zustand durch Azid stabilisiert wird. Hinzu kommt, daß eine direkte strukturelle Wirkung des Azids ( $c = 10$  mM) durch die Bildung einer expandierten Form der  $F_1$ -ATPase ( $\Delta R_g = 2$  %) nachgewiesen werden konnte. In diesem Konzentrationsbereich scheint die Kooperativität des Enzyms durch Abstoßung der  $\alpha,\beta$ -Untereinheiten und den daraus resultierenden Verlust des Kontaktes zur den benachbarten Untereinheiten nicht mehr möglich zu sein. Dies erklärt auch den vergrößerten Gyrationradius.

### 4.3.2 Einfluß von Azid auf die Funktion und Struktur der ATP-Synthase

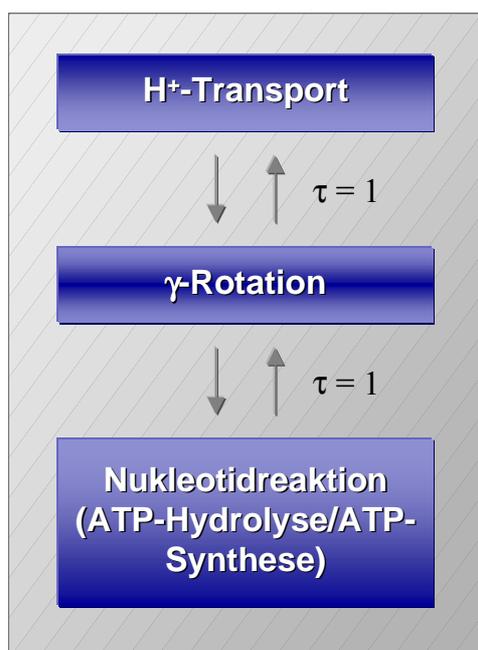
Die ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* reagierte im Gegensatz zur  $F_1$ -ATPase viel empfindlicher bei der Inkubation mit Azid. Schon bei Zugabe von kleinen Mengen Azid kam es zu einer drastischen Strukturänderung in Form einer Expansion des Enzyms um 3 Å, die über einen weiten Konzentrationsbereich bis hin zu 10 mM Azid konstant blieb. Weiterhin zeigten die Kleinwinkelstreudaten, daß in Gegenwart von Azid eine Strukturmodifikation mit einem  $\alpha,\beta$ -Untereinheitenabstand von 80 Å anstatt 57 Å im nativen Enzym stattfindet und sich ein um 10 Å vergrößerter maximaler Atomabstand ausbildet (Abb.35/36, S.63 ff). Parallel führte dies zu einer raschen Abnahme der ATP-Hydrolyseaktivität der Inhibitorprotein-freien ATP-Synthase (Abb.25, S.53). Auch im Fall der ATP-Synthase wurden zwei ähnliche Enzymformen miteinander verglichen, die nur allgemeine Aussagen zur Azidhemmung ermöglichten.

Die ATP-Synthase bietet aufgrund ihrer Komplexibilität durch ihre zusätzlichen kleineren Untereinheiten a, b und c eine größere Angriffsfläche für die Anlagerung von negativ geladenen Azid-Ionen an die Peptidkette. Vermutlich wird im Gegensatz zur  $F_1$ -ATPase zusätzlich zur Anlagerung von Azid an die  $\alpha,\beta$ -Untereinheiten (siehe Abb.67, S.104) auch die Funktion einzelner Aminosäuren der a, b- und c-Untereinheiten des  $F_0$ -Teils durch Azid verändert. Der um 10 Å vergrößerte maximale Atomabstand der Azid-inhibierten ATP-Synthase weist darauf hin, daß möglicherweise der direkte Kontakt der  $F_1$ -Domäne mit dem membranständigen  $F_0$ -Teil gestört ist.

Die ATP-Synthesereaktion der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* zeigte im Gegensatz zur ATP-Hydrolyse bei Zugabe von Azid eine schrittweise Hemmung. Bei einer Konzentration von 10 mM Azid findet die ATP-Synthese noch zu 58 % statt (Abb.26/27, S.54/55). Diese Hemmung scheint im Gegensatz zur ATP-Hydrolyse nach einem anderen Mechanismus abzulaufen, obwohl die ATP-Synthese in der Literatur als der umgekehrte Prozeß zur ATP-Hydrolyse des Enzyms beschrieben wird [57,58]. Dies ist ein Hinweis, daß die protonenabhängige ATP-Synthese, die durch die ATP-Synthase katalysiert wird, nicht die einfache Umkehr der protonenflußproduzierenden ATP-Hydrolyse ist. Ein ähnliches Ergebnis wurde von der Gruppe Vinogradov [106] für die in Partikeln arbeitende ATP-Synthase beschrieben. Bei einer Azidkonzentration von 0.1 mM wurde die ATP-Hydrolyse blockiert, während die ATP-Synthese durch Zugabe von Azid nicht inhibiert wurde.

Das unterschiedliche Verhalten der ATP-Synthase in Gegenwart des Inhibitors Azid im Laufe ihrer Reaktionszyklen, der ATP-Hydrolyse und ATP-Synthese, könnte man mit Hilfe eines molekularen

„Slips“ erklären. Dieser molekulare „Slip“ wird in der Literatur [107] als die Abweichung von einer festen Stöchiometrie zwischen zwei gekoppelten Reaktionen, katalysiert durch ein Enzym, beschrieben. Die folgende Abbildung zeigt die Kopplung der  $\gamma$ -Rotation mit dem Protonentransport und der ATP-Hydrolyse bzw. ATP-Synthese innerhalb des Enzymkomplexes. Bei einem Kopplungsgrad von  $\tau = 1$  findet der jeweilige Prozeß mit einer 100%-igen Ausbeute statt.



**Abbildung 68: Energiekopplung zwischen dem Protonentransport durch den  $F_0$ -Sektor und der ATP-Hydrolyse und ATP-Synthese im  $F_1$ -Sektor der ATP-Synthasen, hervorgerufen durch die mechanische Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit**

Da vermutlich im Laufe der ATP-Synthese- und der ATP-Hydrolysereaktion voneinander verschiedene Zwischenzustände durchlaufen werden, tritt auch eine veränderte Hemmwirkung von Azid abhängig vom jeweiligen Reaktionsweg auf.

Im Fall der ATP-Hydrolysereaktion wäre durch die Anlagerung von Azid als negativ geladenes Molekül die Kooperativität an 3 Bindungszentren ( $\alpha, \beta$ ) gestört. Möglicherweise kommt es zu einer Beeinträchtigung der  $\gamma$ -Rotation und die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie würde anstatt zum Protonentransport über die Membran in Form von Wärme an die Umgebung abgeben. In diesem Fall liegt der Kopplungsgrad unter einem Wert von 1.

Im Fall der ATP-Synthese scheint die Hemmung durch Azid an einem anderen Zwischenzustand des Reaktionszyklus als im Fall der ATP-Hydrolyse stattzufinden. Die ATP-Synthese ist nur möglich, wenn ein Protonenfluß und die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit stattfindet. Bei einer Syntheserate

von 58 % (10 mM Azid) könnte die  $\gamma$ -Untereinheit zeitweise „durchrutschen“ und somit den Kontakt zum  $F_0$ -Teil verlieren.

#### 4.4 Zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung

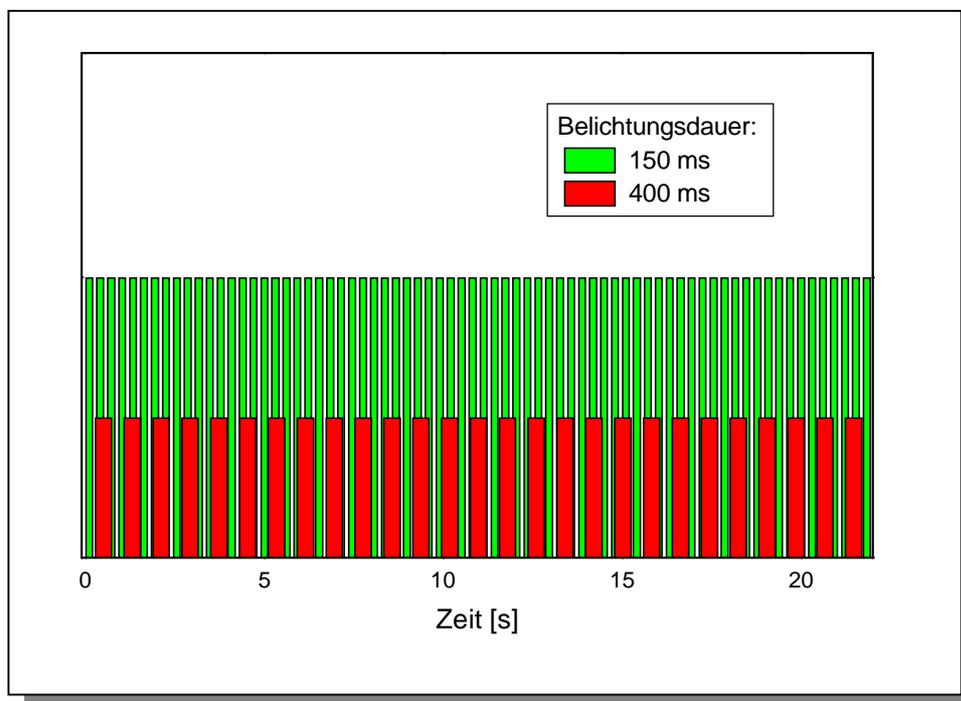
Mit Hilfe der zeitaufgelösten Röntgenkleinwinkelstreuung, die zur Charakterisierung der Größe und Konformation gelöster biologischer Makromoleküle geeignet ist, wurden weiträumige Konformationsänderungen innerhalb des Enzyms bei seiner Regulation nachgewiesen. Der Vorteil der Kleinwinkelstreuung gegenüber der statischen Proteinkristallographie liegt in der Tatsache, daß unter nativen nahezu physiologischen Bedingungen gearbeitet werden kann und auch Konformationsänderungen eines Enzyms im Laufe der Katalyse sichtbar gemacht werden können. Die Proteinstrukturanalyse liefert nur einen einzelnen Schnappschuß im Laufe eines Reaktionszyklus, jedoch in atomarer Auflösung. Grundlage für die zeitaufgelösten Strukturuntersuchungen war die hohe Aktivierungsenergie der ATP-Synthasen aus *Micrococcus luteus* im ATP-Hydrolysezyklus. Die Dauer eines Hydrolysezyklus lag bei Temperaturen von 20 °C im Sekundenbereich [Abschnitt 3.2.3, 60,66,69].

Die zeitaufgelösten Messungen zur Enzymkinetik, an hydrolytisch aktiver  $F_1$ -ATPase und ATP-Synthase, fanden vor allem an der **ESRF (European Synchrotron Radiation Facility)** in Grenoble, Frankreich, statt. Die lange Strahlstabilität und die sehr hohe Brillianz des Instrumentes (ID2) waren die Grundlage zur Studie schneller Reaktionen (Abschnitt 2.8.1) [86]. Im Gegensatz zu Voruntersuchungen [66,69] konnten die arbeitenden Enzyme direkt, d.h. ohne Repetition und mit hoher Genauigkeit untersucht werden (single shot-Technik).

Da es sich um die ersten Streuversuche mit Proteinlösungen in diesem Flußbereich handelte, lieferten die anfänglich durchgeführten Experimente an den Synchrotronstrahlungsquellen ESRF (Grenoble) und ELETTRA (Triest) wichtige Hinweise zur **Methodenentwicklung**.

Die Detektion der intensiven Streustrahlung war abhängig von der technischen Entwicklung der Detektorgruppe am ESRF. Zuerst wurde ein 2D-Gasdetektor eingesetzt, der die volle Intensität der Streustrahlung nicht detektieren konnte. Ein neuartiger Kameraprototyp, ein XR11-CCD Fluoreszenz-Detektor, konnte erstmalig den vollen Fluß des ESRF-Instrumentes ID2 nutzen. Nachteilig bei diesem Prototyp war die limitierte Zeitauflösung, bedingt durch die notwendigen Auslesepausen zwischen den einzelnen Bildern des strukturellen Films von jeweils 400 ms-Dauer. Später stand ein weiterentwickeltes Modell einer CCD-Kamera mit sehr hoher Auflösung (1024×1024 Pixel), einer

Belichtungszeit von 150 ms und einer Auslesezeit von 150 ms zur Verfügung. Die Abbildung 69 zeigt die zeitliche Abdeckung der Strukturuntersuchung beider CCD-Kameras im Vergleich.



**Abbildung 69:** Vergleich der zeitlichen Abdeckung der Strukturuntersuchung bei einer Belichtungsdauer und Auslesezeit von jeweils 400 ms und 150 ms

Kurzlebige Zwischenzustände des zeitaufgelösten ATP-Hydrolysezyklus der  $F_1$ -ATPase und ATP-Synthase, die bei einer Belichtungszeit von 400 ms durch zeitliche Mittelung der Ereignisse nicht sichtbar waren oder Ereignisse, die eventuell in die Lesepausen hineinfließen, konnten bei kürzeren Belichtungs- und Auslesezeiten (150 ms) genauer analysiert und nachgewiesen werden.

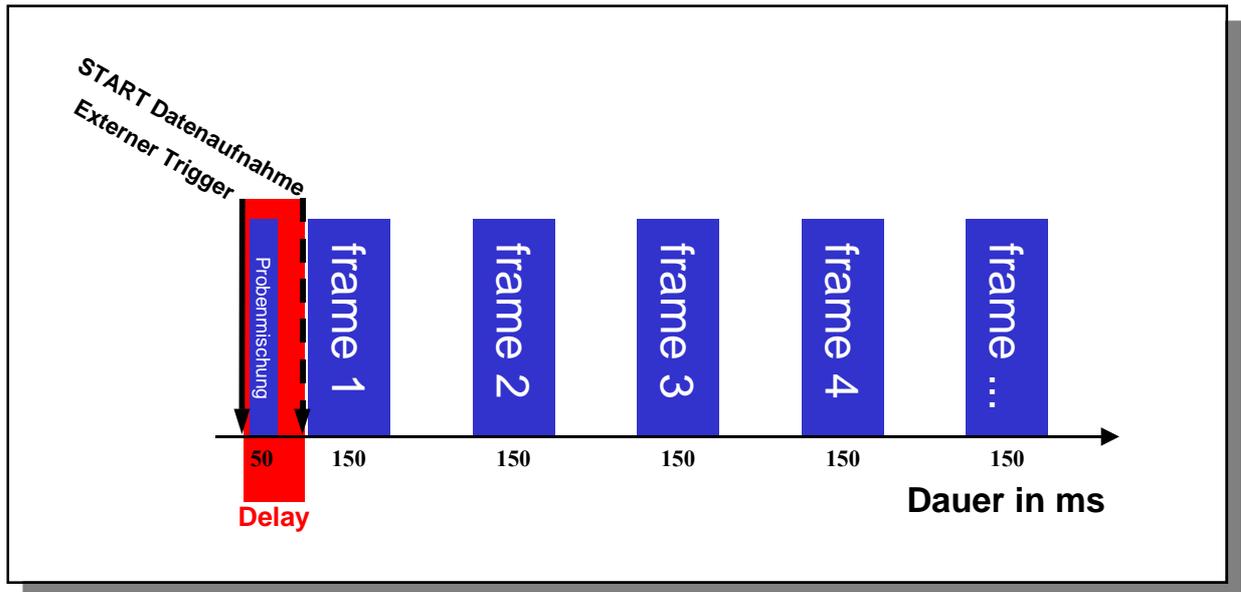
Die Probenumgebung, die speziell für Hochfluß-Röntgenexperimente entwickelt wurde (Abbildung 14/ S.39, [88]), hatte mehrere Funktionen. Durch Anblasen der Durchflußkapillare mit Helium wurde die Aufheizung der Proteinprobe durch den intensiven Röntgenstrahl vermindert. Dadurch konnte die Reaktionstemperatur weitgehend konstant gehalten werden. Durch den Dreikreiswärmeaustauscher für Enzym, Substrat und Verdünnungspuffer wurde die Proteinreaktion speziell im Fall der  $F_1$ -ATPase durch Kühlung soweit verlangsamt, um ein experimentell zugängliches Zeitfenster zu erhalten [60,66,69].

Durch Zusatz von 10 % Glycerin als Radikalfänger und durch Entgasen der Proben direkt vor den Messungen konnten die Probleme der unerwarteten Gasblasenentwicklung und der Strahlenschädigung der Proteine weitgehend gelöst werden. Danach stand das Protein im intensiven Röntgenstrahl für circa 30 s ungeschädigt der Strukturuntersuchung zur Verfügung. Die hohe Stabilität der Enzy-

me aus *Micrococcus luteus* im Röntgenstrahl könnte man dadurch erklären, daß die ATP-Synthase als Membranprotein im Organismus neben den Proteinen der Atmungskette lokalisiert ist. In ihrer direkten Umgebung finden also viele Elektronentransportprozesse statt, die auch zur Bildung freier Radikale führen können (Nebenreaktionen). Möglicherweise existieren bestimmte Schutzmechanismen im Enzym für den Umgang mit freien Elektronen oder mit Radikalen. Das Chaperonsystem GroE aus *E.coli*, dessen Reaktionszyklus parallel zu unseren zeitaufgelösten Messungen analysiert wurde, hielt dem intensiven Röntgenstrahl nicht so lange stand [108]. Als Helferprotein repariert es in der Zelle denaturierte oder falsch gefaltete Proteine. Die Strahlenempfindlichkeit dieses Enzyms ist aber etwa eine Größenordnung höher als die der *Micrococcus*-ATPasen.

Um eine Strahlenschädigung der Proteine zu Beginn der zeitaufgelösten Messung auszuschließen, wurden die statische Streukurven, gemessen an der JUSIFA-Kleinwinkelstreuanlage in Hamburg, als Referenz herangezogen. Dort konnte eine Strahlenschädigung der Proteine ausgeschlossen werden, da direkt auf der Probe eine viel geringere Röntgenstrahlintensität (1 : 200 000 (ESRF)) vorlag. Da die Streukurve der ersten aufgenommenen Zeitscheibe der zeitaufgelösten Strukturuntersuchung keinen Unterschied zu der Referenzstreukurve zeigte, lag ein intaktes Enzym vor.

Um Artefakte während der Analyse der Reaktionszyklen auszuschließen, wurden die Enzyme aus verschiedenen Präparationen und Bakterienkulturen verwendet. Außerdem wurde die Reaktionstemperatur variiert und Kontrollversuche durch schnelles Mischen mit Puffer anstelle von ATP durchgeführt. Der ATP-Hydrolysezyklus wurde durch Substratsättigung der ATP-Synthasen mit Hilfe des „stopped-flow“-Mischverfahren gestartet. Nach den verfügbaren Voruntersuchungen [60,66,69] ist die verwendete Substratkonzentration  $c = 1 \text{ mM}$  mehr als sechsmal größer als die apparente Substratbindungskonstante  $K_m = 0.16 \text{ M}$  ( $c_{\text{substrat}} = 6.25 \cdot K_m$ ). Daher führt der Konzentrationssprung bei Mischen des Enzyms praktisch vollständig in den Enzym-Substrat-Komplex ES. Da der Mischvorgang mit  $t = 50 \text{ ms}$  bei der älteren Apparatur [60,66,69] und  $20 \text{ ms}$  bei der neueren Apparatur [108] viel rascher als die Dauer der Reaktionszyklen war ( $t_R = 3\text{-}20 \text{ s}$ ), konnten Teilereignisse im Verlauf der Reaktion beobachtet werden. In der folgenden Abbildung ist der allgemeine Ablauf der zeitaufgelösten Strukturuntersuchung für eine Belichtungsdauer von  $150 \text{ ms}$  schematisch dargestellt. Vor dem Beginn der Datenaufnahme existiert technisch bedingt eine Verzögerungsphase (delay), in der die Probenmischung ( $50 \text{ ms}$ ) hergestellt wird.



**Abbildung 70: Schematischer Ablauf der zeitaufgelösten Strukturuntersuchung an der ESRF (Grenoble)**

Ausgelöst wurde der Mischvorgang (max. 50 ms) mit Hilfe eines externen Triggers. Die Strukturanalyse des ATP-Hydrolysezyklus der ATP-Synthasen erfolgte nach einer Verzögerung (delay) in Zeitscheiben von jeweils 150 ms Dauer (Auslesezeit 150 ms).

#### 4.4.1 Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* bei einer Temperatur von 20°C

Bei einer Temperatur von 20°C wurden während des Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse Strukturänderungen der  $F_1$ -ATPase mit der Zeit festgestellt (Abb.52/53/55 S.82 ff). Aus den Streukurven der zeitaufgelösten Messungen konnten Informationen über die Änderungen bezüglich der Größe des Proteins, des Abstands einzelner Domänen innerhalb des Hohlkörpers ( $\alpha,\beta$ -Untereinheiten) und der maximalen Moleküldimension entnommen werden.

Anhand des Gyrationradius ( $R_g$ ), der sensitive Informationen über die Größe des Proteins liefert, zeigten sich eine Serie von Expansionen, die von Kontraktionsbewegungen terminiert wurden. In Einzelschüssen betrug die maximale Änderung im Gyrationradius ( $R_g$ ) bis zu 0.82 Å (= 1.75 %) beim Erscheinen dieser Kontraktionsbewegung. Die Änderungen zeigten sich auch in der Summe von Einzelschüssen, was die Annahme der Synchronisation der Probe [60,66,69] unterstützt. Dieses Verhalten zeigt, daß zumindest der größte Teil der Proteine zur selben Zeit die gleichen molekularen Konformationen des Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durchlaufen. Das zunehmende Rauschen nach 22 s Experimentdauer (Abb.52, S.82) kann durch teilweise Proteinschädigung und Auseinanderlaufen der unterschiedlich reagierenden Enzyme erklärt werden (Desynchronisation).

Die Kontraktionsbewegung („Schrumpfpuls“) erfolgte im zeitaufgelösten Reaktionszyklus fast alle 3 Sekunden, währenddessen die dritte erst nach 4 s sichtbar war. Da die Zeit von 3 s der enzymatisch bestimmten Zyklusdauer  $\tau$  der ATP-Hydrolysedauer durch  $F_1$ -ATPase bei 20°C entspricht [60], kann die Zeit zwischen zwei Kontraktionsbewegungen als die Dauer eines Reaktionszyklus angenommen werden. Der Dritte der drei Reaktionszyklen benötigte jedoch circa 1/3 mehr Zeit im Vergleich der ersten zwei Zyklen von 3 s Dauer. Dieses Ergebnis weist auf einen Überzyklus hin, der aus 3 Unterzyklen im ATP-Hydrolysemechanismus der  $F_1$ -ATPase besteht. Der Grund für die längere Dauer des dritten Subzyklus könnte die Existenz der zusätzlichen kleinen Untereinheit ( $\delta$  bei *Micrococcus luteus* ;  $\epsilon$  bei *E. coli*) (siehe Abb.2, S.3) sein, die sich an einer der drei großen Untereinheitenpaare ( $\alpha,\beta$ ) befindet.

Bei der Betrachtung der Nebenmaximas der Streukurven waren zusätzliche molekulare Bewegungen innerhalb der  $F_1$ -ATPase zu erkennen, die im Kontrollexperiment bei der Mischung mit Puffer anstatt Substrat nicht auftraten (Abb.53 B). Die Änderungen im Minimum und im Nebenmaximum der Streukurven repräsentieren bei der  $F_1$ -ATPase aufgrund der speziellen Hohlstruktur direkt die

Bewegung der Untereinheiten innerhalb des Enzyms. So konnte im Laufe des Reaktionszyklus eine Veränderung des  $\alpha,\beta$ -Untereinheitenabstands im Bereich von 59.8 Å bis 61.6 Å ermittelt werden.

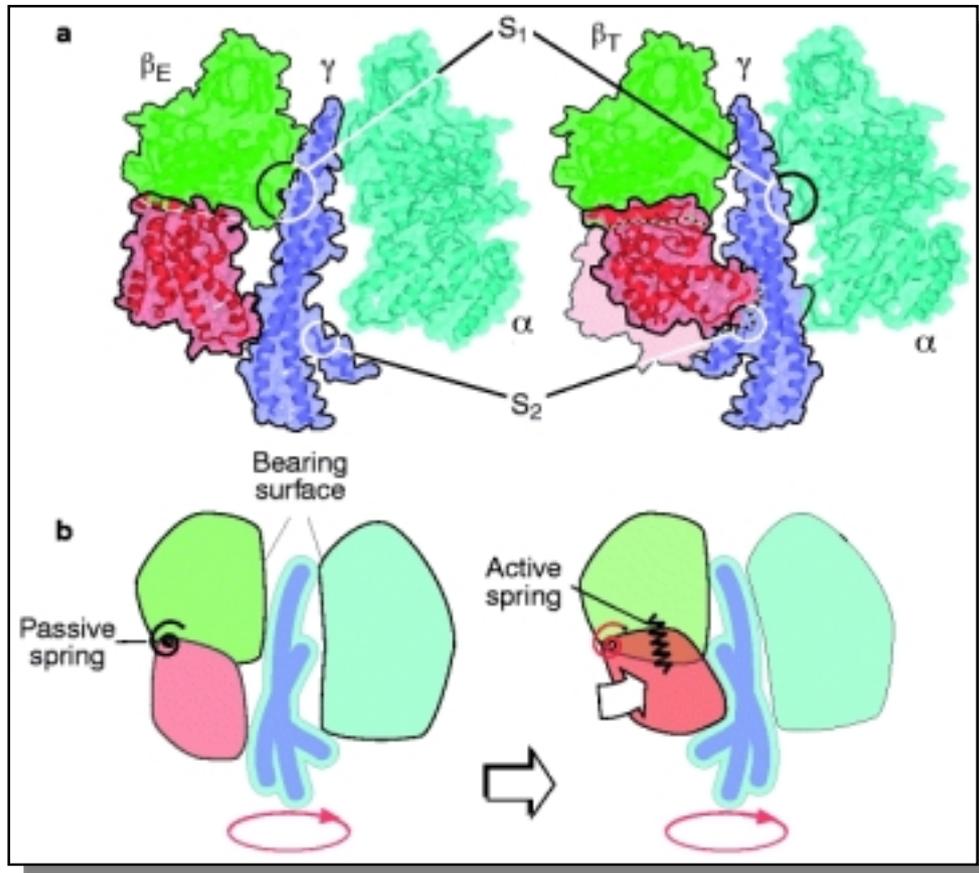
Die intramolekulare Abstandsverteilung in den einzelnen Zeitscheiben des strukturellen Films zeigte eine zusätzliche, jedoch kleine Bewegung in der maximalen Moleküldimension ( $R_{\max}$ ) (Abb.55, S.86). Nach Konstruktion des Strukturmodells für die  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* ( $F_1$ -i8) wird der Ausläufer bei großen Atomabständen durch die aus dem  $\alpha,\beta$ -Hohlkörper herausragende Domäne der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten hervorgerufen (Kapitel 3.4.1). Die Rotation der ( $\gamma + \delta$ )-Untereinheit im Hohlkörper, die bereits von verschiedenen Gruppen nachgewiesen wurde [33,36,51,56], könnte für diese Änderungen verantwortlich sein. Die asymmetrische Position der  $\gamma$ -Untereinheit im  $F_1$ -Hohlkörper und die  $\delta$ -Untereinheit, die sich unsymmetrisch am Ende der  $\gamma$ -Untereinheit befindet, führen bei einer Rotationsbewegung zu Änderungen der maximalen Moleküldimension.

#### 4.4.2 Modellierung der Strukturdynamik der $F_1$ -ATPase im Reaktionszyklus

Der Reaktionszyklus der  $F_1$ -ATPase wurde durch Konstruktion verschiedener Strukturmodelle (FVM-Methode [93]) für einzelne ausgewählte Zwischenzustände charakterisiert. Aussagen über die Änderungen der Molekülform während des ATP-Hydrolysezyklus ließen sich durch den Vergleich der theoretischen und experimentellen Streukurven (20°C) treffen. Die Modellierung einzelner Zwischenzustände führte zu einer Art Kippbewegung der  $\beta$ -Untereinheiten in ihrem unteren Drittel, die zu einem direkten Kontakt zur  $\gamma$ -Untereinheit führte. Diese sogenannte Kippbewegung, die anhand von 3 verschiedenen Molekülmodellen durchgeführt wurde (Kapitel 3.5.4), korreliert gut mit den zeitlich festgestellten Änderungen im Gyrationradius ( $R_g$ ), d.h. mit der Ausdehnung des Moleküls im Reaktionszyklus und der Topologie der experimentellen Streukurven.

In dem Modell von Wang und Oster [37] wurde eine ähnliche Bewegung der katalytischen  $\beta$ -Untereinheit vorgeschlagen. Grundlage für das Erstellen dieses Bewegungsmodells waren die Kristallographiedaten der  $F_1$ -ATPase aus Rinderherzmitochondrien [27]. Die Abbildung 71 zeigt zur Verdeutlichung nochmals diese Kippbewegung in Richtung der  $\gamma$ -Untereinheit, wie sie von Wang und Oster vorgeschlagen wurde, anhand eines Querschnitts. Die dargestellte Bewegung kommt der in dieser Arbeit mittels zeitaufgelöster Kleinwinkelstreuung experimentell und anschließend durch

Strukturmodelle nachgewiesene Kippbewegung während des ATP-Hydrolysezyklus der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* sehr nahe.



**Abbildung 71: Konformationsänderungen innerhalb der  $\beta$ -Untereinheit der  $F_1$ -ATPase [37]**

Durch eine Kippbewegung der  $\beta$ -Untereinheit im unteren Drittel erfolgte ein direkter Kontakt zur  $\gamma$ -Untereinheit

Nach der Kristallstruktur von Walker [27] ist die  $\beta$ -Untereinheit nach außen geklappt, wenn kein Nukleotid in der katalytischen Bindungstasche gebunden ist. Wenn Nukleotide jedoch gebunden sind, ist die  $\beta$ -Untereinheit eingeklappt und es existiert vermutlich ein direkter Kontakt der  $\beta$ -Untereinheit zur  $\gamma$ -Untereinheit. Strukturell besteht jedoch kein Unterschied innerhalb der „eingeklappten“ Konfiguration, egal ob es sich um ADP oder ATP als Nukleotid handelt. In der neueren Literatur wird der strukturell eingeklappte Zustand der  $\beta$ -Untereinheit bzw. der mit Nukleotid besetzte Zustand auch als „Closed“-Konfiguration und der ausgeklappte Zustand ohne Nukleotidbesetzung als „Open“-Konfiguration bezeichnet [100,103,109]. Boyer [1] hingegen benutzt diese Begriffe je nach der Zugänglichkeit der Bindungstasche für die Reaktanten.

Nach dem Bindungswechselmechanismus von Boyer [26] durchläuft jedes der 3 katalytischen Nukleotidbindungscentren der  $F_1$ -ATPase nacheinander bestimmte strukturelle Zustände im Laufe eines Reaktionszyklus. Diese Zustände, nach Boyer „tight“, „loose“ und „open“ genannt, charakterisieren die unterschiedliche Substratbindung an den katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten. Bei einer hohen Nukleotidkonzentration findet die enzymatische Reaktion an allen 3  $\beta$ -Untereinheiten mit hoher Kooperativität untereinander statt (Multisite-Katalyse).

In der folgenden Tabelle sind zur besseren Übersicht die in der Literatur und dieser Arbeit verwendeten Definitionen zur Beschreibung einzelner Zwischenzustände des Reaktionszyklus aufgeführt.

Definition	Ort	Auswirkung	Ausmaß
tight, loose, open	katalytisches Zentrum	Bindungskonstante der Reaktanten	1 Å
Open, closed [1]	katalytisches Zentrum	Zugänglichkeit der Reaktanten	5 Å
Ausgeklappte/eingeklappte $\beta$ -Domäne	Untereinheiten	$F_1$ -Untereinheitenanordnung	10 Å
expandiert, kompakt	ganzes Enzym	Länge	100 Å

**Tabelle 4: Verschiedene Definitionen zur Beschreibung einzelner Zwischenzustände im Laufe des Reaktionszyklus**

Die vorliegenden strukturellen Ergebnisse zum zeitaufgelösten ATP-Hydrolysezyklus geben keinen direkten Aufschluß über einen ADP oder ATP-gebundenen Zustand der  $F_1$ -ATPase im Laufe des Reaktionszyklus. Ein struktureller Unterschied ließ sich jedoch für den nukleotidfreien und mit nukleotidbesetzten Zustand des Enzyms ermitteln. Das Röntgenprofil der  $F_1$ -ATPase im statischen Zustand gibt den unbeladenen Zustand des Enzyms wieder (ohne ATP). Die  $F_1$ -ATPase enthält im statischen Zustand drei Purinnukleotid-Moleküle (ATP/ADP+GTP/GDP), die sich vermutlich in den drei nicht-katalytischen Bindungstaschen befinden (Kapitel 3.1.2). Das Profil der ersten aufgenommenen Zeitscheibe (frame 1) des zeitaufgelösten ATP-Hydrolysezyklus ähnelt demjenigen der statischen Messung des Enzyms. Charakteristisches Merkmal der beiden Streuprofile ist die Existenz des Doppelmaximums bei  $q = 0.086/0.1 \text{ \AA}^{-1}$ . Das Doppelmaximum der Streukurve weist auf zwei unterschiedliche Abstände der  $\alpha, \beta$ -Untereinheiten im  $F_1$ -Kopf hin. Während des Reaktionszyklus jedoch trat das Doppelmaximum nicht mehr so ausgeprägt hervor. Genauere Aussagen über die Anfangsphase und die zeitliche Nukleotidbeladung waren nicht möglich, da apparativ zwischen dem Start der Reaktion und der Datenaufnahme ein „Delay“ existierte (Abb.70, S.111).

Ferner konnten zusätzlich zu den zwei extremen, in Abbildung 71 gezeigten eingeklappten und ausgeklappten Konfiguration der katalytischen  $\beta$ -Untereinheit, die anhand der Ausdehnung der  $F_1$ -ATPase ( $R_g$ ) erkennbar sind, Zwischenzustände im Reaktionszyklus nachgewiesen werden.

Zum Beispiel existiert ein Zustand, in dem die  $\gamma$ -Untereinheit offensichtlich frei im Hohlraum des  $\alpha,\beta$ -Hexamers lokalisiert ist. Diese sogenannten Zwischenzustände sind eventuell für die unterschiedlichen Nukleotidbindungsaffinitäten für ATP mit verantwortlich, die mit der Lokalisation der  $\gamma$ -Untereinheit im  $F_1$ -Kopf korrelieren [34].

Die expandierte Form der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus*, die während des Reaktionszyklus nachgewiesen werden konnte (z.B. in den Zeitscheiben 2 und 11) ist nach den Theorien von Allison [103] und Weber [109] essentiell für den Produktauslaß. Beide Gruppen sind Vertreter der Trisite-Katalyse, d.h. im Lauf des Reaktionszyklus finden Teilreaktionen zur ATP-Hydrolyse an allen 3 katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten nacheinander statt. Des weiteren findet im Laufe der Multisite-Hydrolyse (unter Substratsättigung) die Bindung eines neuen ATP-Moleküls an diese ausgeklappte  $\beta$ -Domäne statt, falls die anderen zwei  $\beta$ -Untereinheiten schon mit Nukleotid gefüllt sind.

Eine fortlaufende Kippbewegung der  $\beta$ -Untereinheiten während des Reaktionszyklus der  $F_1$ -ATPase konnte zeitaufgelöst anhand der Ergebnisse zur Strukturdynamik nachgewiesen werden. Weitere Aussagen, ob und wann die Besetzung der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten mit ATP oder ADP als Nukleotid im Reaktionszyklus erfolgt, können nicht getroffen werden, da hierzu eine extrem aufwendige zeitauflösende Studie mit radioaktivem Nukleotid erforderlich wäre. Dieser Umstand und der völlige Mangel an zeitauflösenden Strukturstudien in der Literatur, macht es schwierig, einen Vergleich mit anderen aufgestellten Theorien [103,109,110] durchzuführen und genauere Aussagen über den Mechanismus des ATP-Hydrolysezyklus zu treffen.

#### **4.4.3 Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* bei einer Temperatur von 15°C**

Bei einer Temperatur von 15°C wurden während des Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse ebenfalls Strukturänderungen der  $F_1$ -ATPase mit der Zeit festgestellt. Jedoch betrug die maximale apparente Änderung im Gyrationradius ( $R_g$ ) im Einzelschuß (150 ms) nur noch  $0.4 \text{ \AA} \pm 0.16 \text{ \AA}$  beim Erscheinen der typischen Kontraktionsbewegung. Durch Kühlung des Reaktionsgemisches auf 15°C verlängerte sich der Reaktionszyklus von 3 s bei 20 °C auf 6.5 s (Abb.56). Die strukturell ermittelte

Dauer korrelierte mit den entsprechenden Daten zur Enzymkinetik [60,66,69]. Die molekularen Bewegungen innerhalb der  $F_1$ -ATPase waren bei 15°C im Vergleich zu 20°C nicht so ausgeprägt in den Nebenmaxima der Streukurven zu erkennen (Abb.58, S.89).

Bei 15°C ließen sich die Einzelschüsse nicht immer aufaddieren, d.h. sie besaßen untereinander einen zeitlichen Versatz (delay). Da die typischen Kontraktionsbewegungen nach jeweils etwa 6.5 s sichtbar sind, kann man davon ausgehen, daß jede einzelne Enzymmischung weitgehend synchron arbeitet. Schon bei früheren enzymatischen Messungen war eine schlechtere Kontrolle des Reaktionszyklus bei tieferen Temperaturen [60,66,69] sichtbar.

Eventuell werden diese Probleme durch den Zusatz von 10 % Glycerin zu den Enzymlösungen ausgelöst. Glycerin hat die essentielle Aufgabe, während der Röntgenbestrahlung des Enzyms als Radikalfänger zu fungieren und das Protein vor Strahlenschädigung zu schützen. Weiterhin kann Glycerin durch seine drei Hydroxylgruppen Wassermoleküle der Hydrathülle des Proteins teilweise ersetzen und schließt dadurch Teilbereiche des Proteins in Form einer Klammer ein. Das Protein ist in seiner Flexibilität eingeschränkt und wird geschützt. Dieses Verhalten wird auch beim Einfrieren von Proteinen, speziell bei der Gefrierlagerung [66], wegen der stabilisierenden Wirkung von Glycerin ausgenutzt. Bei höheren Temperaturen besitzt das Enzym eine höhere thermische Energie und kann sich mehr bewegen. Durch die größere Bewegung des Enzyms wird die stabilisierende Wirkung des Glycerins teilweise aufgehoben. Diese Annahme erklärt die klareren Ergebnisse des ATP-Hydrolysezyklus bei einer Temperatur von 20°C im Gegensatz zu 15°C. Die Änderungen im Gyrationradius verkleinerten sich von 0.82 Å (20°C) auf 0.4 Å (15°C) und die molekularen Bewegungen im Hohlkörper der  $F_1$ -ATPase waren bei tieferen Temperaturen weniger deutlich zu erkennen. Die stabilisierende Wirkung von Glycerin könnte zusätzlich Auswirkungen auf die Startreaktion des ATP-Hydrolysezyklus der  $F_1$ -ATPase besitzen.

#### **4.4.4 Ergebnisse der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung zum Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* bei 20°C**

Im Fall der ATP-Synthase zeigten sich während des ATP-Hydrolysezyklus eine Serie von Expansionen, die von Kontraktionsbewegungen terminiert wurden (Abb.64). In Einzelschüssen betrug die maximale Änderung im Gyrationradius ( $R_g$ ) bis zu 1.5 Å beim Erscheinen dieser Kontraktionsbewegung („Schrumpfpuls“). Da diese Änderungen sowohl im Einzelexperiment als auch in der Summe von Einzelschüssen erkennbar waren, konnte man davon ausgehen, daß die Enzymmi-

schung synchron arbeitet [60]. Das Erscheinen des „Schrumpfpulses“ stimmt mit der enzymatisch bestimmten ATP-Hydrolysezyklusdauer von 20 s gut überein.

Die festgestellten Änderungen waren fast doppelt so groß wie die Änderungen der  $F_1$ -ATPase im Reaktionszyklus. Aus diesem Grunde wurde die Stäbchenlänge der ATP-Synthase analysiert. Dabei zeigte sich eine maximale Änderung der Stäbchenlänge von 3.4 Å im Reaktionsverlauf. Ferner korrelierten die Änderungen der Stäbchenlänge  $L$  mit den Änderungen des Gyrationradius  $R_g$  (Abb.65). Dieser weitere Bewegungsmodus der ATP-Synthase tritt vermutlich zusätzlich zu den Strukturänderungen im  $F_1$ -Kopf des Enzyms auf. Die ATP-Synthase zeigte aufgrund ihres zusätzlichen  $F_0$ -Teils in den nur schwach ausgeprägten Nebenmaxima der Streukurven keine signifikanten Änderungen. Dies ließ keine Aussage über molekulare Bewegungen der großen Untereinheiten ( $\alpha, \beta$ ) innerhalb des Enzyms zu (Abb.66).

Ein ähnliches Ergebnis wurde von der Gruppe Capaldi in der Literatur beschrieben [111]. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen an *E. coli*-ATP-Synthase zeigten eine Kontraktion des Enzyms um 10 % in seiner Längsachse in Anwesenheit von AMP-PNP, einem nicht hydrolysierbaren MgATP-analogen Substrat. Dabei schieben sich die  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten des Stiels teilweise in den Ring aus c-Untereinheiten und die  $\epsilon$ -Untereinheit verändert ihre Position unterhalb des  $F_1$ -Hohlkörpers.

Im Fall der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* waren dies die ersten Messungen zur Struktur- und Dynamik des arbeitenden Enzyms. Im Einzelschußexperiment konnten zwar keine Aussagen über molekulare Bewegungen innerhalb des katalytischen  $F_1$ -Teils gemacht werden, da das Kleinwinkelprofil eine verwaschene Mehrfachschulter zeigte. Jedoch konnte ein zusätzlicher Bewegungsmodus, der bei der  $F_1$ -ATPase während des ATP-Hydrolysezyklus nicht stattfand, nachgewiesen werden.

## 5 Zusammenfassung

Die ATP-Synthase ist eine reversibel arbeitende molekulare Maschine, die eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen spielt. Der große membranständige Proteinkomplex (500000 Masse) koppelt den Transport von Protonen über die biologische Membran mit der Synthese des energiespeichernden Moleküls ATP aus ADP und Phosphat. Ferner kann das Enzym beim umgekehrten Prozeß zur ATP-Synthese, der Hydrolyse von ATP, Protonen in die entgegengesetzte Richtung pumpen. ATP-Synthasen bestehen aus 2 Subkomplexen ( $F_0$  und  $F_1$ ), wobei der katalytische  $F_1$ -Teil von der membranständigen Domäne abgelöst werden kann und isoliert nur zur ATP-Hydrolyse fähig ist. Der hochkooperative Reaktionsmechanismus der dreizentrierten ATP-Synthasen ist noch weitgehend unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ATP-Synthasekomplex und ihr wasserlösliches katalytisches  $F_1$ -Fragment aus dem Bakterium *Micrococcus luteus* in präparativem Maßstab mittels chromatographischer Trennmethode isoliert. Die Überprüfung der Funktionalität beider Enzyme erfolgte mit enzymatischen Methoden. Durch zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung wurde die Struktur- und Dynamik der arbeitenden ATP-Synthase und ihres  $F_1$ -Fragmentes aus *Micrococcus luteus* im Laufe des ATP-Hydrolysezyklus untersucht. Diese Methode diente zum Nachweis weiträumiger Konformationsänderungen innerhalb der arbeitenden Enzyme unter nahezu nativen physiologischen Bedingungen. Die zeitaufgelösten Streuexperimente fanden an der ESRF (Europäische Synchrotronstrahlungsquelle) in Grenoble, Frankreich statt. Die starke Strahlungsquelle, kombiniert mit einem hochentwickelten Detektorsystem (CCD-Kamera), ermöglichte es, Einzelaufnahmen der arbeitenden Enzyme im Laufe des ATP-Reaktionszyklus mit hoher Genauigkeit bei einer Zeitauflösung von 150 ms zu machen (single-shot-Technik). Die Enzyme wurden durch einen Konzentrationssprung mit dem Substrat ATP synchronisiert. Dies erfolgte durch schnelles Mischen ( $< 20$  ms) mit Hilfe der Stopped-flow-Technik. Für beide Enzyme konnten von der Temperatur abhängig molekulare Bewegungen im Laufe des ATP-Hydrolysezyklus nachgewiesen werden.

Statische Messungen zur Strukturuntersuchung der Proteine wurden am schwächeren Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt. Sie dienten aufgrund der hohen Genauigkeit des Kleinwinkelstreuinstrumentes als Referenz zu den zeitaufgelösten Messungen an der ESRF. Anhand dieser Strukturdaten wurden Molekülmodelle der  $F_1$ -ATPase und ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* mit Hilfe der FVM-Methode konstruiert. Dies erfolgte durch Kombination der statischen Röntgenstreuprofile mit den aktuell vorliegenden Kristallographiedaten für die Enzyme

anderer Organismen im Ruhezustand (statisch). Das Molekülmodell der  $F_1$ -ATPase aus *Micrococcus luteus* stellte die Grundlage der Modellierung einzelner Teilschritte des ATP-Hydrolysezyklus des arbeitenden Enzyms bei einer Temperatur von 20°C dar. Die experimentellen Daten konnten mit einer Kippbewegung der membranseitigen Domäne der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten der  $F_1$ -ATPase interpretiert werden.

Zusätzlich wurde die Wirkung von Azid auf die ATP-Synthasen untersucht. Azid ist ein bekannter Inhibitor der funktionellen Kooperativität bei ATP-Synthasen. Anhand der funktionellen und strukturellen Inhibitortitration der ATP-Synthasen mit Azid konnten Aussagen zur Inhibierung der Kooperativität der ATP-Synthasen durch Anlagerung von Azid getroffen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] P.D.Boyer (1997) *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749
- [2] J. Weber, A.E.Senior (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 19-58
- [3] P.L Pederson., L.M. Amzel (1993) *J. Biol. Chem* 268, No 14, 9937-9940
- [4] D.G. Nicholls, S.J. Ferguson (1992) *Bioenergetics 2*, Academic Press, London
- [5] P. Mitchell (1961) *Nature* 191, 144-148
- [6] P. Dimroth (1991) *Bioessays* 13, 463-468
- [7] A.E. Senior (1988) *Physiol. Review* 68, 177-231
- [8] R.H. Fillingame (1997) *J. Exp. Biol.* 200, 217-224
- [9] J.E. Walker, I.R. Collinson., M.J. Van Raaij, M.J. Runswick (1995) *Methods Enzymol.* 260, 163-190
- [10] J.E. Walker (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 2308-2319
- [11] S. Wilkins, R.A. Capaldi (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 93-97
- [12] B. Boettcher, L. Schwarz, P. Gräber (1998) *J. Mol. Biol.* 281, 757-762
- [13] S. Karrasch, J.E. Walker (1999) *J. Mol. Biol.* 290, 379-384
- [14] A.J.W. Rogers, R.A. Capaldi (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29406-29410
- [15] S. Wilkins, F.W. Dahlquist, L.P. McIntosh, L.W. Donaldson, R.A. Capaldi (1995) *Nat. Struct. Biol.* 2, 961-967
- [16] U. Uhlin, G.B. Cox, J.M. Guss (1997) *Structure* 5, 1219-1230
- [17] S. Wilkins, S.D. Dunn, J. Chandler, F.W. Dahlquist, R.A. Capaldi (1997) *Nature Struct. Biol.* 4, 198-201
- [18] J.E. Walker, M.J. Runswick, M. Saraste (1982) *FEBS Letts.* 146, 393-396
- [19] J.P. Aris, R.D. Simoni (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14599-14609
- [20] J. Hermolin, J. Gallant, R.H. Fillingame (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14550-14555

- [21] A.J.W. Rodgers et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31058-31064
- [22] W.P. Jiang, R. H. Fillingame (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6607-6612
- [23] S.D. Watts, Y. Zhang, R. H. Fillingame, R.A. Capaldi (1995) *FEBS Letts.* 368, 235-238
- [24] J. Hermolin, O.Y. Dmitriev, Y. Zhang, R.H. Fillingame (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 17011-17016
- [25] Y. Kagawa, E. Racker (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2467-2474
- [26] P.D. Boyer (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 215-250
- [27] J.P. Abrahams, A.G.W Leslie, R. Lutter, J.E. Walker (1994) *Nature* 370, 621-628
- [28] Y. Shirakihara et al. (1997) *Structure* 5, 825-836
- [29] M.A. Bianchet, J. Hullihen, P.L. Petersen, L.M. Amzel (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11065-11070
- [30] Y. Zhou, T.M. Duncan, R.L. Cross (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10583-10587
- [31] R. Aggerer, I. Ogilvie, R.A. Capaldi (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 19621-19624
- [32] D. Sabbert, S. Engelbrecht, W. Junge (1996) *Nature* 381, 623-628
- [33] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita (1997) *Nature* 386, 299-302
- [34] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita, M. Yoshida (1998) *Cell* 93, 1117-1124
- [35] H. Noji (1998) *Science* 282, 1844-1845
- [36] T. Elston, H. Wang, G. Oster (1998) *Nature* 391, 510-513
- [37] H. Wang, G. Oster (1998) *Nature* 396, 279-282
- [38] P.C. Jones, W.P. Jiang, Fillingame R. H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 17178-17185
- [39] P.C. Jones, Fillingame R. H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29701-29705
- [40] C. Ruppert et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25281
- [41] D. Stock, A.G.W. Leslie, J.E. Walker (1999) *Science* 286, 1700-1705
- [42] H. Seelert, A. Poetsch, N.A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg, D.J. Müller (2000) *Nature* 405, 418-419

- [43] W. Jiang, Fillingame R. H. (1990) *Bacteria* 12, 345-391
- [44] F.I. Valiyaveetil, R.H. Fillingame (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 32635-32641
- [45] M.E. Girvin, V.K. Rastogi, F. Abildgaard, J.L. Markley, R.H. Fillingame (1998) *Biochemistry* 37, 8817-8824
- [46] G. Kaim, U. Matthey, P. Dimroth (1998) *EMBO J.* 17, 688
- [47] S.B. Vik, A.R. Patterson, B.J. Antonio (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16229
- [48] K. Takeyasu et al. (1996) *FEBS Lett.* 392, 110
- [49] S. Singh, P. Turina, C.J. Bustamante, D.J. Keller, R. Capaldi (1996) *FEBS Lett.* 397, 30-34
- [50] R. H. Fillingame (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1101, 240-243
- [51] W. Junge, H. Lill, S. Engelbrecht (1997) *Trends Biochem. Sci.* 22, 420-423
- [52] V.K. Rastogi, M.E. Girvin (1999) *Nature* 402, 263-268
- [53] S. Berry, B. Rumberg (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1276, 51
- [54] I. R. Collinson et al. (1994) *J. Mol. Biol.* 242, 408
- [55] S. Engelbrecht, W. Junge (1997) *FEBS Lett.* 414, 485-491
- [56] Y. Kato-Yamada, H. Noji, R. Yasuda, K. Kinosita, M. Yoshida (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19375-19378
- [57] Y. Sambongi, Y. Iko, M. Tanabe, H. Osmote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y., Y. Wada, M. Futai (1999) *Science* 286, 1722-1724
- [58] O. Pänke, K. Gumbiowski, W. Junge, S. Engelbrecht (2000) *FEBS Letters* 472, 34-38
- [59] T. Nawroth, A. Neidhardt, K. Dose, H. Conrad, B. Munk, H.B. Stuhmann (1989) *Physica B* 156, 485-488
- [60] PD Dr. T. Nawroth (1996) *Habilitationschrift, Universität Mainz*
- [61] T. Nawroth, A. Neidhardt, G. Rathgeber, K. Dose (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 884
- [62] G. Grüber, J. Godovac-Zimmermann, T. Nawroth (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1186, 43-51
- [63] N. Nelson, H. Nelson, E. Racker (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7657-7662

- [64] J.B. Smith, P.C. Sternweis (1977) *Biochemistry* 16, 306-311
- [65] G. Grüber, S. Engelbrecht, W. Junge, K. Dose, T. Nawroth (1994) *FEBS Letters* 356, 226-228
- [66] A. Neidhardt (1991) Dissertation „Strukturelle Dynamik im Reaktionszyklus der F<sub>1</sub>-ATPase aus *Micrococcus luteus*“, Universität Mainz
- [67] M. Futai, H. Osmote (1996) *J. Bioenerg. Biomembranes* 28, 409-414
- [68] T. Noumi, M. Maeda, M. Futai (1987) *FEBS Letters* 213, 381-384
- [69] A. Neidhardt, T. Nawroth, M. Hütsch, K. Dose (1991) *FEBS Letters* 280, 179-182
- [70] Die Zucht der Bakterien wurde in Zusammenarbeit mit Frau Renate Genswein durchgeführt.
- [71] K. Zwicker (1992) Dissertation „Isolation der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* und funktionelle Rekonstitution in Modellmembranen“, Universität Mainz
- [72] C.H. Fiske, Y. Subarow (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-400
- [73] A. Arnold, H.U. Wolf, B.P. Ackermann, H. Bader (1976) *Anal. Biochem.* 71, 209-213
- [74] P.K. Smith et al (1985) *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- [75] M. Kasahara, P.C. Hinkle (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7384-7390
- [76] U.K. Lämmli (1970) *Nature* 227, 680-685
- [77] N. Wagner, M. Gutweiler, R. Papst, K. Dose (1987) *Eur. J. Biochem.* 165, 177-183
- [78] T. Nawroth, H. Conrad, J. Vienken, K. Dose (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 923-931
- [79] J.J. Lemaster, C.R. Hackenbrock (1979) *Meth. Enzymol.* 56, 530
- [80] L.A. Feigin, D.I. Svergun (1987) Plenum Press, New York
- [81] O. Glatter, O. Kratky (1982) *Small-Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London
- [82] C.R. Cantor, P.R. Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry - Freeman* (San Francisco)
- [83] H.B. Stuhmann (1979) *Chemie in unserer Zeit* 13, 11-22
- [84] A. Guinier, G. Fournet (1955) *Meth. Enzymol.* 127, 619-629

- [85] H.G. Haubold, K. Gruenhagen, M. Wagener, H. Jungbluth, H. Heer, A. Pfeil, H. Rongen, G. Brandenburg, R. Moeller, J. Matzerarth, P. Hiller and H. Halling (1989) *Rev. Sci. Instrum.* 60, 1943-1947
- [86] Web-Seite: [http://www.esrf.fr/exp\\_facilities/ID2/handbook/handbook.html](http://www.esrf.fr/exp_facilities/ID2/handbook/handbook.html)
- [87] J.C. Labiche, ESRF
- [88] T. Nawroth, I. Lauer, M. Rossle, H. Heumann, S. Bernstorff H. Amenitsch (1997) *IBR/ELETTRA-SAXS annual report 1996/97*, 75-76;  
und Web-Seite: [http://www.MPSD.de/MPSD\\_TRM.html](http://www.MPSD.de/MPSD_TRM.html)
- [89] Erworben wurde die Stopped-flow- Schrittmotormaschine von der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Hermann, MPI für Biochemie, Martinsried, kommerziell bei ISERT, Eiterfeld
- [90] P. Boesecke, ESRF
- [91] Igor Pro, WaveMetrics Inc., Oregon, USA (1998)
- [92] Web-Seite: <http://www.ill.fr/YellowBook/D22>
- [93] T. Nawroth (1989) *Physica B* 156 157, 493-495
- [94] M. Roessle (1997) Diplomarbeit „Untersuchungen zur Struktur und Funktion des E.coli Chaperoninsystems GroEL und GroES mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung“ Ludwigs-Maximilians-Universitaet München
- [95] N.E. Garret, H.S. Penefsky (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6640-6647
- [96] G. Grüber (1995) Dissertation „Struktur und Regulation der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus*“, Universität Mainz
- [97] D.I. Svergun, I. Aldag, T. Sieck, K. Altendorf, M.H.J. Koch, D.J. Krane, M.B. Kozin, G. Grüber (1998) *Biophysical Journal* 75, 2212-2219
- [98] A.C. Hausrath, G. Grüber, B.W. Matthews, R.A. Capaldi (1999) *PNAS* 96, 13697-13702
- [99] *Strahlenbiophysik* in W. Hoppe (1982) *Biophysik*, Springer-Verlag (New York), 306
- [100] S.P. Tsunoda, E. Muneyuki, T. Amano, M. Yoshida, H. Noji (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 5701-5706
- [101] J. Le Coutre, J. Tittor, D. Oesterhelt, K. Gerwert (1995) *PNAS* 92, 4962-4966

- [102] G. Varo, L.S. Brown, R. Needleman, J.K. Lanyi (1996) *Biochemistry* 35, 6604-6611
- [103] H. Ren, W.S. Allison (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1458, 221-233
- [104] J.M. Jault, C. Dou, N.B. Grodsky, T. Matsui, M. Yoshida, W.S. Allison (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 28818-28824
- [105] J. Weber, A.E. Senior (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 33210-33215
- [106] A.V. Syroeshkin, E.A. Vasilyeva, A.D. Vinogradov (1995) *FEBS Letters* 366, 29-32
- [107] H.V. Westerhoff, K.v. Dam (1987) „Thermodynamics and control of biological free-energy transduction“ Elsevier (Amsterdam), 246 ff
- [108] M. Roessle (2001) Dissertation „Time-resolved small-angle-scattering on proteins“, TU München
- [109] J. Weber, A.E. Senior (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1458, 300-309
- [110] P.D. Boyer (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1458, 252-262
- [111] R. A. Capaldi, B. Schulenberg (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1458, 263-269

## Veröffentlichungen

### Tagungen und Konferenzbeiträge

ESRF User Meeting

„Structure dynamics of ATP-synthase and F<sub>1</sub>ATPase from *Micrococcus luteus*“

T. Nawroth, I. Lauer, A. Neidhardt, M. Rössle, H. Heumann, O. Diat, P. Boesecke,

T. Narayanan

17.- 21.11.97 Grenoble

2<sup>nd</sup> international workshop on ATP-synthase and V-ATPase

„Structural film of working F<sub>1</sub>ATPase and ATP-synthase by time resolved X-ray scattering“

T. Nawroth, I. Lauer, M. Rössle, H. Heumann, S. Bernstorff, H. Amenitsch

14.-18.05.1998 Osnabrück

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik

„Structural switch of ATP-synthase and F<sub>1</sub>ATPase by azide“

I. Lauer, K. Zwicker, M. Roessle, H. Heumann, H. Hartmann, H. Decker, G. Goerigk,

T. Nawroth

21.-23.09.1998 Frankfurt/M.

ESRF 10<sup>th</sup> User Meeting /Workshop

„Structure dynamics of working F<sub>1</sub>ATPase observed by time- resolved small angle X-ray scattering“

I. Lauer, M. Roessle, R. Gebhardt, P. Boesecke, T. Narayanan and T. Nawroth

08.-12.02.2000 Grenoble

**Publikationen**

„Structure and dynamics of bacterial ATP-synthase und F<sub>1</sub>ATPase“

T. Nawroth, I. Lauer, A. Neidhardt, K. Zwicker, A. Post, C. Koch-Brandt, M. Rössle, H. Heumann, B. Lohkamp, H. Hartmann, H. Decker, G. Goerigk  
*HASYLAB annual report 2 (1996) 157-158*

„Time resolved investigation of protein dynamics- working native F<sub>1</sub>ATPase“

T. Nawroth, I. Lauer, M. Rössle, H. Heumann, S. Bernstorff, H. Amenitsch  
*IBR/ELETTRA, SAXS beamline annual report (1996/1997) 75-76*

„Structural switch of ATP-synthase und F<sub>1</sub>ATPase by azide“

T. Nawroth, I. Lauer, A. Neidhardt, A. Post, C. Koch-Brandt, M. Rössle, H. Heumann, B. Lohkamp, H. Hartmann, H. Decker, G. Goerigk  
*HASYLAB annual report 1 (1997) 655-656*

„Structure dynamics of F<sub>1</sub>ATPase during azide-inhibition observed by time resolved X-ray small angle scattering (TR-SAXS)“

T. Nawroth, I. Lauer, M. Rössle, H. Heumann, S. Bernstorff, H. Amenitsch  
*IBR/ELETTRA, SAXS beamline annual report (1997/1998) 67-68*

„Structural film of working F<sub>1</sub>ATPase and ATP-synthase by time resolved X-ray scattering“

T. Nawroth, I. Lauer, M. Rössle, H. Heumann  
*EBEC short reports 10 (1998) 52*

„Effect of DMSO and the inhibitors DCCD and azide on ATP-synthase and F<sub>1</sub>ATPase from *Micrococcus luteus*“

I. Lauer, K. Zwicker, H. Hartmann, H. Decker, M. Rössle, H. Heumann, G. Goerigk, T. Nawroth  
*HASYLAB annual report 1 (1998) 921*

„Structure dynamics of F<sub>1</sub>ATPase during azide-inhibition observed by time-resolved X-ray small angle scattering (TR-SAXS)“

T. Nawroth, I. Lauer, M. Rössle, H. Heumann, S. Bernstorff, H. Amenitsch  
*IBR/ELETTRA, SAXS beamline annual report (1998) 61-62*

„Ultra small angle scattering of the detergent solubilized membrane protein ATP-synthase“

T. Nawroth, I. Lauer, K. Zwicker, H. Hartmann, H. Decker, M. Rössle, H. Heumann,  
G. Goerigk, G.v. Krosigk  
*HASYLAB annual report 1 (1999) 864*

„Structural changes of oxygen transport protein Hemocyanin detected by pH dependent USAXS“

R. Gebhardt, I. Lauer, T. Nawroth, H. Decker, G. Goerigk, G. v. Krosigk  
*HASYLAB annual report 1 (1999) 979*

„Time-resolved SAXS study of conformation changes in the chaperonin system GroE“

M. Rössle, E. Manakova, I. Lauer, T. Nawroth, R. Gebhardt, T. Narayanan and H. Heumann  
*ESRF Newsletter, 33 (1999) 10*

„Time resolved small-angle scattering: Kinetic and structural data of proteins in solution“

M. Rössle, E. Manakova, I. Lauer, T. Nawroth, J. Holzinger, T. Narayanan,  
S. Bernstorff, H. Amenitsch and H. Heumann  
*J. of Appl. Crist. 33 (2000) 548-551*

## Anhang

### Macro 1: Zeitaufgelöste Porod- und Intensitätsnormierung der Streukurven

```
#pragma rtGlobals=1 // Use modern global access method.
```

```
macro poro_rg(baseName, lnwave, startIndex, endIndex)
    String baseName
    String lnwave
    Variable startIndex, endIndex
    Variable m
    Variable index = startIndex
    do
        Make/N=766/D/O $(lnwave + num2istr(index))
        Make/N=766/D/O poro
        porod(baseName, index)
        CurveFit /Q line poro[305,484] /X=q4_scale
        m=W_coef[1]
        subbuf (baseName, lnwave, index,m)
        CurveFit /Q line $(lnwave + num2istr(index))[63,128]/X=qq_scale
        Rg [(index-startindex)][0] = K0
        Rg [(index-startindex)][1] = sqrt(-3*K1)
        sigma [(index-startindex)][0] = W_sigma
        sigma [(index-startindex)][1] = sqrt(-3*(K1-W_sigma)) -sqrt(-3*K1)
        $(basename+num2istr(index))=$(basename+num2istr(index))/exp(K0)
        KillWaves $(lnwave + num2istr(index))
        KillWaves poro
        index += 1
    while (index <= endIndex)
end
function porod(basename, index)
    String baseName
    Variable index
    wave q4=q4_scale
```

```

    Wave w = $(baseName + num2istr(index))
    wave p=poro
    p=w*q4
    return p
end
function subbuf(baseName, lnwave, index,m)
    String baseName
    String lnwave
    Variable index,m
    wave buffile = buf_3m
    Wave w = $(baseName + num2istr(index))
    Wave v = $(lnwave + num2istr(index))
    w = w*((1.003*(1+7.9497))/(1+m)) - buffile
    v = ln(w)
    return v
    return w
end
Function rate(w, x)
    wave w;Variable x
    return w[0]/(1+e^(-w[1]*1/(1/x-1/w[2]))) + w[3]
End
Function dumpedsinus(w,x)
    wave w;
    Variable x;
return w[0]*(exp(-w[1]*w[2]*x))*sin(x*w[2]+w[3])
End

```

**Makro 2: Zeitaufgelöste Fourier-Transformation**

```

#pragma rtGlobals=1          // Use modern global access method.

macro pofr(waveName, maxIndex, prWave,rWave,anzahl, Dmax)
    String waveName
    String prWave,rWave
    Variable anzahl, maxIndex
    Variable point, r_point, index=1
    Variable Dmax
    Variable r=Dmax/anzahl
    Variable qr,dq,Iq
    Variable flaeche
    Make/N=(anzahl)/D/O $(rWave)
    Make/N=766/D/O lnwave
    Variable a=0
    Variable dvq=q_scale[63]/63
    do
        q_scale[a]=dvq*a
        a+=1
    while (a<=62)
    do
        $(rWave)[point]=r*(point)
        point +=1
    while(point <= anzahl)
do
    lnwave=ln($(waveName+num2istr(index)))
    CurveFit /Q line lnwave[63, 128] /X=qq_scale
    a=0
    do
        $(waveName+num2istr(index))[a]=exp(K0)*exp(K1*((q_scale[a])^2))
        a+=1
    while(a<=62)

```

```

Interpolate/T=2/N=180/E=2/Y=atest1_CS/X=q_scale_CS
$(waveName+num2istr(index))/X=q_scale
r_point=1
do
    Make/N=(anzahl)/D/O $(prWave+num2istr(index))
    $(prWave+num2istr(index))[r_point]=0
    point=1
    do
qr=((q_scale_CS[point]+q_scale_CS[point-1])/2)*$(rWave)[r_point]
        dq=q_scale_CS[point]-q_scale_CS[point-1]
        Iq=(atest1_CS[point]+atest1_CS[point-1])/2
        $(prWave+num2istr(index))[r_point]
        =$(prWave+num2istr(index))[r_point]+Iq*sin(qr)*qr*dq
        point+=1
    while (point <= anzahl)
        r_point+=1
    while (r_point <= anzahl)
flaeche=area($(prwave+num2istr(index)),0,anzahl)
        $(prwave+num2istr(index))=$(prwave+num2istr(index))/flaeche
        index+=1
while(index<=maxIndex)
End

```