

Strukturdynamik Protonen-transportierender Membranproteine: Cytochromproteine und ATP-Synthasen

T. Nawroth, P. Eßwein, G. Heinz, I. Lauer A. Neidhardt und T. Rimke

Institut für Biochemie, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität, 55099 Mainz

Bericht über die Arbeiten vom 1.9.1995 bis Frühjahr 1997

30.4.1997

Im Forschungsvorhaben 03-Na4-Mai wurden im Berichtszeitraum bakterielle ATP-Synthase, ihr katalytisches Fragment F_1 ATPase und Cytochromproteine aus Membranen der biologischen Energiekonservierung (Atmungskette) [1-3] isoliert und statische sowie zeitauflösende Untersuchungen mit Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung vorgenommen. Weiterhin wurden bei Cytochrom-Oxidase Subprozesse der Reaktionszyklen durch zeitaufgelöste optische Spektroskopie nach Laserblitz-Aktivierung von CO - inhibiertem Enzym durchgeführt.

Zur effizienten Nutzung der gerade bei kleineren Projekten beschränkten Ressourcen wurde die offene Arbeitsgemeinschaft "Strukturdynamik von Proteindomänen" gebildet (Nutzergruppe für Strahlzeit und Geräte; zeitweilige Personalgemeinschaft für Experimente an Großforschungseinrichtungen). Daran sind gegenwärtig vier Teilprojekte des VB42 und eine externe Gruppe beteiligt (Nawroth, Heumann, Koch-Brandt, Doster/ Petry, Decker). Dieses 1996 und 1997 erfolgreich erprobte Modell ist von weitreichender Bedeutung, z.B. für andere BMBF-Projekte. Insbesondere wurde die Arbeitsgemeinschaft für Gruppen, die nicht dem VB42 angehören offen gehalten; die Struktur erlaubt daher die Einbindung von Gruppen mit Förderung durch die DFG.

Bereitstellung der Untersuchungsobjekte

Zur Studie der Struktur und Dynamik ist die Isolierung der Proteine nicht nur in chemisch reiner Form erforderlich, wie sie zu Arbeiten mit biochemischen und molekulargenetischen Methoden genügt, sondern die besonders bei Membranproteinen komplexen und empfindlichen Makromoleküle müssen in strukturell und in Bezug auf die Bio-Katalyse einheitlicher Form gewonnen werden. Dies gilt um so mehr, wenn Erscheinungen der molekularen Regulation [4] untersucht werden sollen. Darüber hinaus ist die Isolierung in erheblicher Menge erforderlich, insbesondere für zeitaufgelöste Studien oder Neutronenstreuung. Die strukturelle Studie stellt demnach spezifisch erhöhte Anforderungen an Qualität und Menge der Untersuchungsobjekte.

Zu Beginn des Forschungsprojektes wurden daher unter zusätzlicher finanzieller Förderung mit Landesmitteln [5] die Umstellung der Methoden zur Isolierung der ATP-Synthase, F_1 ATPase und der Cytochromproteine aus *Micrococcus luteus* vom Labor-Entwicklungsmaßstab auf halbtechnische Verfahren durchgeführt. Dabei wurde der Einsatz an Zellmasse um eine Größenordnung auf 1/4 kg erhöht, die bis zu fünfstufigen Reinigungsschritte [6-14] werden jetzt mit präparativen HPLC- und FPLC-Säulen von 2,6 und 5 cm Durchmesser durchgeführt (bis zu 50 g Rohprotein im Ausgangsmaterial). Diese Schritte, die auf Ergebnisse des BMBF-Projektes 03-Na3-Mai im kleineren Maßstab aufbauen, sind einerseits erforderlich, da im gegenwärtigen Vorhaben nur beschränkt

—

Personalmittel zur Verfügung stehen (Ersatz von "Manpower" durch technische Ressourcen), andererseits werden für die jetzt begonnen Forschungsarbeiten zur Strukturodynamik mit zeitlicher Auflösung erhöhte Mengen an Untersuchungsmaterial benötigt (bis zu 100 mg).

Gründung der offenen Arbeitsgemeinschaft "Strukturodynamik von Proteindomänen"

Protonen-transportierende Membranproteine sind Multidomänenproteine, die sich durch strukturelle und energetische Kopplung mehrerer Domänen im funktionellen Reaktionszyklus auszeichnen. Einerseits handelt es sich bei diesen Makromolekülen um Proteine universeller Bedeutung, die in Membranen praktisch aller Zellen vorkommen. Andererseits zeigen sie einen Aufbau aus interagierenden und beweglichen Strukturdomänen, der auch bei anderen Multidomänenproteinen vorkommt, die im Verbundprojekt VB42 untersucht werden. Aufgrund dieser übergeordneten strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen den Objekten mehrere Teilprojekte und den hieraus resultierenden gemeinsamen Untersuchungsmethoden wurde 1996 die offene Arbeitsgemeinschaft "Strukturodynamik von Proteindomänen" als Unterstruktur des VB42 initiiert. Der erste Antrag dieser Gruppierung auf gemeinschaftliche Meßzeit am HASYLAB liegt als Anlage 1 bei. Die Kriterien dieser Struktur sind:

- **ähnliche Problemstellung:** weiträumige Bewegungsvorgänge von Domänen in großen Proteinen, z.B. von Untereinheiten in Komplexen, im Mikrosekunden bis Sekundenbereich
- **ähnliche Experimentführung:** **a)** zeitauflösende Untersuchung von strukturbestimmten Reaktionen (dynamisch, transient) und **b)** Vergleich stabiler struktureller Zustände (statisch)
- **gemeinschaftliche Nutzung von Geräten:** z.B. von Probenumgebungen; stopped-flow Mischungsgeräte, Blitzphotolyse Einrichtung; Aktivierung von caged-ATP, Photoaktivierung
- **gemeinschaftliche Durchführung von Experimenten:** zeitweise Personalgemeinschaft durch Bildung einer "Meßtruppe" je Experiment an Großgeräten; gleiche Basis-Auswertung

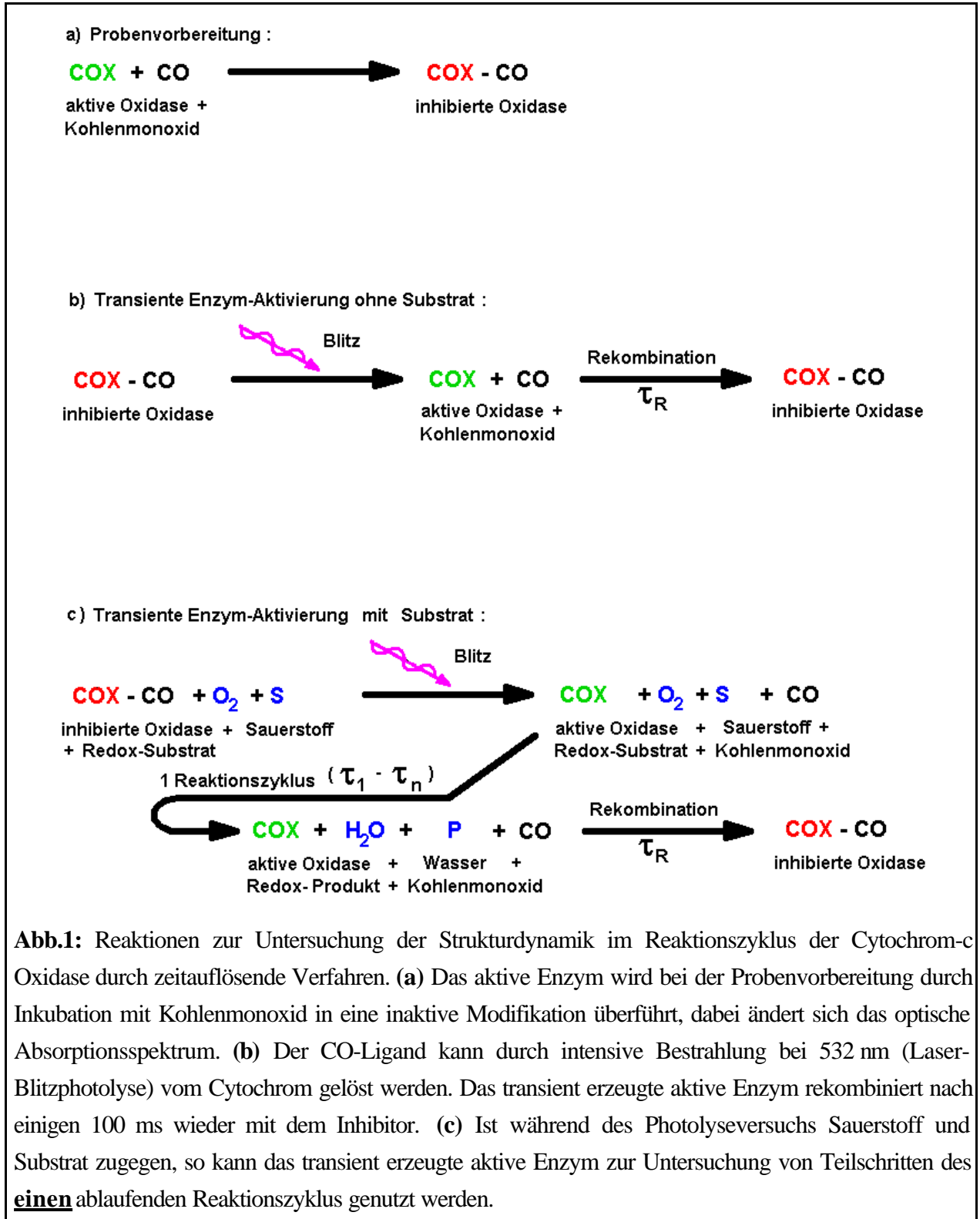
Im Zentrum dieser Studien steht die Anwendung und Entwicklung zeitauflösender Streumethoden. Solche Experimente wurden 1997 an den Synchrotrons ESRF, Grenoble, und ELETTRA, Triest, durchgeführt; zeitaufgelöste Neutronenstreuexperimente sind am D22-Instrument des ILL vereinbart (R.P. May). Der Zusammenschluß ermöglicht die effiziente Nutzung der Ressourcen trotz beschränkter Mittel auch für kleinere Arbeitsgruppen. Die Gruppe soll in Zukunft, wie im Berichtszeitraum erprobt, auch für nicht-VB Mitglieder offen gehalten werden, z.B. für Gruppen mit DFG-Förderung. Dies erscheint insbesondere für die fernere Zukunft von Bedeutung. 1996 und 1997 wurden in diesem Rahmen Kooperation mit den Gruppen **Heumann** [18], **Koch-Brandt** [17], **Doster/ Petry** [Jahresbericht 1995/96], **Decker** [15] etabliert und vertieft. Interesse zur Zusammenarbeit zur Strukturuntersuchung des strukturell verwandten System des Tubulins und der damit assoziierten Proteine wurde von der Gruppe **Mandelkow** geäußert.

Untersuchungen an Cytochrom-Oxidase

Die Untersuchungen zur Struktur- und Funktionsdynamik von Protonen-transportierenden Membranproteinen wurden an der Cytochrom-c Oxidase COX aus *Micrococcus luteus* begonnen. Dieses Redox-Enzym ist wie die im Projekt 03-Na3-Mai untersuchte Chinol-Oxidase QOX aus den gleichen Membranen ein Cytochrom-aa₃ Komplex [6,7,14]. Sie besteht aus vier Protein-Untereinheiten mit 45.000, 38.500, 21.500 und 10.000 g/Mol molekularer Masse. Mit zusammen 115.000 g/Mol besitzt das bakterielle Enzym also nur knapp die halbe Molmasse der mitochondrialen Cytochrom-c Oxidase aus 13 Untereinheiten [1-3]. Das Protein katalysiert *in vivo* und *in vitro* die Oxidation des kleinen Eisenproteins Cytochrom-c (12.000 g/Mol Masse) mit molekularem Sauerstoff in einem mehrstufigen Reaktionszyklus von etwa 2 ms Dauer (bei 37°C). Der Schlüssel für die Studie der Struktur- und Funktionsdynamik ist die in Abb.1a gezeigte Inhibition mit Kohlenmonoxid. Bei beiden terminalen Oxidasen COX und QOX aus *Micrococcus luteus* konnte diese für Sauerstoff-bindende Häm-Proteine typische Inhibition gezeigt werden [7]. Wesentlich für die Untersuchung der Struktur- und Funktionsdynamik mit Kleinwinkelstreuung und anderen Methoden sind die dabei auftretenden spektralen Veränderungen der Enzyme: Bei der CO-Bindung an die reduzierte Cytochrom-c Oxidase COX erhöht sich die Lichtabsorption im Bereich von 470 - 610 nm (α - und β -Bande der Cytochrome), gleichzeitig verschiebt sich die intensive γ -Bande (Soret-Bande im Bereich 410 - 460 nm) zu kürzeren Wellenlängen. Daraus ergibt sich die in Abb.1b skizzierte Möglichkeit durch Einstrahlung von intensivem Licht im Bereich von 500 - 600 nm den CO-Liganden kurzzeitig vom Häm-Protein abzuspalten und während dieser kurzen Zeit, typisch 10 - 500 ms, an dem transient und synchron aktivierten Enzym strukturelle und funktionelle Untersuchungen durchzuführen. Weiterhin kann die mit einer Zeitkonstante τ_R folgende Rekombination mit dem Inhibitor zur Studie der Ligandenbindung an das Protein genutzt werden; derartige Untersuchungen sind z.B. am Hämoglobin und am Myoglobin bekannt geworden. Handelt es sich bei dem Häm-Protein weiterhin um ein Enzym, wie die Cytochrom-c Oxidase, so kann dieser Versuch in der in Abb.1c dargestellten Weise erweitert werden: In Anwesenheit der Enzymsubstrate, z.B. von Sauerstoff und reduziertem Cytochrom-c, läuft am transient aktivierten Enzym ein isolierter, synchroner Reaktionszyklus der mehrstufigen Redoxkatalyse ab. Anschließend findet die Rekombination von Enzym und Inhibitor zur inaktiven Proteinmodifikation statt. Entsprechende Experimente sind mit zeitaufgelöster optischer Spektroskopie (Absorption, FT-IR und Raman) an mitochondrialer Cytochrom-c Oxidase bekannt [1-3,23], an bakteriellen Enzymen und mit Methoden der Strukturforschung liegen aber noch keine Untersuchungen vor.

Die Versuche zur Untersuchung der Struktur- und Funktionsdynamik im Reaktionszyklus der Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. W. Doster, München/ Garching, im Rahmen des Verbundprojektes VB42 durchgeführt. Wie in Jahresbericht 1995/96 skizziert, wurde dabei im Labor ("offline") hergestellte Kohlenmonoxid-inhibierte Cytochrom-c Oxidase (COX-CO) durch Laserblitzbestrahlung (532 nm, 5 ps, 60 mJ) transient in aktives Enzym überführt. Mit Hilfe der von PD. Dr. Doster entworfenen Apparatur konnte die Rekombination (Abb.1b) und Teilschritte des Reaktionszyklus (Abb.1c) durch zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie im Bereich der Soret-Bande der Oxidase (445 nm) untersucht werden. Der neuartige Aufbau erlaubt die Verfolgung spektraler

Änderungen über 11 Dekaden in der Zeit und 7 Dekaden in der Signalamplitude. Die spektroskopisch gezeigten Übergänge zwischen transienten Zuständen der Cytochrom-Oxidase sollen im weiteren Verlauf des Vorhabens durch zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung am Synchrotron strukturell charakterisiert werden.



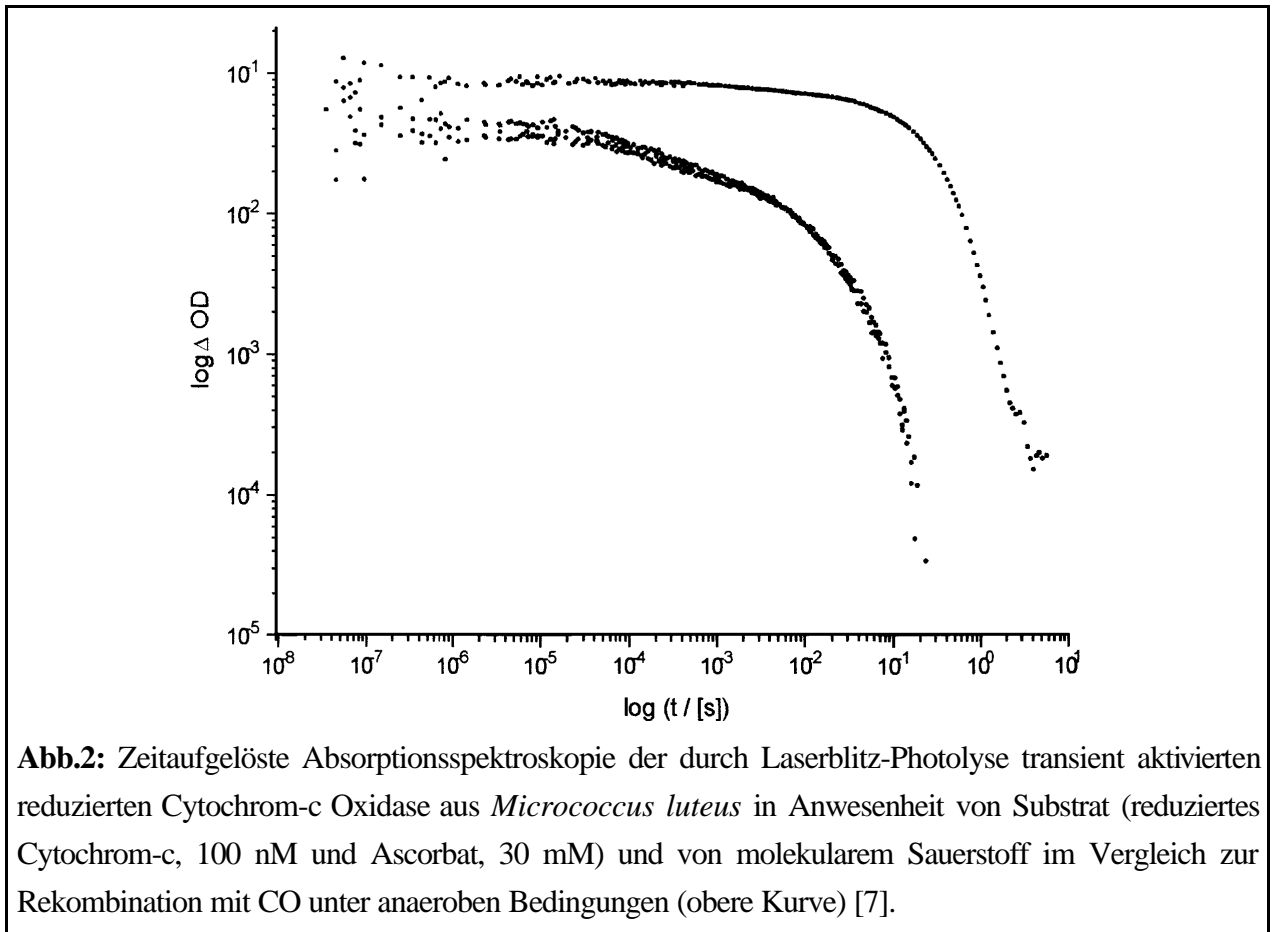


Abb.2: Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie der durch Laserblitz-Photolyse transient aktivierten reduzierten Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* in Anwesenheit von Substrat (reduziertes Cytochrom-c, 100 nM und Ascorbat, 30 mM) und von molekularem Sauerstoff im Vergleich zur Rekombination mit CO unter anaeroben Bedingungen (obere Kurve) [7].

Im Jahresbericht 1995/96 ist das Ergebnis der Versuche mit reduzierter Cytochrom-c Oxidase in Abwesenheit von Substrat nach Abb.1b gezeigt. Danach kann die Reaktion (Rekombination mit CO) repetitiv mit der selben Meßprobe durchgeführt werden. Dies ist für die geplanten Streuexperimente essentiell, da wegen des schnellen Reaktionszyklus (2 ms) eine Reaktionsführung mit einer "stopped-flow" Apparatur, wie sie bei der ATP-Synthase eingesetzt wird, nicht realisierbar ist. Beim gezeigten Experiment mit einer offenen Küvette konnten fünf bis zehn Experimente mit der gleichen Probe durchgeführt werden, bevor durch Verlust an CO eine Veränderung der Kinetik auftrat (Verschiebung der Kurven). Durch erneute Sättigung mit CO konnte jedoch die ursprüngliche Kinetik wieder hergestellt werden, so daß eine bis zu 100-fache Repetition realisierbar erscheint. Die Zeitkonstante für die Rekombination von CO mit reduzierter Cytochrom-c Oxidase aus *M. luteus* in Abwesenheit von Sauerstoff beträgt $\tau_R = 3,8 \cdot 10^{-1} \text{ s}$ (Rate: $2,6 \text{ s}^{-1}$).

In Abb.2 ist das Ergebnis der analogen Versuche in Anwesenheit von Substrat (reduziertes Cytochrom-c, 100 nM und Ascorbat, 30 mM) und von molekularem Sauerstoff nach Abb.1c gezeigt. Unmittelbar erkennbar ist die Beschleunigung der Rekombination mit dem Inhibitor CO unter aeroben Bedingungen um den Faktor 40 im Vergleich zu anaerober Versuchsführung in Abb.3 ($\tau_R = 3 \cdot 10^{-2} \text{ s}$ bei 25°C). Dieses Ergebnis weist auf eine Strukturänderung des Enzyms durch Änderung des Redoxpotentials hin [20,21]. Vermutlich handelt es sich dabei um eine Erscheinung der molekularen Regulation. Die zeitaufgelöste strukturelle Untersuchung mit Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung (statisch) ist für die Förderperiode ab 1998 geplant.

$$N(t) = N_o \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau} \right)^\beta \right] \quad \text{Gl.1} \quad \langle \tau \rangle = \frac{\tau}{\beta} \Gamma \left(\frac{1}{\beta} \right) \quad \text{Gl.2}$$

$N(t)$ = Δ OD
 τ = Zeitkonstante
 β = Streckfaktor

$\langle \tau \rangle$ = Zeitkonstante
 Γ = Eulersche Gammafunktion

$$\text{Rate} = \frac{1}{\langle \tau \rangle} \quad \text{Gl.3}$$

Für eine Abfolge von n Teilschritten in einem Reaktionszyklus läßt sich das optische Signal nach Gleichung 1 bis 3 durch eine Serie gestreckter Exponentialfunktionen darstellen. Die Teilprozesse korrespondieren dann mit den zugehörigen Zeitkonstanten τ_i und den Amplituden $N_{i,0}$.

Die genaue Untersuchung der transienten spektralen Änderungen im Reaktionszyklus der Cytochrom-c Oxidase in Gegenwart von Substrat und Sauerstoff und die Fit-Analyse durch Reihenentwicklung mit gestreckten Exponentialfunktionen ist in Abb.3 gezeigt. Die Ermittlung der in Tabelle1 gezeigten Parameter erfolgte mit dem Programm MathCad 5.0 in Mainz. Neben der langsamen Rekombination des Enzyms mit CO (Beitrag F_R) waren noch vier weitere, schnellere Prozesse nachweisbar (Prozesse $F_1 - F_4$), die mit Teilschritten des Reaktionszyklus einhergehen.

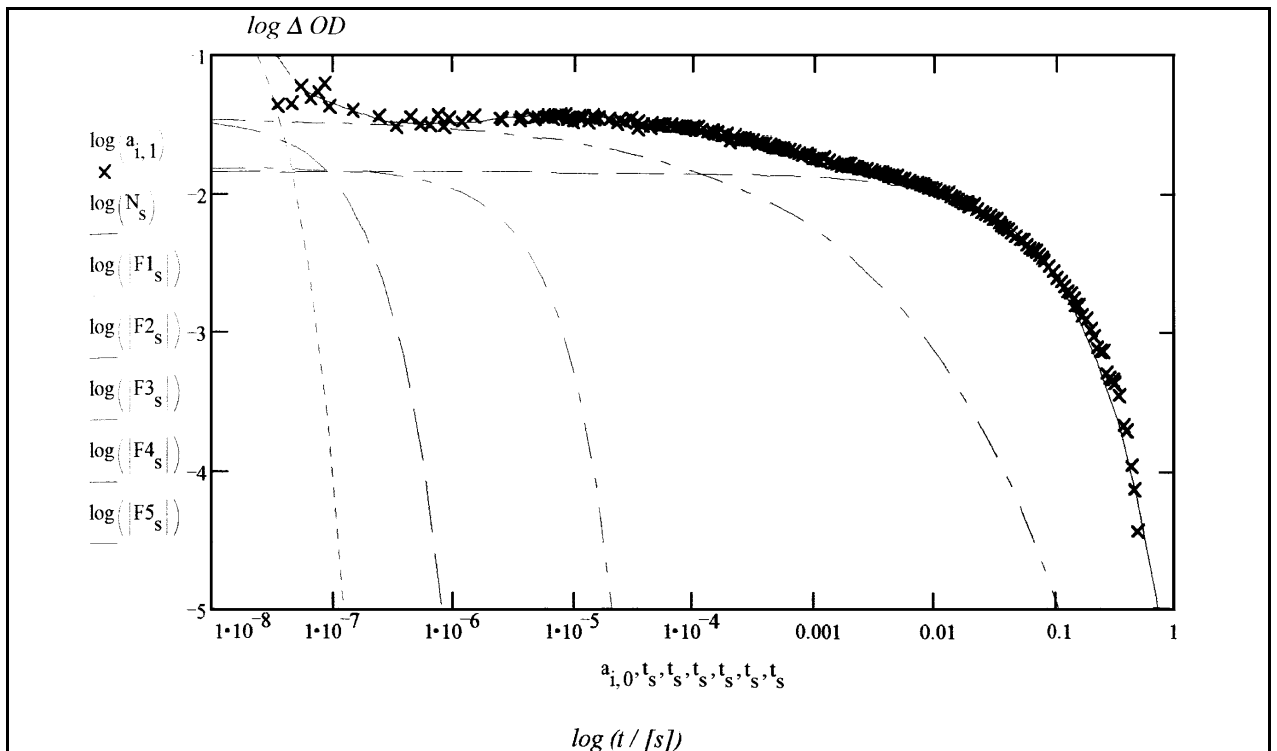


Abb.3: Parameteranalyse zur zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie der durch Laserblitz-Photolyse transient aktivierten reduzierten Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* in Anwesenheit von Substrat (reduziertes Cytochrom-c, 100 nM und Ascorbat, 30 mM) und von molekularem Sauerstoff durch fünf gestreckte Exponentialfunktionen [7].

Tabelle1: Zeitkonstanten und Reaktionsraten von Teilprozessen des Reaktionszyklus ($F_1 - F_4$) der Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* und der Rekombination mit Kohlenmonoxid (Prozeß F_R) in Anwesenheit von Substrat und Sauerstoff (aus [7]).

Prozeß	F_4	F_3	F_2	F_1	F_R
Zeitkonstante t [s]	$2,9 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-2}$
Reaktionsrate R [s^{-1}]	$3,4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^5$	$9,09 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^1$

Weiterhin konnten in Kontrollexperimenten mit mitochondrialer Cytochrom-c Oxidase, die vom Kooperationspartner Dr. T.A. Link, Frankfurt/M. zur Verfügung gestellt wurde, die aus der Literatur [23] bekannten kinetischen Parameter dieses Enzyms reproduziert werden [7].

Im Vergleich zum mitochondrialen Enzym [23] läuft bei der Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* die Rekombination mit CO und der langsamste Subprozeß im Reaktionszyklus (F_1) mit vergleichbarer Reaktionsgeschwindigkeit ab. Die Prozesse F_2 bis F_4 jedoch sind, soweit sie eine direkte Entsprechung im Reaktionszyklus des mitochondrialen Enzyms besitzen, etwa zwei Größenordnungen schneller. Möglicherweise ist die verschiedene Geschwindigkeit des zugeordneten Übergangs vom O- in den F-Zustand des binucleären Eisen-Kupferzentrums der Cytochrom-c Oxidasen eine Konsequenz der unterschiedlichen Untereinheitenstöchiometrie der bakteriellen und mitochondrialen Enzyme. Mit beiden Systemen ist bislang unbekannt, ob und zu welchem Zeitpunkt die im optischen Spektrum nachweisbaren elektronischen Übergänge mit den vermuteten Strukturumwandlungen verbunden sind.

Auch bei diesen Versuchen gelang eine repetitive Versuchsführung (5 Subexperimente). Durch Verbesserung der Bedingungen (geschlossene Küvette; Befüllung mit einer "stopped-flow" Einrichtung unter einem Gaspolster aus reinem Sauerstoff) kann die Repetitionsrate wahrscheinlich auf 50 gesteigert werden, bevor die Probe gewechselt werden muß. Damit kann die für die geplanten zeitaufgelösten Streuexperimente erforderliche Proteinmenge abgeschätzt werden: Mit der bei den bisherigen Streuexperimenten [15-19] erfolgreich eingesetzten Quarz-Durchflußkapillare von 100 μ l Probenwechsellvolumen sind demnach für eine Sekunde integrale Strahlzeit über einen Reaktionszyklus von 2 ms Dauer 10 Probenwechsel mit zusammen 1 ml Probenvolumen und etwa 5 mg Enzym erforderlich. Die insgesamt für eine Experimentserie nötige Proteinmenge beträgt, je nach Grad der Zeitauflösung (100-256 logarithmisch eingeteilte Zeitscheiben in der integralen Strahlzeit) und Strahlstärke des Synchrotrons (ESRF, DESY) etwa 50 - 500 mg. Daher ist der Einsatz der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle ESRF erforderlich. Entsprechende Experimente sind in Arbeitsteilung mit der Gruppe Heumann im VB42 in Vorbereitung (s.o.). Dabei bei der gemeinschaftlichen Durchführung der Experimente in Form einer Arbeitsgemeinschaft (Nutzergruppe), wie bei den Experimenten an DESY, ESRF und ELETTRA, der gemeinsame Aufbau und Nutzung von Geräten (neu entwickelte Blitz-Probenumgebung und "stopped-flow" Apparatur aus Fördermitteln des Projektes) geplant.

-

-

Untersuchung der Membranproteine mit Neutronen- und Röntgenkleinwinkelstreuung

Im Berichtszeitraum wurden Protonen-transportierende Membranproteine mit Neutronen- vor allem aber mit Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Von seiten der Untersuchungsobjekte wurden die meisten Versuche an ATP-Synthase und ihrem katalytischen F₁-Fragment (F₁ATPase) aus *Micrococcus luteus* vorgenommen. Erste Streuversuche fanden jedoch auch an der Cytochrom-c-Oxidase (COX) aus dem gleichen Bakterium statt.

Aufgrund der gegenüber dem Projektantrag stark reduzierten Mittel mußten die Experimente auf ein Minimalprogramm beschränkt werden. Das Programm wurde auf die längerfristig interessanteste Perspektive ausgerichtet, die zeitauflösende Studie von Strukturänderungen. Dazu waren auch statische Streuexperimente notwendig, die vor allem an einem speziellen Instrument am DESY/ HASYLAB, Hamburg, mit hoher Auflösung gewonnen wurden. Diese dienten einerseits als Referenz für die zeitaufgelösten Experimente, die technisch bedingt an den Instrumenten mit hohem Fluß nur mit beschränkter Auflösung durchgeführt werden können. Diese genauen Streuprofile (10^{-3} von $I(0)$; bis zu $0,5 \text{ \AA}^{-1}$) sind zur Ergebnis-Interpretation durch molekulare Modellierung erforderlich. Andererseits sind die durch statische Messungen ermittelten Streuprofile in Abhängigkeit von Inhibitoren der intramolekularen Kooperativität oder im Zusammenhang mit molekularen Regulationsprozessen zur Vorbereitung von zeitauflösenden Experimenten notwendig, bei denen zwischen gekoppelten Teilschritten im Reaktionszyklus unterschieden wird.

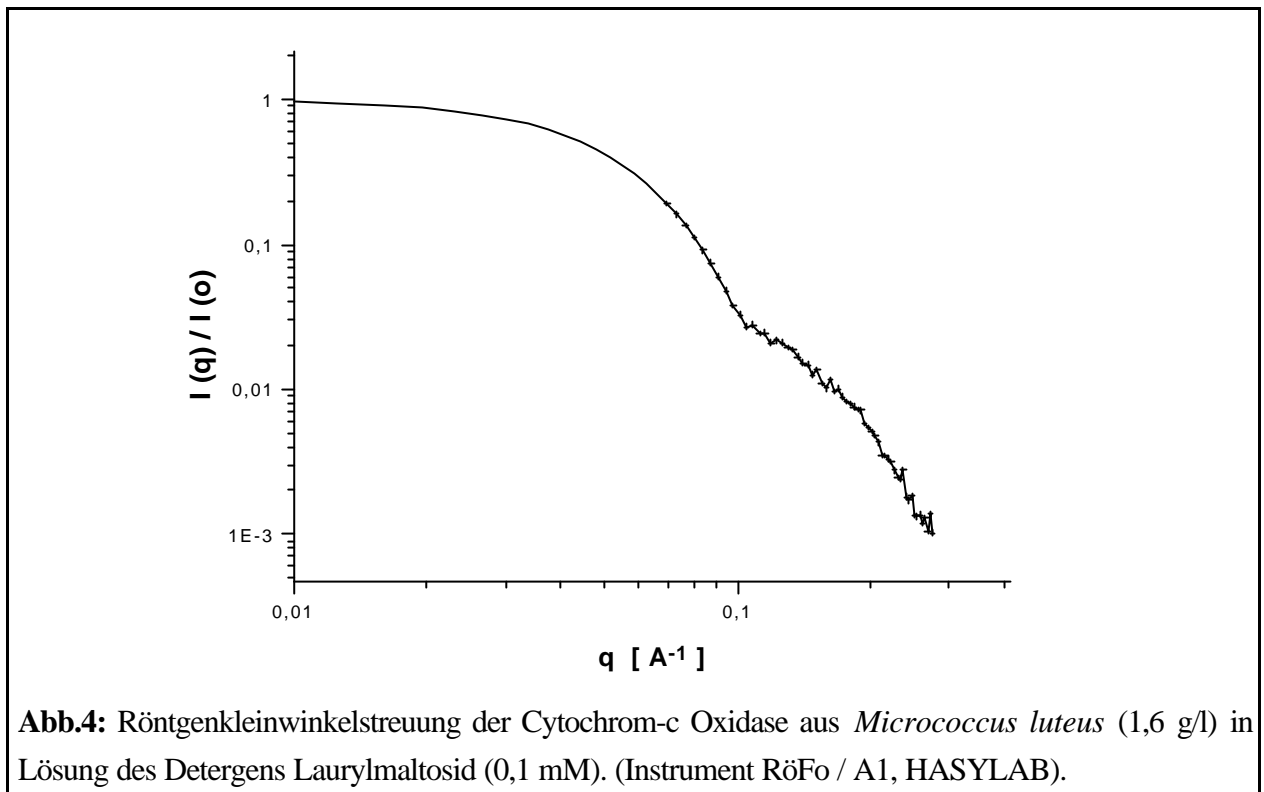
Genutzte und erprobte Instrumente

Zu Anfang des Projektes wurden Experimente zur Kleinwinkelstreuung mit Röntgenstrahlung am DESY-HASYLAB an den Instrumenten R_öFo (A1, Stuhmann) und testweise am D1.2 (X33 des EMBL, Koch) durchgeführt. Besonders im ersteren Fall erwiesen sich diese Versuche jedoch wegen mangelhafter Strahl- und Instrumentestabilität als zunehmend schwierig, so daß andere Alternativen gefunden werden mußten. Mit dem JUSIFA-Instrument (B1 im DESY-HASYLAB, Haubold/Goerigk, IFF des FZ Jülich) wurde ein für unsere Zwecke optimales Instrument gefunden. Obwohl die erste Experimenteserie im Sommer 1996 die erste mit Proteinlösungen an diesem Experiment überhaupt war, konnten hier Streukurven hervorragender Qualität ermittelt werden [15-17]. Die Qualität erklärt sich durch a) das bemerkenswerte Design des Instruments mit nachträglicher Piezo-Ausregelung der Strahllageschwankungen ($\pm 1 \text{ mm}$) und b) die gute Wartung, Justage und User-Betreuung durch einen permanent angestellten Mitarbeiter. Erfolgreiche Experimente zur Neutronenkleinwinkelstreuung wurden im November 1996 an der bewährten KWS-2 Kamera am DIDO-Reaktor des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

1997 konnten weiterhin erste Experimente zur zeitauflösenden Kleinwinkelstreuung nach Synchronisation der arbeitenden Enzymproben mit einem "stopped-flow" Mischgerät durchgeführt werden. Die Experimente an den Synchrotrons ELETTRA, Triest, am Instrument SAXS (österreich. Akademie d. Wissenschaften, Laggner, Graz) und ESRF, Grenoble, am Instrument ID2/BL4 (Diat/ Boesecke) durchgeführt. In beiden Fällen waren die in Kooperation mit der Gruppe Heumann durchgeführten Versuche die ersten Experimente mit Proteinlösungen überhaupt.

—

Strukturuntersuchung der Cytochrom-Oxidase aus *Micrococcus luteus*



Die Röntgenkleinwinkelstreuung der in der Struktur bislang nicht untersuchten Cytochrom-c Oxidase COX aus *Micrococcus luteus* ist in Abb.4 gezeigt. Die Streukurve konnte aufgrund experimenteller Schwierigkeiten am RöFo-Instrument nur bei $q > 0,07 \text{ \AA}^{-1}$ bestimmt werden und muß daher als vorläufig gelten. Im Bereich um $q = 0,15 \pm 0,5 \text{ \AA}^{-1}$ bestanden Schwierigkeiten in der Eliminierung der Streuung von Detergens-Mizellen, die bei der vorausgehenden Ultrafiltration mit dem Protein zusammen ankonzentriert wurden (Protein-abhängig). Daher konnten nur Proteinlösungen untersucht werden, deren Konzentration 1,6 g/l nicht überstieg. Der Streumassenradius von $R_g = 32,5 \pm 0,5 \text{ \AA}$ wurde durch Guinier-Funktion Iteration des Zentralpeaks bestimmt. Er entspricht dem nach der Molekülmasse (105.000 g/Mol) zu erwartenden Wert.

Die in Abb.5 gezeigte intramolekulare Abstandsverteilung ergab eine maximale Moleküldimension von $r_{\text{max}} = 85 \pm 3 \text{ \AA}$. Der strukturelle Vergleich mit der kristallographischen Analyse der Cytochrom-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* [Michel & Ludwig 1995] und mit der im Vorprojekt untersuchten mitochondrialen Cytochrom-Oxidase (nach Monomerisierung) zeigte einen ähnlichen generellen Aufbau. Die Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus* [7] liegt jedoch ohne Manipulation monomer vor, d.h. vermutlich auch in der Natur. In dieser Hinsicht ähnelt das Enzym demnach der terminalen Chinol-Oxidase QOX aus *Micrococcus luteus* [6], die im Vorprojekt untersucht wurde (ebenfalls ein Cytochrom-aa₃ Komplex, was zunächst zu einer Fehl-Klassifizierung als Cytochrom-c Oxidase COX führte).

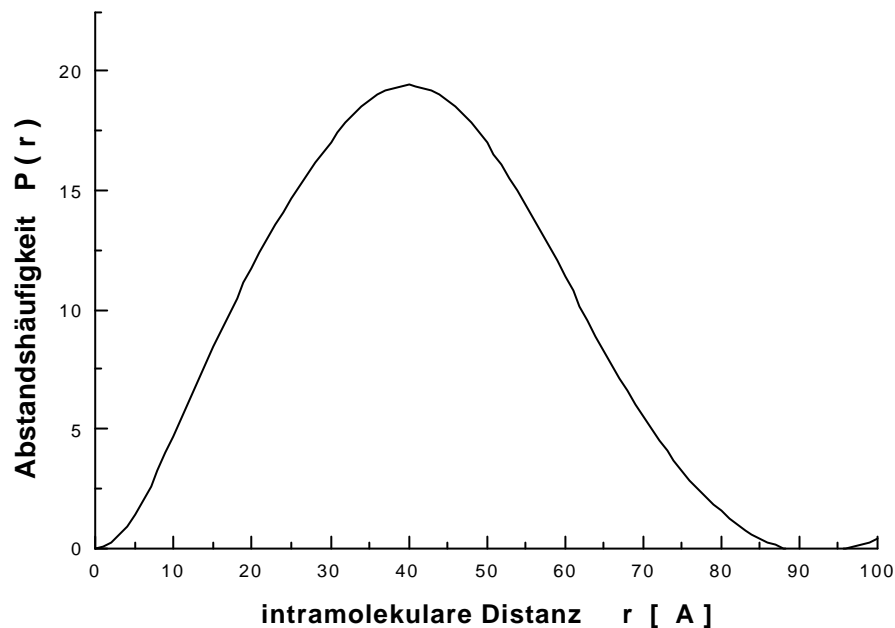
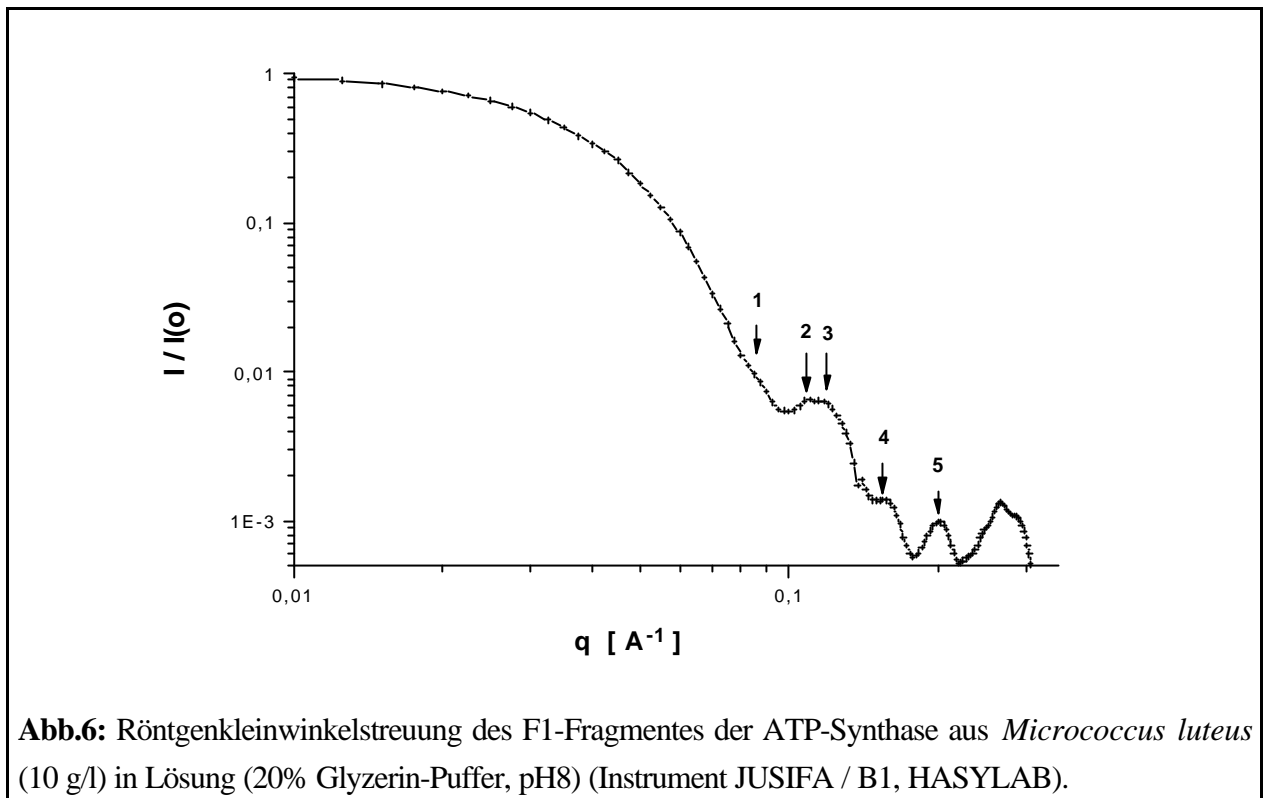


Abb.4: Intramolekulare Abstandsverteilung der Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* (1,6 g/l) in Lösung des Detergens Laurylmaltosid ergibt eine Dimension von $r_{\max} = 85 \pm 3 \text{ \AA}$.

Nach den Ergebnissen der zeitauflösender Spektroskopie und der statischen Kleinwinkelstreuung ist die Cytochrom-Oxidase COX aus *Micrococcus luteus* ein geeignetes Objekt zur geplanten Studie der Struktur- und Dynamik im Reaktionszyklus durch zeitaufgelöste Röntgenkleinwinkelstreuung. Die Schwierigkeiten durch Streuung von Detergenzmizellen können durch Wechsel auf ein Detergens, das nur kleine Mizellen bildet umgangen werden, z.B. das bei der ATP-Synthase bewährte Taurodeoxycholat TDOC. Wie enzymatische Experimente ergaben, schädigt dieses Detergens in geringer Konzentration (5 mM) die Oxidase nicht.

Statische Kleinwinkelstreuung der ATP-Synthase und ihres F₁-Fragmentes

Die statische Kleinwinkelstreuung des F₁-Fragmentes der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* war zu Beginn des Vorhabens aus Vorprojekten in ihrem ungefähren Verlauf bekannt. Das Enzym eignet sich als Objekt für die zeitaufgelöste Strukturuntersuchung im Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse, da es nach den 1995/96 durchgeführten Verbesserungen (upscaling) in großer Menge (100 mg / Batch), Reinheit (>99%) und in kinetisch einheitlicher Form gewonnen wird. Nach unseren enzymatischen Studien kann das arbeitende Enzym durch Konzentrationssprung an seinem Substrat (ATP) aktiviert und synchronisiert werden. In Abb.6 ist die Röntgenkleinwinkelstreuung des Enzyms in hoher Auflösung nach Experimenten am Instrument JUSIFA am DESY-HASYLAB gezeigt. Die Streukurve (4 * 3 h incl. Puffermessung) ist bis zu einem Fehler von $5 \cdot 10^{-4} I(0)$ aufgelöst und zeigt eine Reihe von Nebenmaxima (signifikant: 1 - 5).



Der hohe Gehalt der Proben an Glycerin, einem effektiven Radikalfänger (scavenger), ist für die folgenden Experimente mit zeitauflösender Röntgenstreuung wichtig, da die Proben an den Undulator-Instrumenten in Triest (ELETTRA) und Grenoble (ESRF) mit bis zu 10^{18} Photonen belastet werden (1 mm^2 Fläche, $E = 10 - 12 \text{ keV}$). Das Doppelmaximum in der Streukurve zeigt die Präsenz unterschiedlicher Abstände der großen Untereinheiten im Molekül (Asymmetrie), wie sie auf in der kristallographischen Analyse des inhibierten Enzyms aus Mitochondrien sichtbar ist [Walker et al. Nature 1995]. Die Auswertung der Streukurve nach Guinier ergab einen Streumassenradius von $R_g = 45,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$.

Die semi-direkte Fourier-Transformation der Streukurve (Interpolation nur der fehlenden Kurventeile für $q < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$ und $q > 0,5 \text{ \AA}^{-1}$; direkte Verwendung des experimentellen Streuprofiles) ergab die in Abb.7 gezeigte intramolekulare Abstandsverteilung des Proteins mit den auffälligen Extrema (A - D), die auf Lösungsmittel-separierte Massen im Molekül-Komplex aus 9 Untereinheiten ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) hinweisen. Der Hauptteil der Masse zeigte mit der Extrapolation E1 die schon früher ermittelte maximale Dimension $r_{\text{max}1} = 115 \pm 2 \text{ \AA}$. Nach dem Kurvenausläufer S läßt sich eine um 15 \AA aus dem Molekül herausstehende kleine Domäne postulieren, die mit der Extrapolation E2 zu einer maximalen Moleküldimension von $r_{\text{max}2} = 130 \pm 5 \text{ \AA}$ führt.

Die vorläufige molekulare Modellierung der Lösungs-Streukurve nach der verbesserten FVM-Methode [Nawroth 1989; Würfelmodelle] ergab eine Interpretation der Position der Nebenmaxima durch Abstände von separaten Massen der Untereinheiten im Abstand $d = 2\pi / q$; die modellierte Struktur stimmte gut dem Experiment und mit den bekannten kristallographischen Daten überein. Das Modell wird gegenwärtig optimiert, besonders im Hinblick auf die aufgefundenen Strukturänderungen bei der kompletten ATP-Synthase mit dem Inhibitor Azid.

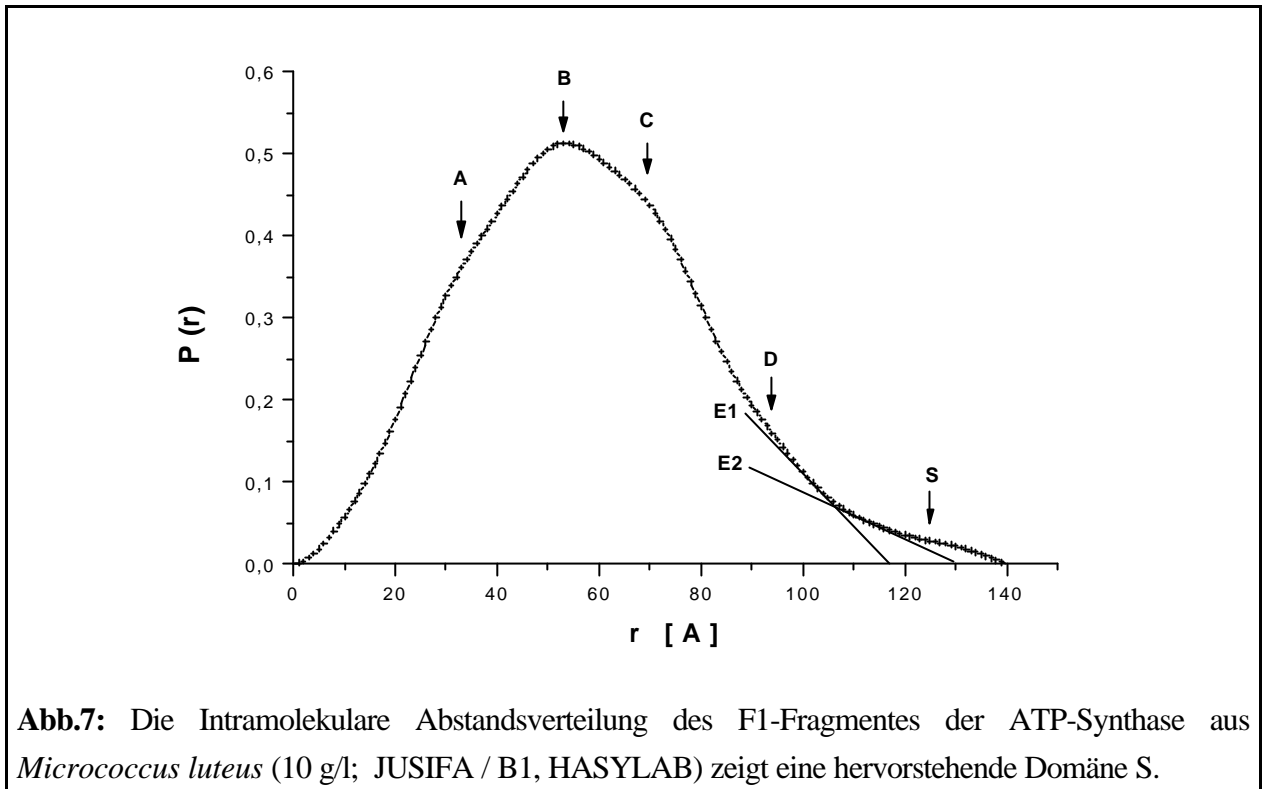


Abb.7: Die Intramolekulare Abstandsverteilung des F₁-Fragmentes der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (10 g/l; JUSIFA / B1, HASYLAB) zeigt eine hervorstechende Domäne S.

Azid ist ein bekannter Inhibitor der funktionellen Kooperativität bei ATP-Synthasen. In mäßiger Menge (1 mM) hemmt es auch bei ATP-Synthase und ihrem F₁-Fragment aus *Micrococcus luteus* die kooperative Katalyse am Multi-Domänen-Enzym (multisite catalysis). In großer Menge (> 10 mM) wird auch die restliche Aktivität einzelner Domänen (unisite catalysis; 0,1% der multisite-Katalyserate) unterdrückt. Es ist danach ein möglicher Schlüssel zur Aufklärung der funktionellen und energetischen Kopplung der ATP-Synthasen. Daneben ist es als Inhibitor und Effektor aber auch bei anderen Protonen-transportierenden Membranproteinen bekannt, z.B. bei Cytochrom-Oxidase und Bacteriorhodopsin.

Durch Inhibitor-abhängige Röntgenkleinwinkelstreuung am JUSIFA-Instrument, Hamburg, wurde die in Abb.8 gezeigte Abhängigkeit der Struktur von der Azid-Konzentration gefunden. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Guinier-Näherung der Streukurven zeigt, daß bei geringer Azid-Konzentration (< 0,1 mM; "I₅₀" der multisite Katalyse) zunächst eine nicht aufgelöste Kontraktion des Moleküls eintritt. Im für die Untersuchung der Unisite-Katalyse relevanten Bereich um $c = 1$ mM kommt es zu einer signifikanten Expansion der F₁ATPase. Bei 0,1 mM beträgt der Streumassenradius $R_g = 44,22 \pm 0,27$ Å, bei 1 mM Azid $R_g = 45,09 \pm 0,24$ Å. Im Bereich um 10 mM und darüber tritt eine teilweise irreversible Hemmung ein (unphysiologisch). Bei späteren Experimenten sollen noch Zwischenwerte ermittelt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zur Azid-Inhibition des katalytischen F₁-Fragmentes der ATP-Synthase zeigen einerseits eine bislang unbekannt Korrelation von Strukturänderungen und Inhibition des Enzyms. Andererseits öffnen sie einen Zugang zur Studie der energetischen und kooperativen Kopplung im Reaktionszyklus der Katalyse durch Vergleich der zeitaufgelösten Röntgenkleinwinkelstreuung in An- und Abwesenheit des Inhibitors Azid.

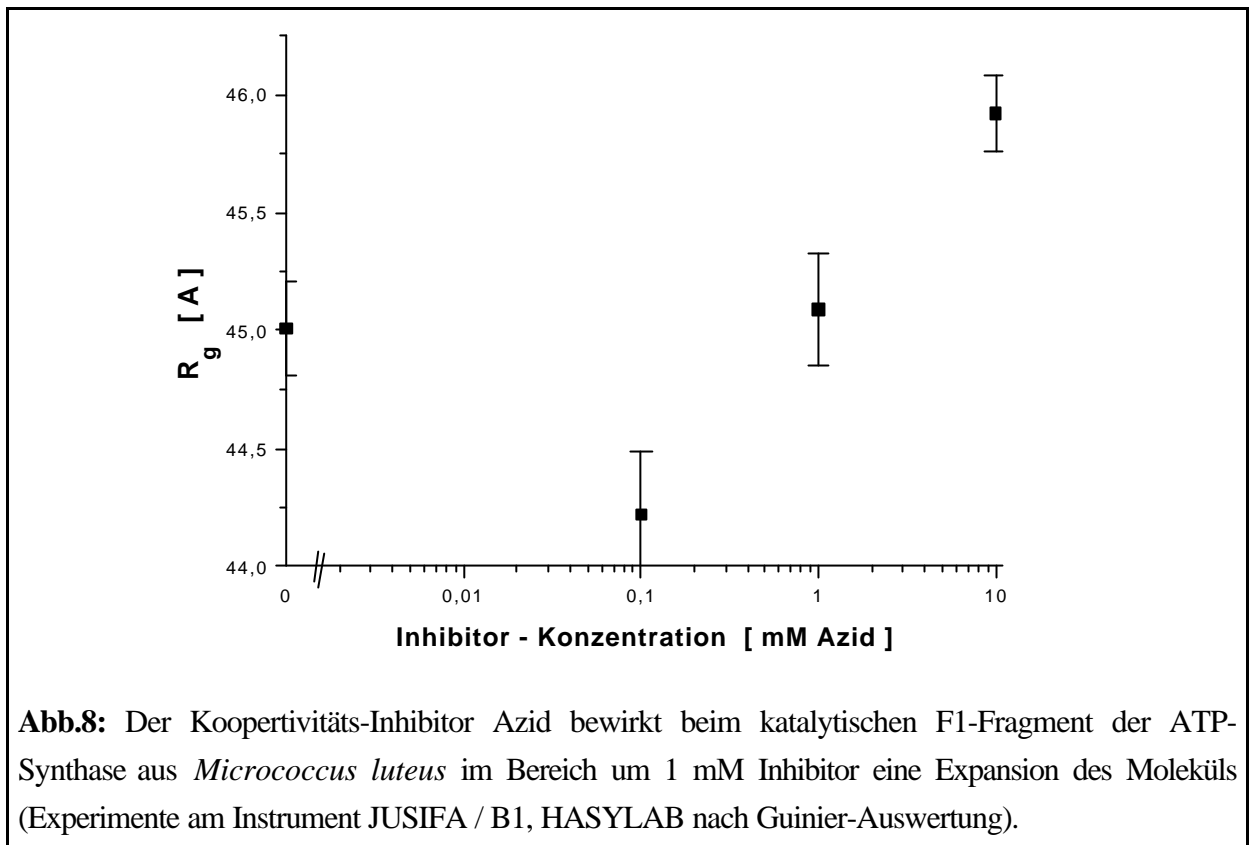
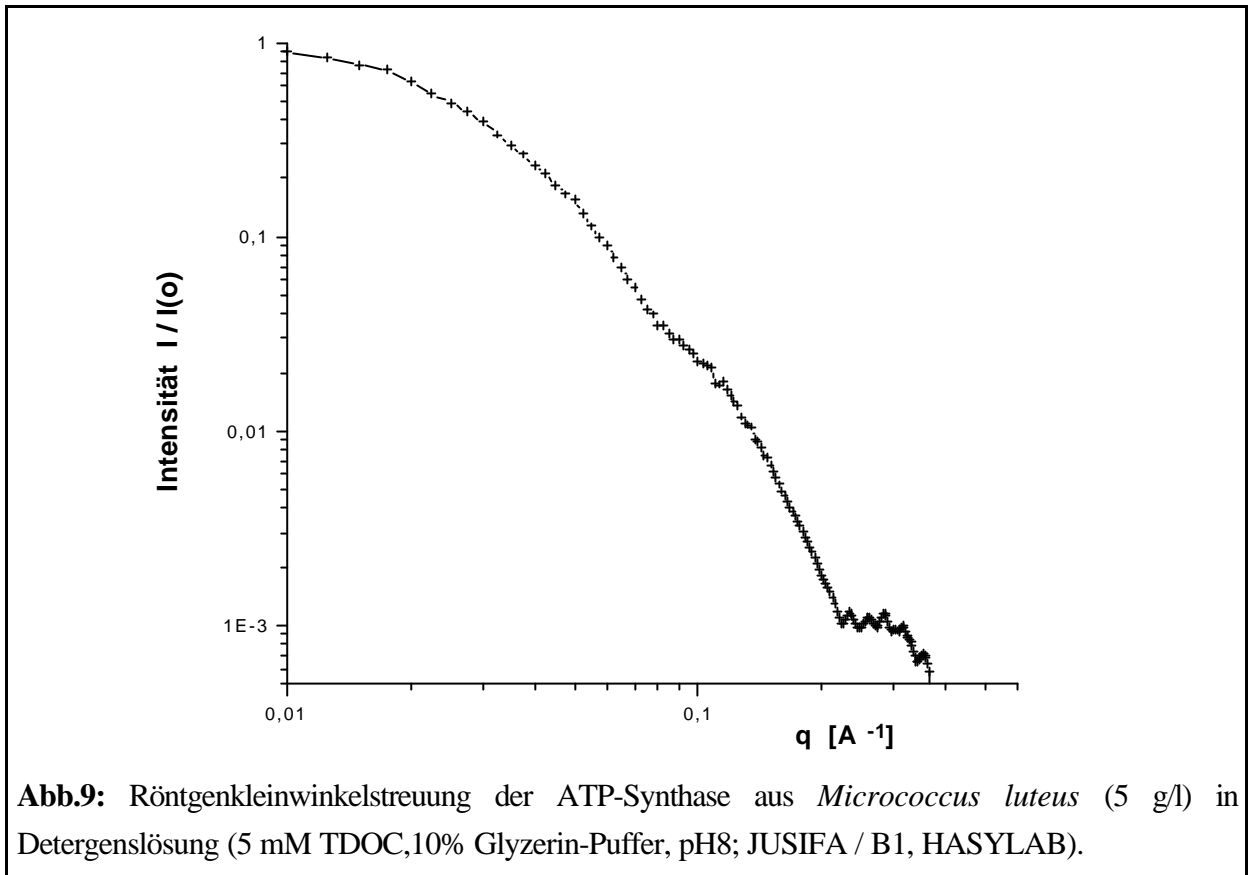


Abb.8: Der Koopertivitäts-Inhibitor Azid bewirkt beim katalytischen F1-Fragment der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* im Bereich um 1 mM Inhibitor eine Expansion des Moleküls (Experimente am Instrument JUSIFA / B1, HASYLAB nach Guinier-Auswertung).

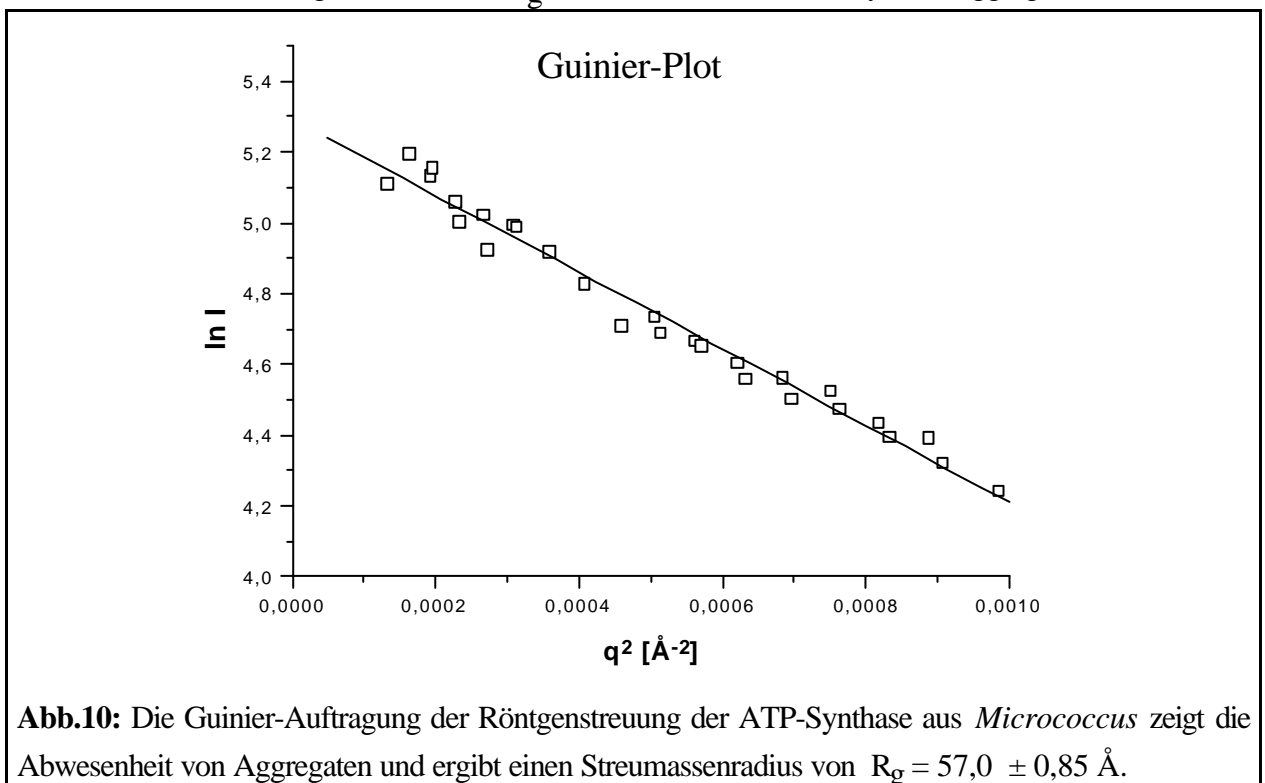
Statische Kleinwinkelstreuung der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus*

Die ATP-Synthase kann aus *Micrococcus luteus* durch Extraktion und Chromatographie in Gegenwart von Detergentien (sukzessive CHAPS, Triton, TDOC) in reiner, homodisperser Form (99%) gewonnen werden. Die Isolierung ist allerdings um eine Größenordnung aufwendiger wie die des F1-Fragmentes. Sie liefert nur 20 mg Enzym bei einem zeitlichen Aufwand von 4 - 6 Wochen aus 250 g Bakterien. Das Enzym ist für Streuversuche dennoch besonders interessant, da es sich durch eine bemerkenswerte Stabilität in Struktur, enzymatischer ATP-Hydrolyse und ATP-Synthese auszeichnet (nach Ko-Reconstitution mit monomerem Bacteriorhodopsin). Die Stabilität und Freiheit von Aggregaten zeichnet das Protein aus diesem Organismus vor dem in früheren Projekten untersuchten Enzym aus *Rhodospirillum rubrum* aus.

Die Strukturuntersuchung des Membranproteins gelingt in Abwesenheit von Lipiden in Gegenwart des Detergens Taurodesoxycholat (TDOC) ohne Störung des Streubildes. Der schwache Streubeitrag der Mizellen aus TDOC kann durch Subtraktion der Puffer-Referenzkurve vollständig eliminiert werden, da die Mizellen eine extrem geringe Masse aufweisen (Tetramer; $M = 2100$ g/Mol). Die Röntgenkleinwinkelstreuung der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in Gegenwart von 5 mM TDOC und 10% Glycerin (Scavenger und Protein-Stabilisator) nach Experimenten am JUSIFA-Instrument des HASYLAB, Hamburg ist in Abb.9 gezeigt (Meßzeit: 4 x 3 h incl. Puffer). Analoge Bilder von allerdings etwas höherem Fehler und vor allem im Kleinwinkelbereich beschränkter q -Skala ($q > 0.025$) wurden anfangs auch am Röfo-Instrument (A1) des HASYLAB erhalten.



Die Streukurve ist durch eine verwaschene Mehrfach-Schulter um $q = 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ charakterisiert - mit der durch den zusätzlichen Fo-Teil bedingten Verschmierung ist dies die Entsprechung zu den Nebenmaxima in der Streukurve des F1-Fragmentes aus dem gleichen Organismus (Abb.6). Der Streumassenradius beträgt nach Abb.10 $R_g = 57,0 \pm 0,85 \text{ \AA}$. Das Enzym ist Aggregat-frei.



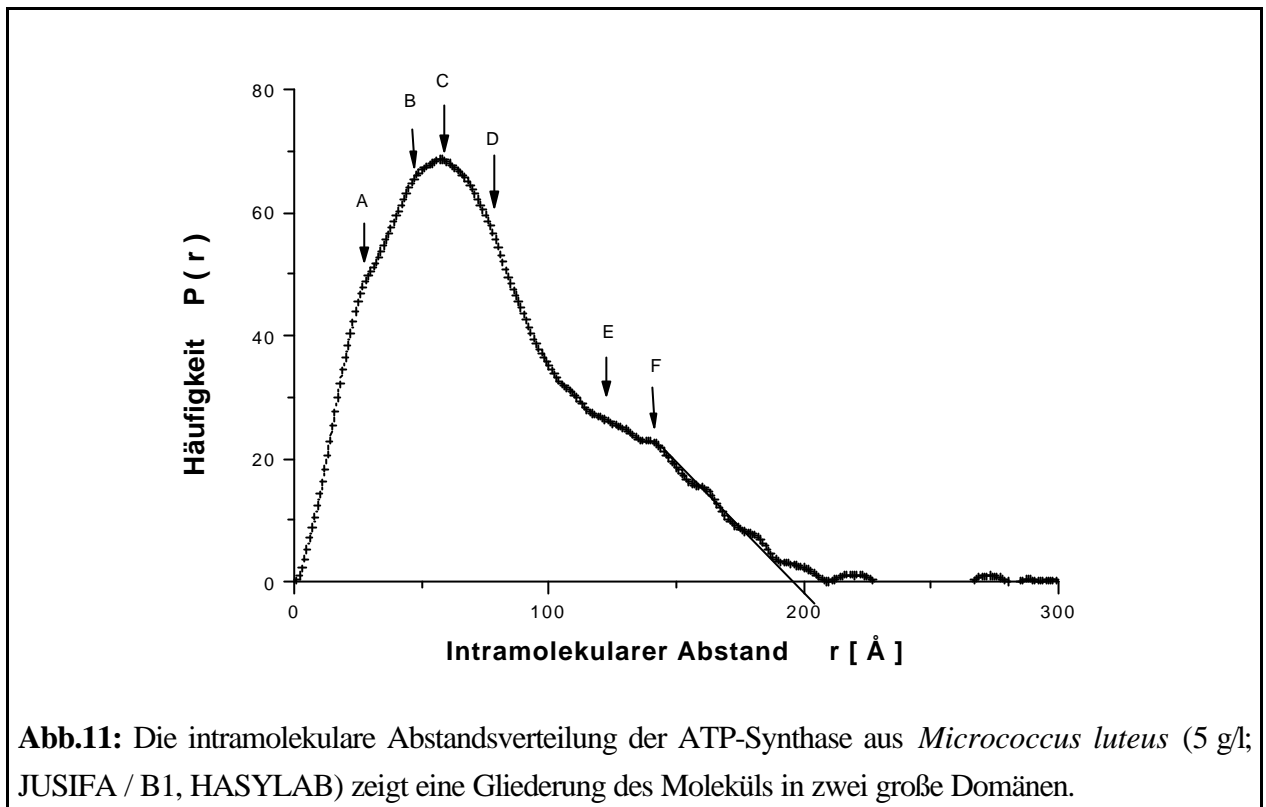


Abb.11: Die intramolekulare Abstandsverteilung der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* (5 g/l; JUSIFA / B1, HASYLAB) zeigt eine Gliederung des Moleküls in zwei große Domänen.

Die semi-direkte Fourier-Transformation der Streukurve ergab die in Abb.11 gezeigte intramolekulare Abstandsverteilung des Proteins mit den auffälligen Extrema (A - F), die eine ausgeprägte Strukturierung des Moleküls belegen (Hohlräume). Die Welligkeit oberhalb $r = 150$ Å beruht auf Meßfehlern. Die Abstandsverteilung zeigt eine Gliederung des Moleküls in zwei große Domänen an (stalk-Modell zwischen den Teilkomplexen F1 und F0). Die Extrapolation der Abstandsverteilung führte zu einer maximalen Moleküldimension von $r_{\max} = 190 \pm 5$ Å. Die molekulare Modellierung der Lösungs-Streukurve nach der verbesserten FVM-Methode [Nawroth 1989; Würfelmodelle] wird gegenwärtig durchgeführt, besonders im Hinblick auf die aufgefundenen Strukturänderungen bei der kompletten ATP-Synthase mit dem Inhibitor Azid.

Die strukturelle Wirkung des Kooperations-Inhibitors Azid auf die komplette ATP-Synthase ist in Abb.12 als Zusammenfassung der Ergebnisse der Guinier-Auswertung der Streukurven gezeigt. Danach bewirkt der Inhibitor hier über einen breiten Konzentrationsbereich eine Strukturänderung in Form einer Expansion des Proteins um $2,6$ Å (4,6%). In den Abstandsverteilungen verschwand dabei die Einsattelung E (Abb.11) unter leichter Vergrößerung der maximalen Moleküldimension um 10 Å. Der analoge Effekt zeigte sich bei der Neutronenstreuung des gleichen Enzyms in D_2O - und H_2O -Puffer, 5 mM TDOC, 10% Glycerin am KWS-2 Instrument am DIDO-Reaktor des Forschungszentrums Jülich. In Abwesenheit des Inhibitors ergab sich ein Streumassenradius von $R_g = 59,0 \pm 1,3$ Å (in H_2O). In Gegenwart von 1 mM Azid zeigte der Anstieg auf $R_g = 63,0 \pm 1,6$ Å eine Expansion des Moleküls an. Die Experimente müssen jedoch nach Komplementierung des Instrumentes mit einem verbesserten 2D-Detektor für große Impulsüberträge ($q > 0,08$ Å⁻¹) ergänzt werden. Hieraus und aus der begonnenen Kontrastvariation durch H/D-Austausch im Lösungsmittel

erhoffen wir uns genaueren Aufschluß über die Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Domänen (Membran-integraler Fo-Teil der ATP-Synthase) in Bezug auf die bei der Azid-Inhibition verschobene Substruktur.

Gegenwärtig wird die molekulare Modellierung zur Interpretation durchgeführt. Nach vorläufigen Abschätzungen spricht die aufgefundene Strukturänderung für eine Verschiebung einer Protein-Untereinheit entlang der Hauptachse (an der Oberfläche) der ATP-Synthase.

Die Breite des Effektbereiches läßt einen Erfolg bei der geplanten Untersuchung der Struktur- und Dynamik der ATP-Synthase im Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse in An- und Abwesenheit des Kooperationsinhibitors Azid durch zeitauflösende Röntgenkleinwinkelstreuung erwarten.

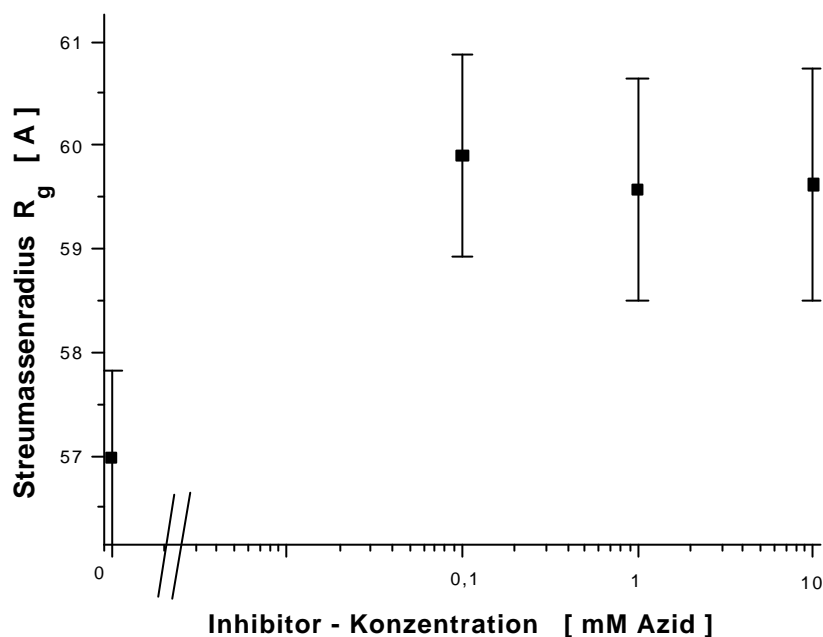


Abb.12: Der Koopertivitäts-Inhibitor Azid bewirkt bei der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* im Bereich um 1 mM Inhibitor eine Expansion des Moleküls um $2,6 \text{ \AA}$ (4,6%) (Experimente am Instrument JUSIFA / B1, HASYLAB nach Guinier-Auswertung).

Erste zeitauflösende Streuexperimente an ATP-Synthase und F1-Fragment

1997 konnten vorbereitende Experimente an Hochstrom-Synchrotrons zur Untersuchung der Struktur- und Dynamik der ATP-Synthase und ihres F1-Fragmentes in den Reaktionszyklen der enzymatischen ATP-Hydrolyse durchgeführt werden. Dazu wurden die Quellen ELETTRA, Triest (User-Inbetriebnahme 11/1996) und ESRF, Grenoble genutzt. Beide Instrumente verfügten über Undulatoren, gekühlte Doppel-Monochromatoren und Toroid-Spiegel zur Fokussierung der Strahlung auf die Probe, wodurch der für die weiteren Versuche erforderliche hohe Fluß ermöglicht wird. Bei voller Strahl-Öffnung beträgt die Intensität am SAXS Instrument, Triest, etwa das 10^4 -fache der Bestrahlungsstärke am JUSIFA-Instrument (Quelle: Biegemagnet ohne Spiegel), am ID2-Instrument der ESRF wird noch

eine ca. 5 mal höhere Leistung erzielt. Gegenwärtig handelt es sich um das weltweit flustärkste Instrument für Röntgenstreuung.

Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe Heumann, Martinsried (GroEL/ES-System) mit einer von uns konstruierten kompletten Probenumgebung (Probenbox) mit Heliumgekühlter Quarz-Durchflukapillare, Proben-Wärmetauscher und Mischzelle durchgeführt (in Optimierung begriffener Prototyp). Die Studien waren bei beiden Instrumenten die ersten Versuche mit Proteinlösungen überhaupt. Als merkbare Einschränkung in der Nutzung erwiesen sich in beiden Fällen die an den Instrumenten noch eingesetzten Gasedektoren mit beschränkter Zählrate (1D an ELETTRA; 2D an ESRF; CCD-Kameras sind hier gerade in Erprobung). Als Fazit läßt sich feststellen, daß eine Nutzung des vollen Flußes mit Gasedektoren unmöglich ist, die teuren CCD-Kameras sind unabdingbar, obwohl damit nur eine beschränkte Zeitauflösung erreicht wird (50 ms). Bei den Cytochromproteinen ist dagegen wegen der durch den kurzen Reaktionszyklus (1,8 ms) erforderlichen hohen Zeitauflösung (10 μ s) der Einsatz der Gasedektoren notwendig. Dabei müssen die Versuche hochgradig repetitiv geführt werden (10^3).

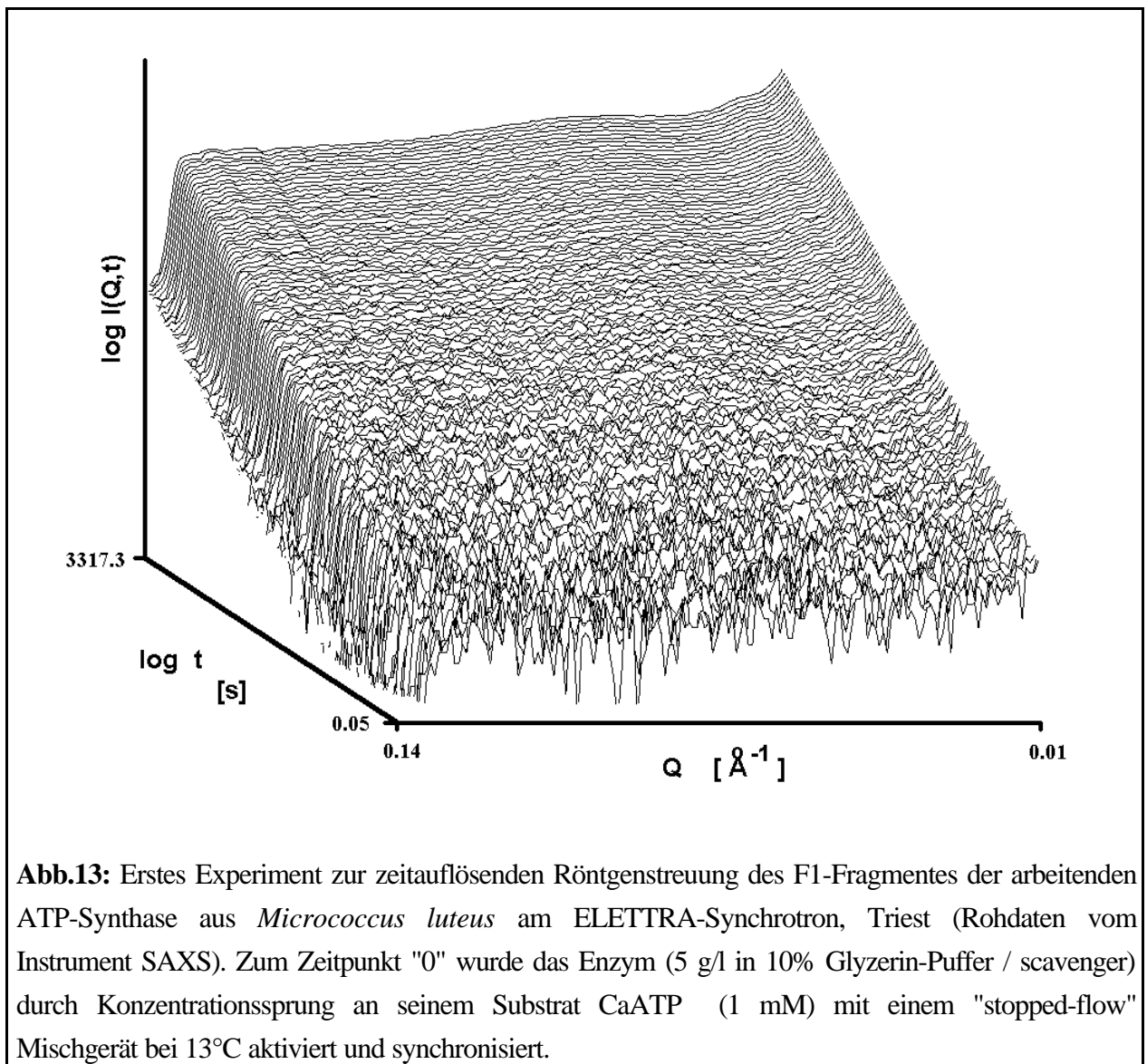


Abb.13: Erstes Experiment zur zeitauflösenden Röntgenstreuung des F1-Fragmentes der arbeitenden ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* am ELETTRA-Synchrotron, Triest (Rohdaten vom Instrument SAXS). Zum Zeitpunkt "0" wurde das Enzym (5 g/l in 10% Glyzerin-Puffer / scavenger) durch Konzentrationssprung an seinem Substrat CaATP (1 mM) mit einem "stopped-flow" Mischgerät bei 13°C aktiviert und synchronisiert.

In Abb.13 ist die zeitauflösende Kleinwinkelstreuung des arbeitenden F1-Fragmentes der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* in einem Experiment am neuen ELETTRA-Synchrotron, Triest, gezeigt. Die Aktivierung und Synchronisierung des Enzyms erfolgte durch schnelles Mischen (stopped flow). Zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit anhand der Ergebnisse der thermodynamischen Studie [14] durch Kühlung von 4 ms (37°C) auf 20 s (13°C) gedehnt. Die Zeitauflösung erfolgte logarithmisch geteilt mit einer Auflösung von 50 ms - 10 s, dadurch sind die ersten 50 Zeitscheiben (scheinbar) übermäßig verrauscht.

Die Auswertung der Experimente (%-Effekt !) wird leider noch einige Zeit erfordern, da hierzu wegen der großen Datenmenge und -Komplexität die Fertigstellung der Windows-Version unseres Auswerteprogrammes "KINEX 2" notwendig ist. Auch von Seiten der Instrumente-Betreiber werden hierfür Programme entwickelt (Datenmenge ca. 10 - 100 GB bei repetitiven Versuchen). Anhand der durchgeführten Testexperimente mit und ohne Zeitauflösung an ATP-Synthase, ihrem F1-Fragment und Gro-EL (Heumann) lässt sich jedoch trotz einiger Abstriche in Bezug auf das erreichbare Signal/Rausch-Verhältnis bzw. Fehler und im nutzbaren Fluß feststellen, dass an beiden Instrumenten Versuche zur zeitaufgelösten Röntgenkleinwinkelstreuung direkt sinnvoll möglich sind. Nach den durchgeführten Versuchen, den Instrumente-Tests und den Plänen der Betreiber ist absehbar, dass die teilweise noch bestehenden Anfangsschwierigkeiten der Instrumente an den beiden Hochstrom-Synchrotrons bis zum Jahresende behoben sein werden. Die Ergebnisse werden aufgrund der experimentellen Einschränkungen jedoch sinnvoll durch statische Experimente mit höherer Auflösung und Genauigkeit, wie sie am JUSIFA-Instrument in Hamburg gewonnen werden, komplettiert (Konzept: Nutzung komplementärer Instrumente). Meßzeit für weitere Experimente wurde noch für 1997 an allen drei Instrumenten (ID2/ESRF, SAXS/ELETTRA, JUSIFA/DESY-HASYLAB) bewilligt.

Referenzen

(die mit * gekennzeichneten Arbeiten sind durch Förderung dieses Vorhabens entstanden)

- 1) Saraste, M. (1990) Quart. rev. Biophys. 23, 331 (Review)
- 2) Trumpower, B.L.; Gennis, R.B. (1994) Annual Review of Biochemistry 63, 675-716 (Review)
- 3) Capaldi, R.A.; Aggeler, R.; Turina, P.; Wilkens, S. (1994) Trends Biochem.Sci. 19, 284-289 (Review)
- 3a) Capaldi, R.A.; Aggeler, R.; Wilkens, S.; Grüber, G. (1996) J. Bioenerg. Biomembr. 28, 397-402
- 3b) Cross, R.L. & Duncan, T.M. (1996) J. Bioenerg. Biomembr. 28, 403-408 (Review AS-Rotation)
- 4) Lanyi, K.K. (1995) Nature 375, 461-463
- 5a) Habilitandenförderung Dr. Nawroth 1995/96 FB Chemie/ "E.& P. Müller-Stiftung" (8.000 DM)
- 5b) Anschlußfinanzierung Dissertation G. Heinz 1996 aus Landesmitteln (2 Monate; 4.000 DM)
- 6) Heinz, G.; Dose, K.; Nawroth, T. (1994) FEMS Microbiol. Lett. 124, 173-178
- 7) Heinz, G. (1996) Dissertation, Mainz

- 8) Nawroth, T.; Zwicker, K.; Dose, K. (1992) *Fresenius Z.Anal.Chem.* 343, 174; "Bioluminescence analysis and numerical evaluation of ATP-synthesis by native and reconstituted membranes containing bacterial ATP-synthase"
- 9) Deisinger, B.; Nawroth, T.; Zwicker, K.; Matuschka, S.; John, G.; Zimmer, G.; Freisleben, H.-J. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218, 377-383 "Purification of ATP-synthase from beef heart mitochondria (F_0F_1) and co-reconstitution with monomeric bacteriorhodopsin into liposomes capable of light-driven ATP synthesis"
- 10) Grüber, G., Godovac-Zimmermann, J., Nawroth, T. (1994) *Biochim.Biophys.Acta.* 1186, 43-51 "ATP synthesis and hydrolysis of the ATP-synthase from *Micrococcus luteus* regulated by an inhibitor subunit and membrane energization"
- 11) Grüber, G.; Engelbrecht, S.; Junge, W.; Dose, K.; Nawroth, T. (1994) *FEBS Lett.* 356, 226-8 "Purification and characterization of the inhibitory subunit (δ) of the ATP-synthase from *Micrococcus luteus*"
- 12) Matuschka, S.; Zwicker, K.; Nawroth, T.; Zimmer, G. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 135-142 "ATP-synthase from beef heart mitochondria: Isolation and functional reconstitution"
- 13) Freisleben, H.-J.; Zwicker, K.; Jezek, P.; John, G.; Bettin-Bogutzki, A.; Ring, K.; Nawroth, T.; (1995) *Chem. Phys. Lipids* 78, 137-147 "Reconstitution of bacteriorhodopsin and ATP-synthase from *Micrococcus luteus* into liposomes of the purified main tetraetherlipid of *Thermoplasma acidophilum*: proton conductance and light-driven ATP synthesis"
- * 14) Nawroth, T. (1996) Habilitationsschrift "Struktur- und Funktionsdynamik von Protonen-transportierenden Membranproteinen"
- * 15) Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Rössle, M.; Heumann, H.; Goerigk, G.; Post, A.; Koch-Brandt, C.; Nawroth, T. (1996) *HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II*; 151-152 "Structural dynamics of the oxygen transporting metallo-protein Hemocyanin"
- * 16) Nawroth, T.; Lauer, I.; Neidhardt, A.; Zwicker, K.; Post, A.; Koch-Brandt, C.; Rössle, M.; Heumann, H.; Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G. (1996) *HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II*; 157-158 "Structure and dynamics of bacterial ATP-synthase and F_1 ATPase"
- * 17) Post, A.; Koch-Brandt, C.; Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G.; Nawroth, T. (1996) *HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II*; 161-162 "Evidence for a carbohydrate mediated molecular interaction of the glycoprotein Clusterin"
- * 18) Rössle, M.; Heumann, H.; Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G.; Post, A.; Koch-Brandt, C.; Nawroth, T. (1996) *HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II*; 169-170 "Structure of native chaperone GroEL in solution"
- 19) Neidhardt, A.; Nawroth, T.; Hütsch, M.; Dose, K. (1991) *FEBS Lett.* 280, 179-182
- * 20) Nawroth, T.; Eßwein, P.; Grüber, G.; Heinz, G.; Neidhardt, A.; Zwicker, K.; Dose, K.; Hütsch, M.; Stuhmann, H.-B.; Böse, M.; Link, T.A. (1995) *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Würzburg 24.-27.9.1995; Proceedings*, P. 33 "Structural features common in proton-translocating membrane proteins: Cytochrom oxidoreductases, ATP-synthases and monomeric bacteriorhodopsin"
- * 21) Nawroth, T.; Eßwein, P.; Grüber, G.; Heinz, G.; Neidhardt, A.; Dose, K.; Hütsch, M.; Stuhmann, H.-B.; Böse, M.; Link, T.A.; Zwicker, K. (1996) *Membranforum Frankfurt/M.* 28.-30.3.1996 und *Biol.Chem. Hoppe-Seyler* (in Druck) "Structural dynamics in proton-translocating membrane proteins: Cytochrome oxidoreductases, ATP-synthases, bacteriorhodopsin"
- * 22) Nawroth, T.; Eßwein, P.; Heinz, G.; Grüber, G.; Neidhardt, A.; Zwicker, K. (1996) *EBEC short reports* 9, "Dynamics and reaction cycle of bacterial ATP-synthase and energy-translocation proton pumps"
- 23) Oliveberg, M.; Brzezinski, P.; Malmström, B.G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 322-328

Bericht über die Durchführung des Vorhabens:**- Verlauf des Vorhabens im Vergleich zum Arbeits-, Zeit- und Finanzierungsplan:**

Die Durchführung des Vorhabens entsprach in etwa dem geplanten Ablauf. Ein stopped-flow Gerät für die zeitauflösenden Studien wurde zum Jahresende 1995 beschafft. Die Nutzung dieses und von weiteren Geräten erfolgt arbeitsteilig im Rahmen der neu gegründeten offenen Arbeitsgemeinschaft "Struktur-dynamik von Proteindomänen" als Untergruppierung des VB42, in Bezug auf zeitaufgelöste Streuexperimente vor allem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Heumann, MPI Martinsried.

- Personelle Veränderungen:

Das Vorhaben wurde bis September 1996 vor allem vom Projektleiter und Dr. A. Neidhardt mit Unterstützung einer technischen Angestellten und eines Chemie-Ingenieurs durchgeführt. Weiterhin waren im Anschluß an das frühere BMBF-Projekt 03-Na3-Mai Frau Dr. P. Eßwein und Herr Dr. G. Heinz zu Cytochromproteinen für das Projekt tätig (Finanzierung aus Landesmitteln), teils im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe Doster/ Petry, München/Garching. Als unerwartet schwierig erwies sich die Besetzung der Doktorandenstelle (Bat IIa/2). Erst zum 1.9.1996 konnte mit Frau Iris Lauer eine qualifizierte Bewerberin gefunden werden (Chemikerin), so daß mit den Arbeiten im vollen Umfang erst verzögert begonnen werden konnte. Zum Ausgleich und Aufholen der dadurch entstandenen Verzögerung im Ablauf des Projektes wurde zum 1.1.1997 befristet bis zum 31.8.1997 Herr Dr. Thomas Rimke als zeitweiliger "Postdoc" eingestellt (Bat2a/2).

- Änderung der Zielsetzung: in der globalen Zielsetzung keine, wegen der reduzierten Förderung mußte allerdings der Umfang der Experimente reduziert werden (Konsolidierung auf ein Minimalprogramm). Die Untersuchung der Objekte (Cytochrom-Oxidoreduktasen und ATP-Synthasen/ F_1 ATPase) muß wegen der beschränkten Mittel nacheinander (zeitlich gestaffelt) statt parallel erfolgen.

- Bereitstellung von Meßzeit:

Zur effektiven Durchführung der Experimente mit kleinen Projekten wurde 1996 eine Nutzergruppe gegründet, die offene Arbeitsgruppe "Struktur-dynamik von Proteindomänen" als Unterstruktur des VB42. Der erste Antrag an das HASYLAB liegt als Anlage bei, für 1997 wurde ein erneuter Antrag gestellt und bewilligt. Die Gruppe ist jedoch auch an anderen Großforschungsgeräten gemeinschaftlich aktiv. Im Zeitraum 9/1995 bis 5/1997 wurden folgende Meßzeiten genutzt:

#	Einrichtung	Instrument	Meßzeit	Objekte	Nutzer; Anteil (%)
1	FRJ-2, Jülich	KWS-2 (IFF/ MPI Polym, Mainz)	10 Tage	ATP-Synthase/ F_1 , Clusterin	offene Arbeitsgruppe: Nawroth 30%, Koch-Brandt 70%
2	DESY/HASYLAB, Hamburg	RöFo (A1) (Stuhrmann)	3 Wochen	ATP-Synthase, Cytochromoxidase, Clusterin	offene Arbeitsgruppe: Nawroth 80%, Koch-Brandt 20%
3	DESY/HASYLAB, Hamburg	JUSIFA (IFF der KFA; Haubold/ Goerigk)	7 Tage	ATP-Synthase, F_1 ATPase, Clusterin, Hemocyanin, GroEL Chaperonin	offene Arbeitsgruppe: Nawroth 25%, Koch-Brandt 25% Decker 25% Heumann 25%
4	ELETTRA, Triest (in Betrieb seit 10/96)	SAXS(österr., Laggner)	10 Tage	ATP-Synthase/ F_1 , GroEL Chaperonin	Nawroth 50%, Heumann 50%
5	ESRF, Grenoble	BL4 (ID2) (O. Diat)	4 Tage	ATP-Synthase/ F_1 , GroEL Chaperonin	Nawroth 50%, Heumann 50%
6	Vorbereitung in Mün- chen für ESRF	(TU München Garching)		Cytochrom- Oxidasen	Nawroth + Doster/ Petry (1 Woche)

Anmerkung: Die Experimente unter (3) bis (5) waren jeweils die ersten Messungen mit Proteinlösungen an diesen Instrumenten überhaupt, was durch Aufbau einer modularen Probenumgebung ermöglicht wurde. Die Instrumente wurden bislang ausschließlich für andere Problembereiche genutzt ((3): Metallproben; (4): Lipidschichten, Fasern; (5): Polymere, Gele). Damit konnten neue Instrumente für den Wissenschaftszweig der Erforschung der Strukturodynamik von Proteinen eröffnet werden.

- weitere Meßzeit für Neutronenstreuung am FRJ-2 Reaktor wurde für 1997 avisiert: 1 Woche (Nutzung in Kooperation: Nawroth; Koch-Brandt)
- Meßzeit für Neutronenstreuung am HFR-Reaktor des ILL wurde für 1997 vereinbart: 3 Tage Testbetrieb für **zeitauflösende Neutronenstreuung am Instrument D22** (Kooperation: R. P. May); außerdem folgen dazu im August 1997 zwei Anträge auf reguläre Meßzeit (Heumann und Nawroth).
- weitere Meßzeit 1997 mit Röntgenkleinwinkelstreuung am DESY/HASYLAB, Hamburg, wurde für die offene Arbeitsgruppe beantragt und bewilligt: 2 x 7 Tage am Instrument JUSIFA (Nutzung wie #3).
- weitere Meßzeit an der ESRF wurde 1997 zusammen mit H. Heumann beantragt und bewilligt: am Instrument BL4 (ID2) 1 Woche mit voraussichtlich 2 x 4 Shifts (ca. 3 Tage Strahlzeit)

- Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen:

Mit folgenden Arbeitsgruppen im VB42 besteht eine Kooperation mit:

- 1) PD Dr. W. Doster / Petry, TU München/Garching: zeitaufgelöste Untersuchung mit Laserblitz-Photolyse von Cytochrom-Proteinen.
- 2) PD Dr. H. Heumann, Martinsried: zeitaufgelöste Röntgenstreuung; stopped-flow Apparatur
- 3) Prof. Dr. C. Koch-Brandt, Universität Mainz: Neutronen- und Röntgenstreuung an Membranproteinen

Mit folgenden externen Arbeitsgruppen besteht eine Kooperation:

- 4) Prof. Dr. H. Decker, Inst. f. Biophysik, Universität Mainz: zeitaufgelöste Röntgenstreuung und Spektroskopie
- 5) Dr. T.A. Link/Prof. Dr. von Jagow/, Frankfurt/M.: mitochondriale Cytochromproteine
- 6) Eine weitere Kooperation besteht mit Prof. B. Ludwig, Biozentrum der Universität Frankfurt/M.: über Cytochrom-Oxidasen (z.B. aus *Paracoccus denitrificans*)

Die Kooperationen 1 - 4 wurden zu einer offenen Arbeitsgemeinschaft als Teilstruktur des VB42 intensiviert (s.u.). Dabei werden neben dem Austausch von Erfahrungen und Information Geräte gemeinschaftlich genutzt und gemeinsame Experimente an Großforschungseinrichtungen durchgeführt (s. Tabelle der Meßzeiten).

- Arbeiten im Dienste der Community:

Zur effektiven Durchführung der Experimente mit kleinen Projekten wurde die offene Arbeitsgruppe "Strukturodynamik von Proteindomänen" (Nutzergruppe) gegründet; der erste Antrag an das HASYLAB liegt als Anlage1 bei. Dieses Konzept einer verbesserten Ressourcen-Nutzung ist auch für andere Gruppen und die weitere Zukunft von Bedeutung. Insbesondere wurde die Arbeitsgemeinschaft für Gruppen, die nicht dem VB42 angehören offen gehalten, wenn auch gegenwärtig alle Teilnehmer dem VB42 angehören, oder für die Förderperiode 1998-2001 einen Förderantrag an das BMBF gestellt haben (H. Decker, Institut für Molekulare Biophysik, Universität Mainz).

-

-

Veröffentlichungen:

Ggf. gruppieren als

A. *Beiträge in Fachzeitschriften und -büchern*B. *Konferenzbeiträge, Fachvorträge*C. *Diplomarbeiten, Dissertationen, Habilitationen.***A. *Beiträge in Fachzeitschriften und -büchern:***

- A1) Nawroth, T.; Eßwein, P.; Heinz, G.; Grüber, G.; Neidhardt, A.; Zwicker, K. (1996) EBEC short reports 9, "Dynamics and reaction cycle of bacterial ATP-synthase and energy-translocation proton pumps"
- ** A2) Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Rössle, M.; Heumann, H.; Goerigk, G.; Post, A.; Koch-Brandt, C.; Nawroth, T. (1996) HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II; 151-152 "Structural dynamics of the oxygen transporting metallo-protein Hemocyanin"
- ** A3) Nawroth, T.; Lauer, I.; Neidhardt, A.; Zwicker, K.; Post, A.; Koch-Brandt, C.; Rössle, M.; Heumann, H.; Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G. (1996) HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II; 157-158 "Structure and dynamics of bacterial ATP-synthase and F₁ATPase"
- ** A4) Post, A.; Koch-Brandt, C.; Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G.; Nawroth, T. (1996) HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II; 161-162 "Evidence for a carbohydrate mediated molecular interaction of the glycoprotein Clusterin"
- ** A5) Rössle, M.; Heumann, H.; Lohkamp, B.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G.; Post, A.; Koch-Brandt, C.; Nawroth, T. (1996) HASYLAB Jahresbericht 1996, Band II; 169-170 "Structure of native chaperone GroEL in solution"

Anmerkung: die Beiträge A2 bis A5 (**) sind ein Resultat der Kooperation in der offenen Arbeitsgemeinschaft "Strukturodynamik von Proteindomänen" und als Anlage2 beigelegt.

B. *Konferenzbeiträge, Fachvorträge : 12*

- Deutsche Neutronenstreuung und BMBF-Verbundtreffen, Reinstorf 18-20.9.1995 1
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, 24.-27.9.1995 Würzburg: 1
- DESY/HASYLAB Jahrestreffen, Hamburg 28.1.1996 (Extra-Poster, nicht im Berichtsband) 1
- Membranforum, Frankfurt/M., 28.-30.3.1996 1
- Europäische Bioenergetik Konferenz EBEC, Louvain la neuve, 17.-22.8.1996 1
- ELETTRA Synchrotron, Triest, 8.1.1997 1
- DESY/HASYLAB Jahrestreffen, Hamburg 28.1.1997 4
- Jahrestreffen des BMBF-Verbundprojektes VB42, München, 23.-24.2.1997 2

C. *Diplomarbeiten, Dissertationen, Habilitationen : 4 (1 + 3)*

- 1 Dissertation begonnen: Iris Lauer (seit 9/1996; Strukturodynamik der ATP-Synthase)
- 2 Promotionen beendet (Arbeiten zu Cytochromproteinen im Vorprojekt begonnen) : Dr. P. Eßwein; Dr. G. Heinz
- 1 Habilitation (Arbeiten im Vorprojekt begonnen) : PD. Dr. T. Nawroth
 - Habil.-Schrift: "Strukturodynamik und Funktion Protonen-transportierender Membranproteine"
 - Abschluß des Habilitationsverfahrens: 11.6.1996
 - Antrittsvorlesung: 12.7.1996 (Priv. Doz.)

Zusammenfassung.

An Membranproteinen des Energiehaushaltes von Zellen, der biologischen Oxidation, wurde die Beziehung zwischen der räumlichen Struktur und der Funktion bzw. Regulation untersucht. Die Untersuchungen wurden an den besonders stabilen Atmungsketten-Proteinen aus dem Bacterium *Micrococcus luteus* durchgeführt. Die terminale Oxidase QOX und die Cytochrom-c Oxidase COX sind wie die ATP-Synthase, bzw. ihr katalytisches Fragment F₁ ATPase, Protonenpumpen.

Zur effizienten Nutzung der gerade bei kleineren Projekten beschränkten Ressourcen wurde die Arbeitsgemeinschaft "Strukturdynamik von Proteindomänen" gebildet (Nutzergruppe für Strahlzeit und Geräte). Daran sind gegenwärtig vier Teilprojekte des VB42 und eine externe Gruppe beteiligt (Nawroth, Heumann, Koch-Brandt, Doster/ Petry, Decker). Dieses 1996 und 1997 erfolgreich erprobte Modell ist von weitreichender Bedeutung, z.B. für andere BMBF-Projekte. Insbesondere erlaubt es die Einbindung von Gruppen mit Förderung durch die DFG.

Die Cytochrom-Oxidase COX wurde im Rahmen einer solchen Kooperation innerhalb des VB42 (Doster/ Petry) mit zeitauflösender optischer Absorptionsspektroskopie nach Aktivierung durch Laserblitzphotolyse des Kohlenmonoxid-inhibierten Enzyms untersucht. Die gefundenen 4 Subprozesse sind die Basis für die geplanten zeitaufgelösten Röntgenuntersuchungen der Strukturdynamik der Cytochrom-Oxidase im Reaktionszyklus an der ESRF im Mikrosekundenbereich.

Streuexperimente, zum großen Teil im Rahmen der offenen Arbeitsgruppe, wurden an den Großforschungseinrichtungen FRJ-2, Jülich; DESY/ HASYLAB, Hamburg; ESRF, Grenoble; und ELETTRA, Triest, an ATP-Synthase, F₁ ATPase und Cytochrom-Oxidase durchgeführt. Die dabei gefundenen Strukturänderungen im Rahmen der Inhibition und Regulation der Enzyme sind die Grundlage für die 1997 begonnenen Versuche zur zeitauflösenden Röntgenstreuung.