

Strukturdynamik Protonen-transportierender Membranproteine: Cytochromproteine und ATP-Synthasen

Zuwendungsempfänger: Uni Mainz
 Förderkennzeichen: 03-Na4-Mai-1
 Förderzeitraum: 1.9.1995 - 31.03.1998

Projektträger: FZJ/BEO/PFR

Bewilligungsvolumen: 166.700,00 DM

Genutzte Großgeräte :

FRJ2, Jülich (N)
 ILL, Grenoble (N)
 DESY/HASYLAB, Hamburg (S)
 ESRF, Grenoble (S)
 Elettra, Triest (S)

Dokumentation/Publikation:

Veröffentlichungen: 9 + 3 in Vorbereitung
 Konferenzbeiträge: 24
 Diplomarbeiten: -
 Dissertationen: 2 + 1 begonnen (2/3)
 Habilitationen: 1

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 F₁-Fragment, Protonenpumpen. Die ATP-Synthase und F₁ATPase gehören gleichzeitig zur Gruppe der molekularen Motoren.

Zur effizienten Nutzung der beschränkten Ressourcen wurde die Arbeitsgemeinschaft "Strukturdynamik von Proteindomänen" gebildet. Das seit 1996 erfolgreich erprobte Modell wird über das BMBF-Projekt hinaus weitergeführt. Bislang waren sechs Gruppen beteiligt (Nawroth, Heumann, Koch-Brandt, Doster/ Petry, Decker, Grüber/Altendorf).

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 sollen als Basis für spätere zeitaufgelöste Röntgenuntersuchungen der Strukturdynamik der Cytochrom-Oxidase im Reaktionszyklus an der ESRF dienen.

Streuexperimente, meist im Rahmen der offenen Arbeitsgemeinschaft, wurden an ATP-Synthase, F₁ATPase, Cytochrom-Oxidase und an Liposomen als Zellmembranmodelle durchgeführt.

Die bei den statischen Versuchen in Hamburg gefundenen Strukturänderungen im Rahmen der Inhibition und Regulation der Enzyme sind die Grundlage für die zeitauflösenden Versuche. Die zeitauflösende Neutronenstreuung erlaubt zukünftig die Studie der Regulation durch Protonen.

Die Experimente zur zeitauflösenden Röntgenstreuung waren ein voller Erfolg. Nach der zeitraubenden Entwicklung von Experimentiereinrichtungen gelang die Lösung der Probleme der Strahlauflösung der Proben, der Strahlenschädigung und der verlangsamten Reaktionsführung synchronisierter Proteinproben. Das Ergebnis, ein struktureller Film des arbeitenden Proteins, zeigte bislang unbekannte kurzzeitige Ausdehnungsänderungen der Proteine. Nach der Modellierung besteht eine Hierarchie der molekularen Bewegungen der ATP-Synthasen.

Strukturdynamik Protonen-transportierender Membranproteine: Cytochromproteine und ATP-Synthasen

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

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

Im Forschungsvorhaben 03-Na4-Mai wurden bakterielle ATP-Synthase, ihr katalytisches Fragment F₁ATPase und Cytochromproteine aus Membranen der biologischen Energiekonservierung (Atmungskette) [1-4] isoliert und statische sowie zeitauflösende Untersuchungen mit Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung vorgenommen. Bei Cytochrom-Oxidase wurden Subprozesse der Reaktionszyklen durch zeitaufgelöste optische Spektroskopie untersucht. Bei ATP-Synthase und ihrem katalytischen F₁-Fragment erfolgte die Studie der Strukturdynamik während der Funktion sowie bei der molekularen Regulation. Dabei wurden die Ziele zum Nachweis von weiträumigen Strukturänderungen der Proteine voll erreicht: sowohl bei der Regulation bzw. deren Inhibierung als auch innerhalb Reaktionszyklus selbst wurden die im Antrag prognostizierten Dynamik-Effekte mit Synchrotronstrahlung aufgefunden (Experimente an den Synchrotrons DESY, Hamburg; ESRF, Grenoble; und ELETTRA, Triest; und am FRJ-2 Reaktor Jülich). Daneben gelangen erste Experimente zur zeitauflösenden Neutronenstreuung von Liposomen zur der Studie der Wirkung des Protonenpotentials auf Membranen und Proteine am ILL, Grenoble.

Zur effizienten Nutzung der beschränkten Ressourcen wurde die offene Arbeitsgemeinschaft "Strukturdynamik von Proteindomänen" gegründet (Nutzergruppe für Strahlzeit und Geräte; zeitweilige Personalgemeinschaft für Experimente an Großforschungseinrichtungen). Daran waren vier Teilprojekte des VB42 und zwei externe Gruppen beteiligt (Nawroth, Heumann, Koch-Brandt, Doster/Petry, Decker, Grüber/Altendorf). Dieses 1996 etablierte Modell ist von weitreichender Bedeutung. Es wird auch nach Ausgrenzung zentraler Gruppen aus dem VB42 fortgeführt, in Zukunft vor allem durch Gruppen mit Förderung durch die DFG und EU.

Biotechnologische Bereitstellung der Untersuchungsobjekte

Die Studie der Struktur und Dynamik von flexiblen Multidomänenproteinen erfordert Untersuchungsobjekte in strukturell und in Bezug auf die Bio-Katalyse einheitlicher Form sowie in erheblicher Menge, wenn Erscheinungen der molekularen Regulation [5] untersucht werden sollen. Wegen der drastisch beschränkten Forschungsmittel wurde ab 1997 die Untersuchung der Cytochromproteine unterbrochen und die Aktivität auf die ATP-Synthase und ihr F₁-Fragment konzentriert. Beide Objekte wurden unter zusätzlicher Förderung mit Landesmitteln [6] aus *Micrococcus luteus* im halbtechnischen Verfahren isoliert. Unter Einsatz von je 1/4 kg Zellmasse wurden die bis zu fünfstufigen Reinigungsverfahren [7-14] jetzt mit präparativen HPLC- und FPLC-Säulen bis 5 cm Durchmesser im biotechnologischen Maßstab durchgeführt (bis zu 50 g Rohprotein). Die erhöhten Mengen an Untersuchungsmaterial mit verschärften Anforderungen an Reinheit und kinetische Homogenität werden für die durchgeführten Forschungsarbeiten zur Strukturdynamik mit zeitlicher Auflösung benötigt (bis zu 100 mg Protein/ Experiment-Serie).

- **Gründung und Weiterführung der offenen Arbeitsgemeinschaft**
"Strukturdynamik von Proteindomänen"

Protonen-transportierende Membranproteine sind Multidomänenproteine, die sich durch strukturelle und energetische Kopplung mehrerer Domänen im Reaktionszyklus auszeichnen. Bei diesen Makromolekülen handelt es sich um Proteine universeller Bedeutung, die in Membranen praktisch aller Zellen vorkommen. Sie zeigen einen Aufbau aus interagierenden flexiblen Strukturdomänen, der jedoch auch bei anderen Multidomänenproteinen vorkommt (Motorproteine, GroEL, Hemocyanin). Aufgrund dieser übergeordneten strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen den Objekten mehrerer Teilprojekte und den hieraus resultierenden gemeinsamen Untersuchungsmethoden wurde 1996 die offene Arbeitsgemeinschaft "Strukturdynamik von Proteindomänen", zunächst als Unterstruktur des VB42 initiiert. 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 an den Synchrotrons ESRF, Grenoble, und ELETTRA, Triest; sowie zeitaufgelöste Neutronenstreuexperimente am D22-Instrument des ILL, Grenoble, durchgeführt. Am DESY, Hamburg, wurden dazu hochgenaue Referenzmessungen mit dem Instrument JUSIFA am Strahl B1 des HASYLAB vorgenommen. Der Zusammenschluß ermöglicht die effiziente Nutzung der Ressourcen trotz beschränkter Mittel auch für kleinere Arbeitsgruppen.

Die Gruppe wird wegen des erfolgreichen Konzeptes weitergeführt, in Zukunft wegen der Ausgrenzung zentraler Gruppen aus dem VB42 (Protein-Forschung) jedoch vorrangig durch Gruppen außerhalb der BMBF-Struktur, z.B. durch Gruppen mit DFG- und EU-Förderung. 1996 bis 1998 wurden in diesem Rahmen Kooperationen mit den Gruppen **Heumann** [21,22], **Koch-Brandt** [20], **Doster/ Petry** [Jahresbericht 1995/96], **Decker** [15,16] und **Grüber/Altendorf** etabliert und vertieft. Wegen des Interesses zur Zusammenarbeit seitens weiterer europäischer Gruppen wird die Arbeitsgemeinschaft ab 1999 länderübergreifend umstrukturiert.

Die Fortführung der Arbeitsgemeinschaft erscheint insbesondere für die Zukunft von Bedeutung, da die verbliebene BMBF-Restförderung mit Zentrierung auf Membranen ohnehin bald endet. Erfolgversprechend und im Fokus der Wissenschaft (s. ESRF- und HASYLAB-Usermeetings 1997; Konferenz "Highlights in Synchrotron Radiation" 11/1997) ist hier die Untersuchung der Strukturdynamik flexibler Multidomänenproteine - das zentrale Thema der Arbeitsgemeinschaft.

Untersuchungen an Cytochrom-Oxidase

Die Untersuchungen zur Struktur- und Dynamik 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 [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 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 Dynamik 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 mit charakteristischen spektralen Veränderungen gezeigt werden [7].

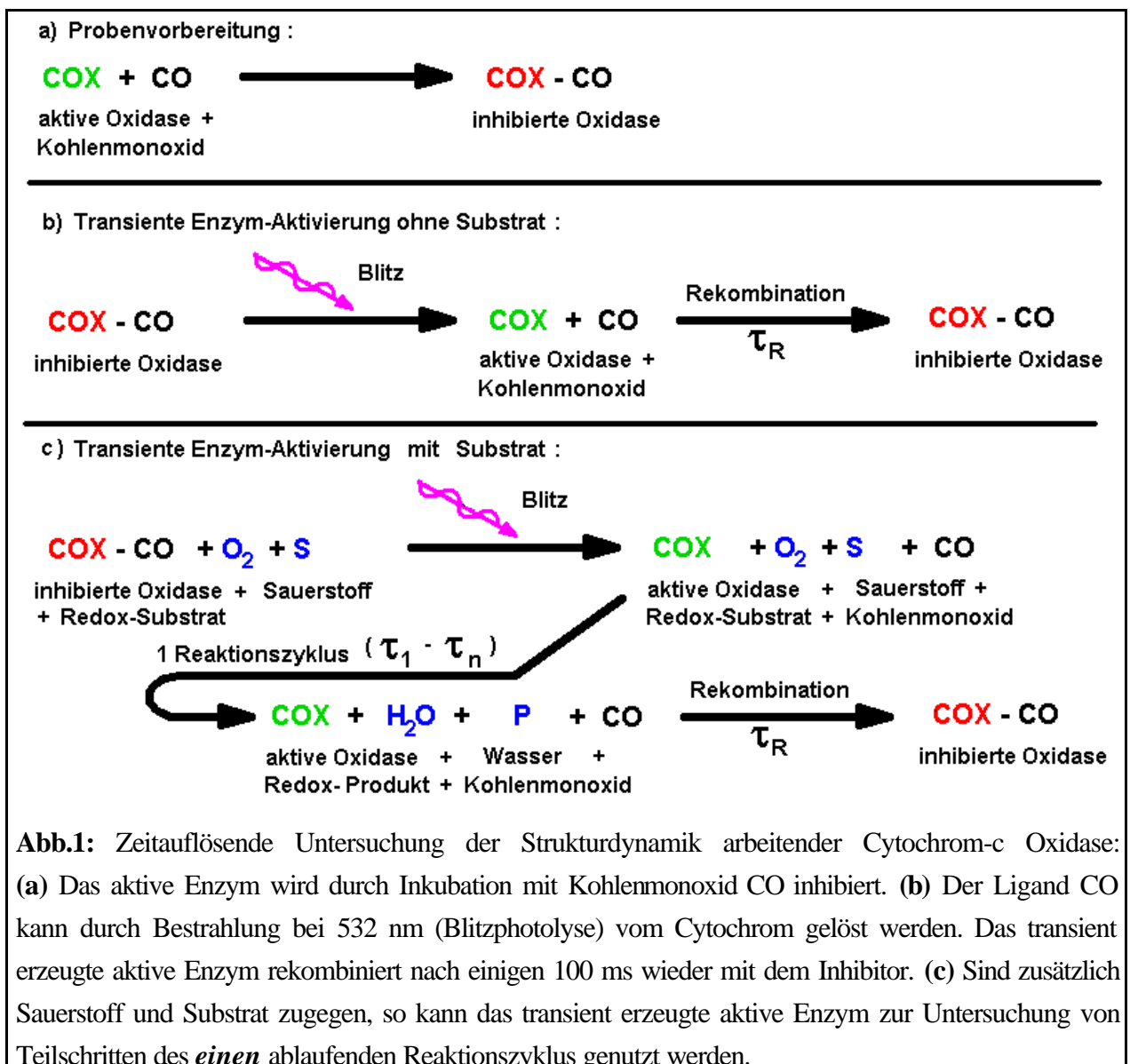


Abb.1: Zeitauflösende Untersuchung der Struktur- und Dynamik arbeitender Cytochrom-c Oxidase: (a) Das aktive Enzym wird durch Inkubation mit Kohlenmonoxid CO inhibiert. (b) Der Ligand CO kann durch Bestrahlung bei 532 nm (Blitzphotolyse) vom Cytochrom gelöst werden. Das transient erzeugte aktive Enzym rekombiniert nach einigen 100 ms wieder mit dem Inhibitor. (c) Sind zusätzlich Sauerstoff und Substrat zugegen, so kann das transient erzeugte aktive Enzym zur Untersuchung von Teilschritten des einigen ablaufenden Reaktionszyklus genutzt werden.

Daraus ergibt sich nach Abb.1b die Möglichkeit durch Bestrahlung im Bereich von 500 - 600 nm den CO-Liganden kurzzeitig vom Häm-Protein abzuspalten und dabei am transient und synchron aktivierten Protein strukturelle und funktionelle Untersuchungen durchzuführen. Die folgende Rekombination mit dem Inhibitor kann zur Studie der Ligandenbindung genutzt werden. Bei einem Enzym kann dieser Versuch nach Abb.1c erweitert werden: In Anwesenheit der Substrate, z.B. von Sauerstoff und Cytochrom-c, läuft am transient aktivierten Enzym ein isolierter, synchroner Reaktionszyklus der Redoxkatalyse ab. Solche Experimente sind mit zeitaufgelöster optischer Spektroskopie (Absorption, FT-IR und Raman) an mitochondrialer Cytochrom-c Oxidase bekannt [1-3,23]. Mit Streumethoden liegen aber noch keine Untersuchungen vor.

Die Untersuchung der Strukturodynamik im Reaktionszyklus der Cytochrom-c Oxidase aus *Micrococcus luteus* erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. W. Doster, München/ Garching (VB42). Wie in Bericht 1995-97 ausführlich dargestellt, wurde dabei Kohlenmonoxid-inhibierte Cytochrom-c Oxidase (COX-CO) durch Laserblitzbestrahlung transient in aktives Enzym überführt und durch zeitaufgelöste optische Spektroskopie untersucht. Dabei wurde die Reaktion in Abwesenheit von Substraten nach Abb1.b, als auch in deren Anwesenheit nach Abb1.c charakterisiert. Leider zeigte sich, daß die Reaktion für Synchrotron-Streuexperimente mit einer CCD-Kamera, wie sie mit ATP-Synthase erfolgreich war (s.u.), zu schnell ist. Daher kann eine zeitaufgelöste Röntgenuntersuchung erst ab 1999 realisiert werden (Gasdetektor-Entwicklung an der ESRF). Die Experimente mußten deshalb auf die zeitauflösende optische Spektroskopie beschränkt werden. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

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}]	$3,4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^5$	$9,09 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^1$

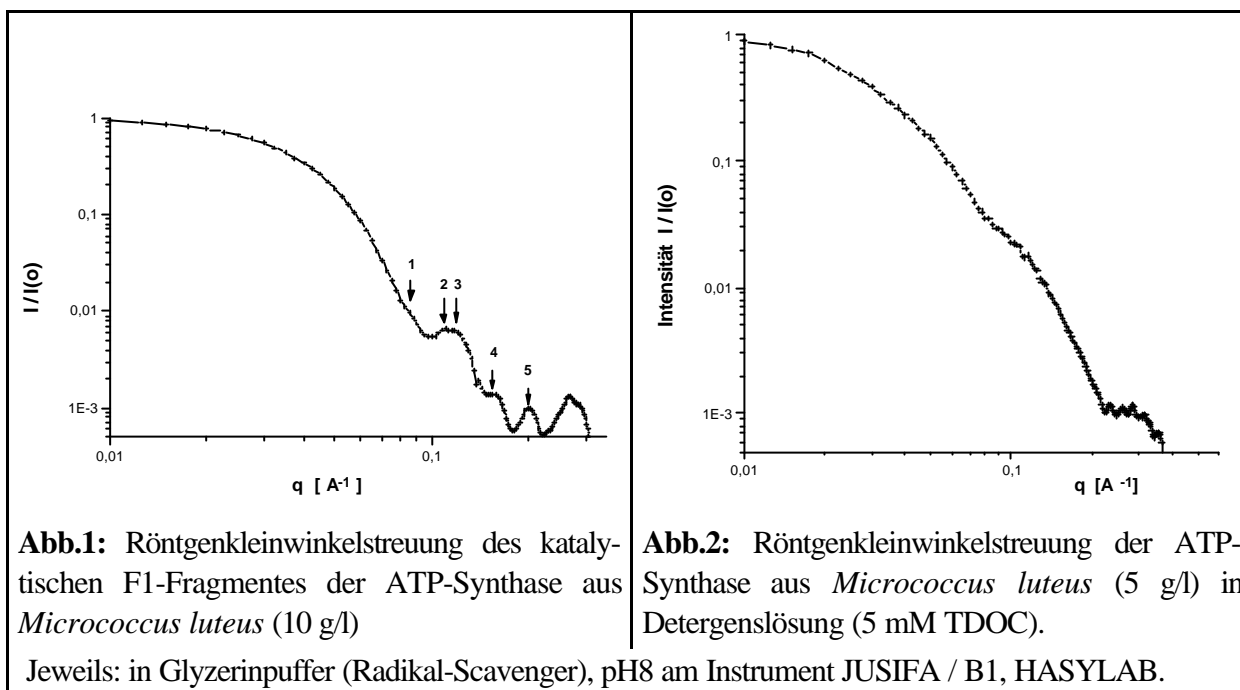
Unmittelbar erkennbar war die Beschleunigung der Rekombination mit dem Inhibitor CO unter aeroben Bedingungen um den Faktor 40 im Vergleich zu anaerober Versuchsführung ($\tau_R = 3 \cdot 10^{-2}$ s bei 25°C). Dies weist auf eine Strukturänderung des Enzyms durch Änderung des Redoxpotentials hin [26,27]. Vermutlich handelt es sich um einen Prozess der molekularen Regulation.

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. Weiterhin konnten in Kontrollexperimenten mit mitochondrialer Cytochrom-c Oxidase mit unserem Kooperationspartner Dr. T.A. Link, Frankfurt/M. die aus der Literatur [23] bekannten kinetischen Parameter dieses Enzyms reproduziert werden [7,14].

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 Größen-

ordnungen schneller. Vermutlich ist der zugeordnete raschere Übergang vom O- in den F-Zustand des binucleären Eisen-Kupferzentrums eine Konsequenz der unterschiedlichen Untereinheitenstöchiometrie. Bislang ist unbekannt, ob und zu welchem Zeitpunkt die im optischen Spektrum nachweisbaren elektronischen Übergänge mit Strukturumwandlungen verbunden sind.

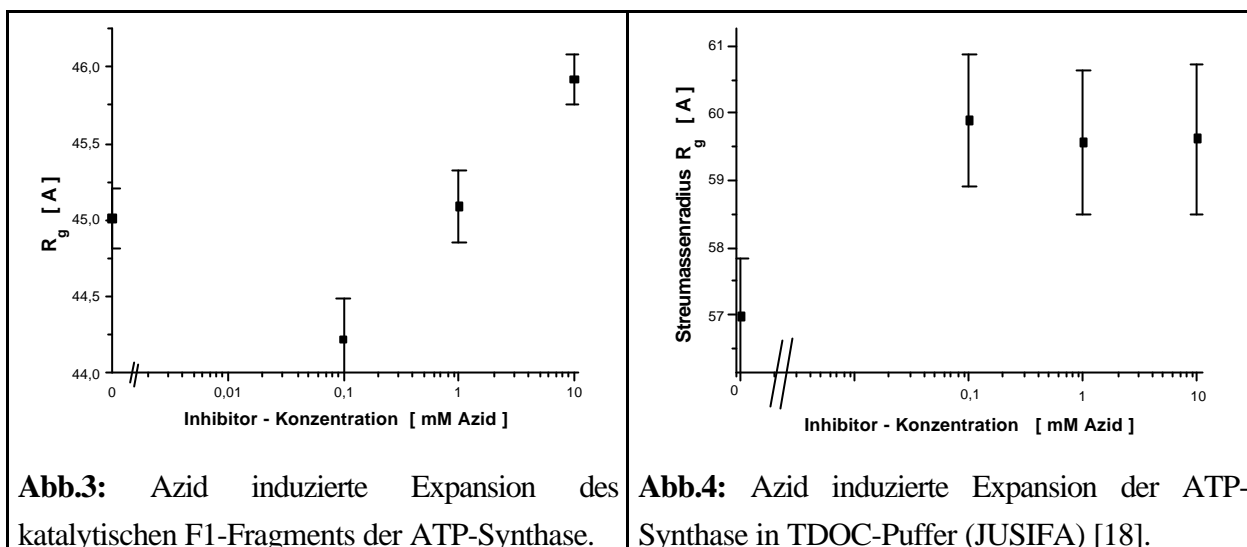
Statische Kleinwinkelstreuung der ATP-Synthase und ihres F1-Fragmentes



Die statische Kleinwinkelstreuung des F1-Fragmentes der ATP-Synthase (F1) aus *Micrococcus luteus* und der vollständigen ATP-Synthase (AS) wurde am Instrument JUSIFA am Strahl B1 des DESY/ HASYLAB mit hoher Genauigkeit ermittelt (Abb.1 und 2). Beide Enzyme eignen sich als Objekte für die zeitaufgelöste Strukturuntersuchung im Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse, da sie nun in großer Menge (50-100 mg/Batch), Reinheit (>99%) und in kinetisch einheitlicher Form gewonnen werden. Nach unseren enzymatischen Studien können die arbeitenden Enzyme durch Konzentrationssprung an seinem Substrat (ATP) aktiviert und synchronisiert werden. Beide Streukurven sind bis zu einem Fehler von $5 \cdot 10^{-4} I(0)$ aufgelöst. Das Profil des F1-Fragmentes zeigt eine Reihe von Nebenmaxima, während das der größeren ATP-Synthase durch eine breite Mehrfach-Schulter dominiert wird (Details: s. Bericht 1995-Frühjahr 1997; [18]).

Der hohe Gehalt der Proben an Glycerin, einem effektiven Radikalfänger (scavenger), ist für die folgenden Experimente mit zeitauflösender Röntgenstreuung essentiell, da die Proben an den Instrumenten in Triest (ELETTRA; Wiggler) und Grenoble (ESRF; Undulator) mit bis zu 10^{16} Photonen belastet wurden (1 mm² Fläche, E = 8 - 12 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. [4]). Die Auswertung der Streukurve nach Guinier ergab Streumassenradien von $R_g = 45,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$ (F1) und $R_g = 57,0 \pm 0,85 \text{ \AA}$ (AS).

Struktureller Schalter bei der Azid-Hemmung der Kooperativität



ATP-Synthase und F1-Fragment besitzen drei kooperativ aktive katalytische Zentren. In Gegenwart niedriger Substrat-Konzentrationen (ATP) ist nur ein Zentrum aktiv (unisite-catalysis). Dieser Bereich ist der Strukturformung am arbeitendem Enzym jedoch nicht zugänglich.

Azid ist ein Inhibitor der funktionellen Kooperativität bei ATP-Synthasen. In mäßiger Menge (1-10 mM) hemmt es die kooperative Katalyse am Multi-Domänen-Enzym (multisite catalysis). In großer Menge (> 10 mM) wird auch die restliche Aktivität einzelner Domänen (unisite catalysis; <1% der multisite-Katalyserate) unterdrückt. Es ist danach ein möglicher Schlüssel zur Aufklärung der funktionellen, energetischen und strukturellen Kopplung der ATP-Synthasen.

Durch strukturelle Inhibitor-Titration und Röntgenkleinwinkelstreuung am JUSIFA-Instrument, Hamburg, wurde die in Abb.3 und 4 gezeigte Abhängigkeit der Struktur von der Azid-Konzentration gefunden. Die Guinier-Analyse der Streukurven zeigt, daß bei geringer Azid-Konzentration (< 0,1 mM; "I₅₀" der multisite Katalyse) zunächst eine nicht aufgelöste Kontraktion des Moleküls eintritt. Im Bereich der Unisite-Katalyse kommt es zu einer signifikanten Expansion: Beim F₁-Fragment im Bereich um $c = 1$ mM; bei vollständiger ATP-Synthase tritt zwischen 0,1 und 10 mM ein Plateau auf (switch). Bei 1 mM Azid ist der Streumassenradius der F₁ATPase mit $R_g = 45,09 \pm 0,24$ Å um $0,8$ Å signifikant erhöht. Bei der ATP-Synthase erfolgt eine Expansion um $\Delta R_g = 2,6$ Å (4,6%).

Die erhaltenen Ergebnisse zur Azid-Inhibition zeigen eine bislang unbekannt Korrelation von Strukturänderungen und Inhibition der Enzyme. Besonders aber 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. Derartige Experimente wurden ab 1998 durch zeitaufauflösende Röntgenkleinwinkelstreuung am ELETTRA Synchrotron, Triest, im Anschluß an dieses Projekt durchgeführt.

Experimente zur zeitauflösenden Neutronenstreuung an Liposomen

1997 konnten Experimente zur Struktur- und Dynamik der ATP-Synthase bei der Regulation durch das Protonenpotential von Lipidmembranen durchgeführt werden (Teilziel: B-3 bzw. Arbeitsprogramm B3 des Antrages). Dazu wurden erstmalig zeitauflösende Streuversuche mit einem von uns konstruierten "stopped-flow" Mischgerät am Instrument D22 des Hochflußreaktors des ILL Grenoble durchgeführt. Hier konnte die für zeitaufgelöste Röntgenstreuversuche an ESRF und ELETTRA entwickelte Technologie (s.u.) für die Neutronenstreuung genutzt werden, die Probenzelle (Quarz; Hellma) und das Steuerprogramm für die Füllrate mußte angepasst werden.

Problematik: ATP-Synthase und Cytochromproteine unterliegen nach enzymatischen Daten einer molekularen Regulation durch die elektrochemische Protonenpotentialdifferenz der Membranen. Die in biologischen Funktionsversuchen verwandten heterogenen Proteoliposomen sind jedoch für Experimente der strukturellen Biologie (Neutronenstreuung etc.) untauglich. In früheren Experimenten konnten wir jedoch zeigen, daß Membranproteine in situ mit Neutronenstreuung untersucht werden können, wenn sie in geringer Menge in kleine einschalige Liposomen SUV rekonstituiert werden. Diese homogenen Proteoliposomen dürfen nur jeweils ein Proteinmolekül enthalten. Der Lipidanteil kann durch Kontrastvariation des Lösungsmittels maskiert werden [22]. Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie an Indikator-Farbstoff gefüllten Liposomen zeigte, daß nach einem pH-Sprung im Medium eine genügend hohe pH-Differenz ($>0,6 \Delta\text{pH}$, Energetisierung) bei solchen Liposomen nur für etwa 10 s besteht [14]. Ein Vergleich der Flußdichten von Instrumenten zur Neutronenstreuung zeigt, daß am Instrument D22 des ILL die Chance besteht, die Struktur der ATP-Synthase in An- und Abwesenheit des regulativen Protonenpotentials ($>0,6 \Delta\text{pH}$) durch zeitauflösende Neutronenstreuung von Proteoliposomen nach einem pH-Sprung zu vergleichen. Am D22 sollten dazu 100 s (10-20 stopped-flow "Schuß") unter Einsatz von 30 mg Protein genügen - eine erfolgversprechende Perspektive.

Die Versuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Heumann und dem ILL (R.P. May, analoge Problematik beim GroEL) nach Vorversuchen am FRJ-2 Reaktor, Jülich, durchgeführt. 1997 wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Experimentserie 9/1997 (2 Tage): Aufbau und Etablierung der zeitauflösenden Technologie. Dazu wurde die Instrumentierung des D22 um einen speziellen "Time-Frame-Controller", der mit unserem Experimentrechner interagiert, ergänzt; Erfolgreiche Mischversuche mit Liposomen und Gro-EL am Instrument, jedoch bestanden Probleme mit der Datenaquisition.
- Experimentserie 11/1997 (2 Tage): Aufbau einer funktionsfähigen Datenaquisition (verbesserungsfähig) und erfolgreiche zeitauflösende Streuversuche mit GroEL und Liposomen in D_2O nach einem pH-Sprung (100,000 counts/s bei $d = 8 \text{ m}$ und nur 1 mm Schichtdicke).

Die Experimente wurden ab 1998 außerhalb des BMBF-VB42 fortgesetzt (zwei erfolgreiche Proposals; erste Ergebnisse in [35]). Experimente zur ΔpH -Regulation der ATP-Synthase sind ab 1999 geplant.

Zeitauflösende Streuexperimente an ATP-Synthase und F1-Fragment

Seit 1997 konnten 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 und ESRF, Grenoble genutzt. Beide Instrumente verfügen über Undulatoren bzw. Wiggler, 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 20.000-fache der Bestrahlungsstärke am JUSIFA-Instrument (Quelle: Biegemagnet ohne Spiegel), am ID2-Instrument der ESRF wird noch eine ca. 5 mal höhere Leistung erzielt (10^{13} ph/s bei 12 keV).

Wie in Abb.5 gezeigt ist, wird bei dieser Art von Experiment die Probe z.B. durch einen Konzentrationsprung des Substrates synchronisiert. Danach verhält sich die Probe für eine beschränkte Zeit wie ein einzelnes Molekül, das die Zustände (1) bis (6) durchläuft. In diesem

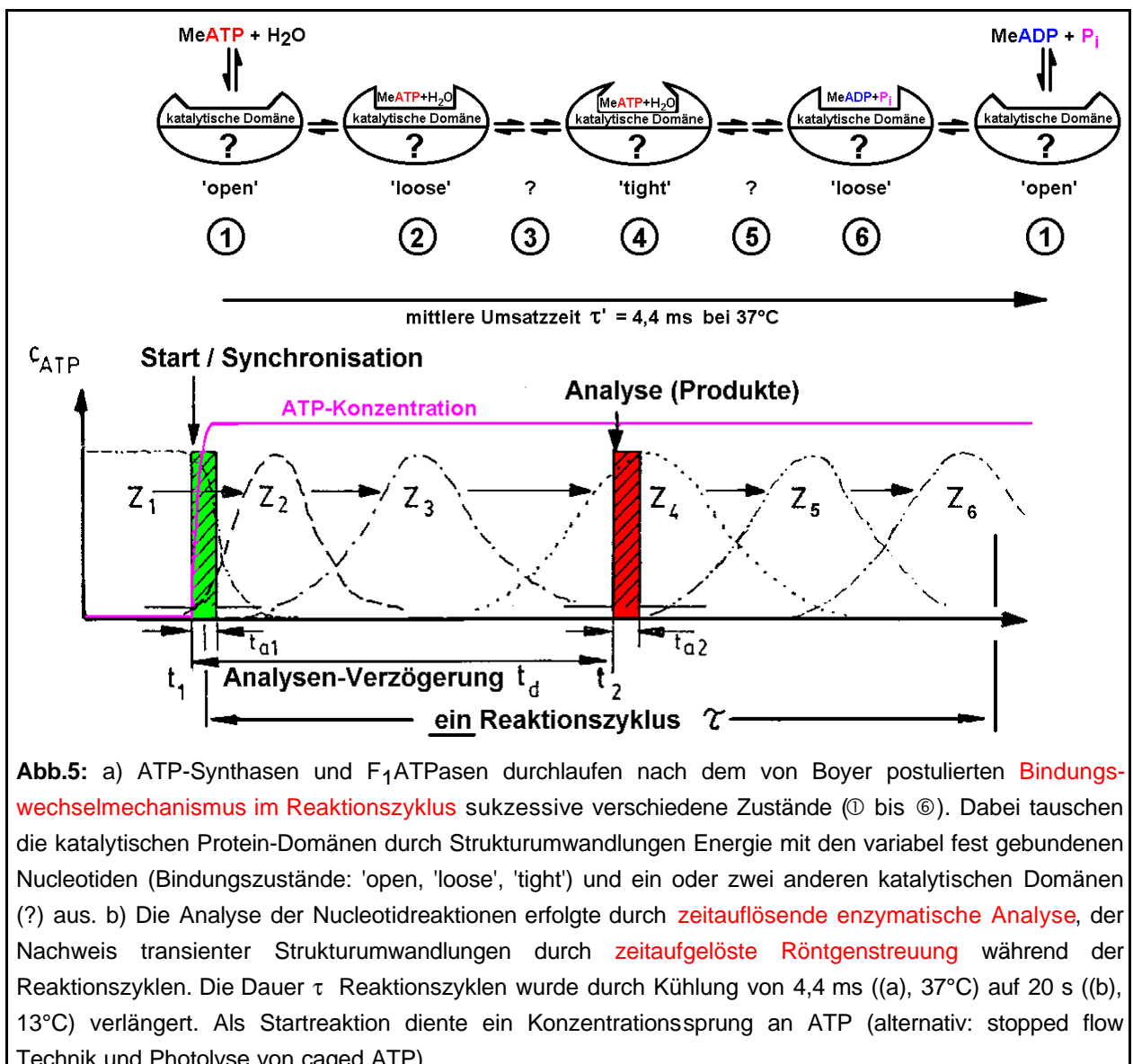


Abb.5: a) ATP-Synthasen und F₁ATPasen durchlaufen nach dem von Boyer postulierten Bindungswechselmechanismus im Reaktionszyklus sukzessive verschiedene Zustände (① bis ⑥). Dabei tauschen die katalytischen Protein-Domänen durch Strukturumwandlungen Energie mit den variabel fest gebundenen Nucleotiden (Bindungszustände: 'open', 'loose', 'tight') und ein oder zwei anderen katalytischen Domänen (?) aus. b) Die Analyse der Nucleotidreaktionen erfolgte durch zeitauflösende enzymatische Analyse, der Nachweis transientser Strukturumwandlungen durch zeitaufgelöste Röntgenstreuung während der Reaktionszyklen. Die Dauer τ Reaktionszyklen wurde durch Kühlung von 4,4 ms ((a), 37°C) auf 20 s ((b), 13°C) verlängert. Als Startreaktion diente ein Konzentrationsprung an ATP (alternativ: stopped flow Technik und Photolyse von caged ATP).

Zeitraum können transiente Strukturen durch zeitaufgelöste Kleinwinkelstreuung nachgewiesen werden (Zustandsdichte Z_0 bis Z_n). Die Synchronisierbarkeit bei ATP-Synthase durch ATP-Sprung wurde bereits in den Voruntersuchungen nachgewiesen [19,14]. Die Streuversuche wurden auf die "stopped flow" Technik beschränkt (caged-ATP Versuche verschoben).

Bei derartigen Studien bestehen folgende Probleme, die 1997/98 sämtlich gelöst wurden:

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

Zur Verlangsamung der enzymatischen Reaktion wurden die Lösungen anhand der Ergebnisse der thermokinetischen Studie von F_1 ATPase und ATP-Synthase durch moderate Kühlung von 4 ms auf 5- 20 s Dauer des Reaktionszyklus eingestellt (s. Abb.6). Dies gelingt wegen der hohen Aktivierungsenergie der enzymatischen Reaktion bei diesen Enzymen (207 und 100 kJ/Mol), erfordert jedoch eine genaue Temperatursteuerung des Streuexperimentes ($\pm 0,2^\circ$). Als Alternative und Ergänzung wurde die Hemmung des Enzyms durch D_2O aufgefunden (Abb.7). Nachteilig war dabei allerdings der hohe Einsatz an D_2O , besonders zur Ermittlung der kinetischen Parameter (komplette Reaktionsführung und Analytik in D_2O). Wichtigstes Ergebnis ist die Aktivierungsenergie der Enzymreaktion in D_2O von $72,1 \pm 2$ kJ/Mol. Danach kann die Reaktion durch Führung in D_2O nochmals etwa um den Faktor 2,5 verlangsamt oder bei 5 Grad höherer Temperatur durchgeführt werden, d.h. näher an den natürlichen Bedingungen.

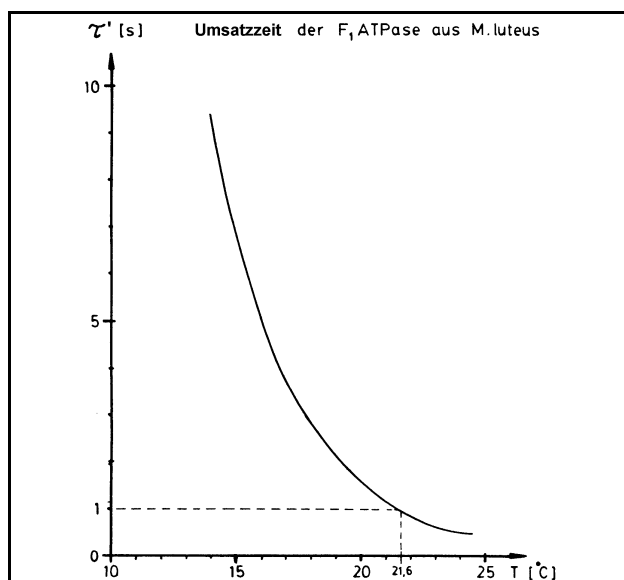


Abb.6: Abhängigkeit der Zyklusdauer des F_1 -Fragmentes der ATP-Synthase von der Temperatur (vollständige ATP-Synthase analog, jedoch $\tau = 20$ s bei 20°C).

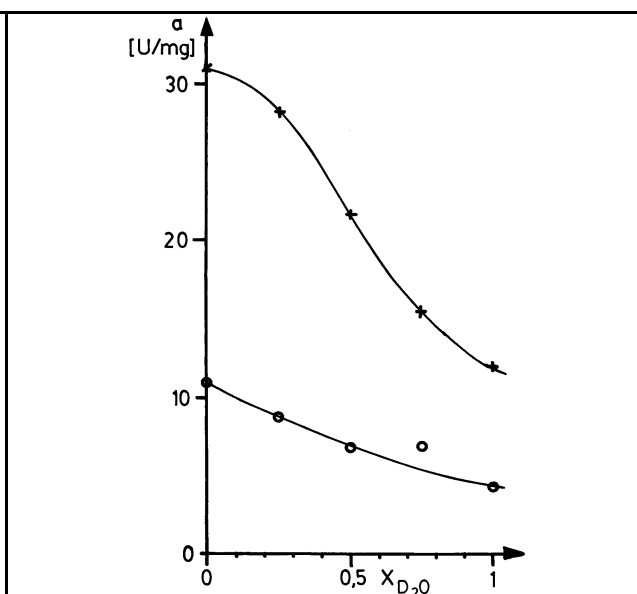


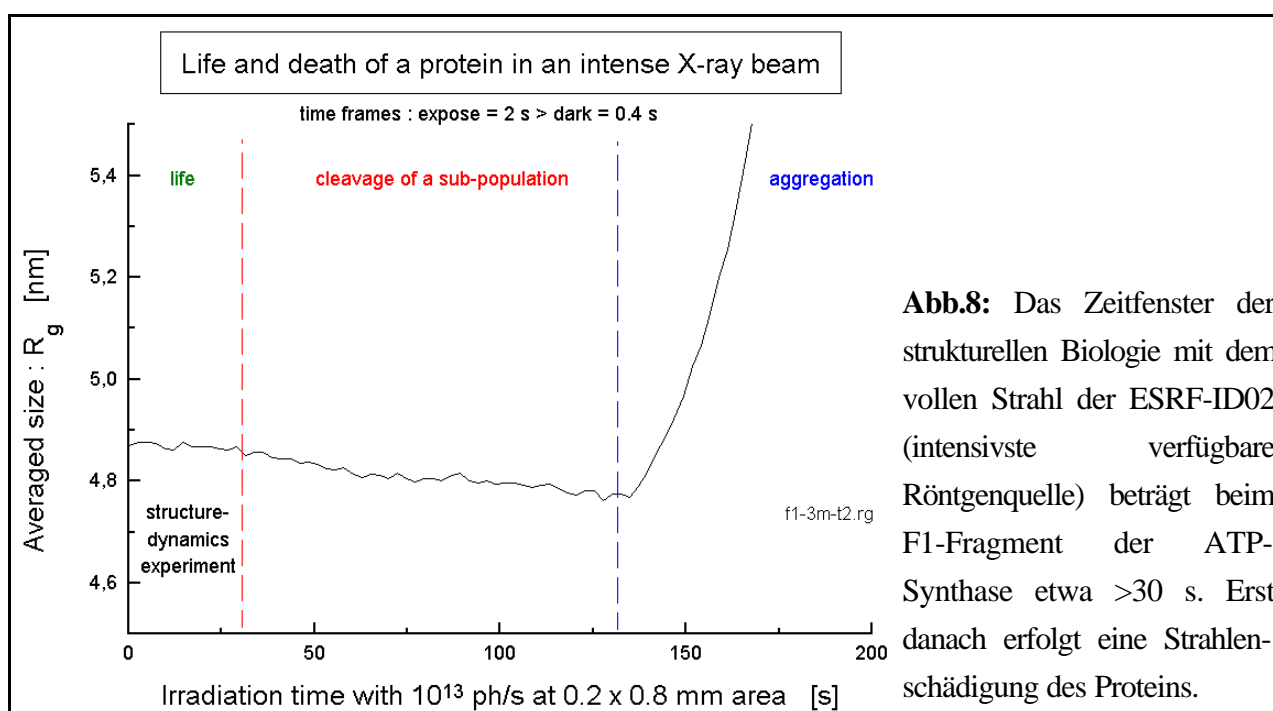
Abb.7: Die D_2O -Hemmung des vollständigen (o) und Inhibitor-freien (+) F_1 -Fragmentes der ATP-Synthase kann zur Verlangsamung des enzymatischen Reaktionszyklus genutzt werden.

Die zeitaufösenden Röntgen-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe Heumann, Martinsried durchgeführt. Die Studien waren bei beiden Instrumenten die ersten Versuche mit Proteinlösungen überhaupt. Weiterhin bestanden keinerlei Berichte in der Literatur zu Experimenten mit Lösungen in diesem Flußbereich (10^{12} - 10^{14} ph/s·mm²).

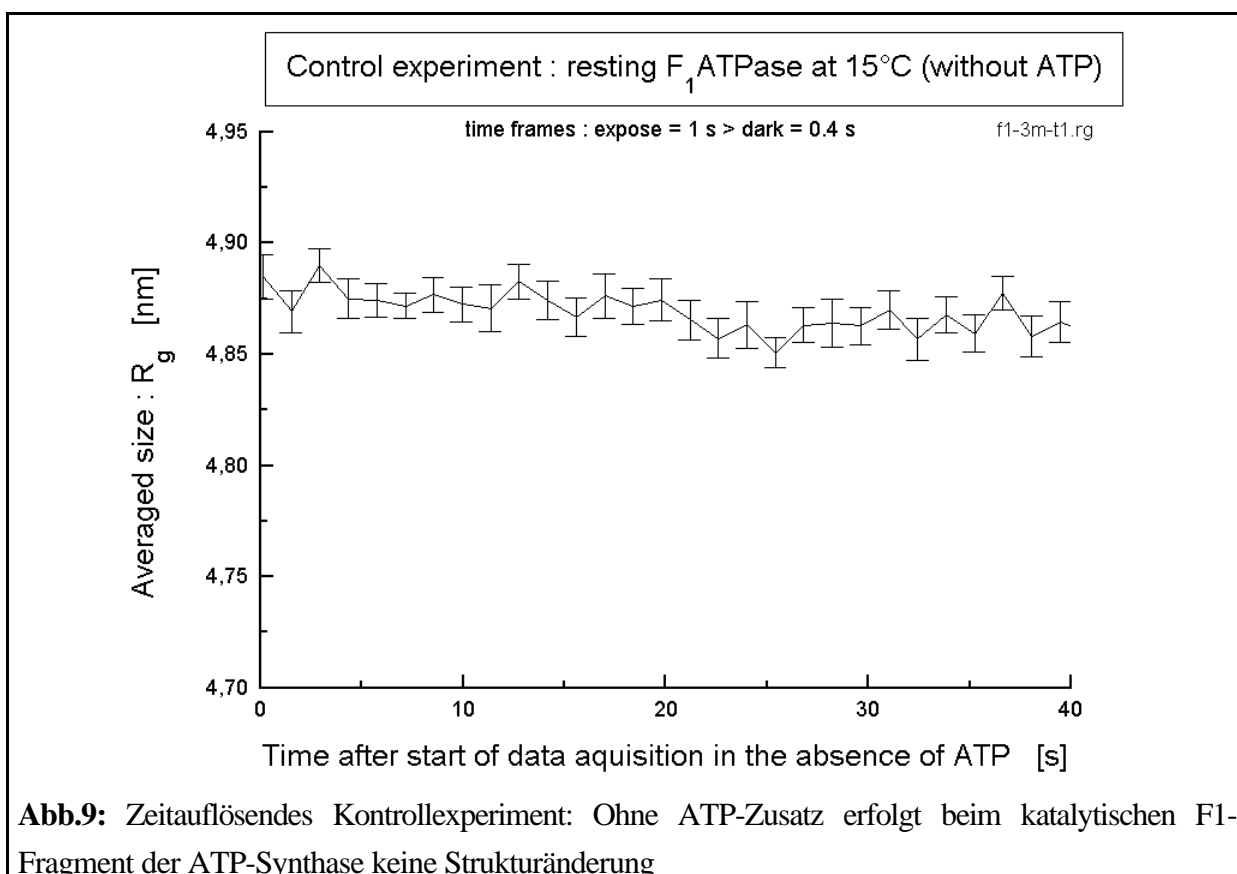
Eine technische Schlüsselentwicklung war die Konstruktion einer Probenumgebung mit einer Probenumgebung (Probenbox) mit Helium-gekühlter Quarz-Durchflußkapillare, Dreikreis-Wärmetauscher und Mischzelle für Hochfluß-Röntgenexperimente: Nach ersten Experimenten an ELETTRA in Kooperation mit der Gruppe P. Laggner, IBR, Graz, wurde ab Mai 1997 eine zusätzliche Helium-Jet Kühlung der Küvette eingesetzt. Weitere Eigenschaften und ein Blockschema sind im SAXS/ELETTRA Jahresbericht [29] und ESRF-Bericht LS722_717 dargestellt.

Als problematisch erwies sich die Detektion der intensiven Streustrahlung. Bei ELETTRA kam ein 1D-Gasdetektor zum Einsatz, der an der Grenze von Sättigungserscheinungen betrieben wurde. Hier gelang wegen der beschränkten Fläche nur die Detektion des intensiven Zentralbereichs des Streuprofiles, wodurch die 20-fache Repetition der Experimente erforderlich war.

Am Instrument ID2 der ESRF wurde anfangs ein 2D-Gasdetektor eingesetzt (18 cm Durchmesser; Argon-Ethan). Ab 0,5% Strahlöffnung (400.000 cts bei 60% Totzeitverlust) wurde lokale Photolyse des Zählgases beobachtet. Dieser Detektortyp ist in der konventionellen Form für Hochfluß-Experimente ungeeignet. Eine Weiterentwicklung der ESRF, wie sie für Cytochromoxidase erforderlich ist, wird erst ab 1999 verfügbar sein. Ab 9/1997 wurde der neuartige XRII-CCD Fluoreszenz-Detektor der ESRF eingesetzt. Hiermit konnte erstmalig der volle Fluß der ESRF genutzt werden. Nachteilig war dabei die beschränkte Zeitaufölung durch die Auslesepausen zwischen den Bildern des strukturellen Films (400 ms). In 1 m Detektorabstand wurden 100.000.000 gestreute Photonen/s gezählt.



Die Probleme der unerwarteten Gasblasenentwicklung und der Strahlenschädigung der Proben wurden durch Entgasen der Proben (Sauerstoff !) und Zusatz von Radikalfängern (scavenger) gelöst. Als Vorteilhaft erwies sich der Zusatz von 10% Glycerin zu Puffer und Protein-Lösung. In Bezug auf die Partikelkonzentration ist dies ein tausendfacher Überschuß gegenüber dem Protein. Unter diesen Bedingungen wurde die in Abb.8 gezeigte Strahlungsfestigkeit der F_1 ATPase unter Bestrahlung mit dem vollen Fluß der ESRF ermittelt. Danach ist das Protein für > 30 s ungeschädigt der Untersuchung zugänglich (Zeitfenster der strukturellen Biologie). Danach erfolgt eine geringe Fragmentierung des Proteins (Teilpopulation) und erst später (2 min) die in der Literatur beschriebene Protein-Aggregation. Nach diesen Ergebnissen besteht also in einem genügend langen Zeitfenster, gegebenenfalls mit intermittierendem Strahl, die Möglichkeit der Strukturuntersuchung am ungeschädigten Protein bei hinreichend konstanter Temperatur.



In Abb. 9 ist das Ergebnis eines stopped-flow Kontrollversuchs mit F_1 ATPase ohne Zusatz von ATP-gezeigt. Der ermittelte Streumassenradius hängt hier, wie gefordert, nicht von der Zeit ab. Apparative Artefakte sind damit ausgeschlossen. Weitere Kontrollversuche wurden mit inaktivem Protein (Rinderserumalbumin, BSA) und ATP durchgeführt. In Abb.10 ist der analoge Versuch nach rascher Vermischung von F_1 ATPase (5 g/l) und CaATP (5+1 mM) als "struktureller Film" des arbeitenden Proteins gezeigt (R_g/t). Die von der enzymatischen Untersuchung (P.D.Boyer, geteilter Nobelpreis 1997) und der statischen Struktur aus der Röntgenkristallographie (J. Walker [4], geteilter Nobelpreis 1997) prognostizierten transienten Strukturänderungen konnten tatsächlich beobachtet werden. Im Gegensatz zum Ergebnis der Voruntersuchung 1990/91 am schwächeren DESY-Synchrotron [19]

Die Interpretation durch Simulation von Streuprofilen wurde mit Molekülmodellen nach der verbesserten FVM-Methode [20] durchgeführt. Insbesondere ist von Interesse, ob die beobachteten Strukturänderungen durch die kürzlich mit Fluoreszenz-Methoden direkt nachgewiesene Rotation der Gamma-Untereinheit der ATP-Synthase und ihres F₁-Fragmentes hervorgerufen werden [3c-3e]. Nach der Modellierung führt die Rotation dieser kleinen Untereinheit *allein* (39.000 von 412.000 g/Mol bei F₁ATPase aus *Micrococcus luteus*) wegen ihrer zentralen Lage in dem aus sechs Alpha- und Beta-Untereinheiten aufgebauten birnenförmigen Hohlkörper jedoch nur zu Änderungen des Streumassenradius, die wesentlich kleiner als 1 Å sind. Die beobachtete Strukturänderung wird offensichtlich durch eine Verschiebung größerer Massen, z.B. der großen Untereinheiten oder von deren Teildomänen verursacht. Nach der Kristallstruktur der F₁ATPase (Walker [4]) ist eine solche Bewegungen jedoch mit der der Gamma-Untereinheit korreliert. Demnach besteht bei ATP-Synthase (Komplex aus F₀-Komplex, Verbindungsdomäne (stalk) und F₁ATPase) eine dreistufige Hierarchie der molekularen Bewegung:

F₀Bewegung \hat{U} Gamma-Rotation \hat{U} F₁ATPase-Untereinheiten Bewegung

Fazit und Deutung

Die gewonnen Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

- Die im Antrag (Ziele und Arbeitsprogramm) vorgeschlagene Vorgehensweise ist richtig und mit zeitgemäßen Instrumenten (ESRF, ELETTRA) und Konzepten ausführbar. Zu genauen Referenz-Messungen kann ein heimisches Instrument verwandt werden (DESY/HASYLAB - B1)
- Die Regulation durch das Protonenpotential kann zukünftig mit zeitauflösender Neutronenstreuung am ILL - D22 untersucht werden (pH-Sprung an Proteo-Liposomen).
- Der Kooperations-Inhibitor Azid führt zu einer stufenförmigen Expansion der ATP-Synthase.
- Mit der entwickelten Einrichtung (Schrittmotor-getriebene doppel-stopped-flow Einheit und Helium-Jet gekühlte Probenbox) wurde die Experimentführung und Temperierung gelöst.
- Die bearbeiteten Proteine widerstehen mit Radikalfängern und Entgasung der Strahlung der intensivsten verfügbaren Röntgenquelle für eine Zeit, die zur Studie des Reaktionszyklus genügt.
- ATP-Synthase und F₁-Fragment lassen sich durch ATP-Konzentrationsprung synchronisieren.
- Während des Reaktionszyklus der ATP-Hydrolyse wird eine Serie von schnellen Strukturänderungen beobachtet (bei vollständiger ATP-Synthase bislang nur qualitativ).
- Die unerwartet kurze Dauer der Teilereignisse bereitet noch Probleme (Aliasing, erhöhte Fehler).
- Der zeitliche Ablauf der Strukturodynamik folgt der der enzymatischen Funktion.
- Die Temperaturabhängigkeit von Strukturodynamik und Funktion zeigt gleichen Verlauf.
- Der Zyklus ist strukturell (und funktionell) mehr als einen Teilprozess lang sichtbar. Es ist hier allerdings nicht klar, was "ein Zyklus" genau bedeutet: Möglicherweise bilden drei "Subzyklen" einen "Superzyklus" (Wiederkehr des gleichen Zustandes des asymmetrischen Proteins ?).
- Nach der Computer-Modellierung besteht eine Hierarchie der molekularen Bewegungen innerhalb der ATP-Synthase und der F₁ATPase.

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)
- 3c) Sabbert, D.; Engelbrecht, S.; Junge, W. (1996) Nature 381, 623-625 (gamma, fluorescence)
- 3d) Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M.; Kinosita, K. (1997) Nature 386, 299-302 (gamma, fluores.)
- 3f) Junge, W.; Lill, H.; Engelbrecht, S. (1997) Trends Biol. Sci. 22, 420-423 (review)
- 4) Abrahams, J.P.; Leslie, A.G.W.; Lutter, R.; Walker, J.E. (1994) Nature 370, 621-628
- 5) Lanyi, K.K. (1995) Nature 375, 461-463
- 6) Habilitandenförderung Dr. Nawroth FB Chemie/ "E. & P. Müller-Stiftung" (8.000 DM)
- 7) Heinz, G.; Dose, K.; Nawroth, T. (1994) FEMS Microbiol. Lett. 124, 173-178
- 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 und Funktion Protonen-transportierender Membranproteine"
- * 15) Bongers, A.; Hartmann, H.; Decker, H.; Nawroth, T.; Post, A.; Goerigk, G. (1997) HASYLAB Jahresbericht 1997, Band I; 653-654 "SAXS measurements of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH1) in the didecameric form"
- * 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. (1997) HASYLAB Jahresbericht 1997, Band I; 655-656 "Structural switch of ATP-synthase and F_1 ATPase by Azide"
- * 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. (1989) Physica 156 & 157 B, 493-495 (Molecular modelling of proteins by FVM cube method)
- * 21) Nawroth, T. (1997) ESRF user meeting (talk) and SR50 conference (2P.), 17-21/11/97, Grenoble
- 22) Nawroth, T. et al. Physica 156B (1989) 489-492 Neutron scattering of ATP-Synthase in liposomes and TDOC

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. Zusätzlich zum stopped-flow Gerät mit Pressluftantrieb wurde aus Eigenmitteln eine Schrittmotor-getriebene, Computer-gesteuerte doppel-stopped flow Einheit aufgebaut. Die Nutzung erfolgt arbeitsteilig im Rahmen der offenen Arbeitsgemeinschaft "Struktur-dynamik von Proteindomänen", in Bezug auf zeitaufgelöste Streuexperimente vor allem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Heumann, MPI Martinsried.

- Personelle Veränderungen:

Das Projekt wurde vom Projektleiter, Herrn Dr. Neidhardt und einer Doktorandin mit Unterstützung einer technischen Angestellten und eines Chemie-Ingenieurs durchgeführt. Erst zum 1.9.1996 konnte für die Doktorandenstelle mit Frau Iris Lauer eine qualifizierte Bewerberin gefunden werden (Chemikerin), so daß mit den Arbeiten im vollen Umfang erst verzögert begonnen werden konnte (negative Auswirkung auf die Bewertung des Antrages 1998-2001). Zum Ausgleich und Aufholen der dadurch entstandenen Verzögerung im Ablauf des Projektes wurde zum 1.1.1997 befristet Herr Dr. Thomas Rimke als zeitweiliger "Postdoc" eingestellt (Bat2a/2). Herr Dr. T. Rimke ist im Juli 1997 ausgeschieden, Herr Dr. A. Neidhardt wechselte im Januar 1998 in die Industrie.

- 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 wurde wegen der beschränkten Mittel auf ATP-Synthasen/ F₁ATPase fokussiert.**- Bereitstellung von Meßzeit:**

Zur effektiven Durchführung der Experimente mit kleinen Projekten wurde 1996 eine Nutzergruppe gegründet, die offene Arbeitsgemeinschaft "Struktur-dynamik von Proteindomänen". Für 1997 und 1998 wurde ein erneuter Antrag gestellt und bewilligt. Die Gruppe ist jedoch auch an anderen Großforschungsgeräten gemeinschaftlich aktiv. Im Zeitraum 1/1997 bis 12/1997 wurden folgende Meßzeiten genutzt:

#	Einrichtung	Instrument	Meßzeit	Objekte	Nutzer; Anteil (%)
1	DESY/HASYLAB, Hamburg	JUSIFA (IFF der KFA; Haubold/Goerigk)	2 x 7 Tage	ATP-Synthase, F ₁ ATPase, Clusterin, Hemocyanin, GroEL Chaperonin	offene Arbeitsgruppe: Nawroth 25%, Koch-Brandt 20% Decker 25% Heumann 20% Grüber/Altendorf 10%
2	ELETTRA, Triest	SAXS (österreich. IBR, Laggner)	2 x 7 Tage	ATP-Synthase/F ₁ , GroEL Chaperonin	Nawroth 50%, Heumann 50%
3	ESRF, Grenoble	BL4 (ID2) (O. Diat)	2 x (5+2) Tage	ATP-Synthase/F ₁ , GroEL Chaperonin	Nawroth 50%, Heumann 50%
4	ILL, Grenoble	D22 (R.P. May)	2 x 2 Tage	Liposomen und GroEL	Nawroth 50%, Heumann 50%

- die Meßzeit für Neutronenstreuung am HFR-Reaktor des ILL diente 1997 dem Testbetrieb für **zeitauflösende Neutronenstreuung am Instrument D22** (Kooperation: R. P. May); dazu folgten für 1998 zwei erfolgreiche Anträge auf Meßzeit (Heumann und Nawroth mit R.P. May / ILL).

- Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen:

Mit folgenden Arbeitsgruppen im VB42 besteht eine Kooperation mit:

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

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) Dr. G. Grüber/ Prof. Dr. K.H. Altendorf, Universität Osnabrück: "Struktur der ATP-Synthase und F1ATPase aus Escherichia coli Bakterien"

Die Kooperationen 1 - 4 wurden zu einer offenen Arbeitsgemeinschaft intensiviert. Diese wird in Zukunft vor allem außerhalb der BMBF-Struktur fortgeführt. Dabei werden neben dem Austausch von Erfahrungen und Information Geräte gemeinschaftlich genutzt und gemeinsame Experimente an Großforschungseinrichtungen durchgeführt.

- Arbeiten im Dienste der Community:

Zur effektiven Durchführung der Experimente mit kleinen Projekten wurde die offene Arbeitsgruppe "Struktur- und Dynamik von Proteindomänen" (Nutzergruppe) gegründet und fortgeführt. Dieses Konzept einer verbesserten Ressourcen-Nutzung ist auch für andere Gruppen und die weitere Zukunft von Bedeutung. Insbesondere steht die Arbeitsgemeinschaft für Gruppen offen, die nicht dem VB42 angehören.

Referenzen

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

- 1) Saraste, M. (1990) Quart. rev. Biophys. 23, 331 (Review)
- 2) Trumppower, 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)
- 3c) Sabbert, D.; Engelbrecht, S.; Junge, W. (1996) Nature 381, 623-625 (gamma, fluorescence)
- 3d) Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M.; Kinoshita, K. (1997) Nature 386, 299-302 (gamma, fluoeres.)
- 3f) Junge, W.; Lill, H.; Engelbrecht, S. (1997) Trends Biol. Sci. 22, 420-423 (review)
- 4) Abrahams, J.P.; Leslie, A.G.W.; Lutter, R.; Walker, J.E. (1994) Nature 370, 621-628
- 5) Lanyi, K.K. (1995) Nature 375, 461-463
- 6a) Habilitandenförderung Dr. Nawroth FB Chemie/ "E.& P. Müller-Stiftung" (8.000 DM)
- 6b) Anschlußfinanzierung Dissertation G. Heinz 1996 aus Landesmitteln (2 Monate; 4.000 DM)
- 7a) Heinz, G.; Dose, K.; Nawroth, T. (1994) FEMS Microbiol. Lett. 124, 173-178
- 7b) 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 "Strukturdynamik und Funktion Protonen-transportierender Membranproteine"
- * 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) Bongers, A.; Hartmann, H.; Decker, H.; Nawroth, T.; Post, A.; Goerigk, G. (1997) HASYLAB Jahresbericht 1997, Band I; 653-654 "SAXS measurements of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH1) in the didecameric form"
- * 17) 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"
- * 18) 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. (1997) HASYLAB Jahresbericht 1997, Band I; 655-656 "Structural switch of ATP-synthase and F_1 ATPase by Azide"
- * 19) Lauer, I.; Zwicker, K.; Roessle, M.; Heumann, H.; Hartmann, H.; Decker, H.; Goerigk, G.; Nawroth, T. (1998) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Frankfurt/M., proceedings, 95 "Structural switch of ATP-synthase and F_1 ATPase by azide"

-
- * 20) 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"
- * 21) 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"
- * 22) Rössle, M.; Manakova, E.; Holzinger, J.; Lauer, I.; Nawroth, T.; Narayanan, T.; Amenitsch, H.; Heumann, H. (1998) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Frankfurt/M., proceedings, 135 "Time resolved small angle scattering on motor proteins: The chaperonin system GroEL and GroES"
- 23) Oliveberg, M.; Brzezinski, P.; Malmström, B.G. (1989) Biochim. Biophys. Acta 977, 322-328
- 24) Neidhardt, A.; Nawroth, T.; Hütsch, M.; Dose, K. (1991) FEBS Lett. 280, 179-182
- 25) Nawroth, T. (1989) Physica 156 & 157 B, 493-495 (Molecular modelling of proteins by FVM cube method)
- * 26) 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"
- * 27) T. 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"
- * 28) 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"
- * 29) Nawroth, T., Lauer, I.; Rößle, M.; Heumann, H.; Bernstorff, S.; Amenitsch, H. (1997) Austrian SAXS - Beamline at ELETTRA, Annual report 1996/97, 75-76 "Time resolved investigation of protein dynamics - working native F₁ATPase"
- * 30) Nawroth, T. (1997) ESRF user meeting (talk: b) and SR50 conference (2Poster: a+b), 17-21/11/97, Grenoble
- a) T. Nawroth, I. Lauer, A. Neidhardt, M. Roessle, H. Heumann, O. Diat, P. Boesecke, T. Narayanan "Structure dynamics of ATP-synthase and F₁ATPase from *Micrococcus luteus*"
- b) T. Nawroth, I. Lauer, A. Neidhardt, M. Roessle, H. Heumann, O. Diat, P. Boesecke, T. Narayanan "Time resolved X-ray small angle scattering of working proteins"
- * 31) Nawroth, T., Lauer, I.; Rößle, M.; Heumann, H. (1998) VAAM Jahrestagung 1998, Frankfurt/M. "Structural film of working F₁ATPase and ATP-synthase by time resolved X-ray scattering"
- * 32) Nawroth, T., Lauer, I.; Rößle, M.; Heumann, H.; Bernstorff, S.; Amenitsch, H. (1998) 2nd International workshop on ATP-synthase and V-ATPase, 14.-18.5.1998, Osnabrück, proceedings FM7 "Structural film of working F₁ATPase and ATP-synthase by time resolved X-ray scattering"
- * 33) Nawroth, T., Lauer, I.; Rößle, M.; Heumann, H. (1998) EBEC short reports 10, ## "Structural film of working F₁ATPase and ATP-synthase by time resolved X-ray scattering"
- * 34) Nawroth, T., Lauer, I.; Neidhardt, A.; Zwicker, K.; Diat, O.; Narayanan, T.; Boesecke, P.; Amenitsch, H.; Bernstorff, S.; Rößle, M.; Heumann, H. (1998) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Frankfurt/M., proceedings, 109 "Structural film of working F₁ATPase and ATP-synthase obtained by time resolved X-ray scattering"
- 34) Nawroth, T. et al. Physica 156B (1989) 489-492 Neutron scattering of ATP-Synthase in liposomes and TDOC
- * 35) Nawroth, T.; Lauer, I.; Zwicker, K.; Rössle, M.; Heumann, Meier, G.; May, R.P. (1998) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Frankfurt/M., proceedings, 108 "Membrane energization alters the proton permeability of liposomes - Time resolved neutron scattering and spectroscopy"

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. Zusätzlich zum stopped-flow Gerät mit Pressluftantrieb wurde aus Eigenmitteln eine Schrittmotor-getriebene, Computer-gesteuerte doppel-stopped flow Einheit aufgebaut. Die Nutzung erfolgte arbeitsteilig im Rahmen der offenen Arbeitsgemeinschaft "Strukturodynamik von Proteindomänen", 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 anfangs 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). Herr Dr. T. Rimke ist im Juli 1997 ausgeschieden. Herr Dr. A. Neidhardt wechselte im Januar 1998 in die Industrie.

- 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 wurde ab 1997 auf ATP-Synthasen/ F₁ATPase fokussiert.

- Bereitstellung von Meßzeit / genutzte Großgeräte:

Zur effektiven Durchführung der Experimente mit kleinen Projekten wurde 1996 eine Nutzergruppe gegründet, die offene Arbeitsgruppe "Strukturodynamik von Proteindomänen", anfangs als Unterstruktur des VB42. Meßzeit-Anträge an das HASYLAB wurden 1996-1998 bewilligt. Die Gruppe ist jedoch auch an anderen Großforschungsgeräten gemeinschaftlich aktiv (ESRF, ELETTRA, ILL):

#	Einrichtung	Instrument	Meßzeit	Objekte	Nutzer; Anteil (%)
					offene Arbeitsgruppe:
1	FRJ-2, Jülich	KWS-2 (IFF,MPI Mainz)	10 Tage	ATP-Synthase,F ₁ , Clusterin	Nawroth 30%, Koch-Brandt 70%
2	DESY/HASYLAB, Hamburg	RöFo (A1) (Stuhrmann)	3 Wochen	ATP-Synthase, Cytochromoxidase Clusterin	Nawroth 80%, Koch-Brandt 20%
3	DESY/HASYLAB, Hamburg	JUSIFA (IFF der KFA; Haubold/ Goerigk)	21 Tage (+ 20 : 5/98+10/98)	ATP-Synthase, F ₁ ATPase, Clusterin, Hemocyanin, GroEL	Nawroth 25%, Koch-Brandt 20% Decker 25% Heumann 25% Grüber/Altendorf 5%
4	ELETTRA, Triest (in Betrieb seit 10/96)	SAXS(österreich., Laggner)	10 Tage + 5 (5/98)	ATP-Synthase,F ₁ , GroEL Chaperonin	Nawroth 50%, Heumann 50%
5	ESRF, Grenoble	BL4 (ID 02) Diat, Narayanan	10 Tage (+ 4 : 6/98)	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)
7	ILL , Grenoble	D22 (R.P. May)	2 x 2 Tage (+ 4 : 9/98)	Liposomen und GroEL	Nawroth 50%, Heumann 50%

-
- die Meßzeit für Neutronenstreuung am HFR-Reaktor des ILL 1997 diente dem Testbetrieb für **zeitauflösende Neutronenstreuung am Instrument D22** (Kooperation: R. P. May); dazu folgten für 1998 zwei erfolgreiche Anträge auf Meßzeit (Heumann und Nawroth mit R.P. May / ILL).
 - Die anfangs genutzten Instrumente am DESY-HASYLAB: RöFo (A1, Stuhmann) und testweise am D1.2 (X33 des EMBL, Koch) wurden wegen Ausfall bzw. mangelnder Strahlstabilität und hohem, zeitlich variabelm Untergrund seit 1997 nicht weiter genutzt.

- **Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen:**

Mit folgenden Arbeitsgruppen im VB42 besteht eine Kooperation mit:

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

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) Dr. G. Grüber/ Prof. Dr. K.H. Altendorf, Universität Osnabrück: "Struktur der ATP-Synthase und F₁ATPase aus Escherichia coli Bakterien"

Die Kooperationen 1 - 4 wurden zu einer offenen Arbeitsgemeinschaft intensiviert. Diese wird in Zukunft vor allem außerhalb der BMBF-Struktur fortgeführt. Dabei werden neben dem Austausch von Erfahrungen und Information Geräte gemeinschaftlich genutzt und gemeinsame Experimente an Großforschungseinrichtungen durchgeführt.

- **Arbeiten im Dienste der Community:**

- 1) Die Untersuchung der Struktur- und Dynamik von Multidomänenproteinen wurde methodisch entscheidend vorangebracht. Die zeitaufgelöste Neutronenstreuung wurde am D22-Instrument des ILL eingeführt, an den Instrumenten ID02 der ESRF und SAXS der ELETTRA wurden erstmalig Experimente mit Proteinlösungen durchgeführt. Insbesondere konnte die Technik der Untersuchung arbeitender Proteine durch zeitaufgelöste Röntgenstreuung an synchronisierten Lösungen etabliert werden. Die Forschungsmethode ist auch für andere Systeme von Bedeutung.
- 2) Zur effektiven Durchführung der Experimente mit kleinen Projekten wurde die offene Arbeitsgruppe "Struktur- und Dynamik von Proteindomänen" (Nutzergruppe) gegründet und fortgeführt. Dieses Konzept einer verbesserten Ressourcen-Nutzung ist auch für andere Gruppen und die weitere Zukunft von Bedeutung. Die Gruppe wird ab 1999 durch Aufnahme neuer Gruppen länderübergreifend umstrukturiert (Deutschland, Frankreich, Schweiz). Thematisch werden dabei "molekulare Bewegungen in Multidomänenproteinen" untersucht.

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften bzw. -büchern

- 1) 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"
- 2) 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"
- 3) 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"
- 4) 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"
- 5) 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"
- 6) Bongers, A.; Hartmann, H.; Decker, H.; Nawroth, T.; Post, A.; Goerigk, G. (1997) HASYLAB Jahresbericht 1997, Band I; 653-654 "SAXS measurements of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH1) in the didecameric form"
- 7) 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. (1997) HASYLAB Jahresbericht 1997, Band I; 655-656 "Structural switch of ATP-synthase and F₁ATPase by Azide"
- 8) Nawroth, T.; Lauer, I.; Rößle, M.; Heumann, H.; Bernstorff, S.; Amenitsch, H. (1997) IBR / ELETTRA, SAXS beamline annual report 1996/97 "Time resolved investigation of protein dynamics - working native F₁ATPase"
- 9) Nawroth, T.; Lauer, I.; Roessle, M.; Heumann, H. (1998) EBEC short reports 10, "Structural film of working F₁ATPase and ATP-synthase by time resolved X-ray scattering"