

Diss ETH Nr. 14643

**Molecular mechanism of the ATP synthase's
F_o motor probed by
mutational analyses of subunit a**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

FRANZISKA WEHRLE

Dipl. Natw. ETH

born May 10, 1972

from Muolen (SG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. Dimroth, examiner

Prof. Dr. M. Aebi, co-examiner

PD Dr. G.Kaim, co-examiner

Zürich 2002

SUMMARY

ATP is the main carrier of free energy in living cells and is primarily synthesised by F_1F_0 ATP synthases. The strictly anaerobic, marine bacterium *Propionigenium modestum* grows by the degradation of succinate to propionate and CO_2 . During fermentation, the free energy of a decarboxylation step generates an electrochemical Na^+ gradient across the membrane, which is directly used by a Na^+ -dependent F_1F_0 ATP synthase. F-type ATPases are composed of a catalytically active headpiece (F_1) protruding into the cytoplasm and a membrane embedded moiety (F_0), which is responsible for ion translocation across the membrane. The mechanism of ion translocation and the coupling of the flux of Na^+ across the membrane to the catalytic events at F_1 are not completely elucidated. The current working model predicts that a ring of c subunits rotates relative to subunits a and b driven by the electrochemical Na^+ gradient and that the torque generated by this rotation is transferred to the catalytic sites in order to synthesise ATP.

In the work presented here, the genes for F_0 subunits a and b from *P. modestum* were cloned as His-tagged fusion proteins and expressed in *Escherichia coli* C43(DE3). The recombinant proteins were purified using Ni^{2+} affinity chromatography. By the use of the above *E. coli* strain, unsatisfactory yield and purity of subunit a after expression in *E. coli* PEF42(DE3) could be overcome to a great extent, and subunit b was purified to homogeneity. Subunits a and b were combined with purified subunit c and re-assembled to a functional F_0 complex. The reconstituted F_0 liposomes were able to perform $^{22}Na^+_{out}/Na^+_{in}$ exchange and $\Delta\Psi$ -driven $^{22}Na^+$ uptake. Furthermore, by the incubation of these F_0 liposomes with purified F_1 -ATPase, a functional F_1F_0 holoenzyme was reconstituted that was able to synthesise ATP and translocate Na^+ upon addition of ATP. By this method we were also able to form an F_0 chimera between *P. modestum* subunits a and b together with the c-oligomer of *Ilyobacter tartaricus* that showed $^{22}Na^+$ transport activities comparable to the wild-type enzyme.

In order to analyse the function of the strictly conserved residue Arg227 on the *P. modestum* subunit a, site directed mutagenesis studies were performed. Previous investigations in *E. coli* describe this site as absolutely essential for a coupled enzyme.

However, we could give convincing evidence that ATP synthases harbouring the aArg227Lys or the aArg227His replacement perform ATP-driven $^{22}\text{Na}^+$ transport, and F_o liposomes of these mutants catalyse $^{22}\text{Na}^+_{\text{out}}/\text{Na}^+_{\text{in}}$ exchange and $\Delta\Psi$ -driven $^{22}\text{Na}^+$ -uptake. The pH optima were shifted compared to the wild-type enzyme to a more basic pH in case of the lysine mutant and to a more acidic pH for the histidine mutant. In addition, they do not cover a wide pH range like the wild-type enzyme but rather show narrow pH optima. Data obtained with mutant aArg227Ala displayed different characteristics. In first studies, it was found that F_o liposomes catalysed $\Delta\Psi$ -driven $^{22}\text{Na}^+$ uptake and F_1F_o liposomes showed Na^+ -dependent ATP hydrolysis that, however, was not coupled to sodium translocation. The latter result indicated that dissociation of Na^+ from the rotor sites might be impaired. Further studies revealed that aArg227Ala was able to synthesise ATP only if the Na^+ concentration in the buffer was low. Interestingly, unlike wild-type F_o complexes, those with the aArg227Ala mutation were able to catalyse $\Delta p\text{Na}^+$ -driven $^{22}\text{Na}^+$ uptake. This transport was also sensitive to elevated sodium concentrations in the lumen of the proteoliposomes. Our data indicate that aArg227 is not essential for coupling the ion flux to rotation, but rather promotes the dissociation of the sodium ions from their binding sites on subunit c. They also do not support earlier suggestions that aArg227 cannot be replaced by other amino acids without loss of function.

A second group of important residues of *E. coli* subunit a are Glu219 and His245. It was demonstrated that these two sites can be functionally interchanged. In *P. modestum* Met236 and Asp259 reside at the equivalent positions. We replaced aAsp259 by glutamate, glycine or lysine. All tested mutants were able to hydrolyse ATP in a Na^+ -coupled manner and could perform ATP synthesis in presence of a membrane potential. The mutant F_o complexes catalysed $^{22}\text{Na}^+_{\text{out}}/\text{Na}^+_{\text{in}}$ exchange and $\Delta\Psi$ -driven $^{22}\text{Na}^+$ uptake. The transport rates were reduced compared to the wild-type in the order wild-type \geq Glu>Gly>Lys, thus clearly depending on charge and polarity of the substitution. Asp259 is not likely to be an essential residue for a functional enzyme, but it seems to be involved in the ion translocation process.

KURZFASSUNG

Energie in Form von ATP ist für alle Organismen von zentraler Bedeutung, um lebensnotwendige Prozesse aufrecht zu erhalten. Sie wird hauptsächlich von F_1F_0 ATP Synthasen bereitgestellt. *Propionigenium modestum* ist ein strikt anaerobes, marines Bakterium, das seinen Energiebedarf durch den Abbau von Succinat zu Propionat und CO_2 deckt. Während der Fermentation von Succinat wird die freie Energie aus der Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA in einem elektrochemischen Natrium-Gradienten konserviert, der direkt von einer Na^+ -abhängigen F_1F_0 ATP Synthase genutzt wird. F-Typ ATPasen bestehen aus einem katalytisch aktiven F_1 -Teil, der auf der cytoplasmatischen Seite an den membrangebundenen F_0 -Teil assoziiert ist. Der Mechanismus der Ionentranslokation durch den F_0 -Teil und die Kopplung des Ionenflusses an die Synthese von ATP sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Das gängige Arbeitsmodell besagt, dass sich ein Ring von 11 c-Untereinheiten relativ zur a-Untereinheit und den zwei b-Untereinheiten dreht. Dabei werden Na^+ Ionen über die Membran transportiert. Die Triebkraft für diese Rotation ist die Energie, die im elektrochemischen Na^+ -Gradienten gespeichert ist. Das Drehmoment wird mittels der γ -Untereinheit zu den katalytisch aktiven β -Untereinheiten übertragen, wo schlussendlich ATP synthetisiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein für die a-Untereinheit von *Propionigenium modestum* mit einem N-terminalen-, und dasjenige der b-Untereinheit mit einem C-terminalen Polyhistidin-Rest modifiziert. Die rekombinanten Proteine wurden in *Escherichia coli* C43(DE3) überexprimiert und mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt. Durch die Verwendung dieses Expressionsstammes konnte die geringe Ausbeute und unvollständige Reinigung der a-Untereinheit im Vergleich zur Expression in *E. coli* PEF42(DE3) deutlich verbessert werden. Die b-Untereinheit konnte bis zur Homogenität gereinigt werden. Zusammen mit gereinigter c-Untereinheit wurden die a- und die b-Untereinheiten zu einem F_0 -Teil zusammengesetzt und in Liposomen rekonstituiert. Die Funktionalität des rekonstituierten F_0 -Teils wurde anhand von $^{22}Na^+_{out}/Na^+_{in}$ -Austausch- und

Na⁺-Aufnahme-Experimenten nachgewiesen. Darüber hinaus konnte durch Inkubation der F_o-Liposomen mit gereinigtem F₁-Teil eine aktive F₁F_o-ATPase generiert werden. Diese war in der Lage, ATP zu hydrolysieren und in Anwesenheit eines Membranpotentials ATP zu synthetisieren. Diese Methode wurde auch eingesetzt, um funktionelle F_o-Hybride zwischen den a- und b-Untereinheiten von *P. modestum* und dem c-Oligomer von *Ilyobacter tartaricus* zu bilden. Die dabei erhaltenen Transportraten waren vergleichbar mit den Werten des F_o Teils von *P. modestum*.

Die Funktion vom hoch konservierten Arg227 der a-Untereinheit der *P. modestum* ATPase wurde mittels Mutagenese-Versuche untersucht. Frühere Studien an aArg210 der *E. coli* ATPase (homologer Rest zu aArg227 aus *P. modestum*) ergaben, dass diese Aminosäure essentiell ist für ein funktionelles Enzym. Es konnte jedoch stichhaltig gezeigt werden, dass das Arginin funktionell durch ein Lysin oder ein Histidin ersetzt werden kann. F_o-Liposomen mit den jeweiligen Mutanten katalysieren ²²Na⁺_{out}/Na⁺_{in}-Austausch und Potential-getriebene Na⁺-Aufnahme. Die pH Optima der beiden Mutanten waren allerdings im Vergleich zum Wildtyp-Enzym verschoben, im Falle der Lysin-Mutante zu einem basischeren pH und im Falle der Histidin-Mutante zu einem saureren pH. Die beiden Mutanten waren zudem über einen kleineren pH Bereich aktiv als das Wildtyp-Enzym. Eine Mutante, bei der das Arginin 227 durch ein Alanin ausgetauscht wurde, zeigte ganz andere Charakteristika. F_o-Liposomen mit der aArg227Ala Mutante waren in Anwesenheit eines Membranpotentials in der Lage, ²²Na⁺ aufzunehmen. F₁F_o Liposomen zeigten Na⁺-stimulierbare ATP Hydrolyse, die jedoch nicht an einen Na⁺-Transport gekoppelt war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Dissoziation der Na⁺-Ionen von den Bindungsstellen der c-Untereinheit beeinträchtigt sein könnte. Weitere Studien zeigten, dass die aArg227Ala Mutante in der Lage war, ATP zu synthetisieren, wenn die Natriumkonzentration im Umgebungspuffer niedrig war. Interessanterweise katalysierte aArg227Ala im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym eine ΔpNa⁺-getriebene ²²Na⁺-Aufnahme. Dieser ²²Na⁺-Transport reagierte ebenfalls empfindlich auf ansteigende Na⁺-Konzentrationen. Unsere Daten weisen hin auf eine mögliche Rolle der positiven Ladung vom aArg227 bei der Dissoziation der Na⁺-Ionen, die sich, gebunden an die c-Untereinheiten, nähern. Die Daten stehen ausserdem im Gegensatz zu früheren Arbeiten, die besagten, dass aArg227 nicht ohne Verlust der Funktionalität durch andere Aminosäuren ausgetauscht werden kann.

Eine zweite Gruppe von wichtigen Resten auf der α -Untereinheit der *E. coli* ATPase sind Glu219 und His245. Es wurde gezeigt, dass diese zwei Reste gegenseitig funktionell ausgetauscht werden können. In *P. modestum* befinden sich Met236 und Asp259 an den äquivalenten Positionen. In dieser Arbeit wurde α Asp259 durch Glutamat, Glycin oder Lysin ausgetauscht. Alle untersuchten Mutanten waren in der Lage, ATP zu synthetisieren und zeigten Na^+ -stimulierbare ATP Hydrolyse. Die gemessenen Aktivitäten waren im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Der Aktivitätsverlust war abhängig von der Ladung und Polarität der Aminosäure-Substitutionen, und zwar in der Folge Wildtyp \geq Glu $>$ Gly $>$ Lys. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass α Asp259 nicht essentiell ist für ein funktionelles Enzym. Trotzdem ist dieser Rest am Ionen-Translokations Prozess beteiligt.