

# Molecular interactions along the ion pathway of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

von Ballmoos, Christoph

**Publication date:**

2005

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004948809>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 15970

# Molecular interactions along the ion pathway of the $F_1F_0$ ATP synthase

A dissertation submitted to the  
FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

For the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by  
CHRISTOPH VON BALLMOOS

Dipl. Natw. ETH  
Born July, 26, 1974  
From Heimiswil (BE)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Dimroth, examiner  
Prof. Dr. Josef Brunner, co-examiner

Zürich 2005



## Summary

Adenosine triphosphate (ATP) is the main carrier of free energy in living cells. A variety of molecular processes like biosynthesis, transport, or mobility are catalyzed by enzymes, which are fueled by ATP. A major proportion of ATP is synthesized by a single enzyme, the  $F_1F_0$  ATP synthase. This membrane bound protein complex is found in bacteria, the chloroplasts of plants and in the inner membrane of mitochondria. As indicated by the name, the enzyme consists of two subcomplexes. The water soluble  $F_1$  complex harbors the nucleotide binding sites and is responsible for the chemical coupling of ADP and inorganic phosphate to ATP. This reaction is catalyzed by a rotary mechanism, which induces conformational changes within  $F_1$  driving the synthesis of ATP. The rotation energy for this process is supplied by a torque, which is generated in the membrane embedded  $F_0$  part, utilizing a transmembrane electrochemical gradient. Compared to the  $F_1$  part, from which a high resolution structure as well as many functional details are known, knowledge about the membrane embedded  $F_0$  part trails behind.

The presented work is divided into nine chapters, which are dealing with different aspects of torque generation in the  $F_0$  motor. The second chapter is written in German, and describes the applied technique of photocrosslinking to an audience of non specialists. Chapters three and four are dealing with the localization of the ion binding site in the  $F_0$  motor relative to the membrane bilayer. The first approach describes the use of a photocrosslinking compound, which specifically interacts with the ion binding site. After illumination, the compound reacts with the lipids of the surrounding bilayer. The second approach uses fluorescence quenching to quantitatively determine the depth of a fluorescently labeled binding site in the membrane harboring spin-labeled phospholipids. Both experiments clearly show that the ion binding site is deeply embedded in the membrane and is located close to the centre of the bilayer. The fifth chapter describes the identification of the site of interaction within the ATP synthase of strongly toxic organotin compounds. A radioactively labeled organotin was equipped with a photoactivatable moiety and allowed the unambiguous identification of subunit a as the target of organotin compounds. The sixth chapter delineates the development of a novel approach to measure  $Na^+$  uptake into liposomes. A fluorescent compound, which specifically complexes with  $Na^+$  ions, is enclosed into proteoliposomes during reconstitution and the  $Na^+$ -transport can subsequently be monitored by means of fluorescence spectroscopy. The seventh chapter describes an experimental approach to characterize the ion binding site of the ATP synthase

from different organisms. The pH-dependent modification with the specific inhibitor dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) of the ATP synthases from *Ilyobacter tartaricus*, *Escherichia coli*, spinach chloroplast and bovine mitochondria was measured and compared. Data analysis of such experiments is usually very laborious and the use of MALDI mass spectroscopy for facilitated data analysis is described. The results are subsequently interpreted in respect to an alternative coupling ion mechanism, in which a coordinated hydronium ion ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) replaces the group protonation of an acidic residue thus far proposed. The eighth chapter describes a novel purification method for the hydrophobic a subunit of the  $F_0$  part by means of mixed organic solvents. This kind of purification for the first time allowed the characterization of the entire a subunit by MALDI mass spectroscopy.

Finally, the discussion introduces the actual mechanistic models of the  $F_0$  motor from different research groups. They are compared in respect to several critical aspects. Potential discrepancies between  $\text{H}^+$  and  $\text{Na}^+$  dependent enzymes are addressed and experiments towards their clarification are proposed.

## Zusammenfassung

ATP ist die universelle Energieform in allen lebenden Zellen und ist verantwortlich für den Antrieb von vielen lebenswichtigen Prozessen sowie für die Synthese aller zellulären Bestandteile. Ein Grossteil des ATP wird von einem einzigen Enzym hergestellt, der  $F_1F_0$  ATP Synthase. Dieses findet sich sowohl in den Membranen von Bakterien und Pflanzen, wie auch in tierischen Zellen. Wie der Name verrät, ist das Protein aus zwei Einheiten aufgebaut. Der wasserlösliche  $F_1$  Teil ist für die chemische Kopplung von ADP mit anorganischem Phosphat zum energiereichen Phosphat verantwortlich. Die Reaktion wird von einem Rotationsmechanismus katalysiert, welcher durch konformationelle Änderungen im  $F_1$  Teil die Herstellung von ATP ermöglicht. Der Antrieb für diese Rotationsbewegung stammt aus dem in der Membran eingebetteten  $F_0$  Teil, welcher in der Lage ist, ein elektrochemisches Potential in eine Drehbewegung umzuwandeln. Während vom  $F_1$  Teil sowohl die atomare Struktur wie auch viele funktionelle Eigenschaften bekannt sind, sind die Kenntnisse über den  $F_0$  Teil weit weniger ausgeprägt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit verschiedenen Aspekten der Antriebsbewegung im  $F_0$  Teil. Das zweite Kapitel beschäftigt sich in einer Sprache, die sich an nicht Spezialisten wendet, mit der Technik des chemischen Photocrosslinking, welche in den folgenden Kapiteln zum Tragen kommt. Die Kapitel drei und vier beschäftigen sich mit der relativen und absoluten Lokalisierung der Ionenbindungsstelle des c-Rings der ATP Synthase in der Membran. Der erste Ansatz bedient sich eines photoaktivierbaren Crosslinkers, welcher kovalent mit der Bindestelle reagiert und nach Belichtung eine Quervernetzung mit Membranlipiden eingeht. Der zweite Ansatz beschreibt eine genauere quantitative Bestimmung der Ionenbindestelle mit Hilfe von einem Fluoreszenzmarker und spin-gelabelten Phospholipiden. Beide Ansätze führen zum eindeutigen Ergebnis, dass die Ionenbindestelle tief in der Membran eingebettet liegt. Im fünften Kapitel wird mit Hilfe eines photoaktivierbaren Derivativs die Bindestelle des Umweltgiftes Tributylzinnchlorid (TBT) an der ATP Synthase untersucht. Mit Hilfe einer radioaktiven Markierung kann die spezifische Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit des  $F_0$  Teils sichtbar gemacht werden. Das sechste Kapitel befasst sich mit einer neuartigen Methode zur Bestimmung von  $Na^+$  Ionen in Lipidvesikeln (Liposomen). Die Technik bedient sich eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher spezifisch mit  $Na^+$  interagiert. Der Farbstoff wird in die Liposomen eingeschlossen und der Transport kann kontinuierlich mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Das siebte Kapitel

beschreibt einen experimentellen Ansatz zur Untersuchung der Ionenbindestelle der ATP Synthase aus verschiedenen Organismen. Dabei wird die pH abhängige Markierung des Inhibitors Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) an die ATP Synthase von *Ilyobacter tartaricus*, *Escherichia coli*, Chlorplasten aus Spinat und den Mitochondrien aus Rinderherz verglichen. Der Einsatz von Massenspektroskopie erleichtert dabei die Auswertung der Daten, welche durch konventionelle Methoden sehr aufwändig wäre. Die Ergebnisse werden danach im Hinblick auf ein koordiniertes Hydroniumion ( $H_3O^+$ ) als alternatives Kopplungion statt einer Punktprotonierung diskutiert. Das achte Kapitel beschreibt eine neue Methode zur Reinigung der stark hydrophoben  $\alpha$ -Untereinheit des  $F_0$  Teils mittels organischen Lösungsmitteln. Diese Art der Reinigung ermöglichte die erstmalige Identifikation der Untereinheit mittels Massenspektroskopie.

Die abschliessende Diskussion vergleicht die aktuellen Modelle zum Mechanismus der Ionentranslokation durch den  $F_0$ -Teil von verschiedenen Arbeitsgruppen. Die entsprechenden Modelle werden kurz vorgestellt und hinterher kritisch diskutiert. Mögliche Diskrepanzen zwischen den Mechanismen von  $H^+$  und  $Na^+$  abhängigen Enzymen werden angesprochen und Experimente zu deren Klärung vorgeschlagen.