

Diss. ETH No. 16487

**F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase:  
Identification of a plug within the c-ring and  
heterologous expression of a sodium-  
translocating enzyme**

A dissertation submitted to the  
**FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH**

for the degree of  
**DOCTOR OF NATURAL SCIENCES**

presented by  
**BENJAMIN OBERFELD**

Dipl. Biochem., University of Tübingen, Germany  
born July 03, 1973  
from Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Dimroth, examiner  
Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt, co-examiner

Zürich 2006

## Summary

ATP is the main carrier of free energy in living cells. It is required for numerous biological processes. In most organisms, the major part of ATP is produced by the enzyme  $F_1F_0$  ATP synthase. This protein complex is found in bacteria, the mitochondria of animals, plants and fungi and the chloroplasts of plants. It can be divided into two parts: the soluble  $F_1$  domain and the membrane embedded  $F_0$  domain. Each of these two domains can be regarded as a nano-sized rotary motor. The  $F_1$  domain catalyses the energy-consuming synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate. The  $F_0$  domain translocates ions across a membrane along an electrochemical gradient. The free energy released during ion translocation is converted into rotary movement. This rotation induces conformational changes within the  $F_1$  domain, providing the energy required for the synthesis of ATP. The structure and many functional details of the  $F_1$  domain are known, but the same level of understanding has yet not been reached for the  $F_0$  domain.

Chapter 2 of the work presented here deals with the c ring, the rotary part of the  $F_0$  domain. The central cavity of this ring must be sealed to prevent unspecific ion flux across the membrane, which would cause a collapse of the essential membrane potential. Using a photocrosslinking approach, it could be shown that phospholipids occupy the internal lumen of the c ring. The phospholipid molecules could be covalently linked to cysteines introduced at the inside of the ring by bifunctional reagents. These reagents react with their sulfhydryl-specific group with cysteines and with their photoactivatable group with any nearby molecule. The obtained products were identified by mass spectrometry and by digestion with a phospholipase. Two different phospholipids, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol, were found. Control experiments verified that the subunit c - phospholipid adducts were formed in the ATP synthase complex in its natural membrane environment. The abundance of phospholipids within the c ring fits well to the hydrophobic nature of the internal surface of the ring.

A heterologous expression system in *Escherichia coli* for the  $Na^+$ -coupled ATP synthase of the bacterium *Ilyobacter tartaricus* is described in chapter 3. The enzyme was conveniently purified by metal chelate affinity chromatography via an engineered His-tag at the N-terminus of the  $\beta$  subunit. After reconstitution into proteoliposomes, the enzyme catalyzed ATP driven  $Na^+$  uptake, and its ATP hydrolysis activity was blocked by the specific inhibitor dicyclohexylcarbodiimide, indicating a functional and highly coupled enzyme. This genetic system offers many opportunities for investigations of structure and function of  $Na^+$ -

coupled ATP synthases. Synthesis of a putative sodium dependent ATP synthase was also found with an expression vector harboring the *atp* operon from *Ruminococcus albus*.

The *atp* operon consists of the eight genes coding for the subunits of the bacterial  $F_1F_0$  ATP synthase and a ninth gene, *atpI*. Little is known about the function of *atpI* and its gene product, the protein i. In chapter 4, an expression system for recombinant *Propionigenium modestum* protein i is presented. An expression plasmid harboring *atpI* and the gene coding for subunit a was constructed. Protein i could be expressed in *E. coli* and purified by metal affinity chromatography, whereas no expression of subunit a was observed. However, this system might be helpful for the detection of interactions of protein i with other proteins via copurification.

Most  $F_1F_0$  ATP synthases use protons as coupling ions, but some use sodium ions instead. In chapter 5, the amino acid residues determining the ion specificity of the c ring are discussed, using data obtained from the crystal structure of the *I. tartaricus*  $c_{11}$  ring, from mutagenesis studies and from sequence comparisons between sodium and proton translocating ATP synthases. The results are used to search for potential  $Na^+$ -coupled ATP synthases in the protein and nucleotide databases.

## Zusammenfassung

ATP ist der wichtigste Träger von freier Energie in lebenden Zellen und wird für zahlreiche biologische Prozesse benötigt. In den meisten Organismen stellt das Enzym  $F_1F_0$  ATP Synthase den grössten Teil des ATP her. Dieser Proteinkomplex kommt in Bakterien, in den Mitochondrien von Tieren, Pflanzen und Pilzen und in den Chloroplasten von Pflanzen vor. Die ATP Synthase besteht aus zwei Teilen, dem löslichen  $F_1$ -Teil und dem membrangebundenen  $F_0$ -Teil. Jeder dieser zwei Teile ist ein winziger Rotationsmotor. Der  $F_1$ -Teil katalysiert die Synthese von ATP aus ADP und anorganischen Phosphat, eine energieverbrauchende Reaktion. Im  $F_0$ -Teil werden Ionen in Richtung eines elektrochemischen Gradienten von einer Seite der Membran zur anderen transportiert. Bei diesem Ionentransport wird Energie frei und in eine Rotationsbewegung umgewandelt. Durch die Rotation werden Konformationsänderungen im  $F_1$ -Teil induziert, die die Energie für die Synthese von ATP liefern. Vom  $F_1$ -Teil sind die Struktur und viele funktionelle Aspekte bekannt, während der  $F_0$ -Teil weniger gut verstanden ist.

In Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit geht es um den c-Ring, den Rotor des  $F_0$ -Teils. Das Loch des c-Rings muss verschlossen sein, damit nicht Ionen unkontrolliert die Membran passieren und dadurch das für die Zelle lebenswichtige Membranpotential zerstören können. Mit Hilfe von Photocrosslink-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich Phospholipidmoleküle im Inneren des c-Rings befinden. Die Phospholipide konnten mit speziellen Reagenzien kovalent an Cysteine in der Innenseite des c-Rings gebunden werden. Diese Reagenzien besitzen eine sulfhydrylspezifische Gruppe, die mit Cysteinen reagiert, und eine photoaktivierbare Gruppe, die mit jedem benachbartem Molekül reagieren kann. Die erhaltenen Crosslink-Produkte wurden mit Massenspektrometrie und Phospholipase-Verdau identifiziert. Zwei verschiedene Phospholipide wurden gefunden, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol. Mit Kontrolleexperimenten wurde gezeigt, dass die Bildung von Crosslinkprodukten zwischen der c-Untereinheit und Phospholipiden in der ATP Synthase in ihrer natürlichen Membranumgebung stattgefunden hat.

Ein heterologes Expressionssystem in *Escherichia coli* für die  $Na^+$ -gekoppelte ATP Synthase von dem Bakterium *Ilyobacter tartaricus* ist in Kapitel 3 beschrieben. An die  $\beta$ -Untereinheit der ATP Synthase wurde ein His-Tag angehängt, so dass das Enzym mit Metallchelate-Affinitätschromatographie einfach gereinigt werden konnte. Nach Rekonstitution in Proteoliposomen katalysierte das Enzym ATP-getriebene  $Na^+$ -Aufnahme und konnte durch den spezifischen Inhibitor Dicyclohexylcarbodiimid gehemmt werden. Das Enzym ist

also funktionell und ATP-Hydrolyse und  $\text{Na}^+$ -Transport sind miteinander gekoppelt. Dieses genetische System bietet viele Möglichkeiten, um die Struktur und Funktion von  $\text{Na}^+$ -gekoppelten ATP Synthasen zu untersuchen. Zusätzlich konnte noch die vermutlich  $\text{Na}^+$ -abhängige ATP Synthase aus dem Bakterium *Ruminococcus albus* in *E. coli* exprimiert werden, indem ein Plasmid mit den *atp*-Genen dieses Organismus verwendet wurde.

Das *atp*-Operon besteht aus acht Genen für die Untereinheiten der ATP Synthase und einem neunten Gen, *atpI*. Über die Funktion von *atpI* und dem Genprodukt von *atpI*, dem i-Protein, ist wenig bekannt. In Kapitel 4 wird ein Expressionssystem für rekombinantes i-Protein aus dem Bakterium *Propionigenium modestum* vorgestellt. Es wurde ein Expressionsplasmid mit dem *atpI* und dem Gen für die  $\alpha$ -Untereinheit hergestellt. Das i-Protein konnte in *E. coli* exprimiert und mit Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Keine Expression der  $\alpha$ -Untereinheit wurde gefunden. Dieses System kann hilfreich sein, um mögliche Interaktionen zwischen dem i-Protein und anderen Proteinen mit Hilfe von Koreinigungs-Versuchen nachzuweisen.

Die meisten  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP Synthasen transportieren Protonen, aber einige transportieren stattdessen Natriumionen. In Kapitel 5 wird diskutiert, welche Aminosäurereste die Ionenspezifität des c-Rings bestimmen. Die dazu verwendeten Daten stammen aus der Struktur des c-Rings von *I. tartaricus*, aus Mutagenese-Studien und aus dem Sequenzvergleich zwischen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}^+$ -transportierenden ATP Synthasen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dazu benutzt, um in den Protein- und Nukleotid-Datenbanken nach möglicherweise  $\text{Na}^+$ -transportierenden ATP Synthasen zu suchen.