



Doctoral Thesis

The revolving core of a biological nanomotor structural and functional investigations on the rotor ensemble of the bacterial F_1F_0 ATP synthase

Author(s):

Pogoryelov, Denys

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005478406> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 17391

**THE REVOLVING CORE OF A BIOLOGICAL NANOMOTOR:
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INVESTIGATIONS ON THE ROTOR
ENSEMBLE OF THE BACTERIAL F_1F_0 ATP SYNTHASE**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH) ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

DENYS POGORYELOV

Dipl. Biol., Odesa Mechnikov National University, Ukraine

Born September 3rd, 1977

Citizen of Ukraine

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Hauke Hennecke, examiner

Prof. Dr. Peter Dimroth, co-examiner

Zürich 2007

Summary

Adenosine triphosphate (ATP) and the electrochemical gradient of coupling ions across the biomembrane are the two energy currencies in all living cells. Both energy currencies drive a variety of energy-dependent, cellular processes. The interconversion between these two energy currencies is provided by a ubiquitous rotary enzyme - the F-type ATP synthase which is located at the energy coupling membrane of bacteria, mitochondria and chloroplasts. The F-type ATP synthases from all organisms are conserved in their structural organization and composed of two structurally and functionally distinct moieties, the F_1 (the soluble domain) and F_o (the membrane part). The water-soluble F_1 domain is composed of $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ subunits and it is connected to the membrane-embedded F_o complex, composed of the subunits ab_2c_n . The F_1 domain performs catalysis of ATP synthesis or hydrolysis, while the F_o part is responsible for the ion translocation across the membrane. The holoenzyme operates as a reversible rotary motor and can be divided into two functional parts – rotor and stator.

The F_o part converts the energy of the electrochemical gradient by ion translocation through the membrane into torque. The rotating parts of the enzyme transmit the kinetic energy into the F_1 domain to induce ATP synthesis. The stator is composed of the subunits $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$ and connects both F_1 and F_o moieties via a peripheral stalk formed by δb_2 . The rotor is comprised of an oligomeric ring-shaped assembly of c subunits which contacts the F_1 subunits γ and ϵ .

Detailed pictures of the γ/ϵ subunit assembly as well as the c oligomer have become available in the separate high resolution structures of the F_1 central stalk and the F_o rotor. The full rotor assembly is available at medium resolution and gives an inchoate view of the exact contact sites between its F_1 and F_o counter parts. A high resolution structure of the full rotor assembly is not yet available and despite a wealth of biochemical data available on this interaction, knowledge of the exact positions of the contact sites and the detailed mechanism of the rotor assembly require further characterization.

Following the introduction chapter the second chapter of this work provides new insights on the organization of the interface between rotor constituents from the *Ilyobacter tartaricus* ATP synthase. In this study a direct quantitative approach for the determination of binding characteristics of the interaction between rotor subunits is presented. The obtained data indicate a very tight binding between F_1 and F_o rotor constituents, comprised

by different contributions of the individual rotor subunits for this interaction. As a result of mutagenesis of the critical amino acid residues in all three rotor components and subsequent interaction analysis of the obtained mutants a two affinity mechanism of the rotor assembly is proposed. NMR data support the proposed interaction mechanism and indicated the structural rearrangements in the flexible regions of the γ subunit upon the rotor assembly.

The third and the fourth chapters of this work provide new insights on the variation of the oligomeric composition of c rings from different organisms. Over the past decade eight c ring stoichiometries from different organisms were determined (three by structural means) and this work more than doubles this knowledge. By using several approaches the c ring stoichiometries from nine different cyanobacterial species of four different taxonomic classes (*Chroococcales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales* and *Gloeobacteria*) and from different environmental groups (fresh water, thermal springs, soda lakes, calcareous rocks) were determined. Although, the sequences of cyanobacterial c subunits are very similar the oligomeric states of the c rings formed by these subunits range from 13 to 15. The stoichiometry number is crucial for the exact knowledge of $H^+(Na^+)$ to ATP ratios of F-ATP synthases and the findings of the variability of this number in cyanobacterial ATP synthases suggest that the oligomeric state of the c ring is adjusted to the bacterial cell energetics at the particular environmental conditions. Therefore, this work represents a first systematic approach to study the structural bases of the variation of such an important bioenergetics parameter as $H^+(Na^+)$ to ATP ratio of the ATP synthase. In this work we report for the first time about the pentadecameric (c_{15}) and tridecameric (c_{13}) c rings. Furthermore, the three examples of pentadecameric c rings underline that an F_1/F_0 symmetry mismatch is not an obligatory feature of all F-ATP synthases as it was proposed previously. In the discussion chapter the two new methodological approaches for the determination of the oligomeric state of c rings are deliberated. In the last section the implication of the variable c ring stoichiometries to the adaptation of different organisms to the particular thermodynamic challenges for ATP synthesis imposed by the physiological and environmental conditions is discussed.

Zusammenfassung

Adenosintriphosphat (ATP) und der elektrochemische Gradient von Kopplungen über die Biomembran sind die zwei Energiewährungen in allen lebenden Zellen. Beide Energiewährungen treiben viele verschiedene, energie-abhängige zelluläre Prozesse an. Die Umwandlung dieser beiden Energiewährungen wird von einem ubiquitären Rotationsenzym bewerkstelligt – die F-Typ ATP-Synthase, die in der Energiekopplungsmembran von Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert ist. Die F-Typ ATP-Synthase in allen Organismen ist in ihrer strukturellen Organisation konserviert und besteht aus zwei strukturell und funktionell unterschiedlichen Einheiten, den F_1 (lösliche Domäne) und den F_0 (Membranteil). Die wasserlösliche F_1 Domäne ist aus den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ zusammengesetzt und ist mit dem Membran-inserierten F_0 Komplex verbunden, welcher aus den Untereinheiten $a_b_2c_n$ zusammengesetzt ist. Die F_1 Domäne katalysiert die ATP-Synthese oder Hydrolyse, während der F_0 Teil für die Ionentranslokation über die Membran verantwortlich ist. Das Gesamtzym funktioniert als reversibler Rotationsmotor und kann in zwei funktionelle Teile, den Rotor und den Stator, aufgeteilt werden.

Der F_0 Teil wandelt durch die Ionentranslokation über die Membran die Energie eines elektrochemischen Gradienten in ein Drehmoment. Die rotierenden Teile des Enzyms übertragen die kinetische Energie in die F_1 Domäne und induzieren damit die ATP-Synthese. Der Stator ist aus den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\delta a_b_2$ zusammengebaut und verbindet die beiden F_1 und F_0 Teile über eine äussere Anbindung, die aus den Untereinheiten δb_2 zusammengesetzt ist. Der Rotor besteht aus einer oligomeren, ringförmigen Anordnung von c-Untereinheiten, die die γ - und ϵ -Untereinheiten des F_1 kontaktiert.

Ein detailliertes Bild sowohl der γ/ϵ Untereinheiten Zusammensetzung als auch des c-Oligomers konnte anhand einzelner hochauflösender Strukturen des F_1 -zentralen Verbindungsstück und dem F_0 Rotor gewonnen werden. Die ganze Zusammensetzung des Rotors ist in einer mittleren Auflösung bekannt und gibt nur ein unvollständiges Bild der genauen Kontaktstellen zwischen der F_1 und F_0 Gegenstücke her. Eine hochauflösende Struktur der ganzen Zusammensetzung des Rotors ist noch nicht bekannt und trotz der Verfügbarkeit grosser Mengen von biochemischen Daten über diese Interaktion, erfordert

die Festlegung der genauen Positionen der Kontaktstellen sowie ein detaillierter Mechanismus der Rotor-Zusammensetzung eine weitere Charakterisierung.

Im zweiten Kapitel dieser Arbeit sind neue Erkenntnisse über die Organisation der Grenzfläche zwischen den Rotor-Einheiten der *Ilyobacter tartaricus* ATP-Synthase zu finden. In dieser Untersuchung wird ein direkt-quantitativer Ansatz zur Bestimmung der Bindungscharakteristik der Interaktion zwischen den Rotor-Untereinheiten präsentiert. Die erhaltenen Daten indizieren eine sehr feste Bindung zwischen den F_1 - und F_0 -Rotorteilen, die aus verschiedenen Beiträgen der individuellen Rotor-Untereinheiten für diese Interaktion zusammengesetzt sind. Aufgrund Mutationen und der darauf folgenden Interaktionsanalyse der erhaltenen Mutationen an kritischen Aminosäuren in allen drei Rotor-Komponenten, kann ein Zweischnitt-Mechanismus der Rotorzusammensetzung vorgeschlagen werden. NMR Daten unterstützen den vorgeschlagenen Interaktions-Mechanismus und indizieren eine strukturelle Umordnung in den flexiblen Regionen der γ -Untereinheit während der Rotorzusammensetzung.

Das dritte und vierte Kapitel dieser Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Variation der oligomeren Zusammensetzung der c-Ringe aus verschiedenen Organismen. Über die letzten acht Jahre wurden acht c-Ring Stöchiometrien von verschiedenen Organismen bestimmt (drei mit Strukturmethoden) und diese Arbeit liefert mehr als eine Verdoppelung dieses Wissens. Unter Anwendung verschiedener Methoden wurden die c-Ring Stöchiometrien von neun verschiedenen, cyanobakteriellen Spezies aus vier verschiedenen taxonomischen Klassen (*Chroococcales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales* and *Gloeobacteria*), verschiedener ökologischer Gruppen (Frischwasser, Thermalquellen, Sodaseen und kalkhaltiges Gebirge), bestimmt. Obwohl die Sequenz der cyanobakteriellen c-Untereinheiten sehr ähnlich sind, variierten die oligomeren Zustände der c-Ringe, welche aus dieser Untereinheit gebildet werden, von 13 bis 15. Die Stöchiometrie ist wichtig zur genauen Bestimmung des $H^+(Na^+)$ zu ATP Verhältnisses von F-ATP-Synthasen und die Erkenntnis der Variabilität dieser Zahl in cyanobakteriellen ATP-Synthasen indiziert, dass der oligomere Zustand der c-Ringe an die bakterielle Zellenergetik der jeweiligen umgebenden Bedingungen angepasst ist. Deshalb repräsentiert diese Arbeit zum ersten Mal einen systematischen Ansatz, um die strukturelle Basis der Variation eines solch wichtigen bioenergetischen Parameters, wie das $H^+(Na^+)$ zu ATP Verhältnis von ATP-Synthasen, zu studieren. In dieser Arbeit berichten wir zum ersten Mal über pentadecamere (c_{15}) und tridecamere (c_{13}) c-Ringe. Weiters unterstreichen drei Beispiele von pentadecameren c-

Ringen, dass der F_1/F_0 -Symmetrie-Mismatch keine, wie zuvor vorgeschlage, unabdingliche Eigenschaft aller ATP-Synthasen darstellt. Im Diskussionskapitel werden zwei neue Methoden zur Bestimmung des oligomeren Zustandes von c-Ringen vorgestellt. Im letzten Abschnitt werden die Implikationen einer variablen c-Ring Stöchiometrie, im Hinblick auf die Adaption der ATP-Synthese verschiedener Organismen an spezielle thermodynamische Begebenheiten, vorgegeben durch die physiologischen und umgebenden Bedingungen, diskutiert.