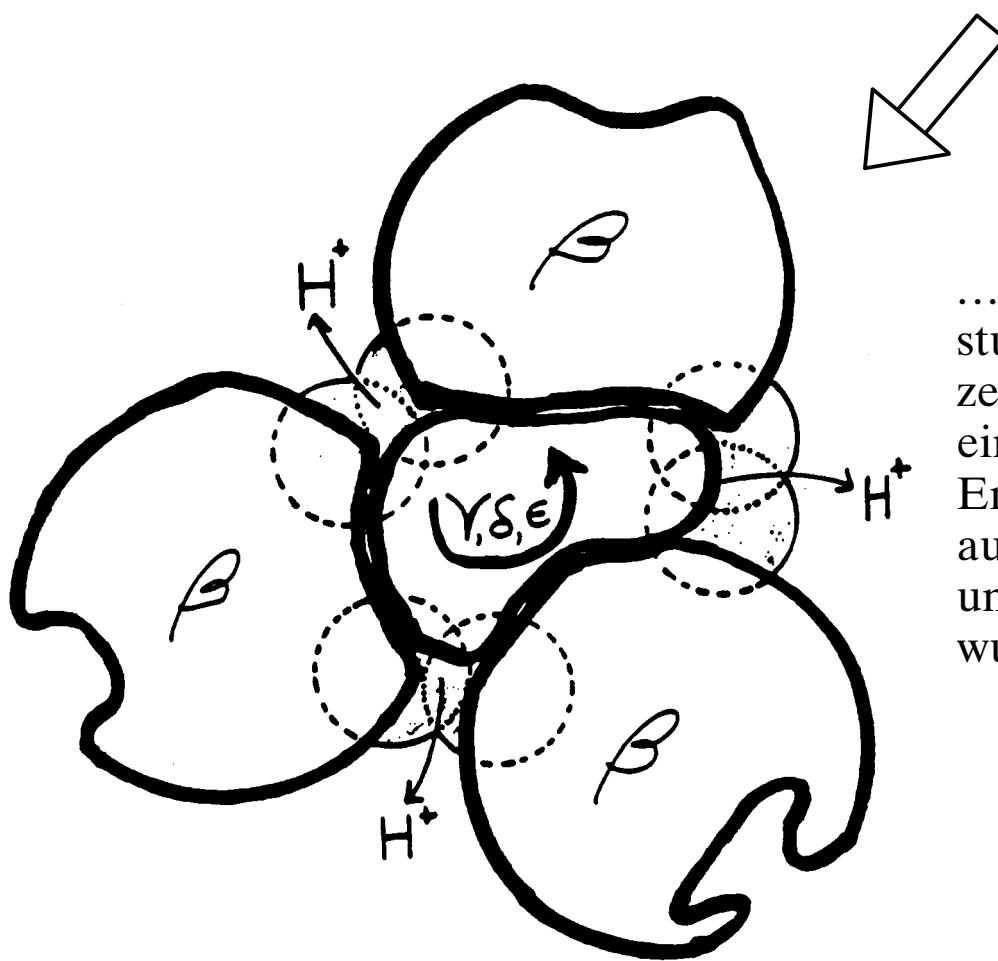
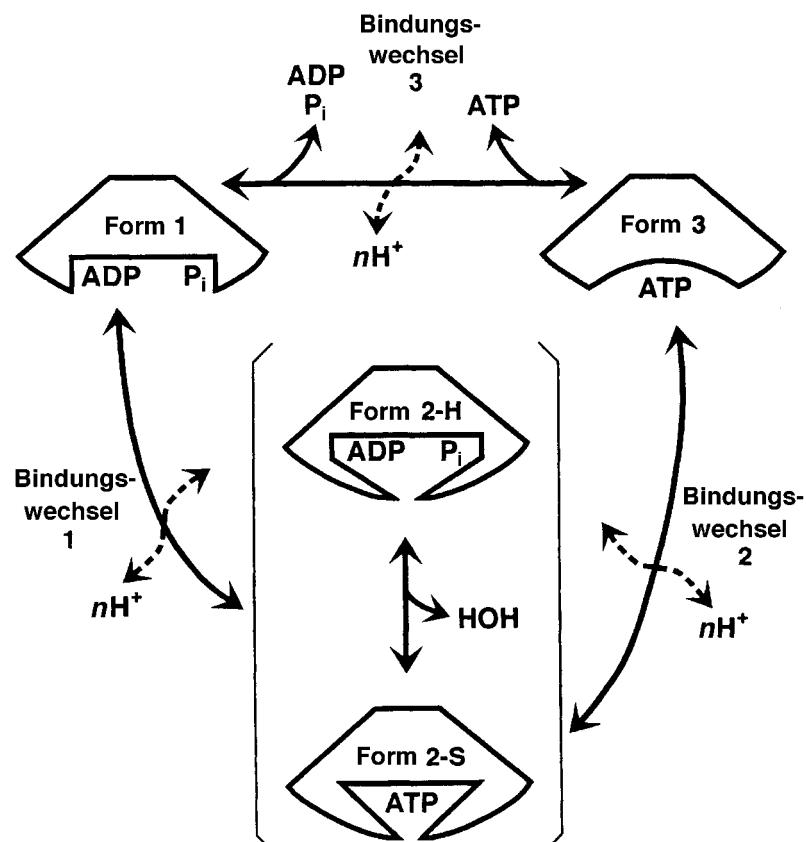


Der Erkenntnis,  
daß ein Bindungs-  
wechsel-Mechanis-  
mus bei der ATP-  
Synthase vorliegt, ...



... folgte das Po-  
stulat der Rotation  
zentraler Unter-  
einheiten des  
Enzyms, das später  
auch experimentell  
untermauert  
wurde.

## Energie, Leben und ATP (Nobel-Vortrag)\*\*

Paul D. Boyer\*

### Überblick

Ich empfinde tiefe Dankbarkeit für die ungewöhnliche und unerwartete Folge von Ereignissen, an deren Ende ich den Nobel-Preis erhielt. Es ist ein großes Glück für mich, der Sprecher für eine ansehnliche Zahl hervorragender Bioenergetiker zu sein, durch deren Anstrengungen der ungewöhnliche und neuartige Mechanismus eines der wichtigsten Enzyme der Natur aufgeklärt wurde. Vor mehr als 50 Jahren wurde ein lebenswichtiger zellulärer Prozeß, die oxidative Phosphorylierung, entdeckt. Dieser Prozeß wurde als der Hauptweg erkannt, auf dem unser Körper aus der aufgenommenen Nahrung Energie gewinnt, um sie für Myriaden essentieller zellulärer Funktionen zu verbrauchen, doch war der Mechanismus weitgehend unbekannt. In den folgenden Jahren wurden auf diesem Gebiet viele Fortschritte erzielt. Heute möchte ich davon berichten, wie Beiträge meiner Arbeitsgruppe in den siebziger Jahren zu neuen Hypothesen führten, die halfen, die Einschränkungen alter, nicht länger haltbarer Paradigmen zu überwinden. Wir entwickelten die Hypothesen weiter und klärten andere Aspekte des Prozesses in den achtziger und frühen neunziger Jahren auf. Dann wurden – wie John Walker, mein Mitpreisträger, berichtet<sup>[123]</sup> – die Röntgenstrukturdaten aus seiner Arbeitsgruppe bekannt. Die Strukturinformationen über das katalytische Zentrum des für die Phosphorylierung erforderlichen Enzyms stützten den neuesten und am wenigsten akzeptierten Aspekt unserer Hypothesen. Heute können John und ich davon berichten, wie eine wahrhaft bemerkenswerte molekulare Maschine die oxidative Phosphorylierung bewerkstelligt, ein Problem, das für mehr als ein halbes Jahrhundert ungelöst war.

Der wichtigste Mitspieler in diesem Prozeß ist Adenosintriphosphat, abgekürzt ATP. Während meines Studiums erkannte Fritz Lipmann<sup>[1]</sup> die zentrale Rolle, die ATP bei der biologischen Energiegewinnung und -nutzung spielt. Für

unsere Zwecke kann der Adenosinteil des Moleküls als praktischer Griff angesehen werden, mit dem ATP an Enzyme gebunden werden kann. Es sind die drei in einer Reihe miteinander verknüpften Phosphatgruppen, insbesondere die beiden terminalen, die an der Energiegewinnung beteiligt sind. Wenn die Energie, die in ATP gespeichert ist, genutzt wird, wird die letzte Anhydridbindung gespalten, und es entstehen Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat ( $P_i$ ). Die erneute Synthese von ATP unter Energieaufwand wird durch das Enzym ATP-Synthase katalysiert, welches in großen Mengen in den intrazellulären Membranen tierischer Mitochondrien, in Pflanzenchloroplasten, in Bakterien und anderen Organismen vorkommt. Das ATP, das von unserer ATP-Synthase gebildet wird, wird aus den Mitochondrien transportiert und für das Funktionieren von Muskeln, Gehirn, Nerven, Nieren, Leber und anderen Geweben sowie für den Transport und die Synthese vieler Verbindungen, die die Zellen benötigen, genutzt. Das ADP und das Phosphat, die dabei entstehen, werden zu den Mitochondrien zurücktransportiert und dort erneut mit aus den Oxidationen stammender Energie zu ATP umgesetzt. Ich schätze, daß die Synthese von ATP die häufigste chemische Reaktion in unserem Körper ist. Und weil außerdem Pflanzen und Mikroorganismen Energie durch dieselbe Reaktion gewinnen und nutzen und die Menge der Biomasse sehr groß ist, sind Bildung und Spaltung von ATP die häufigsten Nettoreaktionen auf der ganzen Welt. Das ist offensichtlich eine sehr wichtige Reaktion. Wie läuft sie nun ab?

Alle lebenden Zellen enthalten Hunderte großer, spezialisierter Moleküle, die Enzyme. Diese katalysieren die Hunderte chemischer Reaktionen, die für das Funktionieren einer Zelle notwendig sind. Dazu gehören auch die Reaktionen, durch die Energie von den Mitochondrien gespeichert wird, die in Muskeln, Gehirn und anderen Zellen dicht gepackt vorliegen. Im Inneren der Mitochondrien und eingebettet in ihre Membranen befinden sich Enzyme, die die Oxidation der Nahrung, die wir aufnehmen, katalysieren. Letztlich verbrennen sie sie, indem sie Sauerstoff verbrauchen und Kohlenstoffdioxid und Wasser freisetzen, in einer Reihe kleiner Schritte, von denen jeder durch ein eigenes Enzym katalysiert wird. Der Sauerstoff, den wir gerade atmen, wird vom Hämoglobin unserer roten Blutkörperchen transportiert und erreicht dann die Mitochondrien, wo er Eisenatome oxidiert, die Bestandteil eines spezialisierten Enzyms sind, das seinerseits andere Enzyme der Atmungskette oxidiert. Der Blutstrom befördert

[\*] Prof. P. D. Boyer  
Molecular Biology Institute  
Department of Chemistry and Biochemistry  
University of California at Los Angeles  
611 Circle Drive East, Los Angeles, CA 90095-1570 (USA)  
Fax: (+1) 310-206-7286  
E-mail: pdboyer@ucla.edu

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 1998.–Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

das produzierte Kohlendioxid zum Ausatmen in die Lunge. Die Sequenz von Oxidationen setzt Protonen frei und baut ein Ladungsgefälle auf, mit dem Protonen durch die Membran transportiert werden. In ähnlicher Weise ist in Chloroplasten die Nutzung der Lichtenergie an die Bildung der protonenmotorischen Kraft gekoppelt. Diese protonenmotorische Kraft sorgt dafür, daß Protonen (Wasserstoffionen) durch die ATP-Synthase transportiert werden, wobei ATP gebildet wird, wie vom Nobelpreisträger des Jahres 1978, Peter Mitchell, gezeigt wurde.<sup>[2]</sup> Die wichtige und sehr schwierige Frage, die für viele Jahre unbeantwortet blieb, war, wie die ATP-Synthase die protonenmotorische Kraft nutzt, um ATP zu bilden.

## Die ATP-Synthase

Zunächst werde ich zusammenfassen, was heute über die ATP-Synthase bekannt ist, dann werde ich anhand einiger Beispiele berichten, wie diese Kenntnisse erlangt wurden. Das Enzym nutzt einen neuartigen Mechanismus, der katalytische Schritte enthält, die sich von allen anderen unterscheiden, die man bislang bei Enzymen gefunden hat. Eine schematische Darstellung der Enzymfunktion ist auf der Internetseite der Nobel-Stiftung<sup>[124]</sup> zu finden. Ein ähnliches Schema wurde in einem Artikel von Richard Cross<sup>[3]</sup> veröffentlicht. Die ATP-Synthase besteht aus je drei Kopien der großen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und hat drei katalytische Zentren, die zum größten Teil von der  $\beta$ -Untereinheit gebildet werden und sich an der Kontaktfläche zwischen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit befinden. Eine zentrale  $\gamma$ -Untereinheit sowie kleinere  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheiten vervollständigen den mit  $F_1$  bezeichneten Enzymteil, der die Zusammensetzung  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  hat, wobei die Untereinheiten nach abnehmender Größe geordnet sind. Dieser Teil des Enzyms wurde zuerst im Labor des glänzenden Forschers Efraim Racker isoliert und als ATPase identifiziert.<sup>[4]</sup> Mehrere führende Forscher auf dem Gebiet der Bioenergetik stammen aus seiner Schule. Die  $F_1$ -ATPase<sup>[\*]</sup> katalysiert die Hydrolyse, nicht aber die Synthese von ATP. Der Rest des Enzyms, der in

die Membran eingebettet ist, wird als  $F_0$ -Teil bezeichnet; bei *E. coli* besteht  $F_0$  aus einer großen  $\alpha$ -Untereinheit, zwei  $\beta$ -Untereinheiten und wahrscheinlich zwölf viel kleineren  $\gamma$ -Untereinheiten. Der  $F_0$ -Teil des mitochondrialen Enzyms ist viel komplexer aufgebaut. Die Bezeichnung  $F_1F_0$ -ATPase wird in der Literatur manchmal für die vollständige ATP-Synthase benutzt.

Während der Nettosynthese von ATP agieren die drei katalytischen Einheiten nacheinander, indem sie zuerst ADP und Phosphat binden, dann ihre Konformation ändern und dabei fest gebundenes ATP bilden, danach ihre Konformation nochmals ändern und dabei das ATP freisetzen. Diese Änderungen kommen durch eine verblüffende Rotation während der Katalyse zustande. Die Katalyse wird vorangetrieben, weil der innere Kern des Enzyms sich dreht; dies wiederum wird durch die Protonen ausgelöst, die durch die Mitochondrienmembran fließen. Ich teile die Ansicht, daß die Aufklärung des Mechanismus der ATP-Synthase eine große Errungenschaft der modernen Biochemie ist. Ich bin mir außerdem sehr wohl dessen bewußt, daß diese Errungenschaft das Ergebnis der Forschung vieler Mitglieder der Bioenergetik-Gemeinde ist, deren Leistung gebührend gewürdigt werden sollte. Durch den Nobel-Preis werden aber immer nur einer oder einige wenige von ihnen zu Helden gemacht. Das Schicksal hat es gut mit mir gemeint, so daß ich heute derjenige bin, der diesen Vortrag hält, weil meine Arbeitsgruppe die ersten Erkenntnisse über drei ungewöhnliche Eigenschaften des von der ATP-Synthase katalysierten Prozesses gewonnen hat, dabei aber von vielen Informationen abhängig war, die von anderen beigesteuert wurden. Diese ungewöhnlichen Eigenschaften sind energiegekoppelte Veränderungen der Bindungseigenschaften, darunter auch die Freisetzung von fest gebundenem ATP, sequentielle Konformationsänderungen von drei katalytischen Zentren, um diese Veränderungen der Bindungseigenschaften zu ermöglichen, und ein Rotationsmechanismus, der die Konformationsänderungen vorantreibt. Solche Charakteristika waren bisher in der Enzymologie unbekannt.

## Frühe Versuche

Mitte der fünfziger Jahre, etwa zwölf Jahre nach meiner Promotion, wurden einige Experimente zur Aufklärung der

[\*] Abkürzungen für  $F_1$ -ATPasen aus verschiedenen Quellen:  $MF_1$ , aus Herz-Mitochondrien;  $CF_1$ , aus Chloroplasten;  $EcF_1$ , aus *E. coli*;  $TF_1$ , aus Kagawas thermophilem Bakterium.



Paul D. Boyer, geboren 1918 in Provo, Utah, erhielt 1939 seinen B.S. in Chemie von der Brigham Young University und promovierte 1943 zum Ph.D. in Biochemie an der University of Wisconsin, Madison. Nach zwei Jahren an der Stanford University, wo er im Rahmen eines militärischen Forschungsprojekts die Stabilisierung von Serumalbumin erforschte, ging er als Assistant Professor an die University of Minnesota. Dort begann er mit Untersuchungen zur oxidativen Phosphorylierung. Seit 1963 ist er Professor am Department of Chemistry and Biochemistry der University of California in Los Angeles, wo er von 1965 bis 1983 auch Gründungsdirektor des Molecular Biology Institute war. 1955 forschte er als Guggenheim-Stipendiat in Schweden und erhielt den Award in Enzyme Chemistry der American Chemical Society. Er ist Ehrendoktor der Universitäten von Stockholm, Minnesota und Wisconsin. 1989 erhielt er den Rose Award der American Society of Biochemistry and Molecular Biology und 1997 den Nobel-Preis für Chemie.

ATP-Synthese in meinem Labor durchgeführt. Eines davon befaßte sich mit der Energiegewinnung bei der Glykolyse. Wir fanden heraus, daß die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat auch ohne anorganisches Phosphat ablaufen konnte,<sup>[5]</sup> was auf die Beteiligung eines Acyl-Enzym-Intermediats schließen ließ. Durch die Ausweitung dieser Experimente und bedeutende Befunde aus der Arbeitsgruppe von Racker<sup>[6]</sup> wurde gezeigt, daß eine Thiolgruppe des Enzyms acyliert und das acyierte Enzym durch anorganisches Phosphat gespalten wird; dabei entsteht 1,3-Diphosphoglycerat, von dem dann eine Phosphatgruppe auf ADP übertragen wird, so daß ATP entsteht. Nach dem Nachweis, daß die Bildung zweier kovalenter Intermediate, des acylierten Enzyms und des phosphorylierten Substrats, der ATP-Bildung vorausgehen, erschien es logisch, auch bei der oxidativen Phosphorylierung nach ähnlichen Intermediaten zu suchen. Wie wir und andere erst Jahre später erkannten, war dieser Ansatz nicht brauchbar.

Eine größere Bedeutung für die Erforschung der ATP-Synthase hatten Experimente mit <sup>18</sup>O- und <sup>32</sup>P-markierten Verbindungen, die durchgeführt wurden, weil Mildred Cohn zeigte, daß Mitochondrien einen raschen Austausch von Sauerstoffatomen zwischen Phosphat und Wasser katalysieren.<sup>[7]</sup> Aus den <sup>32</sup>P-Versuchen konnten wir ableiten, daß die Gesamtreaktion der oxidativen Phosphorylierung dynamisch reversibel ist.<sup>[8]</sup> Die <sup>18</sup>O-Experimente erbrachten das erstaunliche Ergebnis, daß der Austausch der Sauerstoffatome zwischen anorganischem Phosphat und Wasser noch schneller abläuft. Wir führten dies auf die Bildung eines kovalenten Intermediats zurück, das dann durch anorganisches Phosphat gespalten wird (Abb. 1). Unsere Versuche, eine Mitochondrienfraktion zu isolieren, die den ersten Reaktionsschritt bei

empfindlicher Sonde fanden wir in den Mitochondrien ein <sup>32</sup>P-markiertes Protein, das ein Zwischending aus anorganischem Phosphat und ATP trug. Wir identifizierten es als ein zuvor unbekanntes phosphoryliertes Protein mit einer Phosphorylgruppe an einem Histidinrest. Fälschlicherweise glaubten wir, wir hätten ein Intermediat der oxidativen Phosphorylierung gefunden, doch hinterher konnten wir es als Intermediat der GTP- oder ATP-Bildung durch die Succinyl-CoA-Synthetase des Citronensäurecyclus identifizieren.<sup>[9]</sup> Wir hatten um die Goldmedaille gerungen, aber nur Bronze gewonnen.

### <sup>18</sup>O-Austausche und ein neues Konzept

In den folgenden Jahren befaßten wir uns hauptsächlich mit anderen Problemen, u. a. mit dem aktiven Transport in *E. coli*. Diese Untersuchungen ergaben Hinweise auf einen nicht identifizierten energiereichen Zwischenzustand,<sup>[10]</sup> den wir aber nicht charakterisierten. Auch den Gerüchten aus Peter Mitchells Arbeitsgruppe schenkten wir zu wenig Beachtung. Es war schwierig für mich, die protonenmotorische Kraft als Triebkraft der ATP-Bildung zu akzeptieren, weil ich mir keinen logischen Ablauf dieses Prozesses vorstellen konnte. Aber der Reiz der ATP-Synthase blieb bestehen, und so versuchten wir, bei der Photophosphorylierung durch Spinat-Thylakoidmembranen und bei der oxidativen Phosphorylierung durch Herz-Mitochondrien neue Spuren zu finden. Die Messungen des <sup>18</sup>O-Austauschs, mit denen wir den Vorgang untersuchten, lieferten die entscheidende Erkenntnis. Die Austausch-Varianten, die gemessen werden können, lassen sich mit Hilfe von Abbildung 2 einfach verstehen. Der

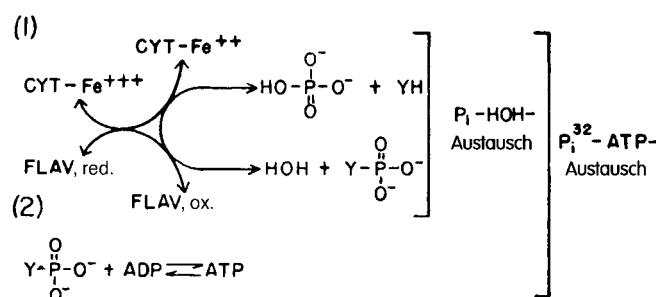


Abb. 1. Austausch der Phosphat-Sauerstoffatome zwischen <sup>32</sup>P<sub>i</sub> und ATP und zwischen P<sub>i</sub> und HOH für die Gesamtreaktion ADP + <sup>32</sup>P<sub>i</sub> ⇌ ATP + HOH sowie dynamische Reversibilität der oxidativen Phosphorylierung (aus Lit.<sup>[7]</sup> mit Veränderungen übernommen). In dieser frühen Untersuchung wurden kovalente Intermediate vorgeschlagen, um zu erklären, daß der Sauerstoffaustausch schneller abläuft als die Umkehr der Gesamtreaktion. FLAV = Flavin, CYT = Cytochrom.

der oxidativen Phosphorylierung katalysiert, der zur Bildung eines Intermediats führt, blieben erfolglos. Etwa sechzehn Jahre später erkannten wir, daß ein solches Zwischenprodukt einfach nicht gebildet wird, und daß der schnelle Austausch von <sup>18</sup>O aus der schnellen und reversiblen Bildung von fest gebundenem ATP resultiert.

In den sechziger Jahren führten wir eine andere Versuchsreihe durch, die nur teilweise erfolgreich war. Mit <sup>32</sup>P als

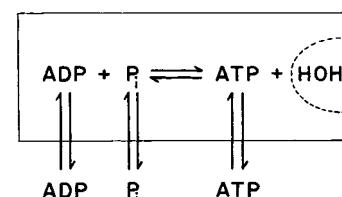


Abb. 2. Bindungs-, Umwandlungs- und Freisetzungsschritte beim Sauerstoffaustausch.

rechteckige Kasten stellt ein katalytisches Zentrum dar. ADP und P<sub>i</sub> können daran binden und werden zu fest gebundenem ATP umgesetzt. Das dabei gebildete Wasser wird gegen Wasser aus dem umgebenden Medium ausgetauscht. Bei der Umkehrreaktion wird ein Sauerstoffatom aus einem Wasser-Molekül in das gebundene P<sub>i</sub>-Ion eingebaut. Wenn P<sub>i</sub> sich im katalytischen Zentrum frei drehen kann, besteht eine Wahrscheinlichkeit von 75 %, daß bei der erneuten Bildung von ATP dieses ein aus dem Wasser stammendes Sauerstoffatom enthält. Unterschiedliche Austausche von Phosphat-Sauerstoffatomen mit Wasser-Sauerstoffatomen sind meßbar (Tabelle 1). Der Austausch von Sauerstoffatomen ist daher eine empfindliche Sonde für Reaktionsschritte, die sonst verborgen bleiben könnten.

Die <sup>18</sup>O-Sonden warfen jedoch einen verwirrenden Aspekt auf: Der Sauerstoffaustausch zwischen gebundenem anorga-

Tabelle 1. Von der ATP-Synthase katalysierter Austausch von Phosphat-Sauerstoffatomen gegen aus dem Wasser stammende Sauerstoffatome.

Austausch	Messung
gebundenes $P_i \rightleftharpoons HOH$	Hydrolyse von $[\gamma^{18}O]ATP$ und Bestimmung des $^{18}O$ -Anteils im gebildeten $P_i$
gebundenes ATP $\rightleftharpoons HOH$	Synthese von ATP aus $[^{18}O]P_i$ und Bestimmung des $^{18}O$ -Anteils im gebildeten ATP
freies $P_i \rightleftharpoons HOH$	Bestimmung des Verlustes von $^{18}O$ aus $[^{18}O]P_i$ , wenn $P_i$ bindet, ausgetauscht wird und wieder ins Reaktionsmedium freigesetzt wird
freies ATP $\rightleftharpoons HOH$	Bestimmung des Verlustes von $^{18}O$ aus $[\gamma^{18}O]ATP$ , wenn ATP bindet, ausgetauscht wird und wieder ins Reaktionsmedium freigesetzt wird

nischem Phosphat und Wasser ( $P_i \rightleftharpoons HOH$ ) war ungewöhnlich unempfindlich gegenüber Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung. Obwohl die Oxidation in Gegenwart des potennten Entkopplers S-13 ohne Nettosynthese von ATP ablief, fand der schnelle Austausch von Wasser gegen Phosphat-Sauerstoffatome weiterhin statt (Abb. 3). Die Bedeutung dieser Beobachtung blieb uns eine geraume Zeit verborgen. Eines Tages aber, während ich einem Seminarvortrag zuhörte, den ich nicht verstand, zermarterten die Ergebnisse der Sauerstoffaustauschexperimente mein Gehirn. Und dann wurde mir klar, daß die Ergebnisse dadurch erklärt werden könnten, daß die aus den Oxidationsprozessen stammende Energie nicht dazu verwendet wird, das ATP-Molekül zu *synthetisieren*, sondern das fest gebundene ATP-Molekül *freizusetzen*. Die reversible Bildung des fest gebundenen ATP-Moleküls könnte im katalytischen Zentrum ohne Beteiligung der protonenmotorischen Kraft weitergehen und so den gegenüber Entkopplern unempfindlichen Sauerstoffaustausch ermöglichen. So hatten wir nun ein neues Konzept für die oxidative Phosphorylierung und wollten es unbedingt

den auf diesem Gebiet forschenden Wissenschaftlern vorstellen. Die Herausgeber des *Journal of Biological Chemistry* schlugen die Gelegenheit aus, dieses neue Konzept zu veröffentlichen. Ich nutzte das Privileg meiner noch jungen Mitgliedschaft in der National Academy of Sciences<sup>[11]</sup> (Abb. 4), um diesen ersten Baustein dessen zu publizieren,

Reprinted from  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
Vol. 70, No. 10, pp. 2837-2839, October 1973

## A New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions

(protein conformational change/uncouplers/mitochondria)

PAUL D. BOYER, RICHARD L. CROSS, AND WILLIAM MOMSEN

The Molecular Biology Institute and The Department of Chemistry, University of California, Los Angeles, Calif. 90024

Contributed by Paul D. Boyer, June 25, 1973

**ABSTRACT** The  $P_i \rightleftharpoons HOH$  exchange reaction of oxidative phosphorylation is considerably less sensitive to uncouplers than the  $P_i \rightleftharpoons ATP$  and  $ATP \rightleftharpoons HOH$  exchanges. The uncoupler-insensitive  $P_i \rightleftharpoons HOH$  exchange is inhibited by oligomycin. These results and other considerations suggest that the relatively rapid and uncoupler-insensitive  $P_i \rightleftharpoons HOH$  exchange results from a rapid, reversible hydrolysis of a tightly but noncovalently bound ATP at a catalytic site for oxidative phosphorylation, concomitant with interchange of medium and bound  $P_i$ . Such tightly bound ATP has been demonstrated in submitochondrial particles in the presence of uncouplers,  $P_i$ , and ADP, by rapid labeling from  $^{32}P$ , under essentially steady-state phosphorylation conditions. These results lead to the working hypothesis that in oxidative phosphorylation energy from electron transport causes release of preformed ATP from the catalytic site. This release could logically involve energy-requiring protein conformational change.

Abb. 4. Der Beginn der Etablierung des Bindungswechsel-Mechanismus. Auszug aus der Veröffentlichung<sup>[11]</sup> in der ein neues Konzept der oxidativen Phosphorylierung vorgestellt wurde.

was der Bindungswechsel-Mechanismus der ATP-Synthese werden sollte. Unabhängig davon äußerte auch Slaters Arbeitsgruppe aufgrund der Gegenwart fest gebundener Nucleotide in isolierten  $F_1$ -ATPasen die Vermutung, daß der Energieaufwand mit ihrer Freisetzung zusammenhängen könne.<sup>[12]</sup>

Unser Eindruck, daß das neue Konzept tragfähig sei, wurde durch begleitende Untersuchungen der ATPase-Aktivität von Muskel-Myosin bestärkt. Anhand von Daten aus meinem und aus Koshlands Labor<sup>[13, 14]</sup> ließ sich schließen, daß Myosin den Austausch  $P_i \rightleftharpoons HOH$  sowohl für freies  $P_i$  aus dem Medium als auch für an das katalytische Zentrum gebundenes  $P_i$  katalysieren konnte. Die Vermutung, Myosin könne spontan fest gebundenes ATP aus ADP aus dem Medium und  $P_i$  bilden, ließ sich experimentell nachweisen.<sup>[15]</sup> Diese und andere auffällige Eigenschaften von Myosin wurden gleichzeitig auch in Untersuchungen von Trentham et al. nachgewiesen.<sup>[16, 17]</sup> Wichtig war, daß der Sauerstoffaustausch auf der Basis der Bildungs- und Spaltungsgeschwindigkeit des gebundenen ATPs quantifiziert werden konnte.

Nicht alle Bioenergetiker akzeptierten bereitwillig das Konzept, daß die aufgewandte Energie hauptsächlich der Freisetzung des gebundenen ATPs dient. Mitchell zog bei-

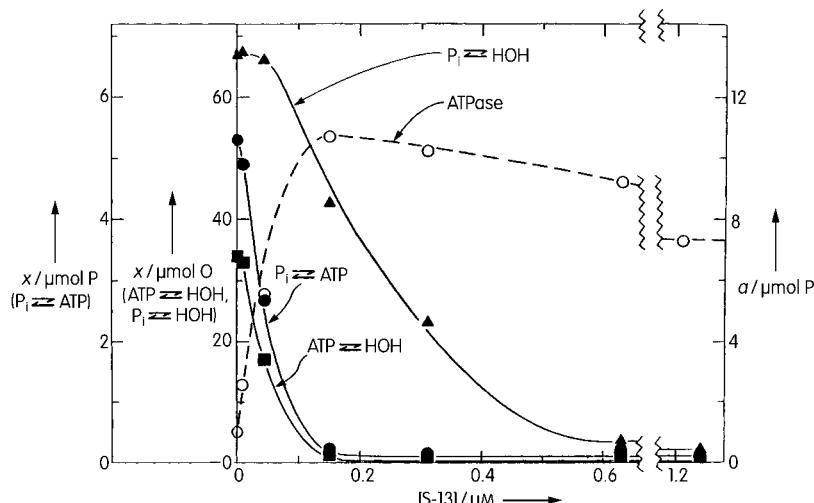


Abb. 3. Die Unempfindlichkeit des Austauschs der Sauerstoffatome von  $P_i$  gegenüber Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung im Vergleich zu anderen untersuchten Reaktionen. Mit unterschiedlichen Entkopplern kam man zu ähnlichen Ergebnissen; im dargestellten Experiment wurde der Entkoppeler S-13 benutzt.  $a$  = ATPase-Aktivität, angegeben in  $\mu\text{mol}$  freigesetztem  $P_i$ ;  $x$  = Austausch, angegeben in  $\mu\text{mol}$  P ( $P_i \rightleftharpoons ATP$ ) oder in  $\mu\text{mol}$  O ( $ATP \rightleftharpoons HOH$ ,  $P_i \rightleftharpoons HOH$ ).

spielsweise einen Mechanismus vor, bei dem die Protonen zum katalytischen Zentrum wandern und dort die Bildung von ATP aus ADP und  $P_i$  induzieren. Für mich erschien es logisch, daß die Protonentranslokation indirekt über Änderungen der Proteinkonformation an die ATP-Freisetzung gekoppelt war.<sup>[18]</sup> Ohne mich zu informieren, wurde meine Publikation von einer Entgegnung Mitchells begleitet,<sup>[19]</sup> worauf ich ein vollständigeres Modell der konformativen Kopplung präsentierte.<sup>[20]</sup> Im Laufe der Zeit wurde diese indirekte Art, in der die Protonentranslokation die ATP-Bildung antreibt, allgemein akzeptiert, was aber Mitchells herausragender Erkenntnis über die protonenmotorische Kraft als Mittel, Energie für ATP-Bildung und aktiven Transport bereitzustellen, keinen Abbruch tut.

## Katalytische Kooperativität

Nun sahen wir uns in eine aufregende Periode der Forschung versetzt. Als wir die mitochondriale oxidative Phosphorylierung weiter mit  $^{32}\text{P}$ - und  $^{18}\text{O}$ -Austauschexperimenten untersuchten, kamen einige irritierende Aspekte ans Licht. Wenn zum Beispiel submitochondriale Partikel, die zur oxidativen Phosphorylierung fähig waren, ATP hydrolysierten, fand ein lebhafter Sauerstoffaustausch zwischen ATP aus dem Medium und Wasser statt. Entfernte man das Produkt ADP, brach der Austausch zusammen (Abb. 5), obwohl die

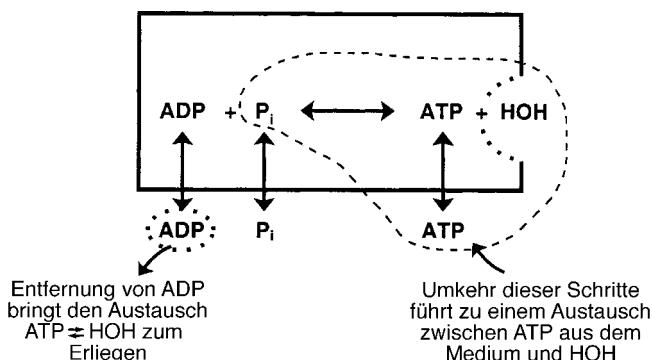


Abb. 5. Katalyse der Synthese und der Hydrolyse von ATP durch submitochondriale Partikel. Die Entfernung von ADP aus dem Medium führt dazu, daß der Sauerstoffaustausch zwischen ATP aus dem Medium und Wasser zum Erliegen kommt.

Umkehr der ATP-Hydrolyse am Enzym weiterhin abließ. Irgendwie wurde die Freisetzung von ATP durch das Fehlen von ADP aus dem Medium, das an das Enzym binden konnte, blockiert. Ein Grund dafür war nicht ersichtlich, wenn die Sauerstoffaustauschreaktionen mit dem einfachen Schema aus Abbildung 2 erklärt wurden. In ähnlicher Weise beendete die Entfernung von ATP aus dem Medium während der Nettosynthese von ATP den Sauerstoffaustausch zwischen  $P_i$  aus dem Medium und Wasser. Eine Erklärung für diesen Befund und andere damit in Zusammenhang stehende Beobachtungen schlug einer meiner Diplomanden, Celik

Kayalar aus der Türkei, vor. Celik sagte, er könne sich diese Ergebnisse erklären, wenn die katalytischen Zentren kooperativ arbeiten müßten, so daß ATP aus einem Zentrum nicht freigesetzt werden könnte, wenn kein ADP und  $P_i$  für die Bindung an einem anderen Zentrum verfügbar sei, oder daß  $P_i$  aus einem Zentrum nicht freigesetzt werden könnte, wenn sich kein ATP für die Bindung an einem anderen Zentrum im Medium befindet. Zusammen mit Jan Rosig aus Holland wies Celik die sequentielle und kooperative Beteiligung von katalytischen Zentren der Synthase während der oxidativen Phosphorylierung oder in solchen submitochondrialen Partikeln nach, die zur oxidativen Phosphorylierung befähigt waren.<sup>[21, 22]</sup> Außerdem wiesen ihre Ergebnisse darauf hin, daß die Bindungswechsel, die mit der Protonentranslokation einhergehen, auch die feste Bindung von  $P_i$  bewirkten.

Adolfsen und Moudrianakis vermuteten, daß die Kooperativität zwischen den katalytischen Zentren auch in der isolierten  $F_1$ -ATPase auftreten könnte, denn sie hatten beobachtet, daß ein fest gebundenes ADP freigesetzt wurde, wenn ATP durch eine bakterielle  $F_1$ -ATPase gespalten wurde.<sup>[23]</sup> Versuche in meiner Arbeitsgruppe bestätigten eine starke Kooperativität zwischen den katalytischen Zentren der isolierten ATPase, so wie wir sie bei der ATP-Synthase gefunden hatten. Wenn  $MF_1$  relativ hohe Konzentrationen von ATP hydrolysiert, enthalten die neugebildeten  $P_i$ -Moleküle nur wenig mehr als das eine aus dem Wasser stammende Sauerstoffatom, das für die Hydrolyse benötigt wird (Abb. 6).

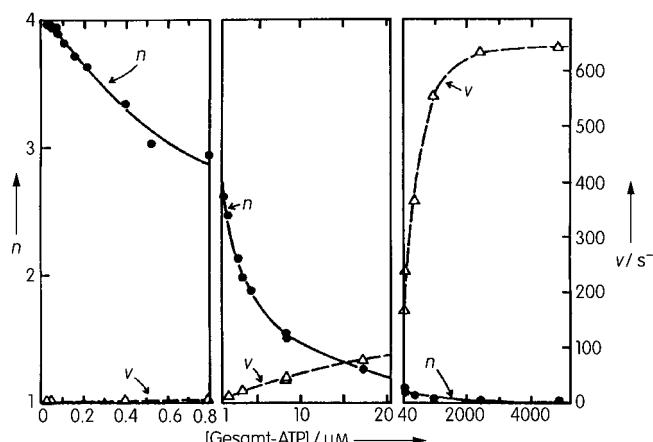


Abb. 6. Einfluß der ATP-Konzentration auf die Zahl der aus dem Wasser stammenden Sauerstoffatome, die in jedes freigesetzte  $P_i$ -Ion eingebaut werden ( $n = \text{O pro } P_i$ ), sowie auf die Netto geschwindigkeit  $v$  der von der  $MF_1$ -ATPase katalysierten Hydrolyse (aus Lit.[10] mit Veränderungen übernommen).

Wenn die ATP-Konzentration allerdings erniedrigt wird, findet ein lehrreicher Wechsel statt. Die Hydrolysegeschwindigkeit nimmt natürlich ab, aber die Zahl der aus dem Wasser stammenden Sauerstoffatome, die in jedem neugebildeten Molekül  $P_i$  enthalten sind, nimmt bis auf fast vier zu. Man kann errechnen, daß nahezu 400 Rückreaktionen der Hydrolyse von gebundenem ATP ablaufen, bevor das gebundene  $P_i$  freigesetzt wird.<sup>[10]</sup> Neugebildetes und gebundenes ADP und  $P_i$  können nicht freigesetzt werden, bevor nicht ATP verfügbar

bar ist, um an einem anderen katalytischen Zentrum zu binden.<sup>[\*]</sup>

Nach diesen Versuchen war es wahrscheinlich, daß die unerwartete katalytische Kooperativität eine hervorstechende Eigenschaft der ATP-Synthase war. Zu dieser Zeit war die vorherrschende Auffassung die, daß das Enzym nur zwei katalytische Zentren habe, und ein Diagramm, das einen solchen Zwei-Zentren-Mechanismus illustrierte, erschien 1977 in meinem Übersichtsartikel in der *Annual Review of Biochemistry*.<sup>[25]</sup> Wir erkannten jedoch, daß, wenn wir drei katalytische Zentren nachweisen könnten, ein Drei-Zentren-Mechanismus, so wie er zwischenzeitlich nachgewiesen ist, wahrscheinlicher wäre.<sup>[22, 26]</sup> Der kritische Punkt war, daß ein fest gebundenes ATP nicht freigesetzt werden konnte, bevor ADP und  $P_i$  an ein zweites oder ein zweites und ein drittes katalytisches Zentrum gebunden und die durch die protonenmotorische Kraft angetriebenen Bindungswechsel stattgefunden haben. Diese positive Kooperativität bedeutete, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen, sowohl bei der Synthese als auch bei der Hydrolyse von ATP, stets ein fest gebundenes ATP in einem katalytischen Zentrum vorhanden sein sollte. Dies wollten wir experimentell überprüfen. Die Experimente wurden mit submitochondrialen Partikeln<sup>[27]</sup> oder Chloroplastenthylakoiden<sup>[28]</sup> durchgeführt, so daß die Nettosynthese von ATP bei ADP-Konzentrationen stattfand, die weit unterhalb des apparenten  $K_m$ -Wertes von ADP für die maximale Phosphorylierungsgeschwindigkeit lagen. Ungefähr ein fest gebundenes ATP, das an der Nettosynthese von ATP beteiligt war, wurde in jeder Synthase nachgewiesen. Diese Daten deuten überzeugend darauf hin, daß eine starke positive katalytische Kooperativität unter den Bedingungen besteht, bei denen tatsächlich eine Synthese von ATP stattfindet. Weitere Ergebnisse aus unserem und aus anderen Labors, die mit der katalytischen Kooperativität konsistent sind oder sie favorisieren, sind an anderer Stelle zusammengefaßt.<sup>[29]</sup>

1982 zeigten Feldman und Sigman, daß sich bei der  $CF_1$ -ATPase oder der ATP-Synthase aus Chloroplastenthylakoiden, die im aktiven Zentrum ein fest gebundenes ADP haben, bei relativ hohen Konzentrationen von  $P_i$  im Medium langsam eine Gleichgewichtskonzentration an gebundenem ATP einstellt.<sup>[30, 31]</sup> Die Charakterisierung dieser Katalyse an einem einzigen aktiven Zentrum unterstützte unser Konzept der Synthese von fest gebundenem ATP ohne Kopplung an die

[\*] Wir versäumten es, dieses aufregende Ergebnis etwa zehn Jahre früher zu erhalten. Zu jener Zeit kam Efraim Racker mit einer Probe  $F_1$ -ATPase in mein Labor, damit wir untersuchen konnten, ob sie einen Sauerstoffaustausch während der ATP-Hydrolyse katalysierte. Wir führten die Reaktion bei relativ hoher ATP-Konzentration durch und fanden den Einbau von nur einem aus dem Wasser stammenden Sauerstoffatom, wie es für die Spaltungsreaktion erforderlich war. Harvey Penefsky machte eine ähnliche Beobachtung.<sup>[24]</sup> Wenn wir gemessen hätten, was bei niedrigeren ATP-Konzentrationen geschieht, hätten wir damals schon die Kooperativität der katalytischen Zentren entdecken können. Wir hatten allerdings keinen Grund anzunehmen, daß sich die Enzymkatalyse für jedes gespaltene Substrat so dramatisch mit der Substratkonzentration ändern würde. Die starke katalytische Kooperativität, die wir später nachwiesen, war zuvor noch für kein anderes Enzym beschrieben worden.

protonenmotorische Kraft. Faktoren, die die Bildung von ATP an den katalytischen Zentren von Myosin und  $F_1$ -ATPasen fördern, sind wahrscheinlich die sehr feste bevorzugte Bindung von ATP und – wie de Meis<sup>[32]</sup> vorgeschlagen hat – eine niedrige Wasseraktivität.

Ebenfalls 1982 trug Penefsky mit seinen Arbeiten zum Durchbruch des Konzeptes der katalytischen Kooperativität bei den auf diesem Gebiet arbeitenden Wissenschaftlern bei. Er hatte die Geschwindigkeitskonstanten der Umsetzungs-, Bindungs- und Freisetzungsschritte der  $MF_1$  in Gegenwart von ATP in Konzentrationen bestimmt, die niedriger waren als die Stoffmengenkonzentration des Enzyms, also unter Bedingungen, die man als Ein-Zentren-Katalyse bezeichnete.<sup>[33, 34]</sup> Wichtig war auch der aus demselben Labor stammende Nachweis, daß die Hydrolyse von Trinitrophenyl-ATP, das an ein einziges katalytisches Zentrum gebunden war, durch die Bindung eines weiteren Moleküls Trinitrophenyl-ATP erheblich beschleunigt wurde.<sup>[35]</sup>

Mehrere Forscher wiesen daraufhin eine langsame Ein-Zentren-Katalyse bei unterschiedlichen  $F_1$ -ATPasen nach. Da man bei  $TF_1$  jedoch keine eindeutige Ein-Zentren-Katalyse nachweisen konnte, erhob sich die Frage, ob die Kooperativität, die wir beobachtet hatten, ein allgemeines Phänomen bei  $F_1$ -ATPasen sei.<sup>[36]</sup> Daß tatsächlich eine langsame Ein-Zentren-Katalyse ablieft, wurde durch die Zunahme des Sauerstoffaustausches zwischen gebundenem  $P_i$  und Wasser bei sinkender ATP-Konzentration nachgewiesen.<sup>[37]</sup> Einige Jahre lang bestand offenbar allgemeine Übereinstimmung darin, daß eine langsame Ein-Zentren-Katalyse abläuft und daß die Katalysegeschwindigkeit deutlich zunimmt, wenn ATP an weitere Zentren bindet. Daher war es etwas überraschend, als kürzlich die Behauptung erhoben wurde, daß  $MF_1$ , von der man die gebundenen Nucleotide abgetrennt hatte, keine langsame Ein-Zentren-Katalyse aufwies.<sup>[38]</sup> Diese Behauptung ließ sich allerdings experimentell nicht halten; die langsame Ein-Zentren-Katalyse läuft sowohl mit nativer als auch mit nucleotidfreier  $MF_1$  ab.<sup>[39, 40]</sup>

## Verwandte Experimente

Meine Arbeitsgruppe führte zu jener Zeit auch Experimente mit der  $Na^+/K^+$ -ATPase durch, über die Prof. Skou berichtet.<sup>[125]</sup> Man war sich unsicher, ob die Phosphorylgruppe, die im Verlauf der Katalyse an das Enzym gebunden wird, auf einen Glutamat- oder einen Aspartatrest übertragen würde. Wir entwickelten ein Verfahren zur Reduktion mit Borhydrid, mit dem wir bestätigten, daß die Phosphorylgruppe an den Aspartatrest gebunden war.<sup>[41, 42]</sup> Wir fanden auch heraus, daß das Enzym in Gegenwart von  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  einen schnellen Sauerstoffaustausch zwischen  $P_i$  und Wasser katalysiert, was von der dynamischen Reversibilität der Enzymphosphorylierung herrührt.<sup>[43]</sup> Dies ist bis auf den heutigen Tag<sup>[44]</sup> eine nützliche Methode, diesen Schritt der Reaktionssequenz zu untersuchen. In ähnlicher Weise wurde bei der verwandten, durch  $Ca^{2+}$  aktivierbaren ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums die Katalyse des schnellen Sauerstoffaustauschs  $P_i \rightleftharpoons HOH$  nachgewiesen.<sup>[45]</sup>

Unsere Aufmerksamkeit richtete sich außerdem auf die Fähigkeit der Pyrophosphatase aus Hefe, den Sauerstoffaustausch  $P_i \rightleftharpoons \text{HOH}$  zu katalysieren.<sup>[46]</sup> Wir zeigten, daß dieser Austausch aus der reversiblen Bildung einer enzymgebundenen Pyrophosphatgruppe resultierte,<sup>[47]</sup> und klärten die Details der Austauschreaktion auf.<sup>[47, 48]</sup> Es war wichtig, daß die Bildungs- und Spaltungsgeschwindigkeiten des gebundenen Pyrophosphats, die mit schnellen Mischungsexperimenten gemessen wurden, mit der Geschwindigkeit des Sauerstoffaustauschs korrelierten.<sup>[47]</sup> Wie oben erwähnt, war dies bereits früher für gebundenes ATP und den Myosin-katalysierten Sauerstoffaustausch gezeigt worden. Für den Pyrophosphatase-katalysierten Sauerstoffaustausch entwickelte Hackney eine theoretische Analyse der Verteilung von  $^{18}\text{O}$ -markierten  $P_i$ -Spezies,<sup>[49]</sup> die uns bei den laufenden Untersuchungen zur oxidativen Phosphorylierung gute Dienste leistete. Der Sauerstoffaustausch  $P_i \rightleftharpoons \text{HOH}$ , der von der ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums katalysiert wird, konnte mit schnellen Mischungs- sowie Abfangexperimenten ebenfalls auf die dynamische Reversibilität der Bildung der phosphorylierten Enzymzwischenstufe zurückgeführt werden.<sup>[50]</sup> Solche Ergebnisse, ebenso wie der Nachweis von Wimmer und Rose,<sup>[51]</sup> daß der von Mitochondrien katalysierte Sauerstoffaustausch  $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{HOH}$  durch die reversible Spaltung der terminalen P-O-P-Bindung bewirkt wird, gaben uns die Gewißheit, daß die Sauerstoffaustausche, die wir bei der oxidativen Phosphorylierung und bei der Photophosphorylierung beobachtet hatten, tatsächlich auf die reversible Hydrolyse von fest gebundenem ATP zurückzuführen sind.

## Die Zahl der katalytischen Zentren

Inzwischen wurde in anderen Arbeitsgruppen die stöchiometrische Zusammensetzung der  $\text{F}_1$ -ATPase aus den einzelnen Untereinheiten aufgeklärt. In einem Übersichtsartikel von Penefsky,<sup>[24]</sup> der die hierzu bis 1978 erschienene Literatur referiert, wurde allerdings angemerkt, daß es darüber noch erhebliche Meinungsverschiedenheiten gab. Die Schwierigkeiten bei der zuverlässigen Bestimmung von Molekulargewichten und der Zahlen der Untereinheiten erschweren eine eindeutige Aussage darüber, ob die großen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in zwei oder drei Kopien vorliegen. Berichte, in denen aufgrund von Messungen an  $\text{EcF}_1$  und  $\text{TF}_1$ , die aus auf  $^{14}\text{C}$ -markierten Aminosäuren kultivierten Bakterien isoliert worden waren,<sup>[52, 53]</sup> die stöchiometrische Zusammensetzung  $\alpha_3\beta_3\gamma_1$  favorisiert wurde, erschienen uns überzeugend. Auch Publikationen über die Zusammensetzung von  $\text{CF}_1$  sprachen für das Vorliegen von je drei der großen Untereinheiten.<sup>[54]</sup> Wegen dieser und anderer Ergebnisse akzeptierten die Bioenergetiker bald weithin die Zusammensetzung  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  für die  $\text{F}_1$ -ATPasen. Auch bei unseren weiteren Versuchen gingen wir von diesem Verhältnis der Untereinheiten aus.

Die Zahl der Nucleotidbindungsstellen am Enzym blieb bis vor etwa zehn Jahren umstritten. Für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit wurde das Vorliegen von Nucleotidbindungsstellen nachgewiesen. Veröffentlichungen aus dem Jahr 1982 über  $\text{MF}_1$ <sup>[55]</sup> und aus dem Jahr 1983 über  $\text{EcF}_1$ <sup>[56]</sup> gaben gute Hinweise auf den gegenwärtig akzeptierten Wert von sechs

potentiellen Nucleotidbindungsstellen pro Enzym. Allerdings wurden noch 1987 lediglich drei Nucleotidbindungsstellen für  $\text{CF}_1$ <sup>[57]</sup> und vier für  $\text{Leber-F}_1$ <sup>[58]</sup> postuliert. Später erhaltene Daten für  $\text{CF}_1$ <sup>[59, 60]</sup> und das Leberenzym<sup>[61]</sup> sowie die hochkonservierte Sequenz der  $\beta$ -Untereinheiten unterstützen die gegenwärtige Ansicht, daß alle  $\text{F}_1$ -ATPasen sechs Nucleotidbindungsstellen haben, die sich allerdings erheblich in ihrer Affinität unterscheiden.

In Untersuchungen zur chemischen Derivatisierung, wie denen von Bragg<sup>[62]</sup> oder den in Übersichtsartikeln<sup>[63, 29]</sup> zusammengefaßten, wurde gezeigt, daß alle drei  $\beta$ -Untereinheiten unterschiedliche chemische Eigenschaften haben, obwohl sie dieselbe Aminosäuresequenz aufweisen. Diese Heterogenität war ein Hauptgrund, warum wir es für wahrscheinlich hielten, daß alle drei  $\beta$ -Untereinheiten während der Katalyse unterschiedliche Konformationen durchlaufen. Die Beteiligung aller drei  $\beta$ -Untereinheiten in einer kooperativen, sequentiellen Reaktionsweise wurde durch Befunde (von denen über zwanzig in einem früheren Übersichtsartikel<sup>[29]</sup> aufgeführt sind), wonach die Derivatisierung nur einer Stelle pro Enzym die Katalyse fast vollständig blockiert, gestützt, aber nicht bewiesen. Ebenso beeindruckend waren die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Futai, daß bereits eine aufgrund einer Mutation defekte  $\beta$ -Untereinheit die Katalyse unterbindet,<sup>[64]</sup> und ähnliche Mutationsstudien von Senior et al.,<sup>[65]</sup> anhand derer die Beteiligung von drei äquivalenten  $\beta$ -Untereinheiten an der Katalyse postuliert wurde.

Es hat allerdings lange gedauert, bis allgemein akzeptiert war, daß drei katalytische Zentren in äquivalenter Weise an der Reaktion beteiligt sind. Das Vorliegen einer katalytischen und zweier regulatorischer Zentren wurde postuliert.<sup>[66, 67]</sup> Verschiedene Modelle mit nur zwei katalytischen Zentren wurden ebenso vorgeschlagen<sup>[68–73]</sup> wie 1991 ein Modell mit vier katalytischen Zentren, die in zwei alternierenden Paaren angeordnet sein sollten.<sup>[74, 75]</sup> In einem Übersichtsartikel von Tiedge und Schafer aus dem Jahr 1989<sup>[76]</sup> wurde aufgrund von Symmetriebetrachtungen die Beteiligung von äquivalenten  $\beta$ -Untereinheiten favorisiert. Unterschiedliche Modelle und ein Übersichtsartikel von 1991, in dem das Zwei-Zentren-Modell bevorzugt wurde,<sup>[77]</sup> wurden von mir berücksichtigt, als ich 1992 in einer eigenen Übersicht<sup>[29]</sup> versuchte, auf alle Experimente einzugehen, die nicht mit unserem Bindungswechsel-Mechanismus im Einklang waren. Dabei kam ich wiederum zu dem Ergebnis, daß sehr wahrscheinlich drei Zentren in äquivalenter Weise an der Katalyse beteiligt sind. Spätere Daten<sup>[78]</sup> haben diese Schlußfolgerung erhärtet, obwohl einige Zweifel bleiben könnten, von denen ich nichts weiß. Die Annahme, daß drei Katalysezentren in gleicher Weise beteiligt sind, hat die Experimente in meinem Labor geleitet, seit sich die Anwesenheit von drei  $\beta$ -Untereinheiten als wahrscheinlich herausgestellt hatte.

## Katalyse durch Rotation

Gegen Ende der siebziger Jahre begannen wir mit Experimenten, die uns zur Postulierung einer dritten Eigenschaft des Bindungswechsel-Mechanismus veranlaßten. Das Vorliegen von je drei Kopien der großen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sowie

einzelner  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheiten machte es unwahrscheinlich, daß alle drei  $\beta$ -Untereinheiten identische Wechselwirkungen mit den nur einfach vorkommenden Untereinheiten eingehen sollten. Besonders das Zusammenwirken mit der größeren  $\gamma$ -Untereinheit war wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung. Aus McCarty's Labor kamen Berichte, daß bei Chloroplasten die Reaktivität von SH-Gruppen der  $\gamma$ -Untereinheit durch Lichteinwirkung gesteigert wurde und daß Modifikationen der  $\gamma$ -Untereinheit den unkontrollierten Durchtritt von Protonen durch die koppelnde Membran verstärkten.<sup>[79, 80]</sup> Wegen dieser und anderer Befunde vermuteten wir, daß die  $\gamma$ -Untereinheit stark mit der katalytischen  $\beta$ -Untereinheit wechselwirkt. Die wachsende Information über die Synthase ermöglichte die Interpretation weiterer  $^{18}\text{O}$ -Markierungsexperimente, die in meinem Labor im Gange waren.

Hochangereichertes  $^{18}\text{O}$ -markiertes Wasser wurde besser verfügbar, und so konnten wir mit NMR-Messungen, wie sie von Cohn<sup>[81]</sup> durchgeführt worden waren, oder mit Massenspektrometrie die von uns so bezeichneten  $^{18}\text{O}$ -Isotopomere von  $\text{P}_i$  bestimmen, die 0, 1, 2, 3 oder 4  $^{18}\text{O}$ -Atome enthielten. Wenn die ATP-Synthese oder -Hydrolyse mit hochangereicherten  $^{18}\text{O}$ -markierten Substraten unter Bedingungen abläuft, bei denen nennenswerter Sauerstoffaustausch stattfindet, kann die Verteilung der gebildeten Isotopomere gemessen werden. Wenn sich alle beteiligten katalytischen Zentren identisch verhalten, folgt die Verteilung der  $^{18}\text{O}$ -Isotopomere einem statistisch vorhersagbaren Muster. Die Ergebnisse eines typischen Experiments zur Hydrolyse von  $[^{18}\text{O}]\text{ATP}$  durch die  $\text{F}_1$ -ATPase sind in Abbildung 7 gezeigt.<sup>[82]</sup> Danach lag die Verteilung der Isotopomere sehr nahe bei der, die für ein identisches Verhalten aller katalytischen Zentren zu erwarten war. Die Daten schließen die mögliche Beteiligung von zwei Typen katalytischer Zentren aus. In einem Beispiel in Abbildung 7 ist gezeigt, daß dies eine deutlich andere Verteilung der Isotopomere ergeben würde. Wichtig war, daß die Experimente auch bei Nettosynthese von ATP durch ATP-Synthasen aus Chloroplasten und Mitochondrien ein identisches Verhalten aller katalytischen Zentren ergaben.<sup>[83-85]</sup> Die Tests waren empfindlich und einleuchtend; sollten zwischen den katalytischen Zentren Unterschiede bei der Substratbindung, -umwandlung oder -freisetzung oder bei den entsprechenden Konzentrationsabhängigkeiten bestehen, so hätte sich dies bei den  $^{18}\text{O}$ -Markierungsexperimenten zeigen müssen.

Wieder wurde ich mit nicht erklärbaren Ergebnissen konfrontiert. Kontakte zwischen einem oder mehreren ähnlichen Resten auf den kleineren Untereinheiten mit jeder der drei  $\beta$ -Untereinheiten schienen zwar möglich, doch wären dann keine identischen Wechselwirkungen zu erwarten. Die Situation könnte analog zu der bei den Serinproteasen sein, bei denen ein Serinrest trotz unterschiedlichster Sequenzen an der richtigen Stelle positioniert ist. Doch bei den verschiedenen Proteasen läuft die Katalyse nicht auf die gleiche Weise

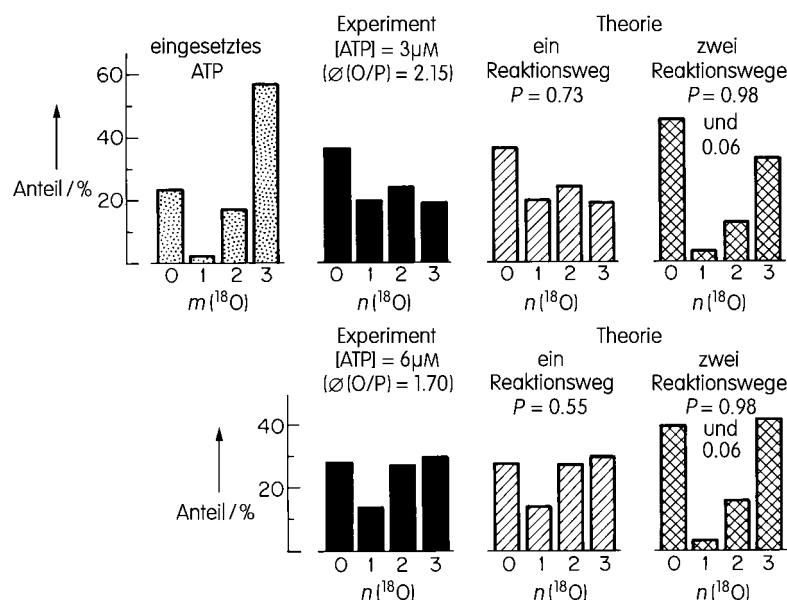


Abb. 7. Verteilung von  $^{18}\text{O}$ -Isotopomeren von  $\text{P}_i$ , die bei der  $\text{MF}_1$ -ATPase-katalysierten Hydrolyse von  $[\gamma^{18}\text{O}]\text{ATP}$  bei zwei relativ niedrigen ATP-Konzentrationen (oben:  $3\mu\text{M}$ , unten:  $6\mu\text{M}$ ) gebildet werden. Gezeigt sind die durchschnittliche Zahl von eingebauten Sauerstoffatomen, die aus dem Wasser stammen ( $\text{O}/\text{P}$ -Verhältnis), und die Verteilung der Molekülspesies mit 0 bis 3  $^{18}\text{O}$ -Atomen. Ebenfalls gezeigt ist die theoretische Verteilung, die für einen Reaktionsweg erwartet wird, wenn die Wahrscheinlichkeit  $P$  für einen Austausch von gebundenem  $\text{P}_i$  (anstatt dessen Freisetzung) 0.73 (bei  $3\mu\text{M}$  ATP) oder 0.55 (bei  $6\mu\text{M}$  ATP) beträgt. Dies wird mit den Verteilungen verglichen, die erwartet werden, wenn zwei Reaktionswege, einer mit hoher und einer mit niedriger Wahrscheinlichkeit für einen Austausch, ablaufen würden, die zusammen den insgesamt gemessenen Sauerstoffaustausch ergeben.  $m(^{18}\text{O})$  = Zahl der  $^{18}\text{O}$ -Atome pro  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP;  $n(^{18}\text{O})$  = Zahl der  $^{18}\text{O}$ -Atome pro gebildetem  $\text{P}_i$ . (Aus Lit.<sup>[82]</sup> mit Veränderungen übernommen.)

ab. Meiner Meinung nach schien es nur eine Möglichkeit dafür zu geben, daß die Reaktion an allen katalytischen Zentren sequentiell und identisch ablaufen kann und dabei durch eine oder mehrere in einfacher Kopie vorkommende kleinere Untereinheiten moduliert wird. Dies wäre ein mit einer Rotation verbundener Katalysecyclus, bei dem die großen katalytischen Untereinheiten um einen kleineren, asymmetrischen Kern rotieren würden. Diese Überlegung führte zusammen mit dem, was über die Struktur des Enzyms bekannt war, zum Postulat einer Katalyse durch Rotation, das auf Gordon-Konferenzen<sup>[86-88]</sup> veröffentlicht wurde. Eine Skizze unseres Konzepts aus dieser Zeit ist in Abbildung 8 wiedergegeben.<sup>[88]</sup>

Der zentrale Kern ähnelt einer Nokkenwelle, die die Konformation der  $\beta$ -Untereinheiten moduliert. Die Annahme, daß der Kern asymmetrisch sei, wurde erhärtet, als die Aminosäuresequenz<sup>[89]</sup> bekannt wurde; diese ergab keinen Hinweis

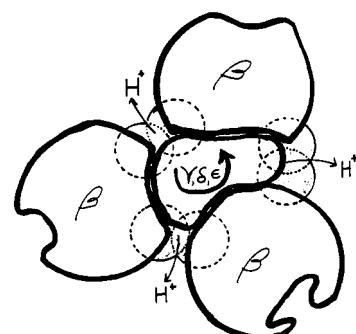


Abb. 8. Skizze der möglicherweise unter Rotation ablaufenden Katalyse, die 1980 für Präsentationen und Diskussionen benutzt wurde.

auf eine dreizählige Symmetrie der kleineren Untereinheiten.

Später wurden weitere Vermutungen über mögliche Rotationsvorgänge bei der Katalyse durch die ATP-Synthase geäußert. Zusätzliche Informationen über die Struktur des  $F_0$ -Teils der Synthase ließen die Vorstellung einer Kreisbewegung in der  $F_0$ -Domäne attraktiv erscheinen. Cox et al. vermuteten eine Rotationsbewegung der kreisförmig angeordneten  $c$ -Untereinheiten.<sup>[90, 91]</sup> Hoppe und Sebald stellten sich ein Oligomer aus  $c$ -Untereinheiten als Kern vor, der relativ zu den Untereinheiten  $a$  oder  $b$  rotiert,<sup>[92]</sup> eine Vermutung, die noch immer sinnvoll erscheint. Mitchell schlug ein Rotationsmodell vor, in dem die katalytischen Zentren gegenüber einem durch die  $\gamma$ -Untereinheit verlaufenden Protonenkanal exponiert sind.<sup>[93]</sup>

Die Homogenität der Katalyse, die durch die  $^{18}\text{O}$ -Markierungstechnik nachgewiesen worden war, schloß meiner Meinung nach auch solche Postulate aus, denen zufolge nur zwei  $\beta$ -Untereinheiten an der Katalyse beteiligt wären, während die dritte regulatorische Funktionen hätte. Überlegungen zur Bedeutung der Symmetrie für die Wechselwirkung der Untereinheiten machten es unwahrscheinlich, daß zwei Zentren sich in einer identischen Katalyse abwechseln könnten. Ihre Wechselwirkungen an einer Seite konnten nicht mit denen auf einer anderen Seite im gleichen Stadium der Katalyse identisch sein.

Wir versuchten, einige Aussagen zu den Positionswechseln der Untereinheiten zu treffen, wie sie bei einer Rotation während der Katalyse erforderlich wären. Nach Markierung einer  $\beta$ -Untereinheit mit radioaktivem Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) behielt die  $MF_1$ -ATPase noch eine gewisse Aktivität. Eine andere  $\beta$ -Untereinheit reagierte mit 2-Azido-ATP. Nach einigen katalytischen Reaktionsschritten war die Reaktivität gegenüber DCCD und 2-Azido-ATP statistisch verteilt, wie dies zu erwarten war, wenn die relativen Positionen und die Konformationen sich geändert hatten.<sup>[94]</sup> In einem anderen Versuch beobachteten wir, daß eine geringe Vernetzung der Untereinheiten miteinander die Katalyse blockierte und daß die Spaltung der Querverbindungen die Aktivität wiederherstellte.<sup>[95]</sup> Die Veröffentlichung einer anderen Arbeitsgruppe, daß die Vernetzung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten die Katalyse nicht hemmte,<sup>[96]</sup> hielt ich für nicht stichhaltig.<sup>[29]</sup> Keiner dieser Versuche war so lehrreich wie jene, die später von anderen Gruppen veröffentlicht wurden (siehe unten). Es schien offensichtlich, daß eine angemessene Beurteilung der Möglichkeit einer Rotation während der Katalyse aufgeschoben werden mußte, bis die dreidimensionale Struktur der  $F_1$ -ATPase bekannt sein würde. Als ich im Frühjahr 1992 einen Übersichtsartikel vorbereitete, faßte ich den Stand der Dinge bezüglich einer Rotation während der Katalyse zusammen.<sup>[29]</sup> Dies schloß ein, daß eine weitere Anheftungsstelle zwischen  $F_0$  und  $F_1$  notwendig sei, die als Stator wirkt, und die Vermutung, daß nach gegenwärtigem Wissen die  $\delta$ -Untereinheit des *E. coli*-Enzyms oder die analoge OSCP-Untereinheit (OSCP = für die Oligomycin-Empfindlichkeit verantwortliches Protein) der Mitochondrien diese Funktion übernehmen könnte, eine Voraussage, die durch neuere Versuche unterstützt wurde.<sup>[97, 98]</sup> Die Anheftung des Stators an die Außenseite einer  $\alpha$ -Untereinheit könnte zum Teil für die Asymmetrie der  $\alpha$ -

Untereinheiten, die auch während der Katalyse bestehen bleibt, verantwortlich sein.<sup>[99]</sup> Dies mag in Analogie zur Symmetrie der internen Rotation eines Motors stehen, die nicht gestört wird, wenn der Motor auf einer Unterlage befestigt wird.

Der Rotationsmechanismus der Katalyse erhielt starken Auftrieb durch die Kristallstruktur des Hauptteils von  $MF_1$ , die von Abrahams, Leslie, Lutter und Walker<sup>[100]</sup> gelöst wurde. Diese Struktur bildete die Basis für neuartige Nachweismethoden für die Rotation in den Labors von Cross,<sup>[3, 101, 102]</sup> Capaldi<sup>[103–105]</sup> und Kagawa.<sup>[97]</sup> Sabbert et al. wiesen die Rotation mit ausgefeilten Fluoreszenztechniken nach,<sup>[106, 107]</sup> und Noji et al. führten einen visuellen Nachweis.<sup>[108]</sup> Aufgrund solcher Entwicklungen konnte ich einen kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel mit „*The ATP Synthase – A Splendid Molecular Machine*“ überschreiben.<sup>[78]</sup> Diese neueren Aspekte der ATP-Synthase-Geschichte passen allerdings eher zum Vortrag meines Mitpreisträgers John Walker.<sup>[123]</sup> Vorher möchte ich aber noch einige zusätzliche wichtige und ungeklärte Facetten der Katalyse durch die ATP-Synthase diskutieren.

## Einige zusätzliche Aspekte

Nachdem während der letzten zwanzig Jahre viele ungewöhnliche Aspekte der von der Synthase katalysierten Reaktion geklärt werden konnten, wurde der Bindungswechsel-Mechanismus zunehmend akzeptiert. Einige dieser Aspekte werden im folgenden aufgegriffen. Die Zahl und die Eigenschaften der Nucleotidbindungsstellen mußten geklärt werden. Mit 2-Azido-ATP, das von Abbot et al.<sup>[109]</sup> für Untersuchungen an  $F_1$ -ATPasen eingeführt worden war, klärten wir für  $F_1$ -ATPasen aus verschiedenen Quellen auf, wo katalytische und nichtkatalytische Bindungsstellen lagen.<sup>[59, 110–112]</sup> Die Charakteristika der Hemmung der  $F_1$ -ATPase durch  $Mg^{2+}$  und fest gebundenes ADP, die unsere frühen Untersuchungen und die vieler anderer gestört haben, wurden geklärt.<sup>[113, 114]</sup> Die Rolle der nichtkatalytischen Nucleotide bei der Überwindung der Hemmung wurde aufgeklärt.<sup>[115, 116]</sup>

Eine direkte Abschätzung, wie viele katalytische Zentren während der Photophosphorylierung besetzt sind, wurde durchgeführt.<sup>[117]</sup> Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß nahezu die maximale Geschwindigkeit der ATP-Synthase erreicht wird, wenn genau eine weitere, nicht aber auch die dritte Bindungsstelle mit Substrat belegt ist. Die Auswertung dieser Daten, anderer früherer Resultate sowie neuerer Experimente über die Belegung der Bindungsstellen in  $MF_1$  führten zu Verfeinerungen meiner Sicht des Bindungswechsel-Mechanismus. Herausragende Aspekte aus früheren Versuchen sind die, daß die Geschwindigkeit der ATP-Bildung während der Ein-Zentren-Katalyse viel langsamer ist als die der ATP-Bildung während der schnellen Photophosphorylierung, und daß während der Photophosphorylierung etwa ein fest gebundenes ATP-Molekül pro Molekül Synthase vorhanden ist. In älteren Beschreibungen des Mechanismus (Abb. 9) wird nach einem erfolgten Bindungswechsel ein katalytisches Zentrum so dargestellt, daß es fest gebundenes ADP und  $P_i$  enthält, die reversibel zu fest gebundenem ATP

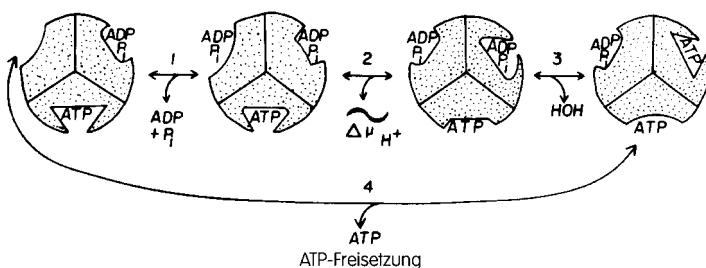


Abb. 9. Typisches Drei-Zentren-Modell der Kooperativität, in dem fest gebundenes ADP und  $P_i$  als Intermediate enthalten sind.

umgewandelt werden, bis der nächste Bindungswechsel stattfindet. Wir schlagen nun vor, daß während der Nettosynthese von ATP die Umwandlung der katalytischen Zentren wie in Abbildung 10 dargestellt stattfindet. Wenn ein Zentrum, an das ADP und  $P_i$  gebunden sind, eine Konformation

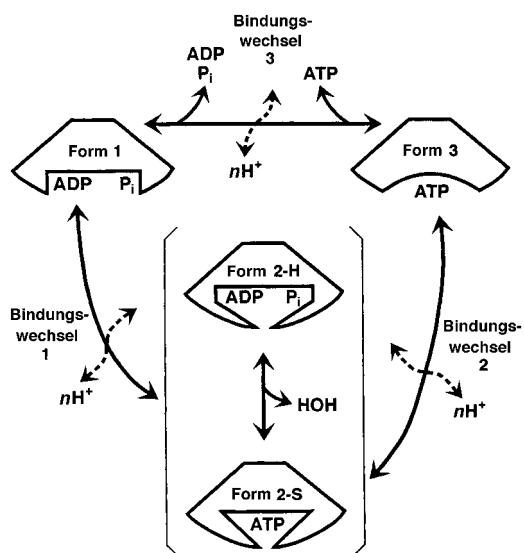


Abb. 10. Vorgeschlagenes Schema der Modifizierung der katalytischen Zentren der ATP-Synthase durch sukzessive Bindungswechsel. Wenn ADP+ $P_i$  an die Form 1 binden und die notwendige protonenmotorische Kraft wirkt, kommt es beim Bindungswechsel 1 sowohl zur schnellen Bildung als auch zur festen Bindung von ATP. Die meisten Zentren nehmen die Konformation der Form 2-S ein, und ATP wird nach dem Bindungswechsel 2 nur noch locker gebunden. Wenn ATP an die Form 3 bindet und keine protonenmotorische Kraft wirkt, kommt es während des Bindungswechsels 3 sowohl zur schnellen Bildung als auch zur festen Bindung von ADP+ $P_i$ . Die meisten Zentren nehmen die Konformation der Form 2-H ein, und ADP+ $P_i$  bleiben während des Bindungswechsels 1 locker gebunden. Das Quasi-Gleichgewicht der Form 2 wird sowohl von der Besetzung der Zentren in den Formen 1 und 3 als auch von der protonenmotorischen Kraft moduliert.

einnimmt, die eine festere Bindung der Substrate bewirkt, kann es auch die schnelle Knüpfung der terminalen kovalenten Bindung im ATP-Molekül katalysieren, so daß praktisch das gesamte gebundene ADP und  $P_i$  in gebundenes ATP umgewandelt werden. Ein Zentrum mit fest gebundenem ADP und  $P_i$ , wie es in Abbildung 9 gezeigt ist, ist demnach keine Zwischenstufe. Beim nächsten schnellen Bindungswechsel wird ATP ins Medium freigesetzt.

Alle ATP-Moleküle, die bei der oxidativen Phosphorylierung<sup>[118]</sup> oder bei der Photophosphorylierung<sup>[119, 84]</sup> gebildet werden, enthalten etwa 0.4–1.1 Sauerstoffatome, die aus Wassermolekülen stammen. Das bedeutet, daß in gewissem Umfang die Rückreaktion der ATP-Synthase abgelaufen ist. Tatsächlich läßt sich bei der oxidativen Nettophosphorylierung durch Mitochondrien mit  $^{32}P$ -Markierungsexperimenten eine schnelle Umkehrbarkeit des Gesamtprozesses nachweisen.<sup>[9, 118]</sup> Wahrscheinlich resultiert also der schnelle Einbau einiger aus dem Wasser stammender Sauerstoffatome aus der Reversibilität eines in Abbildung 10 gezeigten Bindungswechsels. Die weitaus langsamere Ein-Zentren-Katalyse, die ohne Nucleotide aus dem Medium ablaufen kann, läuft vielleicht so ab, wie es im unteren Teil von Abbildung 10 angedeutet ist. Nach einiger Zeit löst sich das  $P_i$  ab, und an der Synthase verbleibt fest gebundenes ADP. Dieses ADP verursacht in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  eine starke Hemmung der ATPase-Aktivität. Wenn allerdings eine protonenmotorische Kraft wirkt, wird dieses fest gebundene ADP ohne Verzögerung beim ersten Bindungswechsel ins Medium freigesetzt.<sup>[120]</sup>

Weitere neuere Untersuchungen zur Besetzung der Zentren während der ATP-Hydrolyse durch  $MF_1$  beruhten auf der Konkurrenz zwischen ATP und Trinitrophenyl-ATP (TNP-ATP). Sie ergaben, daß TNP-ATP stark an das dritte katalytische Zentrum binden konnte, für das ATP eine Dissoziationskonstante  $K_D$  im millimolaren Konzentrationsbereich hat. Bei einer ATP-Konzentration deutlich unter 1 mm wurde fast die maximale ATPase-Geschwindigkeit erreicht.<sup>[121]</sup> Dieses Ergebnis, die weitere Charakterisierung des Übergangs von der Ein-Zentren- zur Mehr-Zentren-Katalyse sowie Messungen der initialen Reaktionsgeschwindigkeit lassen sich am besten damit erklären, daß für eine annähernd maximale Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse nur die Besetzung von zwei katalytischen Zentren notwendig ist.<sup>[40]</sup> Interessanterweise hatte ADP eine deutlich höhere Affinität für das dritte, leere Zentrum von  $MF_1$  als ATP. Unsere gegenwärtige Hypothese über die Besetzung der katalytischen Zentren während der unter Rotation verlaufenden Katalyse ist in Abbildung 11 dargestellt. Bei hohen Synthesegeschwindigkeiten ist an ein Zentrum ATP gebunden, das links davon liegende Zentrum (beim Blick aus einer

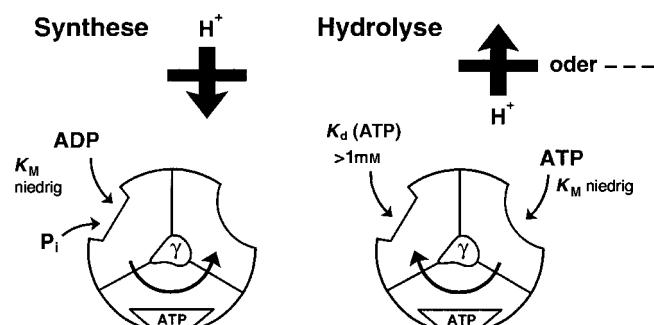


Abb. 11. Schematische Darstellung des Vorschlags, daß zur Erreichung von nahezu maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten bei der ATP-Hydrolyse durch die  $F_1$ -ATPase oder bei der ATP-Synthase durch die ATP-Synthase nur die Besetzung von zwei katalytischen Zentren erforderlich ist.

Position oberhalb des F<sub>1</sub>-Teils der Synthase) kann bevorzugt ADP und P<sub>i</sub> binden. Beim Wirken einer entsprechenden protonenmotorischen Kraft folgt die schnelle Synthese von ATP. Die Besetzung eines dritten Zentrums mit ADP und P<sub>i</sub> bei höheren Substratkonzentrationen führt nur zu einer geringfügigen Geschwindigkeitserhöhung. Bei der Nettohydrolyse von ATP, wenn die protonenmotorische Kraft nur schwach oder gar nicht vorhanden ist, kann die bevorzugte Bindung von ATP am Zentrum, das sich rechts von dem mit dem fest gebundenen ATP befindet, zu einer fast maximalen Hydrolysegeschwindigkeit führen. Die Besetzung des dritten Zentrums bei Substratkonzentrationen im millimolaren Bereich führt nur zu einer geringen Geschwindigkeitserhöhung. Die Natur scheint einen Weg dafür gefunden zu haben, daß die ATP-Synthase unter Bindung von ADP an ein Zentrum mit niedriger Affinität für ATP abläuft, wodurch verhindert wird, daß ATP seine eigene Synthese hemmt.

Die Aufklärung der prinzipiellen Merkmale der Katalyse durch die ATP-Synthase eröffnet viele Gelegenheiten, dieses bemerkenswerte Enzym besser zu verstehen. Ich werde diese Entwicklungen mit Interesse verfolgen. Ich glaube, daß die Gesellschaft fortfahren wird und dies auch sollte, einen Teil ihrer Ressourcen für wissenschaftliche Grundlagenforschung zu verwenden, sogar dann, wenn der einzige Erfolg in der Befriedigung besteht, die aus der Kenntnis des Ablaufs von Lebensprozessen erwächst. Eine zusätzliche Rechtfertigung liegt darin, daß solche Kenntnisse die Grundlage für vergangene und zukünftige Bestrebungen bilden, ein gesundes Leben zu ermöglichen. Wie von Ernster zusammengefaßt wurde,<sup>[122]</sup> ist der Sauerstoff, den wir zur ATP-Synthase nutzen, gleichzeitig eine giftige Substanz, die zur Bildung schädlicher freier Radikale führt. Das Mitochondrium ist besonders empfindlich gegen solche Schädigungen, und die Kenntnis der Enzyme, die an der Gewinnung und Nutzung von Energie beteiligt sind, kann unser Wissen über unerwünschte Schädigungen erweitern und dazu beitragen, Wege zu ihrer Vermeidung zu finden.

*Eine letzte Danksagung: Es war für mich eine außergewöhnlich glückliche Fügung, daß ich während der letzten Jahrzehnte als Biochemiker gearbeitet habe, als so viel in meinem Forschungsgebiet erreicht wurde. Ich bin zutiefst dankbar, daß ich an vielen Forschungsarbeiten beteiligt war, in denen bei einem lebenswichtigen Enzym ein ungewöhnlicher, unter Rotation verlaufender Katalysecyclus aufgeklärt wurde. Ich bin der Gesellschaft zu Dank verpflichtet, die dies ermöglicht hat, meiner Frau Lyda für ihre freigiebige Hingabe und die Führung, mit der sie mir und unseren Kindern geholfen hat, unseren Weg zu finden, sowie den Universitäten und staatlichen Stellen, durch die das Umfeld und die finanzielle Unterstützung für meine Forschungen bereitgestellt wurden.*

Eingegangen am 17. April 1998 [A277]  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

**Stichwörter:** ATP · Bioenergetik · Enzymkatalyse · Nobel-Aufsätze · Phosphorylierungen

- [1] F. Lipmann, *Adv. Enzymol.* **1941**, *1*, 99–152.
- [2] P. Mitchell, *Science* **1979**, *206*, 1148–1159.
- [3] T. M. Duncan, V. V. Bulygin, Y. Zhou, M. L. Hutcheon, R. L. Cross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10964–10968.
- [4] H. S. Penefsky, M. E. Pullman, A. Datta, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3330–3336.
- [5] H. L. Segal, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1953**, *204*, 265–280.
- [6] I. Krinsky, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1952**, *198*, 721–730.
- [7] M. Cohn, *J. Biol. Chem.* **1953**, *201*, 739–744.
- [8] P. D. Boyer, A. S. Falcone, W. H. Harrison, *Nature* **1954**, *174*, 401–404.
- [9] C. C. O'Neal, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 5761–5767.
- [10] W. L. Klein, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 7257–7265.
- [11] P. D. Boyer, R. L. Cross, W. Momsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 2837–2839.
- [12] D. A. Harris, J. Rosing, R. J. van de Stadt, E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *314*, 149–153.
- [13] M. E. Dempsey, P. D. Boyer, E. S. Benson, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2708–2715.
- [14] H. M. Levy, N. Sharon, E. Lindemann, D. E. Koshland, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2628–2633.
- [15] R. G. Wolcott, P. D. Boyer, *J. Supramol. Struct.* **1975**, *3*, 154–161.
- [16] C. R. Bagshaw, J. F. Eccleston, F. Eckstein, R. S. Goody, H. Gutfrund, D. R. Trentham, *Biochem. J.* **1974**, *141*, 351–364.
- [17] C. R. Bagshaw, D. R. Trentham, R. G. Wolcott, P. D. Boyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2592–2596.
- [18] P. D. Boyer, *FEBS Lett.* **1975**, *50*, 91–94.
- [19] P. Mitchell, *FEBS Lett.* **1975**, *50*, 95–97.
- [20] P. D. Boyer, *FEBS Lett.* **1975**, *58*, 1–6.
- [21] J. Rosing, C. Kayalar, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 2478–2485.
- [22] C. Kayalar, J. Rosing, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 2486–2491.
- [23] R. Adolfsen, E. N. Moudrianakis, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *172*, 425–433.
- [24] H. S. Penefsky, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1979**, *49*, 223–280.
- [25] P. D. Boyer, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 955–966.
- [26] C. Kayalar, Dissertation, University of California, Los Angeles, **1977**.
- [27] M. Gresser, J. Cardon, G. Rosen, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 10649–10653.
- [28] G. Rosen, M. Gresser, C. Vinkler, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 10654–10661.
- [29] P. D. Boyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1140*, 215–250.
- [30] R. I. Feldman, D. S. Sigman, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1676–1683.
- [31] R. Feldman, D. S. Sigman, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 12178–12183.
- [32] L. de Meis, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *973*, 333–349.
- [33] C. Grubmeyer, R. Cross, H. S. Penefsky, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12092–12100.
- [34] R. L. Cross, C. Grubmeyer, H. S. Penefsky, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12101–12105.
- [35] T. Hisabori, E. Muneyuki, M. Odaka, K. Yokoyama, K. Mochizuki, M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4551–4556.
- [36] M. K. Yohda, M. Yoshida, *J. Biochem.* **1987**, *102*, 875–883.
- [37] V. N. Kasho, M. Yoshida, P. D. Boyer, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6949–6954.
- [38] D. B. Reynafarje, P. L. Pedersen, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 32546–32550.
- [39] Y. Milgrom, R. L. Cross, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32211–32214.
- [40] Y. Milgrom, M. B. Murataliev, P. D. Boyer, *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1037–1043.
- [41] C. Degani, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 8222–8226.
- [42] C. Degani, A. S. Dahms, P. D. Boyer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, *242*, 77–79.
- [43] P. D. Boyer, L. de Meis, M. G. C. Carvalho, D. D. Hackney, *Biochemistry* **1977**, *16*, 136–140.
- [44] V. N. Kasho, M. Stengelin, I. N. Smirnova, L. D. Faller, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8045–8052.
- [45] T. Kanazawa, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3163–3172.
- [46] M. Cohn, *J. Biol. Chem.* **1958**, *230*, 369–379.

- [47] C. A. Janson, C. Degani, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3743–3749.
- [48] D. D. Hackney, P. D. Boyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3133–3137.
- [49] D. D. Hackney, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 5320–5328.
- [50] P. D. Boyer, L. de Meis, M. G. C. Carvalho, D. D. Hackney, *Biochemistry* **1977**, *16*, 136–140.
- [51] M. J. Wimmer, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6769–6775.
- [52] P. D. Bragg, C. Hou, *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, *167*, 311–321.
- [53] Y. Kagawa, N. Sone, M. Yoshida, H. Hirata, H. Okamoto, *J. Biochem.* **1976**, *80*, 141–151.
- [54] S. Merchant, S. L. Shaner, B. R. Selman, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1026–1031.
- [55] R. L. Cross, C. M. Nalin, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2874–2881.
- [56] J. G. Wise, T. M. Duncan, L. R. Latchney, D. N. Cox, A. E. Senior, *Biochem. J.* **1983**, *215*, 343–350.
- [57] R. E. McCarty, G. G. Hammes, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 234–237.
- [58] N. Williams, J. Hullihen, P. L. Pedersen, *Biochemistry* **1987**, *26*, 162–169.
- [59] Z. Xue, J. M. Zhou, T. Melese, R. L. Cross, P. D. Boyer, *Biochemistry* **1987**, *26*, 3749–3753.
- [60] G. Girault, G. Berger, J. M. Galmiche, F. Andre, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14690–14695.
- [61] K. J. Guerrero, P. D. Boyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *154*, 854–860.
- [62] P. D. Bragg, C. Hou, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1015*, 216–222.
- [63] P. V. Vignais, J. Lunardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 977–1014.
- [64] T. Noumi, M. Taniai, H. Kanazawa, M. Futai, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9196–9201.
- [65] R. Rao, A. E. Senior, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17450–17454.
- [66] J. H. Wang, V. Joshi, J. C. Wu, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7996–8001.
- [67] J. H. Wang, J. Cesana, J. C. Wu, *Biochemistry* **1987**, *26*, 5527–5533.
- [68] A. Di Pietro, F. Penin, C. Godinot, D. C. Gautheron, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5671–5678.
- [69] D. A. Bullough, J. G. Verburg, A. Yoshida, W. A. Allison, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11675–11683.
- [70] D. Leckband, G. G. Hammes, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2306–2311.
- [71] J. P. Issartel, A. Dupuis, J. Junardi, P. V. Vignais, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4726–4730.
- [72] X. Ysern, L. M. Amzel, P. L. Pedersen, *J. Bioenerg. Biomemb.* **1988**, *29*, 423–450.
- [73] P. Fromme, P. Gräber, *FEBS Lett.* **1989**, *259*, 33–36.
- [74] A. B. Shapiro, R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4194–4200.
- [75] A. B. Shapiro, K. D. Gibson, H. A. Scheraga, R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17277–17285.
- [76] H. Tiedge, G. Schafer, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *977*, 1–9.
- [77] J. A. Berden, A. F. Hartog, C. M. Edel, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1057*, 151–156.
- [78] P. D. Boyer, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 717–749.
- [79] R. E. McCarty, J. Fagan, *Biochemistry* **1973**, *12*, 1503–1507.
- [80] J. V. Moroney, R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 8951–8955.
- [81] M. Cohn, A. Hu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 200–205.
- [82] R. L. Hutton, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9990–9993.
- [83] D. D. Hackney, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 3164–3170.
- [84] D. D. Hackney, G. Rosen, P. D. Boyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 3646–3650.
- [85] W. E. Kohlbrenner, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 10881–10886.
- [86] P. D. Boyer, W. E. Kohlbrenner, in *Energy Coupling in Photosynthesis* (Hrsg.: B. Selman, S. Selman-Reiner), Elsevier/North Holland, New York, **1981**, S. 231–240.
- [87] M. J. Gresser, J. A. Myers, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12030–12038.
- [88] P. D. Boyer, in *Biochemistry of Metabolic Processes* (Hrsg.: D. L. F. Lennon, F. W. Stratman, R. N. Zahltan), Elsevier, New York, **1983**, S. 465–477.
- [89] H. Kanazawa, T. Kayano, K. Mabuchi, M. Futai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *103*, 604–612.
- [90] G. B. Cox, D. A. Jans, A. L. A. Fimmel, F. Gibson, L. Hatch, *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 201–208.
- [91] G. B. Cox, A. L. Fimmel, F. Gibson, L. Hatch, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *849*, 62–69.
- [92] J. Hoppe, W. Sebald, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *768*, 1–27.
- [93] P. Mitchell, *FEBS Lett.* **1985**, *181*, 1–7.
- [94] T. Melese, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 15398–15401.
- [95] R. P. Kandpal, P. D. Boyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *890*, 97–105.
- [96] K. M. Musier, G. G. Hammes, *Biochemistry* **1987**, *26*, 5982–5988.
- [97] W. Kagawa, T. Hamamoto, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1996**, *28*, 421–431.
- [98] I. Ogilvie, R. Aggeler, R. A. Capaldi, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19621–194624.
- [99] F. A. S. Kironde, R. L. Cross, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3488–3495.
- [100] J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, J. E. Walker, *Nature* **1994**, *370*, 621–628.
- [101] Y. Zhou, T. M. Duncan, V. V. Bulygin, M. L. Hutcheon, R. L. Cross, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 96–100.
- [102] R. L. Cross, T. M. Duncan, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1996**, *28*, 403–408.
- [103] R. Aggeler, R. A. Capaldi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13888–13891.
- [104] C. Tang, R. A. Capaldi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3018–3024.
- [105] Z. Feng, R. Aggeler, M. Haughton, R. A. Capaldi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17986–17989.
- [106] D. Sabbert, S. Engelbrecht, W. Junge, *Nature* **1996**, *381*, 623–625.
- [107] D. Sabbert, S. Engelbrecht, W. Junge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2312–2317.
- [108] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr., *Nature* **1997**, *386*, 299–302.
- [109] M. S. Abbott, J. J. Czarnecki, B. R. Selman, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 12271–12278.
- [110] R. L. Cross, D. Cunningham, C. G. Miller, Z. Xue, J. M. Zhou, P. D. Boyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5715–5719.
- [111] Z. Xue, C. G. Miller, J. M. Zhou, P. D. Boyer, *FEBS Lett.* **1987**, *223*, 391–394.
- [112] J. G. Wise, B. J. Hickey, P. D. Boyer, *FEBS Lett.* **1987**, *223*, 395–401.
- [113] K. J. Guerrero, Z. Xue, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16280–16287.
- [114] M. B. Murataliev, Y. M. Milgrom, P. D. Boyer, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8305–8310.
- [115] Y. M. Milgrom, L. L. Ehler, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11551–11558.
- [116] M. B. Murataliev, P. D. Boyer, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 681–687.
- [117] J. M. Zhou, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1531–1538.
- [118] D. A. Berkich, G. D. Williams, P. T. Masiakos, M. B. Smith, P. D. Boyer, K. F. LaNoue, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 123–129.
- [119] M. Avron, N. Sharon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1960**, *2*, 336–339.
- [120] J. Rosing, D. J. Smith, C. Kayalar, P. D. Boyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *72*, 1–8.
- [121] M. B. Murataliev, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15431–15439.
- [122] L. Ernster, *Chem. Scr.* **1986**, *26*, 525–534.
- [123] J. E. Walker, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2438–2450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2308–2319.
- [124] Internet-Adresse: <http://www.nobel.se>
- [125] J. C. Skou, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2452–2461; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2320–2328.