

Als 1962 pilzförmige Knöpfchen von ca. 100 Å Durchmesser auf der Innenseite der inneren Membran von Rinderherz-Mitochondrien unter dem Elektronenmikroskop entdeckt wurden (oben), wußte man nur, daß sie an der biologischen Energieumwandlung beteiligt sind. Auf der Basis der dreidimensionalen Struktur der F₁-ATPase bei atomarer Auflösung (unten) versteht man heute den Mechanismus der ATP-Synthese sehr genau.

ATP-Synthese durch Rotations-Katalyse (Nobel-Vortrag)**

John E. Walker*

Die biologische Energie stammt von der Sonne. Die Lichtenergie, die bei der Photosynthese in Chloroplasten und phototrophen Bakterien eingefangen wird, wird in Kohlenhydraten und Fetten gespeichert. Diese gespeicherte Energie kann durch den oxidativen Metabolismus in Form von Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt und als treibende Kraft für andere biologische Prozesse genutzt werden. ATP ist ein energiereiches Produkt sowohl der Photosynthese als auch des oxidativen Stoffwechsels und wird in Lehrbüchern oft als die chemische Währung der biologischen Energie bezeichnet.

In den sechziger und siebziger Jahren wurde die Forschung über den oxidativen Stoffwechsel von einer Kontroverse über die Natur der Zwischenstufe zwischen Nicotinamidadenindinucleotid (NADH (reduzierte Form), einem Schlüsselprodukt des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels) und ATP bestimmt. Viele Bioenergetiker glaubten an eine energiereiche kovalente chemische Verbindung als Zwischenstufe und suchten dafür nach Indizien. Das Problem wurde von Peter Mitchell gelöst, dem Nobel-Preisträger für Chemie des Jahres 1978. Er wies nach, daß in Mitochondrien die Energie aus NADH über die Elektronentransportkette freigesetzt und dann dazu benutzt wird, mit Protonen ein chemisches Potentialgefälle über die innere Membran der Organelle aufzubauen. Er nannte diesen Gradienten die protonenmotorische Kraft (PMF = proton motive force; auch als $\Delta\mu_{H^+}$ bezeichnet). Es wurde gezeigt, daß die protonenmotorische Kraft vom ATP-synthetisierenden Enzym (ATP-Synthase) zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt wird, und zwar nicht nur in Mitochondrien, sondern auch in Eubakterien und Chloroplasten.^[1]

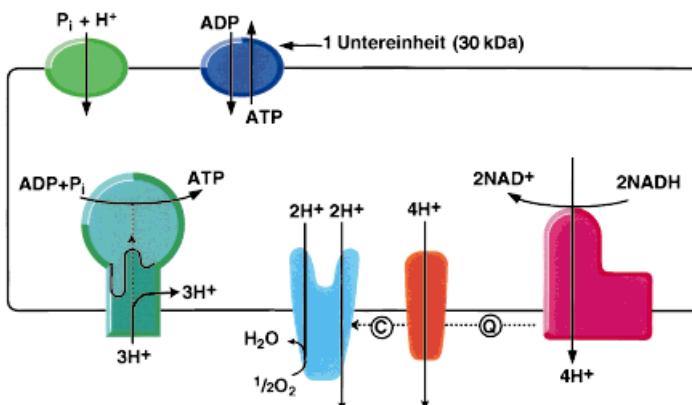
Dank Peter Mitchells Anstrengungen wurde die protonenmotorische Kraft als die entscheidende Zwischenstufe bei der biologischen Energieumwandlung erkannt. Außer zur ATP-Synthese wird sie auch von verschiedenen Membranproteinen zum Transport von Zuckern, Aminosäuren und anderen

Substraten und Metaboliten über biologische Membranen genutzt. Die PMF treibt die Rotation der Flagellen beweglicher Bakterien an. Bei neugeborenen Kindern und Tieren im Winterschlaf wird sie direkt in Wärme umgewandelt, indem die Mitochondrien des braunen Fettgewebes entkoppelt werden. Manche Bakterien, die in stark salzhaltigem Milieu leben, erzeugen einen Natriumionengradienten (sodium motive force) als äquivalente Zwischenstufe in ihren Energieumwandlungsprozessen.^[2] Das allgemeine Konzept, daß ein Protonen- oder Natriumionen-Gradient aufgebaut und dann als Energiequelle für andere biochemische Funktionen genutzt wird, wird als Chemiosmose bezeichnet.

Heute sind die generellen Prinzipien der chemiosmotischen Theorie allgemein anerkannt. Es wird akzeptiert, daß während des Elektronentransports in Mitochondrien die aus NADH stammende Redoxenergie von drei Protonenpumpen genutzt wird, die als Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) bezeichnet werden. Sie treten nacheinander in Aktion und erzeugen die protonenmotorische Kraft, indem sie Protonen aus der Matrix (dem Inneren) der Organelle heraustransportieren (Abb. 1). Bis vor kurzem war die Wirkungsweise dieser chemiosmotischen Protonenpumpen noch rätselhaft, doch wächst unser Verständnis durch die Anwendung moderner Methoden der Molekularbiologie zur Analyse ihrer Strukturen und Funktionen ständig. Zum Beispiel können anhand zweier unabhängiger, hochauflöster Kristallstrukturen der Cytochrom-c-Oxidase (aus Rinder-Mitochondrien^[3, 4] und dem Bakterium *Paracoccus denitrificans*^[5, 6]) Mutations- und spektroskopische Experimente konzipiert werden, die neue Einsichten über den Mechanismus liefern. Die Teilstrukturen vom mitochondrialen Komplex III aus zwei unterschiedlichen Organismen^[7] werden unser Verständnis dieses Enzyms bald auf ähnliche Weise erweitern. Komplex I, die dritte Protonenpumpe in Mitochondrien, ist in Säugern ein Komplex aus wenigstens 43 verschiedenen Polypeptiden, mit einem Molekulargewicht von über 900 000.^[8] Außerdem enthält er ein nichtkovalent gebundenes Flavinmononucleotid und mindestens fünf Eisen-Schwertel-Cluster, die als Redoxzentren wirken. Wegen dieser extremen Komplexität ist die Strukturanalyse von Komplex I weniger weit fortgeschritten als die der Komplexe III und IV, obwohl seine allgemeine Gestalt elektronenmikroskopisch aufgeklärt werden konnte.^[9, 10]

[*] Prof. Dr. John E. Walker
Medical Research Council
Laboratory of Molecular Biology
Hills Road, Cambridge CB22QH (Großbritannien)
Fax: (+44) 1-223-213-556
E-mail: walker@mrc-lmb.cam.ac.uk

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



ATP-Synthase	Cyt. aa ₃	Cyt. bc ₁	Komplex I	
Untereinheiten kDa	31 600	13 205	11 240	43 1000

Abb. 1. Die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzymkomplexe in der inneren Membran von Säuger-Mitochondrien. Drei Protonenpumpen, Komplex I, Komplex III (Cytochrome bc₁) und Komplex IV (Cytochrome aa₃) wandeln die in NADH enthaltene Redoxenergie in protonenmotorische Kraft (PMF) um, indem sie Protonen aus der Matrix des Mitochondriums ausschleusen. Die ATP-Synthase synthetisiert mit der aus der protonenmotorischen Kraft resultierenden Energie ATP aus ADP und Phosphat. ADP und Phosphat werden durch verwandte Transportproteine in die Mitochondrien gebracht. Externes ADP wird gegen internes ATP ausgetauscht, wodurch das neu gebildete ATP für viele biologische Funktionen verfügbar wird. Die gestrichelten Linien zeigen den Weg der Elektronen an. Q und C sind die beweglichen Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrome c.

Die ATP-Synthase

Seit 1978 haben meine Kollegen und ich uns auf die Strukturanalyse der ATP-Synthase konzentriert, eines anderen Enzymkomplexes aus vielen Untereinheiten, der wie die drei Protonenpumpen in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Abb. 1). Ähnliche Komplexe gibt es in Chloroplasten und in den Membranen von Eubakterien. Bei unseren Forschungen sind wir immer von der Erwartung beflügelt worden, daß eine detaillierte Kenntnis der Struktur zu einem tieferen Verständnis der ATP-Bildung führen werde. Ein wesentlicher Teil unserer Bemühungen war darauf gerichtet, die Untereinheiten-Zusammensetzung der ATP-

synthetisierenden Enzyme aus unterschiedlichen Quellen aufzuklären und die Primärsequenzen der Untereinheiten zu bestimmen.^[11–31] Mit diesen sehr ausführlichen Analysen konnten wir zeigen, daß die Gesamtstruktur der ATP-Synthase und damit auch die allgemeinen Prinzipien, nach denen sie funktioniert, sich in Mitochondrien, Chloroplasten und Eubakterien sehr ähneln, obwohl die Enzyme aus verschiedenen Quellen sich in Details der Sequenzen und Untereinheiten-Zusammensetzung unterscheiden (Tabelle 1). Es ist auch bekannt, daß die ATPasen aus verschiedenen Quellen sich im Mechanismus unterscheiden, über den ihre katalytische Aktivität geregelt wird.^[32]

Tabelle 1. Einander entsprechende Untereinheiten in den ATP-Synthasen von Bakterien, Chloroplasten und Rinder-Mitochondrien.

Typ	Bakterien	Chloroplasten	Mitochondrien ^[a]
F ₁	α	α	α
	β	β	β
	γ	γ	γ
	δ	δ	OSCP
	ϵ	ϵ	δ
	–	–	ϵ
F ₀	a	a (oder x)	a (oder ATPase 6)
	$b^{[b]}$	b und b' (oder I und II)	b
	c	c (oder III)	c

[a] Die ATP-Synthase aus Mitochondrien enthält zusätzlich die Untereinheiten F₆, Inhibitor, A6L, d, e, f und g, die kein Gegenstück in den Enzymen aus Chloroplasten und Bakterien haben. [b] Die ATP-Synthasen aus *E. coli* und dem Bakterium PS3 (beides Enzyme mit 8 Untereinheiten) haben zwei identische Kopien der Untereinheit b pro Komplex. Schwefelfreie Purpurbakterien und Cyanobakterien haben offenbar neun unterschiedliche Untereinheiten, die zusätzlichen Untereinheiten (als b' bezeichnet) sind Homologe zur b-Untereinheit. In ähnlicher Weise besteht das Chloroplasten-Enzym aus neun nichtidentischen Untereinheiten, von denen die Untereinheiten I und II homolog zu b bzw. b' sind.

1962 wurde elektronenmikroskopisch gezeigt, daß die Innenseite der inneren Membran von Rinderherz-Mitochondrien dicht mit pilzförmigen Knöpfchen von etwa 100 Å Durchmesser besetzt ist (Abb. 2 A).^[33] Später wurden ähnliche Strukturen gefunden, die mit den Thylakoidmembranen von Chloroplasten (Abb. 2 B)^[34] und den inneren Membranen von Eubakterien (Abb. 2 C) assoziiert sind. Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung war die Funktion dieser membrangebundenen Knöpfchen nicht bekannt, doch glaubte man, daß sie wahrscheinlich für die biologische Energieumwandlung wichtig waren.



John E. Walker wurde 1941 in Halifax, Großbritannien, geboren. Er erhielt seinen M.A. an der Universität Oxford, wo er auch zum D.Phil. promovierte. Seit 1982 arbeitet er als Senior Scientist im Laboratorium für Molekularbiologie des Medical Research Council in Cambridge. 1995 wurde er zum Fellow der Royal Society in London ernannt, und 1997 erhielt er den Nobel-Preis für Chemie.

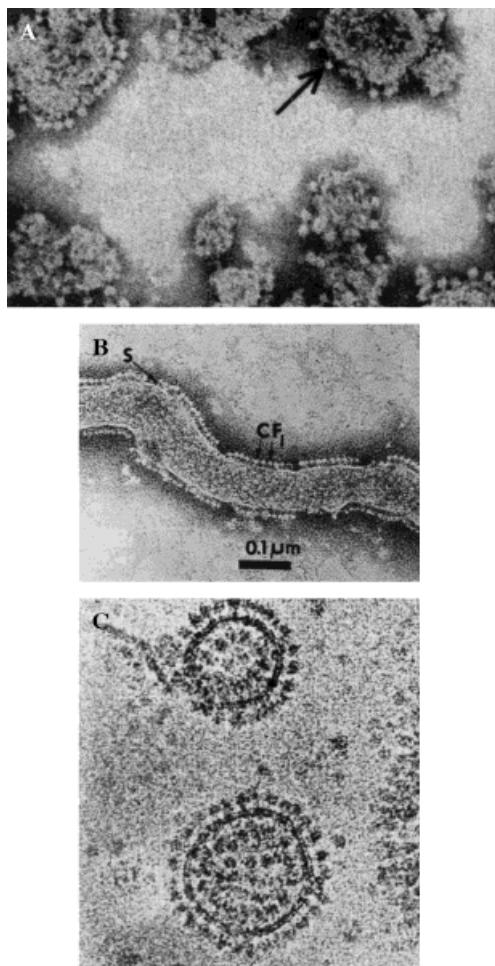


Abb. 2. Knöpfchen, die mit den biologischen Membranen assoziiert sind, unter dem Elektronenmikroskop nach negativer Anfärbung. A) Inside-out-Vesikel aus Rinderherz-Mitochondrien; B) Thylakoidmembranen aus Erbsen-Chloroplasten; C) Inside-out-Vesikel aus *E. coli*. Die drei Aufnahmen sind unterschiedlich stark vergrößert, alle Knöpfchen haben einen Durchmesser von ca. 100 Å. (Mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [88, 89] übernommen.)

tig sind und nannte sie daher „die grundlegenden Teilchen der Biologie“.^[35] In einer brillanten Serie biochemischer Rekonstitutionsexperimente wies Efraim Racker in den sechziger Jahren nach, daß sie der ATP-synthetisierende Enzymkomplex waren (z.B. Lit.[36–38]) und daß diese frühen mikroskopischen Aufnahmen die ersten flüchtigen Blicke auf ihre Struktur waren.

Heute wissen wir, daß der Kopf des Pilzes ein globulärer Proteinkomplex ist (F_1 -Domäne genannt), in dem die katalytischen Zentren der ATP-Synthase liegen. Der F_1 -Teil ist durch einen schlanken, etwa 45 Å langen Stiel an den Membranteil gebunden. Diese hydrophobe Membrandomäne (F_0 -Domäne genannt) transportiert Protonen durch die energieladene Membran zurück in die Matrix und setzt dabei irgendwie Energie frei, die dann für die ATP-Synthase in der katalytischen F_1 -Domäne verfügbar wird. Einige Jahre lang war allgemein anerkannt, daß für jedes ATP-Molekül, das in der F_1 -Domäne gebildet wird, drei Protonen durch die F_0 -Membrandomäne zurückfließen.^[1] Neuere Experimente lassen hingegen vermuten, daß das Chloroplasten-Enzym für jedes gebildete ATP-Molekül vier Protonen zurücktransportiert.^[39] Daher sind entweder einer oder – weniger wahrscheinlich – beide Werte für das $H^+ : ATP$ -Verhältnis falsch, oder aber der Mechanismus und die Strukturen des mitochondrialen und des Chloroplasten-Enzyms unterscheiden sich in ihrem F_0 -Teil erheblich. Diesen Punkt werde ich später im Zusammenhang mit der möglichen Struktur und dem Mechanismus von F_0 weiter ausführen.

Das allgemeine Modell vom Mechanismus der ATP-Synthase, das ich später vorstellen werde, besagt, daß die F_0 -Membrandomäne einen rotierenden molekularen Motor enthält, der von der protonenmotorischen Kraft angetrieben wird. Es wird vorgeschlagen, daß dieser Motor mechanisch an den Stiel des Enzyms gekoppelt ist und daß die Rotation des Stiels die katalytische Domäne beeinflußt und dafür sorgt, daß die drei katalytischen Zentren einen Cyclus von Konformationen durchlaufen (Rotations-Katalyse), in dem zunächst die Substrate gebunden und abgeschirmt werden, dann aus diesen ATP gebildet wird und schließlich das neu gebildete ATP vom Enzym freigesetzt wird. Dieser Umwandlungscyclus der drei katalytischen Zentren ist Teil des Bindungswechsel-Mechanismus der ATP-Synthase, der von Paul Boyer etabliert wurde (Abb. 3).^[40, 90] Eines der wichtigsten Postulate dabei ist, daß die energieabhängigen Schritte in diesem Cyclus der ATP-Synthase die Substratbindung und die Produktfreisetzung sind. Dieser Mechanismus setzt außerdem voraus, daß die ATP-Synthase eine asymmetrische Struktur hat; eine Struktursymmetrie wird zudem durch die molaren Verhältnisse der Untereinheiten der F_1 -ATPase impliziert. Tatsächlich ist mittlerweile anhand der asymmetrischen Eigenschaften, die die Enzymstruktur aufweist, klar, daß es im katalytischen Cyclus keine Zustände mit Struktursymmetrie geben kann.

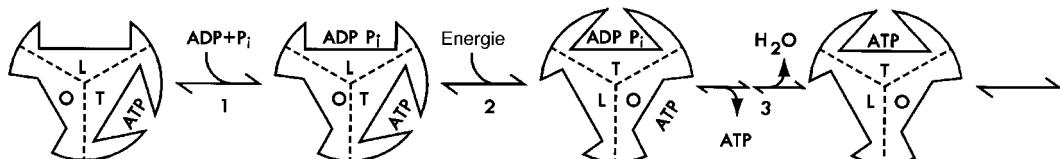


Abb. 3. Energieabhängiger Bindungswechsel-Mechanismus der ATP-Synthase. Die katalytischen Zentren der β -Untereinheiten treten miteinander in Wechselwirkung und nehmen dabei abwechselnd eine von drei Konformationen ein: O = offen; die Bindungsstelle hat eine sehr niedrige Affinität für die Substrate und ist katalytisch inaktiv. L = lockere Bindung; die Bindungsstelle bindet die Substrate nur locker und ist katalytisch inaktiv. T = feste Bindung; die Bindungsstelle bindet die Substrate fest und ist katalytisch aktiv. Durch die protoneninduzierte Konformationsänderung geht eine Bindungsstelle mit T-Konformation, die gebundenes ATP enthält, in die O-Form über und setzt das Nucleotid frei. Gleichzeitig wird die Bindungsstelle mit L-Konformation, die locker gebundenes ADP und Phosphat enthält, in die T-Form umgewandelt und katalysiert die Bildung von ATP. Neue Substrate binden an die Bindungsstelle mit O-Konformation, die daraufhin in die L-Form übergeht und so weiter. Ein Drittel des katalytischen Cyclus ist dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [40] übernommen.)

Die Struktur der F₁-ATPase

Eine aus experimenteller Sicht wichtige Eigenschaft des ATP-Synthase-Komplexes, die die Strategie für die Strukturanalyse beeinflußt hat, ist die, daß die globuläre, katalytische F₁-ATPase-Domäne von der Membrandomäne abgelöst und von dieser getrennt in wässriger Lösung untersucht werden kann, wie Racker in den sechziger Jahren gezeigt hat. Anschließend reinigten Alan Senior und Harvey Penefsky den F₁-Komplex aus Rind.^[41, 42] und Penefsky wies fünf unterschiedliche Polypeptide nach, die er α , β , γ , δ und ε nannte.^[42] Bald danach wurde auch akzeptiert, daß sie sich zu einem Komplex mit der stöchiometrischen Zusammensetzung $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ zusammenlagern. Jeder F₁-Teil ist also ein Komplex aus neun Polypeptiden, der für das Enzym aus Rinderherz ein Gesamt molekulargewicht von ca. 371 000 hat (Tabelle 2).

Tabelle 2. Die Untereinheiten der Rinder-F₁-ATPase.

Untereinheit	$M_r^{[a]}$	Funktion
α	55 247	Nucleotidbindung
β	51 705	Nucleotide, Katalyse
γ	30 141	Verbindung mit F ₀
δ	15 065	Stiel
ε	5 632	Stiel

[a] Die relative Molekulmasse des Gesamtkomplexes $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ beträgt 371 694.

Die α - und β -Untereinheiten binden Nucleotide, aber wir wissen inzwischen, daß die katalytischen Nucleotidbindungsstellen fast vollständig innerhalb der β -Untereinheiten liegen (Abb. 4). Die Nucleotide, die an die α -Untereinheiten gebunden sind, bleiben während des katalytischen Cyclus dort assoziiert und sind nicht direkt an der ATP-Synthese beteiligt. Was sie dort tun, ist noch immer rätselhaft, doch wurden sowohl strukturelle als auch regulatorische Funktionen vermutet.

1981 fanden wir heraus, daß die Sequenzen der α - und β -Untereinheiten fast über die gesamte Länge schwach homolog sind,^[12, 13] und Matti Saraste und ich fragten uns, welche Sequenzabschnitte am Aufbau der Nucleotidbindungsstellen beteiligt sind. Wir untersuchten die bekannte Primär- und Raumstruktur der Adenylatkinase^[43] und die Sequenz von Myosin aus *Caenorhabditis elegans* (die damals noch nicht veröffentlicht war, mir aber von Jonathan Karn zur Verfügung gestellt wurde) und konnten daraufhin vorschlagen, daß zwei kurze degenerierte Sequenzmotive, die Adenylatkinase, Myosin sowie die α - und β -Untereinheiten der F₁-ATPase gemeinsam haben, am Aufbau der Nucleotidbindungsstellen dieser Enzyme beteiligt sein sollten.^[44]

Dieser Vorschlag hatte viel weitreichendere Konsequenzen, als wir uns 1982, zur Zeit der Publikation, vorgestellt hatten. Während der nächsten Jahre wurde eines der beiden Motive als verlässlicher Indikator für Purinnucleotidbindungsstellen in Proteinen mit bekannter Sequenz, aber unbekannter biochemischer Funktion etabliert. Eine spektakuläre Demonstration ihres prognostischen Wertes war die Identifizierung von Mitgliedern der weit verbreiteten Familie der ABC-Transportproteine (ABC = adenosin bin-

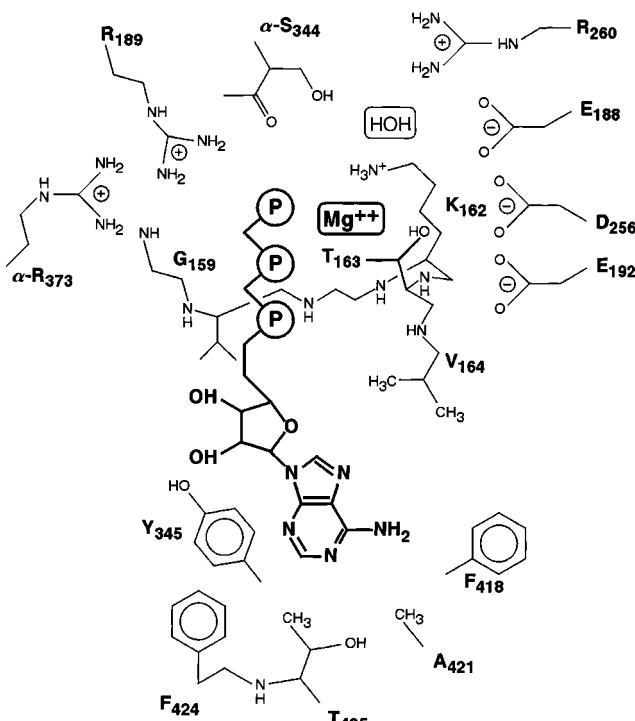


Abb. 4. Die Nucleotidbindungsstelle in der β_{TP} -Untereinheit der Rinder-F₁-ATPase. Mit Ausnahme von Arg 373 der α_{TP} -Untereinheit, der Carbonylgruppe des Proteinkrückgrats sowie der Seitenkette von Ser 344 der α_{TP} -Untereinheit gehören alle dargestellten Aminosäuren zur β_{TP} -Untereinheit. Die Reste 159–164 sind Teil des P-Loops. Das für einen nucleophilen Angriff auf die terminale Phosphatgruppe in einer definierten Orientierung gebundene Wassermolekül wird durch Glu 188 aktiviert. Sobald sich an dieser Phosphatgruppe im fünffach koordinierten Übergangszustand der ATP-Hydrolyse eine negative Ladung bildet, wird diese durch die Guanidiniumgruppe von Arg 373 der α -Untereinheit stabilisiert. (Mit freundlicher Genehmigung aus Lit.[50] übernommen.)

ding cassette),^[45] zu der das für die cystische Fibrose (Mucoviscidose) verantwortliche Protein und das Multi-drug-resistance-Protein gehören. Ein weiterer früher Erfolg war der Nutzen der beiden Motive bei der Identifizierung des onkogenen Proteins p21 als GTPase.^[46] Aus der weiter unten beschriebenen Kristallstruktur der F₁-ATPase ließ sich, wie bei anderen Proteinen, ableiten, daß die beiden Sequenzmotive Aminosäuren beinhalten, die an der Bildung der Phosphat-bindenden Region der Nucleotidbindungsstellen beteiligt sind. Daher wird eines dieser Sequenzmotive oft als P-Loop-Sequenz (P = phosphate binding) bezeichnet (Abb. 5).^[47]

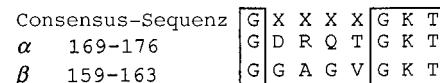


Abb. 5. Sequenzmotiv des phosphatbindenden Loops in der α - und β -Untereinheit der Rinder-F₁-ATPase. In einigen Bindungsstellen für Purin-Nucleotide ist der letzte Threoninrest durch einen Serinrest ersetzt.

Bei der Bestimmung der Kristallstruktur der F₁-ATPase aus Rinderherz-Mitochondrien war das zentrale Problem, Kristalle des Proteinkomplexes zu erhalten, die die Röntgenstrahlen mit hinreichend hoher Auflösung beugten. Wir

erhielten zwar zu Beginn unserer Versuche Kristalle, doch beugten sie die Röntgenstrahlen nur schwach. Daher untersuchten wir sieben Jahre lang systematisch, welche Faktoren das Kristallwachstum beeinflußten, und die Beugungseigenschaften der Kristalle verbesserten sich allmählich. 1990 erhielten wir endlich geeignete Kristalle. Im Rückblick waren die entscheidenden Faktoren hierfür die Verwendung hochreiner Enzympräparationen, aus denen auch Spuren von Verunreinigungen entfernt worden waren; der Austausch endogen gebundener Nucleotide gegen Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat (AMP-PNP), ein nichthydrolysierbares chemisches Analogon von ATP, das den Komplex in einer definierten Konformation fixiert; sowie die Kristallzüchtung in Gegenwart von Deuteriumoxid anstelle von Wasser. Messungen an einem Synchrotron ergaben, daß Kristalle der Rinder-F₁-ATPase, die unter den zuvor genannten Bedingungen gezüchtet worden waren, die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von mindestens 2.8 Å beugten.^[48, 49] Die Zusammenarbeit mit Drs. René Lutter und Rose Todd während dieser kritischen Phase war von entscheidender Bedeutung. An diesem Punkt erschien eine Strukturanalyse der F₁-ATPase erstmalig als realistische Möglichkeit. Unsere Erfolgschancen mit einem so großen Proteinkomplex wurden durch die Zusammenarbeit mit Dr. Andrew Leslie, einem professionellen Proteinkristallographen, enorm gesteigert. Zusammen mit ihm und dem als Postdoktorand tätigen Gastwissenschaftler Dr. J. P. Abrahams lösten wir die Struktur bei atomarer Auflösung überraschend schnell,^[50] wenn man die Größe des Komplexes und die damit verbundenen Probleme beim Sammeln und Auswerten der Röntgenbeugungsdaten berücksichtigt.

Das Strukturmodell der Rinder-F₁-ATPase enthält 2983 Aminosäuren. Mit Ausnahme von kurzen, ungeordneten Regionen an den N-Termini konnte der Kettenverlauf der α - und β -Untereinheiten vollständig bestimmt werden. Auch drei α -helicale Bereiche der γ -Untereinheit, die den Aminosäuren 1–45, 73–90 und 209–272 entsprechen, wurden in das Modell eingebaut. Die Segmente, die diese drei Bereiche verbinden, sind ebenso wie die gesamte δ - und ε -Untereinheit (150 bzw. 50 Aminosäuren) ungeordnet. Diese ungeordneten Bereiche der γ -, δ - und ε -Untereinheiten, die zusammen ca. 300 Aminosäuren ausmachen, liegen wahrscheinlich dicht unterhalb des $\alpha_3\beta_3$ -Unterkomplexes an der Stelle, wo die γ -Untereinheit aus der Struktur herausragt (die γ -Untereinheit ist in den Abbildungen 6 und 7 blau dargestellt). Die Ausstülpung ist wahrscheinlich ein Überrest des 45 Å langen Stiels, der die F₁- und die F₀-Domäne im vollständigen ATP-Synthase-Komplex miteinander verbindet.

Das Strukturmodell zeigt, daß die drei α - und die drei β -Untereinheiten alternierend um eine sechszählige Pseudosymmetriearchse angeordnet sind, die durch einen α -helicalen Bereich der einzelnen γ -Untereinheit gebildet wird (Abb. 6 und 7). Trotz des großen Überschusses an AMP-PNP und ADP in der Mutterlauge, aus der die Kristalle gewachsen sind, sind nur fünf und nicht sechs Nucleotide an jeden Enzymkomplex gebunden. Ein AMP-PNP-Molekül findet sich in jeder α -Untereinheit, ein viertertes in einer β -Untereinheit. Ein ADP-Molekül ist an die zweite β -Untereinheit gebunden, die dritte enthält überhaupt kein Nucleotid. Ein

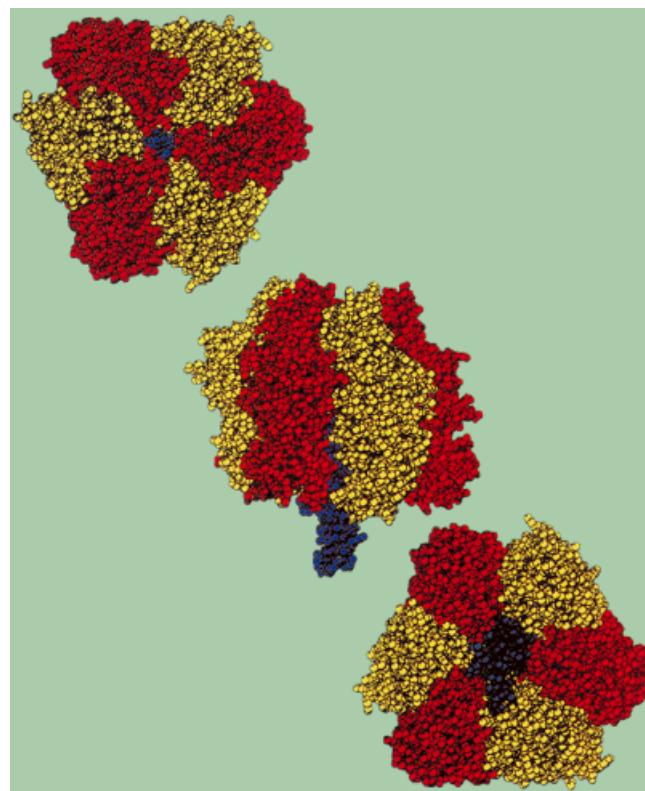


Abb. 6. Dreidimensionale Struktur der Rinder-F₁-ATPase in raumfüllender Darstellung. Die α -, β - und γ -Untereinheiten sind rot, gelb bzw. blau gezeichnet. Die einzelnen Darstellungen des Komplexes (von oben nach unten) entsprechen folgenden Blickrichtungen: Ansicht von oben (bei der intakten ATP-Synthase in Membranrichtung), von der Seite und von unten.

Strukturvergleich zwischen den drei chemisch identischen β -Untereinheiten im F₁-Komplex liefert die Erklärung hierfür. Die beiden katalytischen β -Untereinheiten, die AMP-PNP und ADP gebunden haben (β_{TP} bzw. β_{DP} ; Abb. 7b und 7c), haben unterschiedliche, aber relativ ähnliche Konformationen, während die Struktur der dritten β -Untereinheit, an die kein Nucleotid gebunden ist (β_E ; Abb. 7d), entscheidend von den beiden anderen abweicht, besonders im Bereich der zentralen Domäne, in der in β_{TP} und β_{DP} die Nucleotide gebunden sind. In β_E hat sich die C-terminale Hälfte dieser zentralen Domäne zusammen mit dem Bündel aus sechs α -Helices, die diese zentrale Domäne bilden, von der sechszähligen Pseudosymmetriearchse weggedreht. Dieses Aufbrechen der Struktur der zentralen Domäne zerstört die Fähigkeit der β_E -Untereinheit zur Nucleotidbindung. Daher weist die Kristallstruktur der F₁-ATPase die Asymmetrie auf, die für den Bindungswechsel-Mechanismus erforderlich ist, und die drei unterschiedlichen Konformationen der Untereinheiten β_E , β_{TP} und β_{DP} können als „offener“, „locker bindender“ bzw. „fest bindender“ Zustand interpretiert werden.

Neuere ausführliche kristallographische Untersuchungen der F₁-ATPase im Komplex mit Antibiotika-Inhibitoren,^[51, 52] mit gebundenem ADP und ATP,^[91] nach Inhibition durch ADP und Aluminiumfluorid^[92] sowie nach Inhibition durch kovalent gebundenes 7-Chlor-4-nitrobenzofurazan^[93] lassen kaum daran zweifeln, daß die oben beschriebenen hochauf-

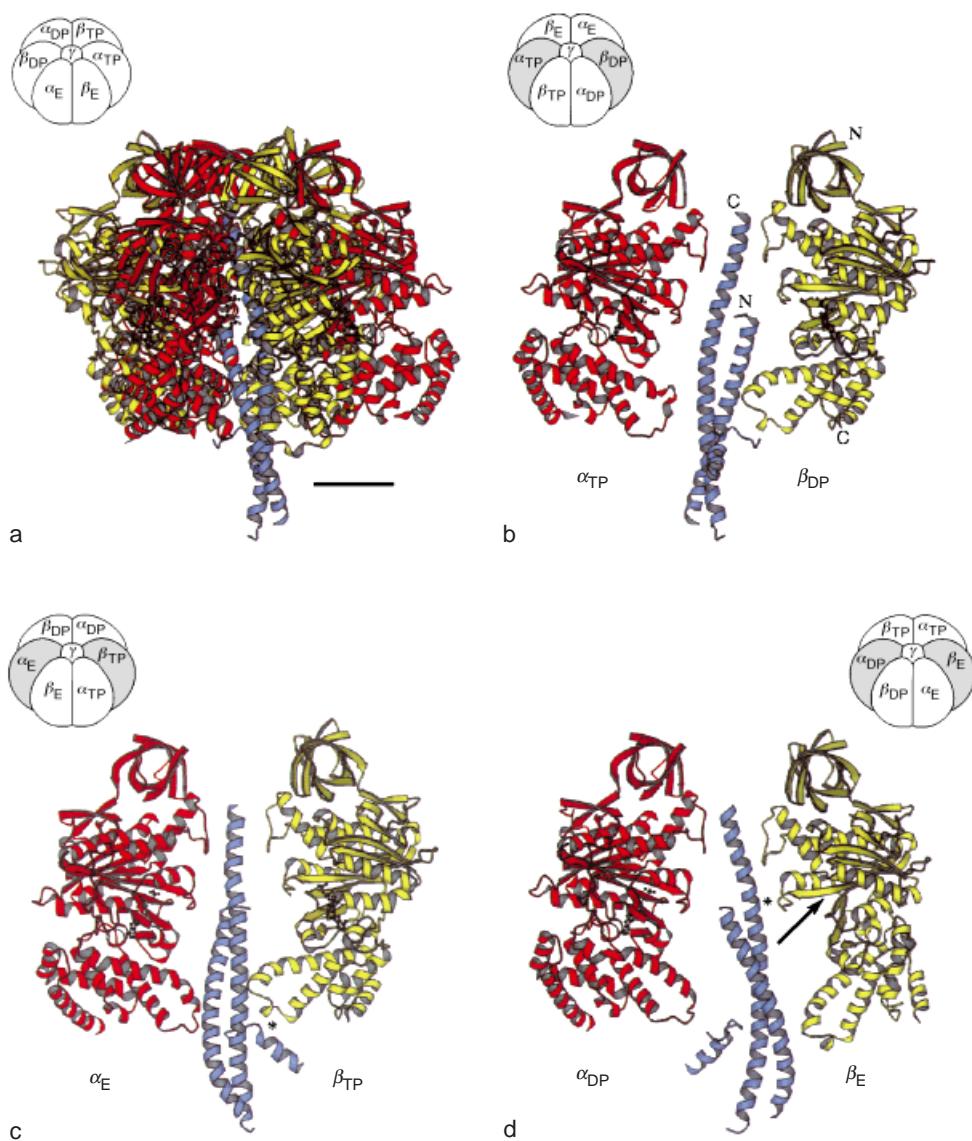


Abb. 7. Bänderdarstellung der dreidimensionalen Struktur der Rinder-F₁-ATPase. Die Farbcodierung der Untereinheiten entspricht der aus Abbildung 6. Nucleotide sind als schwarze Kugel-Stab-Modelle dargestellt. Die Pseudosymmetriechse verläuft vertikal. An die drei α -Untereinheiten und an die β_{TP} -Untereinheit ist jeweils ein Moleköl AMP-PNP gebunden. Die Untereinheit β_{DP} enthält ein ADP-Moleköl, an die Untereinheit β_E ist kein Nucleotid gebunden. Die Untereinheiten α_{TP} , α_E und α_{DP} nehmen relativ zueinander die gleichen Positionen ein wie die entsprechenden β -Untereinheiten, sind diesen gegenüber aber um $\sim 60^\circ$ gedreht. Die Beziehung der verschiedenen α - und β -Untereinheiten zueinander ist in der linken oder rechten oberen Ecke der Abbildungen a)–d) skizziert. In b)–d) zeigt der schattierte Teil der Skizze an, welche Untereinheiten dargestellt sind. Die Untereinheit α_{TP} trägt zur Bildung der Nucleotidbindungsstelle von β_{TP} bei, und Entsprechendes gilt für α_{DP} und α_E . Die Aminosäuren der Untereinheiten α und γ sind von 1–510 bzw. 1–272 nummeriert. Vereinbarungsgemäß hat die fünfte Aminosäure (Serin) der Untereinheit β die Sequenznummer 1 und die ersten vier Aminosäuren (Ala-Ala-Gln-Ala) die Sequenznummern –1 bis –4. Die C-terminale Aminosäure hat die Sequenznummer 478. a) Ansicht des gesamten F₁-Teils, in dem die Untereinheiten α_E und β_E dem Betrachter zugewandt sind; die Superspiralisierung (coiled coil) der antiparallelen N- und C-terminalen Helices der γ -Untereinheiten ist durch die Öffnung in der Kontaktfläche zwischen α - und β -Untereinheit sichtbar. Der Maßstabsbalken ist 20 Å lang. b) Ansicht der Untereinheiten α_{TP} , γ und β_{DP} aus einer ähnlichen Perspektive wie in a), jedoch um 180° um die Pseudosymmetriechse gedreht. Die N- und C-Termini der β - und γ -Untereinheiten sind markiert. c) Ansicht der Untereinheiten α_E , γ und β_{TP} aus einer ähnlichen Perspektive wie in a), jedoch um $\sim 60^\circ$ gedreht. Der Stern deutet eine Wechselwirkung zwischen dem Loop mit dem Sequenzmotiv DELSEED und der γ -Untereinheit an. d) Ansicht der Untereinheiten α_{DP} , γ und β_E aus einer ähnlichen Perspektive wie in a), jedoch um 60° gedreht. Der Pfeil zeigt die Unterbrechung des β -Faltblatts in der nucleotidbindenden Domäne an. Asp316, Thr318 und Asp323 in einem Loop der nucleotidbindenden Domäne der β_E -Untereinheit bilden H-Brücken mit den Aminosäuren Arg254 und Gln255 aus der C-terminalen Helix der γ -Untereinheit, 6 Å unterhalb der hydrophoben Hülle. Der Stern markiert einen Loop, der mit dem C-terminalen Teil der γ -Untereinheit in Wechselwirkung steht. (Mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [50] übernommen.)

gelösten Strukturen einem Zustand während des aktiven Cyclus des Enzyms entsprechen.

Der aufregendste Aspekt der Struktur ist der, daß sie einen Mechanismus für die Umwandlung der drei katalytischen Untereinheiten während des Konformationszyklus andeutet, wie er nach dem Bindungswechsel-Mechanismus notwendig ist. Aus der Struktur (Abb. 7) läßt sich ableiten, daß die Nucleotidbindungs-Eigenschaften dieser drei katalytischen β -Untereinheiten durch den zentralen α -helicalen Teil der γ -Untereinheit moduliert werden. Dieser Teil ist gekrümmt, und sein superspiralisierte (Coiled-coil-) Bereich scheint starr zu sein. Wie anhand der Kristallstruktur zu erkennen ist, sollte diese Krümmung den „offenen Zustand“ der β_E -Untereinheit hervorrufen, indem sie gegen die C-terminale Domäne des Proteins drückt und so die Nucleotidbindungsstelle aufspaltet und nach außen drängt, so daß die Fähigkeit zur Nucleotidbindung verlorengeht. In diesem Modell ist der einfachste Weg, die drei Konformationen der β -Untereinheiten ineinander umzuwandeln, eine Rotation des zentralen α -helicalen Bereichs. Wenn er rotiert, bewegt sich der gekrümmte Teil der γ -Untereinheit von der β_E -Untereinheit weg, so daß sich die Nucleotidbindungsstelle wieder schließen kann und nach einander die Substrate bindet, aus denen spontan ATP gebildet wird. Gleichzeitig wird die nächste β -Untereinheit allmählich durch die Wechselwirkung mit dem gekrümmten Teil der γ -Untereinheit geöffnet, so daß das in ihrer Nucleotidbindungsstelle gebildete ATP freigesetzt werden kann.

Indizien für einen Rotationsmechanismus der ATP-Synthase

Die Vermutung, daß mit der ATP-Synthase eine cyclische Modulation der Nucleotidbindungs-Eigenschaften der drei katalytischen β -Untereinheiten durch die Rotation der γ -Untereinheit einhergeht, war deswegen so attraktiv, weil sie eine vernünftige Strukturbasis für den Bindungswechsel-Mechanismus lieferte. Der Vorschlag ging jedoch auf die Interpretation einer statischen Kristallstruktur zurück, und es gab keinen Beweis dafür, daß das Enzym tatsächlich so funktionierte. Daher wurden in den Labors von Richard Cross, Rod Capaldi und Wolfgang Junge verschiedene Experimente durchgeführt, um die Rotationshypothese zu testen.^[53-55] Sie stimmten alle mit dem Rotationsmodell überein und lieferten überzeugende Nachweise für eine Bewegung der γ -Untereinheit von 90–240°; ein schlüssiger Beweis für wiederholte Gesamtrotationen um 360° fehlte aber noch.

Anfang 1997 wurden klare Hinweise auf eine kontinuierliche Rotation der γ -Untereinheit relativ zum umgebenden $\alpha_3\beta_3$ -Unterkomplex durch ein spektakuläres Experiment von Masasuke Yoshida et al.^[56] vom Tokyo Institute of Technology erhalten. Das Prinzip des Experiments (Abb. 8) bestand darin, den $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Unterkomplex an eine nickelbeschichtete Glasoberfläche in einer einheitlichen Orientierung zu binden, indem die nickelbindende Sequenz (His)₁₀ an die N-Termini der β -Untereinheiten angehängt wurde. Ein Cysteinrest, der

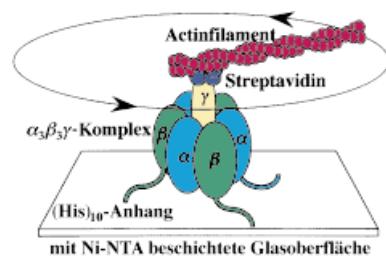


Abb. 8. Experimenteller Nachweis der ATP-abhängigen Rotation der γ -Untereinheit des $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Unterkomplexes. Erklärungen siehe Text. (Mit freundlicher Genehmigung aus Lit.[56] übernommen.) NTA = Nitrilotriacetat.

durch Mutagenese an der exponierten Spitze der γ -Untereinheit distal zur nickelbeschichteten Oberfläche eingeführt worden war, wurde biotinyliert; daran wurde über ein Streptavidinmolekül, das vier Biotinbindungsstellen hat, ein fluoreszenzmarkiertes, ebenfalls biotinyliertes Actinfilament gebunden. Die Actinfilamente waren 1–3 μm lang, und ihre ATP-abhängige Rotation gegen den Uhrzeigersinn konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug etwa eine Umdrehung pro Sekunde, etwa ein Fünfzehntel dessen, was anhand der Wechselzahl des vollständig aktiven Enzyms berechnet worden war. Die geringere Aktivität röhrt vermutlich von der Last des Actinfilaments und dem Fehlen der δ - und ε -Untereinheiten her.

Neben dem Vorteil, einen direkt sichtbaren Nachweis für die Rotation der γ -Untereinheit zu liefern, war ein weiterer

höchst wichtiger Aspekt dieses Experiments der, daß damit die Reihenfolge der Umwandlung der aus der Kristallstruktur abgeleiteten drei Konformationen der β -Untereinheiten ineinander ermittelt werden konnte. Während der ATP-Hydrolyse geht die β_{DP} -Untereinheit in die β_{E} -Form über, aus β_{E} wird β_{TP} und aus β_{TP} wird β_{DP} . Die Annahme liegt nahe, daß bei der ATP-Synthase die γ -Untereinheit in entgegengesetzter Richtung rotiert und daß die Reihenfolge der Konformationsänderungen der β -Untereinheiten umgekehrt wie die bei der ATP-Hydrolyse ist.

Die Erzeugung der Rotation durch einen Protonentransport durch die F_0 -Membrandomäne

Nachdem einmal überzeugende Argumente für die Rotation der γ -Untereinheit vorlagen, tauchten die nächsten Fragen auf: Wie wird die Rotation durch den Protonentransport durch die F_0 -Domäne erzeugt, und welcher Art ist die Verbindung zwischen den Domänen F_1 und F_0 ? Eine hochaufgelöste Struktur ist entscheidend, um beide Fragen zu beantworten, doch bislang ist diese Struktur weder für die F_0 -Domäne noch für die zentrale Achse zwischen F_1 und F_0 mit Ausnahme der geordneten Ausstülpung der γ -Untereinheit bekannt. Die Strukturen der isolierten ε -Untereinheit^[57, 58] und eines Fragments der δ -Untereinheit des *Escherichia coli*-Enzyms^[59] wurden aufgeklärt. Die bakterielle ε -Untereinheit (die zur δ -Untereinheit des Rinder-Enzyms äquivalent ist)^[60] steht möglicherweise mit der Ausstülpung der γ -Untereinheit in Wechselwirkung, und die bakterielle δ -Untereinheit (äquivalent zur Rinder-OSCP-Untereinheit; OSCP = für die Oligomycinempfindlichkeit verantwortliches Protein)^[60] hat vermutlich Kontakt zum N-terminalen Ende der α -Untereinheiten (siehe unten), doch die genaue Lokalisierung und Funktion dieser Proteine im ATP-Synthase-Komplex sind unklar.

Auch wenn eine detaillierte Struktur der F_0 -Domäne noch fehlt, sammeln sich Hinweise auf die Anordnung der mit der Membran in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten. Die einfachste bislang charakterisierte F_0 -Domäne ist die des Enzyms aus dem Eubakterium *E. coli*. Sie besteht aus den drei Untereinheiten a , b und c im molaren Verhältnis ab_2c_{9-12} .^[61, 62] Die Unsicherheit bei der Zahl der c -Untereinheiten pro Komplex röhrt von experimentellen Schwierigkeiten her, wodurch keine exakteren Messungen möglich sind. Sekundärstrukturmodelle aller drei Untereinheiten wurden aufgrund der Interpretation der Sequenzen bakterieller F_0 -Untereinheiten vorgeschlagen.^[63] Aus der Sequenz von Untereinheit a wurden mehrfach Anzeichen für fünf, sechs oder sieben hydrophobe, membrandurchspannende Bereiche im Protein abgeleitet, wobei neuere Versuche ergaben, daß der korrekte Wert fünf ist.^[64] In der C-terminalen und der vorletzten α -Helix sind positiv geladene Aminosäuren, die für die Funktion der F_0 -Domäne essentiell sind. Die Untereinheit b ist über eine einzelne N-terminale α -Helix in der Membran verankert.^[65] Der Rest dieses Proteins ist hochgeladen und bildet vielleicht ein Homodimer, indem parallele α -Helices zu einer Superspirale verdrillt werden. Diese polare Region außerhalb der Membran tritt mit den

Untereinheiten der F_1 -Domäne in Wechselwirkung.^[66] Im Modell der Untereinheit c sind zwei antiparallele, membrandurchspannende α -Helices durch eine außerhalb der Membran liegende Schleife miteinander verbunden; diese Struktur wurde für das Protein in einer Chloroform-Methanol-Lösung mit NMR-Messungen bestätigt.^[64] Cysteinreste, die durch Mutagenese in den Loop und in die Spitze der γ -Untereinheit eingeführt wurden, bilden unter oxidierenden Bedingungen eine Disulfidbrücke; demnach stehen diese Regionen im intakten Enzym entweder miteinander (vielleicht nur vorübergehend) in Kontakt oder liegen dicht beieinander.^[67] Ähnliche Experimente sprechen für eine Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten ε und c .^[68] Das wichtigste Element der Untereinheit c ist die Carboxylgruppe der Seitenkette eines Aspartatrestes der C-terminalen α -Helix, die in die Membran eingebettet ist. Diese Carboxylgruppe ist bei allen bekannten Sequenzen von c -Untereinheiten konserviert und wird für den Transport von Protonen durch die Membran benötigt.^[61, 63] Je nach der exakten Zahl der c -Untereinheiten pro Komplex gibt es 9–12 solcher verborgener Carboxylgruppen in jedem ATP-Synthase-Komplex.

Der mitochondriale ATP-Synthase-Komplex enthält Untereinheiten, die zu den Untereinheiten a und c äquivalent sind (Tabelle 1). Die mitochondriale Untereinheit b ist wahrscheinlich auch das Äquivalent ihres gleichnamigen bakteriellen Gegenstücks, obwohl sie anscheinend zwei antiparallele, membrandurchspannende α -Helices (statt nur einer) am N-Terminus hat; außerdem gibt es nur eine b -Untereinheit pro Enzymkomplex. Wahrscheinlich wird die Funktion der zweiten bakteriellen b -Untereinheit im mitochondrialen Komplex von Untereinheiten übernommen, die nur dort vorkommen (z.B. von den Untereinheiten d und F_6), doch dies kann erst aufgeklärt werden, wenn auf Strukturebene mehr Details über die bakteriellen und die mitochondrialen Enzyme bekannt werden. Dennoch haben die bakteriellen und mitochondrialen F_0 -Domänen so viele Eigenschaften gemeinsam, daß es sehr wahrscheinlich ist, daß sie nach einem ganz ähnlichen Mechanismus funktionieren.

Auch die Entwicklung von Modellen zur Assoziation der Untereinheiten der F_0 -Domäne in der Membran macht Fortschritte. Nach einem solchen Modell bilden die c -Untereinheiten durch die Wechselwirkungen ihrer C-terminalen α -Helices einen Ring, ihre N-terminalen α -Helices liegen außerhalb des Ringes;^[69] die ringförmigen Strukturen der c -Untereinheiten ließen sich durch Kraftmikroskopie sichtbar machen.^[70, 71] Einige vorläufige experimentelle Hinweise auf diese Anordnung wurden auch durch die Bildung von Disulfidbrücken nach Einführung von Cysteinresten an geeigneten Stellen gewonnen.^[94] Außerdem sieht man auf den Kraftmikroskopie-Bildern, daß die b -Untereinheiten an der Außenseite des Rings der c -Untereinheiten plaziert sind.^[71] Gegenwärtig gibt es keine experimentellen Ergebnisse, die besagen, ob die a -Untereinheit innerhalb oder außerhalb des Rings der c -Untereinheiten liegt.

Wolfgang Junge hat ein Modell dafür entwickelt, wie der Protonentransport durch die F_0 -Domäne eine Rotationsbewegung erzeugen könnte (Abb. 9).^[72] Wesentlich für diesen hypothetischen Rotationsmotor ist, daß die essentiellen

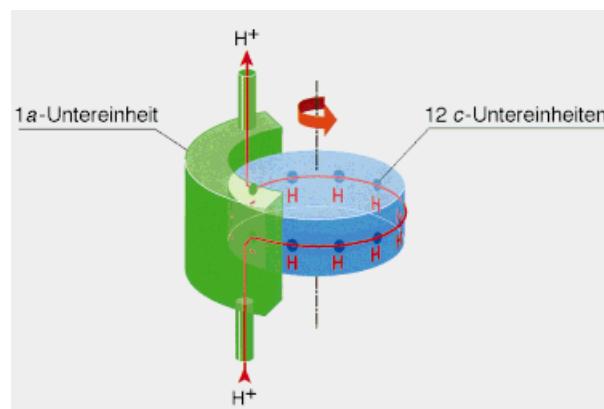


Abb. 9. Hypothetisches Modell für die Erzeugung einer Rotation durch den Protonentransport durch die F_0 -Domäne der ATP-Synthase (nach W. Junge). Der zentrale zylindrische Teil besteht aus c -Untereinheiten, die äußere gekrümmte Struktur ist die einzelne a -Untereinheit. Die rote Linie zeichnet den Weg der Protonen nach. Weitere Erklärungen im Text.

Carboxylgruppen in den c -Untereinheiten rund um den äußeren Rand des Rings angeordnet sind. Ein Teil der äußeren Oberfläche des Rings steht mit der Untereinheit a in Wechselwirkung, und in dieser Region sind die Carboxylgruppen negativ geladen. Man stellt sich nun vor, daß die Untereinheit a eine Einlaßöffnung auf der äußeren Membranoberfläche hat, durch die ein Proton eine der negativ geladenen Carboxylgruppen neutralisieren kann. Die so entstandene nichtionisierte Carboxylgruppe wird durch thermische Schwingungen in ihre bevorzugte Umgebung in der Phospholipiddoppelschicht gelangen. Die Neutralisation dieses Carboxylats an einer Stelle des Randes wird von der Ionisation einer weiteren, etwas weiter entfernt am Rand des Rings der c -Untereinheiten liegenden Carboxylgruppe begleitet, wobei das Proton durch eine Auslaßöffnung in Untereinheit a auf der Gegenseite der Membran freigesetzt und damit eine negative Ladung an der Kontaktfläche zwischen dem Ring der c -Untereinheiten und der Untereinheit a regeneriert wird. Aus diesen Protonierungs/Deprotonierungs-Vorgängen resultiert eine Drehbewegung des inneren Rings der c -Untereinheiten. Die Rotation bringt die nächste negativ geladene Carboxylgruppe zur Einlaßöffnung, wo sie dann durch ein weiteres Proton neutralisiert wird. Die gleichzeitige Freisetzung eines anderen Protons durch die Auslaßöffnung verursacht eine weitere Drehung. Vermutlich ist diese Rotationsvorrichtung direkt an die γ -Untereinheit gekoppelt.

Zur Synthese eines jeden ATP-Moleküls muß die γ -Untereinheit um 120° rotieren, so daß bei jeder vollständigen Umdrehung der γ -Untereinheit der F_1 -Domäne drei ATP-Moleküle gebildet werden. In einem hypothetischen Protonenmotor mit einem Ring aus zwölf c -Untereinheiten entspricht dies der sequentiellen Neutralisierung von vier Carboxylatgruppen durch Aufnahme von Protonen (und der gleichzeitigen sequentiellen Freisetzung von Protonen aus vier ungeladenen Carboxylgruppen). Mit anderen Worten, ein H^+ :ATP-Verhältnis von vier paßt zu einem molaren Verhältnis von zwölf c -Untereinheiten pro F_0 -Domäne. Analog hierzu würde ein H^+ :ATP-Verhältnis von drei neun c -Untereinheiten pro F_0 -Domäne erfordern.

Verbindungen zwischen der F_1 - und der F_0 -Domäne der ATP-Synthase

Die Argumente für eine Wechselwirkung zwischen der zentralen γ -Untereinheit und der assoziierten ε -Untereinheit in der bakteriellen F_1 -Domäne mit einem Loop einer c -Untereinheit der F_0 -Domäne sind bereits oben aufgeführt worden. Wahrscheinlich sind diese Proteine die wichtigsten Komponenten der zentralen Verbindung zwischen F_1 und F_0 , die im Elektronenmikroskop als 45 Å langer Stiel erscheint. Daneben gibt es immer mehr Hinweise auf eine zweite Verbindung zwischen der F_1 - und der F_0 -Domäne. Es ist bekannt, daß die bakterielle δ -Untereinheit und die äquivalente OSCP-Untereinheit aus Rind mit der N-terminalen Region der α -Untereinheiten wechselwirken, die am oberen Ende der F_1 -Domäne, distal zur Membrandomäne liegt.^[73, 74] Seit den sechziger Jahren weiß man auch, daß die Rinder-OSCP-Domäne für die Bindung von F_1 an F_0 benötigt wird, sie also vermutlich mit Untereinheiten der Membrandomäne in Wechselwirkung tritt. Daher ist die unvermeidliche Schlußfolgerung, daß die OSCP-Untereinheit (und wahrscheinlich auch die Untereinheit δ in den bakteriellen und Chloroplasten-Enzymen) sich vom oberen Ende von F_1 bis hinunter zu einer Region erstreckt, die mit der Membrandomäne assoziiert ist. Im Rinder-Enzym steht der N-terminalen Teil von OSCP mit dem N-terminalen Teil der α -Untereinheiten in Wechselwirkung.^[75, 76] Weiterhin wurden die Wechselwirkungen der Rinder-OSCP-Untereinheit mit verschiedenen F_0 -Komponenten in In-vitro-Rekonstitutionsexperimenten untersucht.^[77] Diese ergaben, daß die OSCP-Untereinheit hauptsächlich an den polaren, außerhalb der Membran liegenden Teil der Untereinheit b (als b' bezeichnet) bindet und nicht an die Untereinheiten d und F_6 . Die Untereinheiten b und F_6 dagegen binden an den b' -OSCP-Komplex und bilden einen stöchiometrischen Komplex, der von jedem der vier Proteine ein Exemplar enthält. Dieser Komplex (unglücklicherweise ebenfalls „Stiel“ genannt) geht mit einem Komplex der Untereinheiten δ und ε aus Rind keine starken Wechselwirkungen ein,^[78] was mit der Vorstellung übereinstimmt, daß der „Stiel“-Komplex aus Rind etwas anderes ist als der 45 Å lange zentrale Stiel.

Durch die Analyse einzelner Partikel aus negativ angefärbten Proben monodisperser Rinder-ATP-Synthase^[79-82] unter dem Elektronenmikroskop (EM) erhielt Simone Karrasch Hinweise auf einen zweiten, peripheren Stiel (Abb. 10). Ähnliches wurde unabhängig davon für das *E. coli*-Enzym^[95] und für eine ATPase vom V-Typ (ein der ATP-Synthase verwandtes Enzym) aus *Clostridium fervidus*^[83] beobachtet. Die EM-Aufnahme des Rinder-Enzyms zeigt auch eine andere neuartige Eigenschaft, eine scheibenförmige Struktur oder einen Kragen, der offensichtlich zwischen dem zentralen Stiel und der F_0 -Domäne sitzt und so ähnlich auch bei dem Enzym aus *Clostridium* zu sehen war. Es bleibt zu klären, welche Untereinheiten des Rinder-Enzyms an der Bildung des peripheren Stiels und des Kragens beteiligt sind. Die OSCP-Domäne und die Untereinheit b sind gute Kandidaten für den Stiel, während der Kragen vielleicht aus Teilen der c -Untereinheiten gebildet wird.

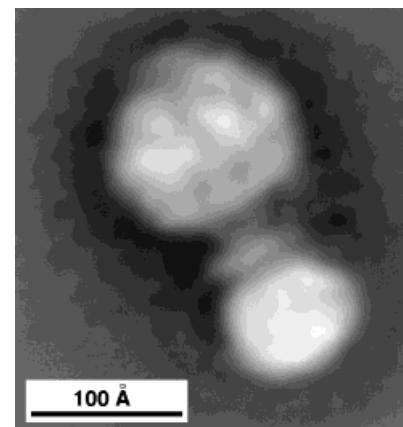


Abb. 10. Elektronenmikroskopische Abbildung von Rinder-ATP-Synthase, die nach Mittelung der Aufnahmen von 4940 einzelnen, negativ angefärbten Partikeln des Enzyms erhalten wurde. Die Ebene der Membran, mit der der Komplex in Mitochondrien assoziiert ist, verläuft von links nach rechts in einem Winkel von 45° nach oben. Der größere Kreis ist die katalytische F_1 -Domäne, der kleinere Kreis darunter ist die F_0 -Domäne (oder ein Teil davon). Die neu entdeckten Einzelheiten sind der Kragen, der offensichtlich den zentralen Stiel umgibt, und die schwache periphere Verbindung zwischen Kragen und F_1 -Domäne, die als Stator dienen könnte. Möglicherweise befinden sich weitere Strukturelemente auf dem oberen Teil der F_1 -Domäne, die in der isolierten F_1 -ATPase nicht vorhanden sind (detailliertere Erläuterung siehe Text).

Gegenwärtig können wir über die Funktion des peripheren Stiels nur spekulieren; vielleicht wirkt er als Stator, der dem Bestreben des $\alpha_3\beta_3$ -Unterkomplexes entgegenwirkt, der Rotation der zentralen γ -Untereinheit zu folgen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß dieser periphere Stiel in einer festen Position gebunden bleibt, weil sich die Beschaffenheit der Oberfläche des $\alpha_3\beta_3$ -Unterkomplexes in Abhängigkeit von der rotierenden γ -Untereinheit cyclisch ändern sollte und sich daher die bevorzugte Bindungsstelle der peripheren Struktur in gleicher Weise bewegen muß. Die Funktion des Kragens ist ein noch größeres Geheimnis.

Die Evolution der ATP-Synthase und ihre Verwandtschaft mit anderen Enzymen

In bakteriellen Operons, die die Untereinheiten der ATP-Synthase codieren, liegen die Gene für die F_1 - und F_0 -Untereinheiten oft getrennt voneinander. Diese Anordnung läßt vermuten, daß sich die beiden Domänen unabhängig voneinander als Strukturmodule entwickelt haben,^[84] ähnlich wie es auch bei der „modularen Evolution“ der Köpfe und Schwänze von Bakteriophagen geschah.^[85, 86] Wenn das zutrifft, sollte man an anderen Stellen in der belebten Natur F_1 - und F_0 -Module mit neuen biochemischen Funktionen finden.

Es ist noch zu früh zu sagen, ob es irgendwelche wichtigen strukturellen und mechanistischen Beziehungen zwischen der F_0 -Domäne und den Flagellenmotoren der Bakterien gibt, obwohl die Möglichkeit hierfür eindeutig besteht. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise auf signifikante funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der F_1 -Domäne der ATP-Synthase und DNA- und RNA-Helicases, die Energie aus der Hydrolyse von ATP oder GTP verwenden, um die

Stränge von Nucleinsäure-Duplices zu trennen (siehe z.B. Lit. [87]). Der Rotationsmechanismus der ATP-Synthase stellt sich daher vielleicht als erstes Beispiel eines allgemeineren Prinzips der Enzymkatalyse heraus.

Schlußbemerkungen

Die hochaufgelöste Struktur der katalytischen Domäne der ATP-Synthase hat unser Verständnis der physiologischen ATP-Bildung bereichert. Nichtsdestoweniger sind noch weitere aufregende Strukturuntersuchungen notwendig, bis wir verstanden haben, wie durch den Transmembrantransport von Protonen durch den Membranteil der ATP-Synthase eine Rotation erzeugt wird. Ein kurzes Gedicht von Robert Frost^[96] stellt den gegenwärtigen Stand der Dinge treffend dar:

We dance round in a ring and suppose
The secret sits in the middle and knows.

Es freut mich, daß ich zu unserem gegenwärtigen Verständnis der ATP-Synthese beitragen konnte, und hoffe, in Zukunft an der Enthüllung des Geheimnisses, das im Zentrum sitzt, mitwirken zu können.

Ich hoffe, es ist deutlich geworden, daß in meinen Ausführungen das Ergebnis der gemeinsamen Anstrengungen vieler außergewöhnlich fähiger und hochgeschätzter Kollegen und Mitarbeiter zusammengefaßt ist, darunter Doktoranden sowie Postdoktoranden, die als Gastwissenschaftler bei mir gearbeitet haben und die ich führen durfte. Allen sage ich Dank für ihre Beiträge. Ich danke besonders dem Medical Research Council, der meine Arbeiten großzügig über mehr als 20 Jahre gefördert hat. Viele als Gastwissenschaftler tätige Postdoktoranden erhielten Stipendien von der European Molecular Biology Organization, andere von der Europäischen Gemeinschaft und vom Human Frontiers of Science Project. Diesen Organisationen sei ebenfalls für ihre Unterstützung gedankt.

Eingegangen am 27. April 1998 [A280]
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

Stichwörter: ATP · Bioenergetik · Enzymkatalyse · Nobel-Aufsätze · Proteinstrukturen

- [1] D. D. Nicholls, S. J. Ferguson in *Bioenergetics 2*, Academic Press, London, **1992**.
- [2] „Na⁺-coupled alternative to H⁺-coupled primary transport system in bacteria“: P. Dimroth, *Bioessays* **1991**, *13*, 463–468.
- [3] „Structures of the metal sites of oxidized cytochrome c oxidase at 2.89 Å resolution“: T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, D. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069–1074.
- [4] „The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å“: T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, D. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1996**, *272*, 1136–1144.
- [5] „Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*“: S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, *376*, 660–669.

- [6] „Structure at 2.7 Å of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase with an antibody F_v fragment“: C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10547–10553.
- [7] „Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria“: D. Xia, C. A. Yu, H. Kih, J. Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu, J. Deisenhofer, *Science* **1997**, *277*, 60–66.
- [8] „The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains“: J. E. Walker, *Q. Rev. Biophys.* **1992**, *25*, 253–324.
- [9] „Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction“: V. Guénaut, R. Vincentelli, D. Mills, H. Weiss, K. Leonard, *J. Mol. Biol.*, **1997**, *265*, 409–418.
- [10] „Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice“: N. Grigorieff, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 1033–1046.
- [11] „The *atp* operon: nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins and the δ subunit of *Escherichia coli* ATP synthase“: N. J. Gay, J. E. Walker, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 3919–3926.
- [12] „The *atp* operon: nucleotide sequence of the region encoding the α subunit of *Escherichia coli* ATP synthase“: N. J. Gay, J. E. Walker, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 2187–2194.
- [13] „The *atp* operon: nucleotide sequence of the genes for the γ, β and ε subunits of *Escherichia coli* ATP synthase“: M. Saraste, N. J. Gay, A. Eberle, M. J. Runswick, J. E. Walker, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 5287–5296.
- [14] „The amino acid sequence of the β subunit of ATP synthase from bovine heart mitochondria“: M. J. Runswick, J. E. Walker, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 3081–3089.
- [15] „*Rhodopseudomonas blastica* *atp* operon: Nucleotide sequence and transcription“: V. L. J. Tybulewicz, G. Falk, J. E. Walker, *J. Mol. Biol.* **1984**, *179*, 185–214.
- [16] „The *unc* operon: nucleotide sequence, regulation and structure of ATP synthase“: J. E. Walker, M. Saraste, N. J. Gay, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *768*, 164–200.
- [17] „Nucleotide sequence of the *Rhodospirillum rubrum* *atp* operon“: G. Falk, A. Hampe, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1985**, *228*, 391–407.
- [18] „Primary structure and subunit stoichiometry of F₁-ATPase from bovine mitochondria“: J. E. Walker, I. M. Fearnley, N. J. Gay, B. W. Gibson, F. D. Northrop, S. J. Powell, M. J. Runswick, M. Saraste, V. L. J. Tybulewicz, *J. Mol. Biol.* **1985**, *184*, 677–701.
- [19] „A sixth subunit of ATP synthase, an F₀ component, is encoded in the pea chloroplast genome“: A. L. Cozens, J. E. Walker, A. L. Phillips, A. K. Huttly, J. C. Gray, *EMBO J.* **1986**, *5*, 217–222.
- [20] „Two overlapping genes in bovine mitochondrial DNA encode membrane components of ATP synthase“: I. M. Fearnley, J. E. Walker, *EMBO J.* **1986**, *5*, 2003–2008.
- [21] „The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301: support for an endosymbiotic origin of chloroplasts“: A. L. Cozens, J. E. Walker, *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 359–383.
- [22] „ATP synthase from bovine mitochondria: sequences of imported precursors of oligomycin sensitivity conferral protein, factor 6 and adenosine triphosphatase inhibitor protein“: J. E. Walker, N. J. Gay, S. J. Powell, M. Kostina, M. R. Dyer, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8613–8619.
- [23] „ATP synthase from bovine mitochondria: characterization and sequence analysis of two membrane associated subunits and of their corresponding c-DNAs“: J. E. Walker, M. J. Runswick, L. Poulter, *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 89–100.
- [24] „DNA sequence of a gene cluster coding for subunits of the F₀ membrane sector of ATP synthase in *Rhodospirillum rubrum*“: G. Falk, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1988**, *254*, 109–122.
- [25] „ATP synthase from bovine mitochondria: complementary DNA sequence of the import precursor of a heart isoform of the alpha subunit“: J. E. Walker, S. J. Powell, O. Vinas, M. J. Runswick, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4702–4708.
- [26] „The δ subunit of ATP synthase from bovine heart mitochondria. Complementary DNA sequence of its import precursor cloned with the aid of the polymerase chain reaction“: M. J. Runswick, S. M. Medd, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1990**, *266*, 421–426.

- [27] „The epsilon subunit of ATP synthase from bovine heart mitochondria: complementary DNA, expression in bovine tissues and evidence of homologous sequences in man and rat“: O. Viñas, S. J. Powell, M. J. Runswick, V. Iacobazzi, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1990**, 265, 321–326.
- [28] „Identification of the subunits of F_1F_0 -ATPase from bovine heart mitochondria“: J. E. Walker, R. Lutter, A. Dupuis, M. J. Runswick, *Biochemistry* **1991**, 30, 5369–5378.
- [29] „Organization and sequence of genes for subunits of ATP synthase in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* 6716“: H. S. van Walraven, R. Lutter, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1993**, 294, 239–251.
- [30] „The F_0 membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition and reconstitution with F_1 -ATPase“: I. R. Collinson, M. J. Runswick, S. K. Buchanan, I. M. Fearnley, J. M. Skehel, M. J. van Raaij, D. E. Griffiths, J. E. Walker, *Biochemistry* **1994**, 33, 7971–7978.
- [31] „The F_1F_0 -ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F_1 and F_0 domains“: I. R. Collinson, J. M. Skehel, I. M. Fearnley, M. J. Runswick, J. E. Walker, *Biochemistry* **1996**, 35, 12640–12646.
- [32] „The regulation of catalysis in ATP synthase“: J. E. Walker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 912–918.
- [33] „Cell-membrane ultrastructure. Low-temperature electron microscopy and x-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems“: H. Fernández-Morán, *Circulation* **1962**, 26, 1039–1065.
- [34] „Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent, Ca^{++} -dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts“: V. K. Vambutas, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 2660–2667.
- [35] „The Mitochondrion“: D. E. Green, *Sci. Am.* **1964**, 210, 63–74.
- [36] „Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles“: Y. Kagawa, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 2475–2482.
- [37] „Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase“: Y. Kagawa, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 2462–2466.
- [38] „Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. Reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase“: Y. Kagawa, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 2467–2474.
- [39] „The H^+ /ATP ratio of the ATP synthase from the thiol modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four“: H. van Walraven, H. Strotmann, O. Schwartz, B. Rumberg, *FEBS Lett.* **1996**, 379, 309–313.
- [40] „The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities“: P. D. Boyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1140, 215–250.
- [41] „Methods for the purification of each subunit of the mitochondrial oligomycin-insensitive adenosine triphosphatase“: J. C. Brooks, A. E. Senior, *Biochemistry* **1972**, 11, 4675–4678.
- [42] „The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase“: A. F. Knowles, H. S. Penefsky, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 6616–6623.
- [43] „Substrate positions and induced-fit in crystalline adenylate kinase“: E. F. Pai, W. Sachsenheimer, R. H. Schirmer, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 37–45.
- [44] „Distantly related sequences in the α and β subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold“: J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, N. J. Gay, *EMBO J.* **1982**, 1, 945–951.
- [45] „ABC transporters: from microorganisms to man“: C. F. Higgins, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1992**, 8, 67–113.
- [46] „Homology between human bladder carcinoma oncogene product and mitochondrial ATP synthase“: N. J. Gay, J. E. Walker, *Nature* **1983**, 301, 262–264.
- [47] „A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif“: E. V. Koonin, *J. Mol. Biol.* **1990**, 229, 1165–1174.
- [48] „Structural aspects of proton pumping ATPases“: J. E. Walker, I. M. Fearnley, R. Lutter, R. J. Todd, M. J. Runswick, *Philos. Trans. R. Soc. B* **1990**, 326, 367–378.
- [49] „Crystallization of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria“: R. Lutter, J. P. Abrahams, M. J. van Raaij, R. J. Todd, T. Lundqvist, S. K. Buchanan, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 787–790.
- [50] „Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria“: J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, J. E. Walker, *Nature* **1994**, 370, 621–628.
- [51] „The structure of bovine F_1 -ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin“: M. J. van Raaij, J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6913–6917.
- [52] „The structure of bovine F_1 -ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin“: J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. van Raaij, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9420–9424.
- [53] „Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F_1 -ATPase“: T. M. Duncan, V. V. Bulygin, Y. Zhou, M. L. Hutcheon, R. L. Cross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 10964–10968.
- [54] „Structural changes in the γ and ϵ subunits of the *Escherichia coli* F_1F_0 -type ATPase during energy coupling“: R. A. Capaldi, R. Aggerer, S. Wilkens, G. Grüber, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1996**, 28, 397–401.
- [55] „Intersubunit rotation in active F-ATPase“: D. Sabbert, S. Engelbrecht, W. Junge, *Nature* **1996**, 381, 623–625.
- [56] „Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase“: H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr., *Nature* **1997**, 386, 299–302.
- [57] „Structural features of the ϵ subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy“: S. Wilkens, F. W. Dahlquist, L. P. McIntosh, L. W. Donaldson, R. A. Capaldi, *Nature Struct. Biol.* **1995**, 2, 961–967.
- [58] „Crystal structure of the ϵ -subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*“: U. Uhlin, G. B. Cox, J. M. Guss, *Structure* **1997**, 5, 1219–1230.
- [59] „Solution structure of the N-terminal domain of the δ -subunit of the *E. coli* ATP synthase“: S. Wilkens, S. D. Dunn, J. Chandler, F. W. Dahlquist, R. A. Capaldi, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 198–201.
- [60] „Subunit equivalence in *Escherichia coli* and bovine heart mitochondrial F_1F_0 ATPases“: J. E. Walker, M. J. Runswick, M. Saraste, *FEBS Lett.* **1982**, 146, 393–396.
- [61] „Membrane sectors of F- and V-type H^+ -transporting ATPases“: R. H. Fillingame, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 491–498.
- [62] „Stoichiometry of subunits in the H^+ -ATPase complex of *Escherichia coli*“: D. L. Foster, R. H. Fillingame, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 2009–2015.
- [63] „Molecular mechanics of ATP synthesis by F_1F_0 -type H^+ -transporting ATPases“: R. H. Fillingame, *Bacteria* **1990**, 12, 345–391.
- [64] „Subunit interactions coupling H^+ transport and ATP synthesis in F_1F_0 ATP synthase“: R. H. Fillingame, M. E. Girvin, W. Jiang, F. Valiyaveetil, J. Hermolin, *Acta Physiol. Scand.*, im Druck.
- [65] „*E. coli* F_1 -ATPase interacts with a membrane protein component of a proton channel“: J. E. Walker, M. Saraste, N. J. Gay, *Nature* **1982**, 298, 867–869.
- [66] „The polar domain of the b subunit of *Escherichia coli* F_1F_0 -ATPase forms an elongated dimer that interacts with the F_1 sector“: S. D. Dunn, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 7630–7636.
- [67] „The gamma subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF_1F_0) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F_0 part“: S. D. Watts, Y. Zhang, R. H. Fillingame, R. A. Capaldi, *FEBS Lett.* **1995**, 368, 235–238.
- [68] „Subunits coupling H^+ transport and ATP synthesis in the *Escherichia coli* ATP synthase: Cys-Cys crosslinking of F_1 subunit ϵ to the polar loop of F_0 subunit c “: Y. Zhang, R. H. Fillingame, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 24609–24614.
- [69] „Model of the c -subunit oligomer in the membrane domain of F-ATPases“: G. Groth, J. E. Walker, *FEBS Lett.* **1997**, 410, 117–123.
- [70] „Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase in aqueous buffer“: S. Singh, P. Turina, C. J. Bustamante, D. J. Keller, R. A. Capaldi, *FEBS Lett.* **1996**, 397, 30–34.
- [71] „Molecular imaging of *Escherichia coli* F_0F_1 -ATPase in reconstituted membranes by atomic force microscopy“: K. Takeyasu, H. Omote, S. Nettikadan, F. Tokumasu, A. Iwamoto-Kihara, Futai, M., *FEBS Lett.* **1996**, 392, 110–113.
- [72] „Rotary catalysis by F-ATPase: real-time recording of intersubunit rotation“: W. Junge, D. Sabbert, S. Engelbrecht, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1996**, 100, 2014–2019.

- [73] „The NH₂-terminal portion of the α -subunit of the *Escherichia coli* F₁-ATPase is required for binding the δ -subunit“: S. D. Dunn, L. A. Heppel, C. S. Fullmer, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 6891–6896.
- [74] „Lack of ability of trypsin-treated mitochondrial F₁-ATPase to bind to the oligomycin sensitivity conferring protein (OSCP)“: T. Hundal, B. Norling, L. Ernster, *FEBS Lett.* **1983**, 162, 5–10.
- [75] „Oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP) of mitochondrial ATP synthase. The carboxy terminal region of OSCP is essential for the reconstitution of oligomycin-sensitive H⁺-ATPase“: S. Joshi, A. A. Javed, L. C. Gibbs, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12860–12867.
- [76] „Topology and function of „stalk“ proteins in the bovine mitochondrial H⁺-ATPase“: S. Joshi, M. J. Pringle, R. Siber, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 10653–10658.
- [77] „ATP synthase from bovine heart mitochondria: *in vitro* assembly of a stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence“: I. R. Collinson, M. J. van Raaij, M. J. Runswick, I. M. Fearnley, J. M. Skehel, G. L. Orriss, B. Miroux, J. E. Walker, *J. Mol. Biol.* **1994**, 242, 408–421.
- [78] „The δ - and ϵ -subunits of bovine F₁-ATPase interact to form a heterodimeric subcomplex“: G. L. Orriss, M. J. Runswick, I. R. Collinson, B. Miroux, I. M. Fearnley, J. M. Skehel, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1996**, 314, 695–700.
- [79] „F₁F₀-ATPase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin sensitive ATPase“: R. Lutter, M. Saraste, H. S. van Walraven, M. J. Runswick, M. Finel, J. F. Deatherage, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1993**, 295, 799–806.
- [80] „Structural analysis of ATP synthase (F₁F₀-ATPase) from bovine heart mitochondria“: J. E. Walker, I. R. Collinson, M. J. van Raaij, M. J. Runswick, *Methods Enzymol.* **1995**, 163–190.
- [81] „Large scale chromatographic purification of F₁F₀-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria“: S. K. Buchanan, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1996**, 318, 343–349.
- [82] „ATP synthase from bovine heart mitochondria: reconstitution into unilamellar phospholipid vesicles of the pure enzyme in a functional state“: G. Groth, J. E. Walker, *Biochem. J.* **1996**, 318, 351–357.
- [83] „Visualization of a peripheral stalk V-type ATPase: evidence for the stator structure essential to rotational catalysis“: E. Boekema, T. Ubbink-Kok, J. S. Lolkema, A. Brisson, W. N. Konings, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck.
- [84] „Evolution of ATP synthase“: J. E. Walker, A. L. Cozens, *Chem. Scr.* **1996**, 26B, 263–272.
- [85] „A theory for molecular evolution of bacteriophages“: D. Botstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1980**, 354, 484–491.
- [86] „Comments on the arrangement of the morphogenetic genes of bacteriophage lambda“: S. Casjens, R. Hendrix, *J. Mol. Biol.* **1974**, 90, 20–23.
- [87] „The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases“: X. Yu, E. H. Egelman, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 101–104.
- [88] „Cryoelectron microscopy of *Escherichia coli* F₁ adenosine triphosphatase decorated with monoclonal antibodies to individual subunits of the complex“: E. P. Gogol, R. Aggeler, M. Sagerman, R. A. Capaldi, *Biochemistry* **1989**, 28, 4717–4724.
- [89] G. Weissman, R. Claiborne *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology*, **1975**.
- [90] P. D. Boyer, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2424–2436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2296–2307.
- [91] K. Braig, M. Montgomery, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [92] K. Braig, I. Menz, M. Montgomery, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [93] „Borine F₁-ATPase covalently inhibited with 4-chloro-7-nitrobenzofuran: the structure provides further support for a rotary catalytic mechanism“: G. L. Oriss, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Structure* **1998**, 6, 831–837.
- [94] N. J. Glavas, J. E. Walker, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [95] S. Wilkens, R. A. Capaldi, persönliche Mitteilung.
- [96] *The Poetry of Robert Frost—The Complete Poems, Complete and Unabridged* (Hrsg.: E. C. Latham), **1975**, Holt, Rinehart and Winston, New York, S. 362.