**Субъединица эпсилон прокариотической АТФ-синтазы**

Емельянов Артём Александрович

2 курс ФББ МГУ

**Научный руководитель**

Фенюк Борис Александрович

**Введение**

АТФ-синтаза — это фермент, синтезирующий АТФ, основную энергетическую валюту в клетке. Он представляет собой сложный белковый комплекс, состоящий из двух основных доменов: F0, образующий канал для протонов, и F1, который осуществляет катализ реакции синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (или обратной реакции) при помощи энергии разности электрохимического потенциала.

Каждый из доменов АТФ-синтазы состоит из нескольких субъединиц. Основные компоненты, которые формируют каталитическую часть F1 – это три альфа- и три бета-субъединицы, а также несколько дополнительных субъединиц, таких как эпсилон и дельта, которые играют важную роль в регуляции активности фермента. Субъединицы a и c домена F0 образуют протонный канал, который позволяет ионам H+ проходить через мембрану, что высвобождает энергию, необходимую для синтеза АТФ.

Эпсилон-субъединица является одной из составляющих F1 домена и играет важную роль в регуляции активности АТФ-синтазы. Эта субъединица может находиться в двух конформациях: contracted (активной) и extended (неактивной), каждая из которых влияет на её функциональные свойства и взаимодействие с другими компонентами фермента. В активной (contracted) конформации эпсилон субъединица у некоторых видов бактерий может связывать АТФ. В данном обзоре литературы проанализированы и систематизированы данные (и предложенные в научной литературе гипотезы) о том, как структура эпсилон-субъединицы влияет на её способность связывать АТФ в активной конформации.

**Цели и задачи**

Целью данного обзора является анализ влияния исследованных в литературе конформаций эпсилон субъединицы бактериальной АТФ синтазы на связывание с АТФ в активном состоянии и систематизация полеченных данных

В ходе написания литературного обзора решались следующие задачи:

… (пока хз как их сформулировать)

**Литературный обзор**

Для начала необходимо чётко определить объект исследования

**Структура фермента**

Структура АТФ-синтазы различается у разных организмов, но основные компоненты остаются схожими. Фермент, как правило, состоит из двух основных доменов: F0 и F1. Субъединичный состав может отличаться, однако в нём так же можно выделить консервативные части.

В E. coli, домен F1 состоит из пяти различных субъединиц: α, β, γ, δ и ε в стехиометрическом соотношении 3α : 3β : 1γ : 1δ : 1ε. Домен F0, отвечающий за транслокацию протонов через мембрану, включает в себя три дополнительные субъединицы: a, b и c. Соотношение этих субъединиц в E. coli составляет 1a : 2b : 10c.

В отличие от этого, митохондриальный фактор F1 имеет аналогичный состав, но включает в себя дополнительную субъединицу, известную как OSCP (ligomycin sensitivity conferring protein). Стехиометрия для митохондриальной АТФ-синтазы описывается соотношением 3α : 3β : 1γ : 1δ : 1ε : 1OSCP.

В клетках животных структура немного отличается. Общепринятые стехиометрические коэффициенты для АТФ-синтазы в этих клетках следующие: 3α : 3β : 1γ : 1δ : 1ε : 1OSCP : 1a : 1b : 8c.

Домен F1 был широко изучен, и его трехмерная структура была определена с высоким разрешением (2,4 Å) с помощью рентгеновской кристаллографии. Комплекс F₁ преимущественно состоит из трех типов субъединиц: 3α : 3β : 1γ. Центральная часть фермента состоит из длинных α-спиральных сегментов субъединицы γ, которые чередуются с субъединицами альфа и бета *[фотка из какой-нибудь статьи]*.

Субъединицы альфа и бета каждая содержат сайт связывания нуклеотидов, в то время как субъединица гамма играет решающую структурную роль. Субъединица гамма располагается асимметрично относительно центра альфа-бета тримера, образуя "стебель", который соединяет F1 с доменом F0. Субъединица ε располагается ближе к сектору F0 и участвует в регуляции.

F0 домен образует канал для переноса протонов через мембрану. Он состоит из a, b и c типов субъединиц. c субъединицы образуют олигомерное кольцо, в котором количество элементов варьируется в пределах от 8 до 14 *[ссылка?]*. Например, F0 домен АТФ-синтазы в E. coli обычно содержит 10 c субъединиц. Каждая c субъединица состоит из двух трансмембранных альфа-спиралей, соединенных петлей, богатой полярными аминокислотами, что имеет решающее значение для переноса протонов.

Субъединица a гидрофобна. Она образована несколькими трансмембранных альфа-спиралей, которые, вероятно, участвуют в образовании протонного канала.

Напротив, субъединица b выглядит более гидрофильной и способствует стабилизации сборки F1 и F0, образуя «периферическую ножку» АТФ-синтазы.

**(БОЛЕЕ ПОДРОБНО ОПИСАТЬ РОЛИ СУБЪЕДИНИЦ)**

**Разнообразие АТФ синтаз**

АТФ синтаза – это одна из систем клетки, ответственна за взаимопревращение двух основных энергетических валют: АТФ и разности электрохимического потенциала. Этот фермент катализирует обратное фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом с использованием энергии разности электрохимического потенциала с разных сторон мембраны *[какая-нибудь статья про работу АТФ синтазы].* Иногда этот фермент может катализировать и обратную реакцию, при этом оба вида превращений могут осуществляться одним и тем же белковым комплексом, а направление реакции зависит от физиологических условий в клетке *[статья Зубаревой, см её источники]*.

АТФ синтазы делятся на несколько типов: F-, V- и A-АТФ-синтазы. Все АТФ-синтазы имеют высокую структурную гомологию и гомологию последовательностей *[ссылка?]*, что означает, что они произошли от общего предка, обладавшего всеми базовыми структурами для синтеза АТФ и ионного транспорта.

АТФ-синтазы F-типа характеризуются относительно простой структурой, включающей гидрофильный F1-субкомплекс и гидрофобный F0-субкомплекс. F1-часть содержит кольцо, образованное чередующимися альфа- и бета-субъединицами, где находятся сайты связывания нуклеотидов. Центральный стержень, состоящий из гамма-субъединицы, соединяет F1 и F0 комплексы и производит вращательное движение, необходимое для передачи энергии, затрачиваемой на синтез АТФ. Примечательно, что АТФ-синтазы F-типа от разных организмов (например, бактерий и хлоропластов) демонстрируют небольшие структурные различия, сохраняя консервативную структуру субъединиц, которая имеет ключевое значение для осуществления каталитических функций. Митохондриальные АТФ-синтазы F-типа, однако, устроены более сложно и включают в себя дополнительную эпсилон-субъединицу в своем центральном стержне *[всё та же статья Зубаревой]*.

АТФ-синтазы V-типа значительно отличаются по структуре от ферментов F-типа. Они имеют три периферических стебля, каждый из которых состоит из двух субъединиц (е и g), и расположены в эукариотических клетках. Эти структурные отличия задают специфику их работы: АТФ-синтазы V-типа преимущественно функционируют как протонные помпы, а не как катализаторы АТФ-синтазной реакции. Центральный стебель в V-тип ферментах содержит дополнительные уникальные субъединицы, которые участвуют в прикреплении субъединицы d к c-кольцу, которая отсутствует в АТФ-синтазах F-типа и является функциональным аналогом их гамма-субъединицы. А гидрофильный домен в субъединице a способствует прикреплению периферических стеблей.

А-тип АТФ-синтазы имеют функциональное сходство с ферментами F-типа. В основном они встречаются у архей и некоторых бактерий. Они имеют два периферических стержня и один центральный стержень, который соединяется с альфа-бета тримером. Считается, что структурные компоненты ферментов типа А эволюционировали из предковых форм, общих с АТФ-синтазами типа V.

**РАССКАЗАТЬ ПРО НАТРИЕВЫЕ АТФ-СИНТАЗЫ**

В данном обзоре будут рассмотрены эпсилон субъединицы прокариотических АТФ-синтаз F-типа.

**Механизм работы**

Механизм работы АТФ-синтазы будет рассмотрен на примере митохондриального фермента F-типа.

АТФ-синтаза интегрирована во внутреннюю мембрану. Она использует трансмембранную разность электрохимического потенциала, созданного электронно-транспортной цепью. Протоны (H+) возвращаются в матрикс митохондрий через канал, образованный доменом F0 АТФ-синтазы. **ПОДРОБНЕЕ + КАРТИНКА**

F0-субкомплекс, погружённый в мембрану, состоит из нескольких типов субъединиц: c-субъединиц, которые образуют кольцо, **ОСТАЛЬНЫЕ ВИДЫ**.

**ВРАЩЕНИЕ C-КОЛЬЦА**

Вращение c-кольца передается F1-субкомплексу через центральный стержень, состоящий из гамма-субъединицы. Это вращение вызывает конформационные изменения в бета-субъединицах F1, которые ответственны за катализ реакции синтеза АТФ. F1-субкомплекс имеет три бета-субъединицы, каждая из которых способна связывать АДФ и неорганический фосфат для образования АТФ.

По мере того, как бета-субъединицы претерпевают конформационные изменения во время каждого оборота: последовательно сменяющие друг друга конформации «рыхлая», «тугая» и «открытая», в каждой из которых бета-субъединица имеет различную аффинность к АТФ. Они последовательно связывают АДФ и неорганический фосфат, превращают их в АТФ и высвобождают его в матрикс митохондрий. Этот процесс приводится в действие механической энергией вращения гамма-субъединицы, получаемой от трансмембранной разности электрохимического потенциала. Полный цикл синтеза АТФ происходит за 1 оборот гамма-субъединицы.

**Катализ АТФ синтазной реакции**

У всех роторных АТФаз имеется три каталитических сайта, образованных в основном остатками β-субъединиц у F-АТФаз. Эти сайты имеют консервативную структуру и участвуют в связывании магниевых комплексов нуклеотидов, что критично для процесса катализа.

(Важно отметить, что без магния нуклеотиды связываются с ферментом, но не происходит гидролиза или синтеза)

Синтез АТФ осуществляется посредством механизма чередования изменяющегося сродства. В разные моменты времени каталитические сайты имеют различное сродство к субстратам и продуктам реакции. Это означает, что события в одном сайте влияют на конфигурацию других. При каждом обороте γ-субъединицы происходит изменение конформации β-субъединиц, что приводит к синтезу или гидролизу трех молекул АТФ.

Каждая бета-субъединица может находиться в одной из трех конформаций:

1. Loose (L): связывает АДФ и фосфат.
2. Tight (T): "прижимает" молекулы АДФ и фосфат, что приводит к образованию АТФ.
3. Open (O): высвобождает АТФ и захватывает новые молекулы АДФ и фосфата

**Регуляция работы АТФ синтазы**

Механизм регулирования АТФ-синтазы АДФ в основном связан с неконкурентным ингибированием АДФ при его связывании с каталитическим центром фермента в отсутствие неорганического фосфата.

Когда АДФ связывается с каталитическим сайтом комплекса F0F1, он может вызывать конформационные изменения в ферменте. Это связывание происходит в отсутствие неорганического фосфата. Конформационные изменения, вызванные связыванием АДФ увеличивают аффинность каталитического сайта к АДФ. Это инактивирует фермент, предотвращая дальнейший синтез АТФ и приводя к состоянию, при котором может происходить обратная реакция – гидролиз АТФ. Освобождение связанного АДФ и реактивация АТФ-синтазы происходит, если протонная сила достаточна. Однако порог для реактивации часто выше, чем тот, который необходим для синтеза АТФ, что указывает на то, что при низкой трансмембранной разности потенциала фермент остается неактивным. Повышение электрического заряда на мембране увеличивает аффинность каталитического сайта к неорганическому фосфату, тем самым снижая вероятность присутствия АДФ без него. Этот механизм помогает предотвратить переход в инактивированное состояние.

Субъединица эпсилон также проявляет ингибирующую активность. Однако подробности механизма этого явления остаются не до конца ясными. По состоянию на текущий момент, механизм ингибирующей активности АТФ-синтазы, осуществляемой её эпсилон-субъединицей, заключается в том, что эта субъединица стабилизирует ингибированное состояние фермента, препятствуя его активации.

В экспериментах на молекулах α3β3γε комплекса из цианобактерии Thermosynecoccus elongatus было установлено, что при ингибировании АТФ-синтазы субъединицей ε угловое положение γ-субъединицы совпадает с состоянием АДФ-ингибирования и «каталитической паузы». Аналогичные результаты были получены при исследовании комплекса из термофильной бактерии Bacillus sp. PS3, где при низких концентрациях АТФ (200 нМ) субъединица ε увеличивала время нахождения фермента в АДФ-ингибированном состоянии в 6 раз, не влияя при этом на вероятность ингибирования активного фермента.

Дополнительные эксперименты с использованием флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) показали, что структура фермента с субъединицей ε в вытянутой ингибирующей конформации соответствует паузе ожидания АТФ, а не каталитической паузе. Это создаёт противоречие с предыдущими данными, которое требует дальнейшего изучения.

Эксперименты по манипуляции единичными молекулами показали, что активация α3β3γ-комплекса в состоянии АДФ-ингибирования происходит при меньшем угле поворота и требует меньшей силы по сравнению с α3β3γε-комплексом [1][3]. Это указывает на роль субъединицы ε в стабилизации ингибированного состояния фермента. Также было показано, что активация гидролиза АТФ в ответ на энергизацию мембраны отсутствует у F0F1 дикого типа, но наблюдается у фермента без C-концевого ингибиторного домена субъединицы ε.

В дополнение к этому, эксперименты на α3β3γδ-комплексе из \*E. coli\* продемонстрировали, что добавление субъединицы ε увеличивает длительность остановки вращения γ-субъединицы в положении «каталитической паузы».

**ОБЪЕДИНИТЬ ВСЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ В СПИСОК**

Таким образом, механизм ингибирования АТФазной активности фермента Bacillus sp. PS3, вероятно, реализуется через электростатические взаимодействия между положительно заряженными остатками C-концевого домена субъединицы ε и отрицательно заряженными остатками участка βDELSEED. Это подтверждается результатами мутагенезов, где замена кислых остатков на аланины приводит к исчезновению способности субъединицы ε ингибировать активность фермента *[Вся эта секция из Лапашиной (стр. 15)]*.

**ПЕРЕФРАЗИРОВАТЬ НЕЭСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ЧАСТЬ**

**Субъединица Эпсилон**

**ОПИСАНИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ЭПСИЛОН**