МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

**Эпсилон субъединица прокариотической АТФ-синтазы**

Курсовая работы студента 2 курса

Емельянова Артёма Александровича

Научный руководитель

д.б.н. Фенюк Борис Александрович

**Содержание**

[**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 3](#_Toc182318373)

[**ВВЕДЕНИЕ** 4](#_Toc182318374)

[**ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ** 5](#_Toc182318375)

[**ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР** 6](#_Toc182318376)

[**1.1.** **Разнообразие АТФ-синтаз** 6](#_Toc182318377)

[**1.2.** **Структура бактериальной АТФ-синтазы F-типа** 7](#_Toc182318378)

[**1.2.1.** **Субъединичный состав** 7](#_Toc182318379)

[1.2.2. **Пространственная структура** 7](#_Toc182318380)

[**1.2.3.** **Структура субъединиц** 7](#_Toc182318381)

[**1.3.** **Механизм работы прокариотической АТФ-синтазы F-типа** 8](#_Toc182318382)

[**1.4.** **Общая структура субъединицы эпсилон** 10](#_Toc182318383)

# **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

# **ВВЕДЕНИЕ**

АТФ-синтаза — это фермент, синтезирующий АТФ, основную энергетическую валюту в клетке за счет вращения центральных субъединиц относительно окружающих субъединиц статора. Он представляет собой сложный белковый комплекс, состоящий из двух основных доменов: F0, участвующий в образовании протон-транспортного канала, и F1, который осуществляет катализ реакции синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (или обратной реакции) при помощи энергии трансмембранной разности электрохимического потенциала H+.

Каждый из доменов бактериальной АТФ-синтазы состоит из нескольких субъединиц. Основные компоненты, формирующие каталитическую часть F1 – это три альфа- и три бета-субъединицы; также в его состав входят две дополнительные субъединицы – эпсилон и дельта. Эпсилон-субъединица играет важную роль в стабилизации F1F0 комплекса при его сборке и в регуляции активности АТФ-синтазы. Несмотря на то, что F1 в целом и субъединица эпсилон в частности достаточно хорошо изучены, ряд структурно-функциональных особенностей остаётся вопросом дискуссий.

В данном обзоре проанализированы и систематизированы данные и предложенные в научной литературе гипотезы о том, как эпсилон-субъединица в различных конформациях влияет на работу АТФ-синтазы.

# **ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ**

Целью данного литературного обзора является анализ регуляторных влияний исследованных конформаций эпсилон субъединицы бактериальной АТФ-синтазы на её активность

В ходе написания литературного обзора решались следующие задачи:

1. Проанализировать предложенные в литературе данные о структуре и конформационных переходах в субъединице эпсилон
2. Проанализировать теории, описывающие и объясняющие механизмы конформационных переходов в субъединице эпсилон
3. Выявить противоречивые факты и не получившие полного объяснения данные о механизмах конформационных переходов, требующие дальнейшего исследования

# **ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

АТФ синтаза является одним из самых распространенных ферментов, встречающихся практически во всех живых организмах: в плазматической мембране бактерий, внутренней мембране митохондрий, мембране тилакоидов хлоропластов и даже в эукариотических клетках. В связи с его широким распространением, его формы в различных организмах имеют весьма отличную друг от друга структуру.

## **Разнообразие АТФ-синтаз**

АТФ-синтаза катализирует важнейшую реакцию: синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, используя при этом энергию разности электрохимического потенциала H+ с разных сторон мембраны*.* 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.

АТФ синтазы делятся на несколько типов: F-, V- и A-АТФ-синтазы. Все они имеют высокую стерическую гомологию и гомологию последовательностей, что позволяет с большой долей вероятности утверждать, что происходят от общего предка эу- и прокариот, который уже обладал всеми базовыми структурами для синтеза АТФ и ионного транспорта.

1. АТФ-синтазы F-типа от разных организмов (например, бактерий и хлоропластов) демонстрируют общее структурное сходство, сохраняя консервативную структуру каталитических субъединиц. Митохондриальные АТФ-синтазы F-типа, однако, устроены более сложно и включают в себя дополнительную эпсилон-субъединицу в своем центральном стержне.
2. 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.
3. 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.

В данной работе основное внимание будет уделено бактериальным АТФ-синтазам F-типа

* 1. **Структура бактериальной АТФ-синтазы F-типа**
     1. **Субъединичный состав**

В простейшем случае бактериальные формы АТФ-синтазы включают в себя 2 субкомплекса, которые состоят из 8 типов субъединиц. Гидрофильный F1-субкомплекс состоит из пяти различных субъединиц: α, β, γ, δ и ε в стехиометрическом соотношении 3α : 3β : 1γ : 1δ : 1ε. Гидрофобный F0-субкомплекс имеет в своём составе 3 типа субъединиц: *a*, *b* и *c*. Соотношение этих субъединиц в хорошо изученном ферменте термофильной бактерии  *Bacillus* sp. PS3 составляет 1*a* : 2*b* : 10*c*.

### **Пространственная структура**

Домен F1 состоит из выступающей за пределы мембраны сферической глобулы, состоящей из 6 чередующихся α и β субъединиц. Внутри образованного ими купола ассиметрично располагаются очень длинные α-спиральные участки верхняя части γ-субъединицы – это начало главного стебля, передающего механическую энергию от ротора к каталитическим сайтам *(выделено пунктирной линией)*. Главный стебель значительно выступает за пределы 3α3β-гексамера. Около противоположного конца γ-субъединицы расположена субъединица ε. Она связана как с субъединицей γ, так и с вращающимся *c*-кольцом домена F0.

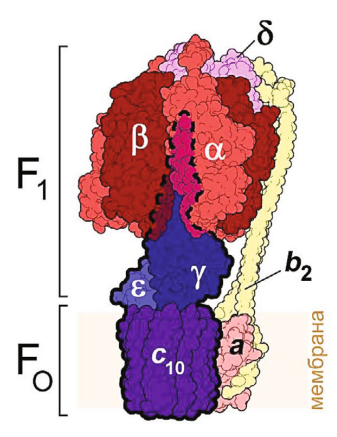


Рис 1. Структура F-АТФ-синтазы *Bacillus sp. PS3*

В домене F0 субъединица *a* и 2 субъединицы *b* образуют периферическую ножку АТФ-синтазы – статор, заякоривающий фермент в мембране. Олигомер из *c*-субъединиц образует так называемое *c*-кольцо – ротор АТФ-синтазы. Вместе с *a*-субъединицей этот ротор образует протонный канал *(Рис 1.)*.

* + 1. **Структура субъединиц**

Субъединица α имеют сферическую форму и располагаются вокруг центральной гамма-субъединицы. Они имеют сайт связывания нуклеотидов, однако он не участвует в катализе и выполняет регуляторную функцию. Их последовательность консервативна.

Как и α субъединицы, субъединицы β обладают сферической формой и высокой консервативностью последовательности, однако в отличии от них они несут каталитические сайты связывания и напрямую участвуют в реакции синтеза/гидролиза АТФ.

Гамма-субъединица АТФ-синтазы располагается в центре F1-глобулы. Она занимает асимметричное положение, что позволяет ей взаимодействовать с разными альфа- и бета-субъединицами неодинаково. Размер гамма-субъединицы составляет около 31,5 кДа и включает 287 аминокислотных остатков. Она субъединица представляет собой длинный полипептидный фрагмент, который выступает из центра каталитического комплекса и формирует главный стержень, связывающий его с мембранным сектором F0. *(В гамма-субъединице присутствует нуклеотид-связывающий домен, который не активен при обычных условиях и выполняет исключительно структурную роль [?])*

Каждая *c*-субъединица состоит из двух трансмембранных α-спиральных колонн, соединенных полярной петлей. Важным элементом является консервативный остаток аспартата (Asp-61), который находится на уровне середины гидрофобного слоя мембраны и играет ключевую роль в переносе протонов. Эти субъединицы формируют олигомерное кольцо, которое выступает в роли ротора при катализе синтеза АТФ. В зависимости от типа организма количество *c*-субъединиц может варьироваться; например, в митохондриальных ATP-синтазах животных обычно содержится 8 *c*-субъединиц, в дрожжах и некоторых бактериях — 10, а в хлоропластах — 14.

Субъединица a состоит из пяти трансмембранных α-спиральных доменов. Она взаимодействует с b-субъединицами, образуя так называемую периферическую ножку, которая соединяет домены F1 и F0 и является частью якоря, удерживающего статор в мембране.

* 1. **Механизм работы прокариотической АТФ-синтазы F-типа**

АТФ-синтаза интегрирована во внутреннюю мембрану. Она использует трансмембранную разность электрохимического потенциала, созданного электронно-транспортной цепью, для синтеза молекул АТФ из АДФ и неорганического фосфата.

F1-субкомплекс имеет три бета-субъединицы, каждая из которых способна связывать АДФ и неорганический фосфат для образования АТФ. 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.

По мере того, как бета-субъединицы претерпевают конформационные изменения во время каждого оборота: последовательно сменяющие друг друга конформации «T» (tight), «L» (loose) и «O» (open), в каждой из которых бета-субъединица имеет различную аффинность к АТФ (Рис. 2):

1. Тугая конформация характеризуется высокой аффинностью АТФ; в этот момент катализируется реакция образования АТФ.
2. Рыхлая конформация характеризуется умеренной аффинностью к эти веществам; в этот момент они слабо связаны с каталитическим центом.
3. Открытая конформация характеризуется низкой аффинностью к нуклеотидам и неорганическому фосфату; В этот момент они могут войти в активный центр бета-субъединицы.

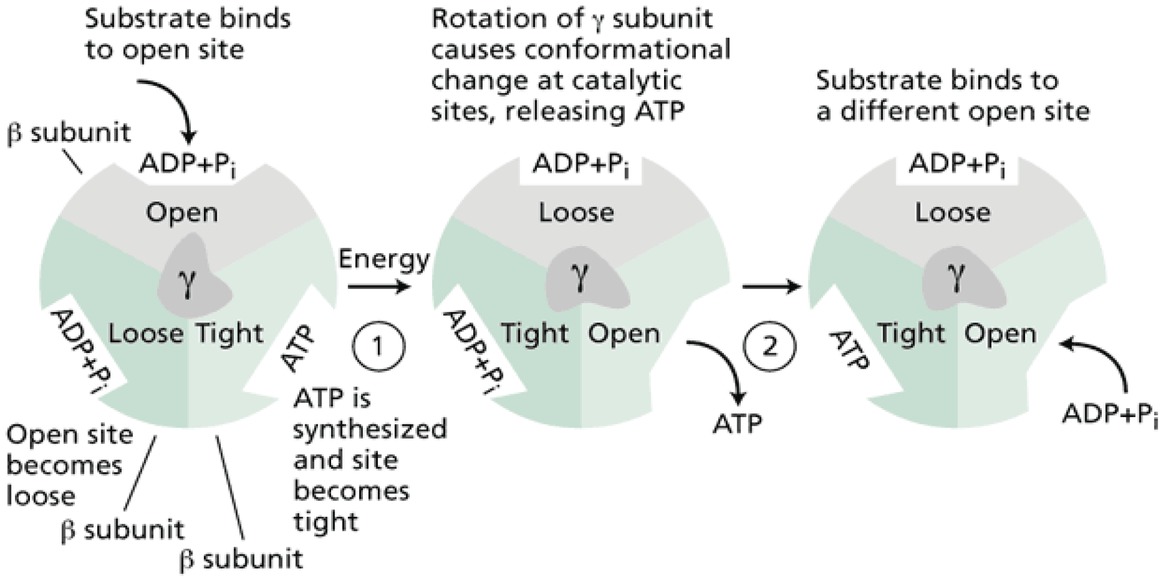


Рис. 2 Механизм binding-change

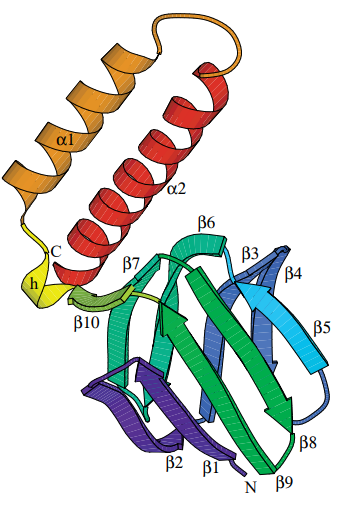
Они последовательно связывают АДФ и неорганический фосфат, превращают их в АТФ и высвобождают его в цитоплазму. Этот процесс приводится в действие механической энергией вращения гамма-субъединицы, получаемой от трансмембранной разности электрохимического потенциала H+. Полный цикл синтеза АТФ происходит за 1 оборот гамма-субъединицы, при этом синтезируется 3 молекулы АТФ.

Важно отметить, что число субъединиц в *c*-кольце может варьироваться от 8 до 15 у разных видов. Это имеет значительный эффект на стехиометрию процесса синтеза АТФ, поскольку каталитический домен в своём составе имеет всегда фиксированное количество каталитических субъединиц. Таким образом, за один оборот всегда синтезируется 3 молекулы АТФ, однако при этом через мембрану пропускается количество протонов, равное числу субъединиц в *c*-кольце: у *Bacillus* sp. PS3 на синтез 3 молекул АТФ тратиться 10 протонов.

* 1. **Общая структура субъединицы эпсилон**

Субъединица эпсилон представляет из себя небольшой белок, длиной около 130 аминокислот (15 кДа), состоящий из двух основных доменов: N-концевой 10-нитевой бета-бочки (NTD) и подвижного C-концевого домена, включающего в себя 2 альфа-спирали (CTH1 и CTH2) (Рис. 3).

Рис. 3 Структура субъединицы ε прокариотической F-АТФ-синтазы



N-концевой домен взаимодействует с гамма-субъединицей и с *с*-кольцевым олигомером. C-концевой домен участвует в ингибировании гидролиза АТФ.

Данные о взаимном расположении α-спиралей C-концевого домена и β-бочки оказались противоречивыми. Одни исследования о том, что две С-концевые альфа спирали образуют шпильку. Однако другие свидетельствовала о том, что никакой шпильки не образуется, а вместо этого C-концевой домен вытянут вдоль γ-субъединицы.

Некоторое время вопрос о существовании нескольких конформаций субъединицы ε оставался открытым.

* 1. **Конформации субъединицы ε**

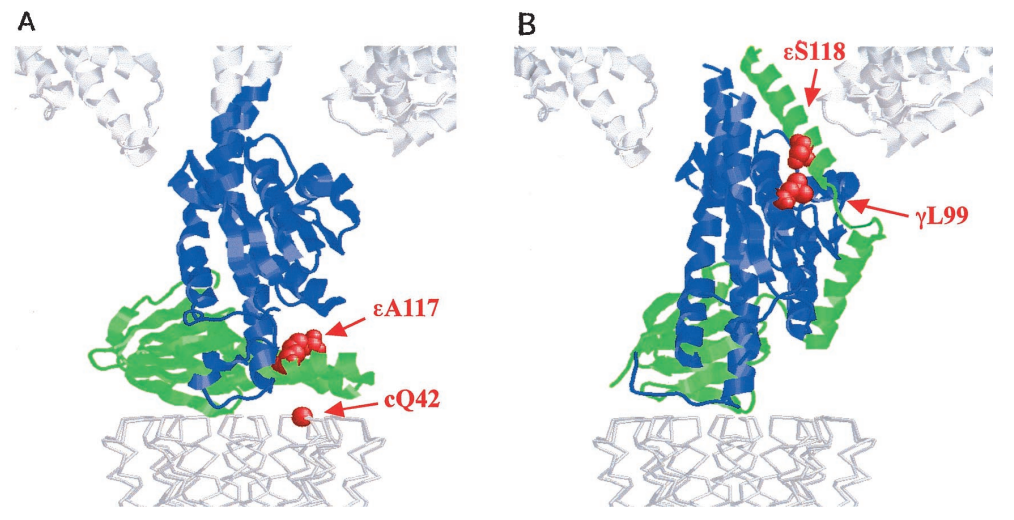
Два расположения субъединицы ε относительно γ, найденные в MF1 и в комплексе γ’ε субъединицы E. coli, соответственно (Рис. 4 A, B). Аланин-117 в субъединице ε и глутамин-42 c субъединицы γ находятся в непосредственной близости в структуре, описанной Гиббонсом и др. (Рис. 4 A) – эти остатки исследователи заменили на цистеин.

Во второй конформации ε, наблюдается тесное приближение позиций 99 γ и 118 ε, как показано при определении структуры комплекса γ’ε EF1, и наличие этой конформации в E-F1F0 было проверено с использованием мутанта γ-L99Cy ε-S118C (Рис. 1 B).

В обоих экспериментах кросс-сшивки показали высокий выход сшитых белков. Окисление с помощью CuCl2 привело к высокому выходу сшивки в обоих экспериментах, что подтверждено иммуноблоттингом с использованием соответствующих антител к субъединицам. Учёные сделали вывод, что при 100 мМ CuCl2 выход сшивок составил 85–90%, основываясь на количественной оценке исчезновения полосы ε субъединицы в иммуноблотах, окрашенных антителами к ε.

Таким образом, обе конформации встречаются в E-F1F0 в E. coli, и, соответственно, ε субъединица должна быть способна переключаться между ними.

Рис. 4 Сравнение конформаций субъединицы ε АТФ-синтазы



В contracted состоянии обе альфа-спирали C-концевого домена расположены рядом друг с другом в области *c*-кольца и образуют шпильку (Рис. 4 A)

В extended конформации альфа-спирали вытянуты вдоль γ-субъединицы; вторая альфа спираль взаимодействует с бета-DELSEED последовательностью каталитической субъединицы (Рис. 4 B)

* 1. **Конформационные изменения**

Функциональная роль С-концевых α-спиралей ε-субъединицы в комплексе F1Fo остается не до конца изученной. Исследования по сшиванию показали, что закрепление этих спиралей при помощи белковых сшивок не оказывает существенного влияния на ферментативную активность, что указывает на то, что C-концевой домен обладает значительной подвижностью.

Данные, полученные в результате структурных исследований, подтверждают эту гипотезу. Подвижность α-спиралей ε-субъединицы согласуется с наблюдениями, полученными при проведении других экспериментов.

Структурные данные, полученные с использованием композитной модели MF1–γ′–ε, демонстрируют пространственное разделение вершины β-сэндвича и областей DELSEED β-субъединиц; расстояние составляет не менее 10 Å. Таким образом, C-концевой спиральный участок ε-α2 не может одновременно взаимодействовать с β-субъединицами, со спиральным участком ε-α1 и ε-NTD. Это говорит о том, что C-концевой спиральный домен ε-субъединицы должен претерпевать конформационные изменения в течение каталитического цикла.