

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

Эпсилон субъединица прокариотической АТФ-синтазы

Курсовая работы студента 2 курса

Емельянова Артёма

Научный руководитель
д.б.н. НИИ ФХБ 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 две дополнительные субъединицы — эпсилон и дельта. Эпсилон-субъединица, являясь одной из составляющих F₁ субкомплекса, играет важную роль в регуляции активности АТФ-синтазы и в связывании её доменов. 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 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

Для комплексного понимания ... необходимо рассмотреть структурный и функциональный контекст эпсилон субъединицы прокариотической АТФ-синтазы.

1. Разнообразие АТФ синтаз

АТФ синтаза – это одна из систем клетки, ответственна за взаимопревращение двух основных энергетических валют: АТФ и трансмембранной разности электрохимического потенциала. Этот фермент катализирует обратное фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом с использованием энергии разности электрохимического потенциала с разных сторон мембраны [1]. 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 [2].

АТФ синтазы делятся на несколько типов: F-, V- и A-АТФ-синтазы. Все АТФ-синтазы имеют высокую структурную гомологию и гомологию последовательностей, что позволяет с большой долей вероятности утверждать, что они имеют общее происхождение [3] от общего предка эу- и прокариот [4], обладавшего 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 [5], сохраняя консервативную структуру каталитических субъединиц [6]. Митохондриальные АТФ-синтазы F-типа, однако, устроены более сложно и включают в себя дополнительную эпсилон-субъединицу в своем центральном стержне [7].
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 (e 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 [8].
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 [9]. Считается, что структурные компоненты ферментов типа А эволюционировали из предковых форм, общих с АТФ-синтазами типа V [10].

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

2. Структура АТФ-синтазы

В простейшем случае бактериальные формы АТФ-синтазы включают в себя 2 субкомплекса, состоящие из 8 типов субъединиц. Гидрофильный F₁-субкомплекс состоит из пяти различных субъединиц: α , β , γ , δ и ϵ в стехиометрическом соотношении $3\alpha : 3\beta : 1\gamma : 1\delta : 1\epsilon$. Гидрофобный F₀-субкомплекс имеет в своём составе 3 типа субъединиц: a, b и c. Соотношение этих субъединиц в *Bacillus PS3* составляет $1a : 2b : 10c$. Однако число субъединиц в c-кольце может варьироваться от 8 до 15 у разных видов [11].

В домене F₁ присутствует 3-альфа-3-бета гексамер, внутри которого ассиметрично расположен главный стебель, образованный гамма-субъединицей. Субъединица эпсилон расположена около F₀ домена и связана как с субъединицей гамма, так и с c-кольцом (Рис 1. А) [12].

В домене F₀ субъединица a и 2 субъединицы b образуют периферическую ножку АТФ-синтазы. Олигомер из c-субъединиц образует так называемое c-кольцо (Рис 1. А) [12].

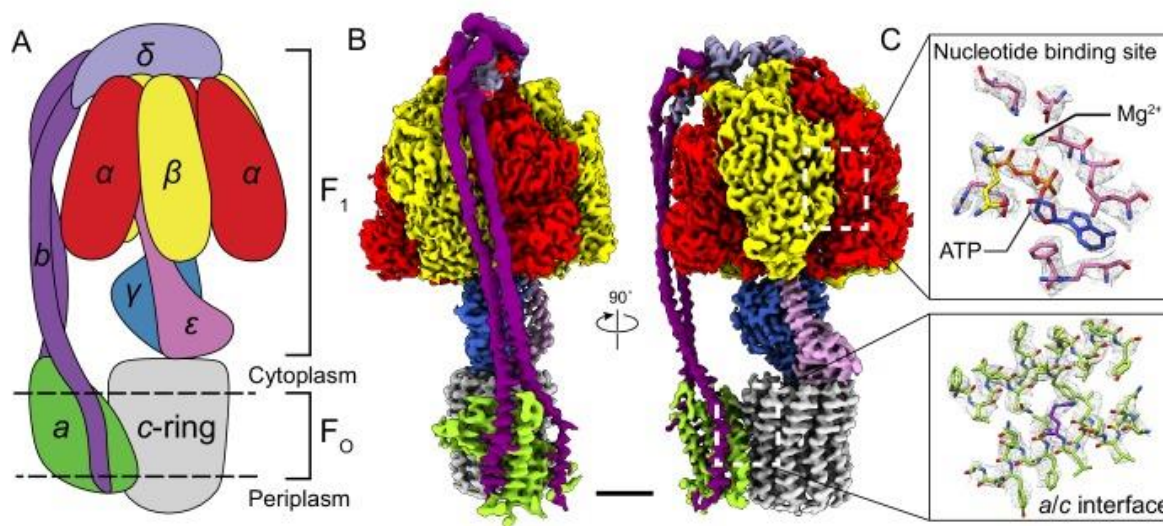


Рис. 1 Структура АТФ-синтазы (PMID: 30724163)

3. 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, для синтеза молекул АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Протоны (H⁺) возвращаются в матрикс митохондрий через канал, образованный доменом F₀ АТФ-синтазы [13].

F₀-субкомплекс, погружённый в мембрану, состоит из нескольких типов субъединиц: с-субъединиц, которые образуют кольцо.

Вращение с-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 «tight», «loose» и «open», в каждой из которых бета-субъединица имеет различную аффинность к АТФ:

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

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, при этом синтезируется 3 молекулы [13].

4. Структура субъединицы эпсилон

Субъединица эпсилон представляет из себя небольшой белок, состоящий из N-концевой бета-бочки (NTD) и подвижного C-концевого домена, включающего в себя 2 альфа-спирали (СТН1 и СТН2). N-концевой домен взаимодействует с гамма-субъединицей [15]. C-концевой домен участвует в ингибировании гидролиза АТФ [16].

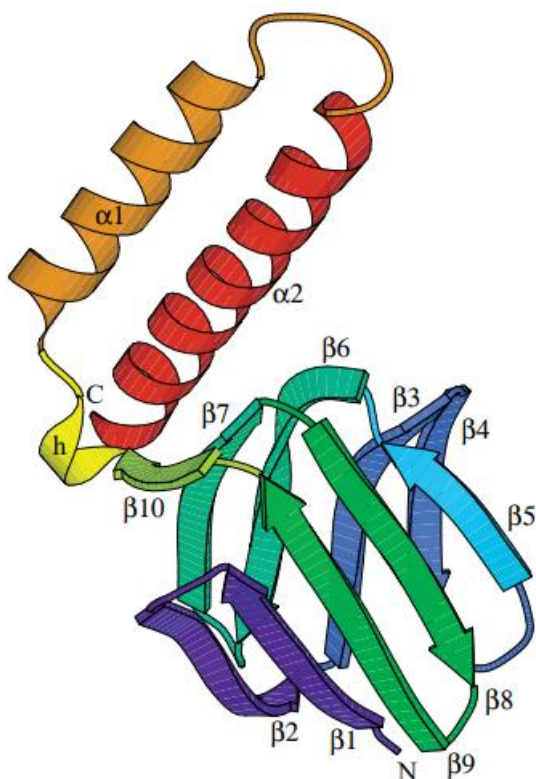


Рис. 2 Структура субъединицы эпсилон АТФ-синтазы в *E. coli* (PMID: 9331422)

Данные о взаимном расположении альфа-спиралей и бета-бочки оказались противоречивыми. Были получены противоречивые данные о пространственной структуре эпсилон-субъединицы методом кросс-сшивок и при помощи кристаллографии на изолированном эпсилон-гамма комплексе.

Данные по белковым кросс-сшивкам говорили о том, что две альфа спирали образуют шпильку. Однако кристаллография свидетельствовала о том, что никакой шпильки не образуется, а вместо этого С-концевой домен вытянут вдоль гамма-субъединицы. В дальнейшем вытянутая структура также пронаблюдалась при построении карты электронной плотности.

Опираясь на эти данные, учёные пришли к выводу, что эпсилон субъединица претерпевает значительные конформационные изменения в процессе работы АТФ-синтазы [18].

5. Конформации субъединицы эпсилон

Эпсилон субъединица находится в живой клетке в двух конформациях [20, 21]:

1. Contracted: обе альфа-спираль С-концевого домена расположены рядом и образуют шпильку (Рис. 3 А, В)

2. Extended: альфа-спирали вытянуты вдоль центрального стержня; вторая альфа спираль взаимодействует с бета-DELSEED последовательностью каталитической субъединицы (Рис. 3 C, D)

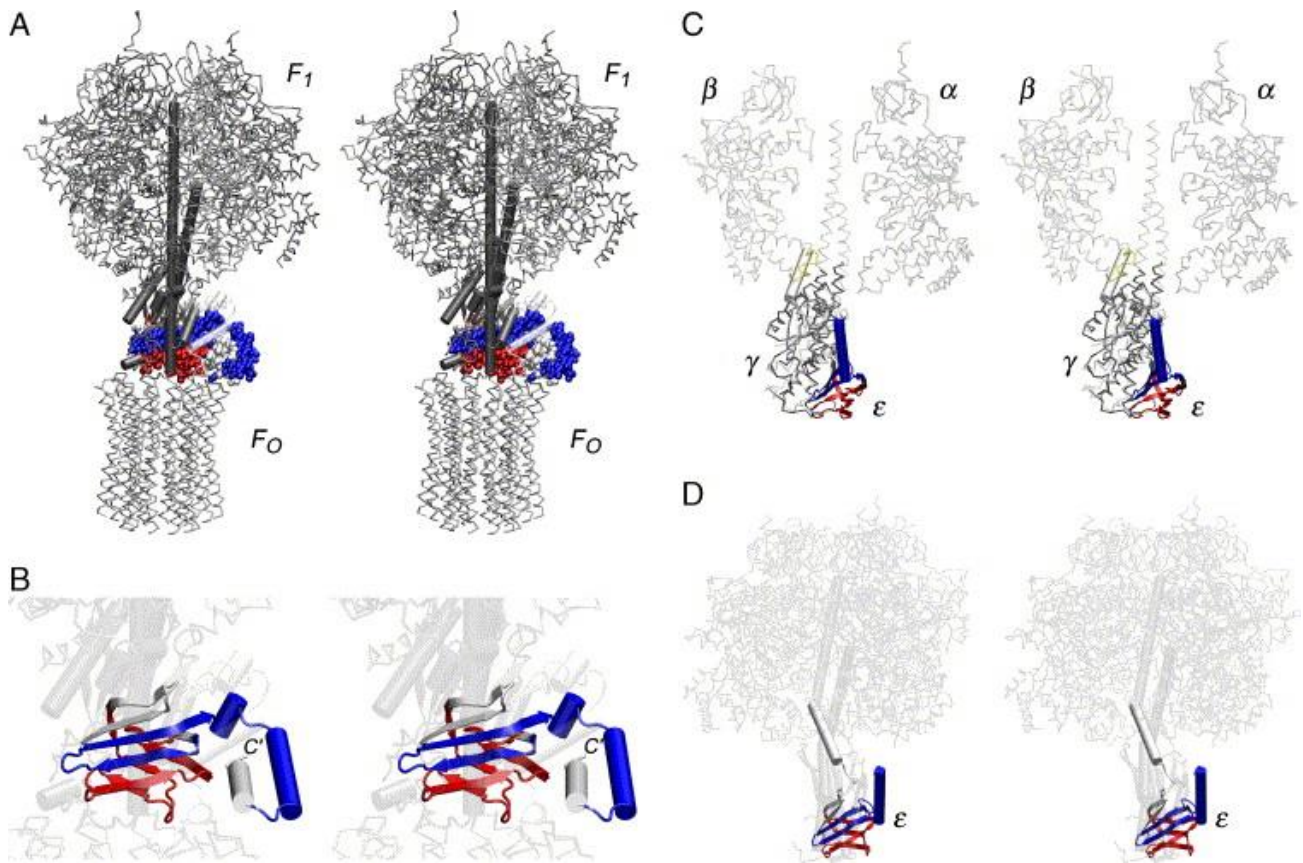


Рис. 3 Extended и Contracted конформации субъединицы эпсилон (PMID: 16701076)

В исследовании было установлено, что субъединица 3 белка принимает Contracted состояние в присутствии АТФ, в то время как в условиях, когда присутствует АДФ, она переходит в ингибирующее расширенное состояние. Это наблюдение может быть объяснено тем, что соотношение АТФ/АДФ влияет на конформацию данной субъединицы. Эксперименты показали, что АТФ действительно вызывает переход субъединицы эпсилон в Contracted состояние (Рис. 4) [19].

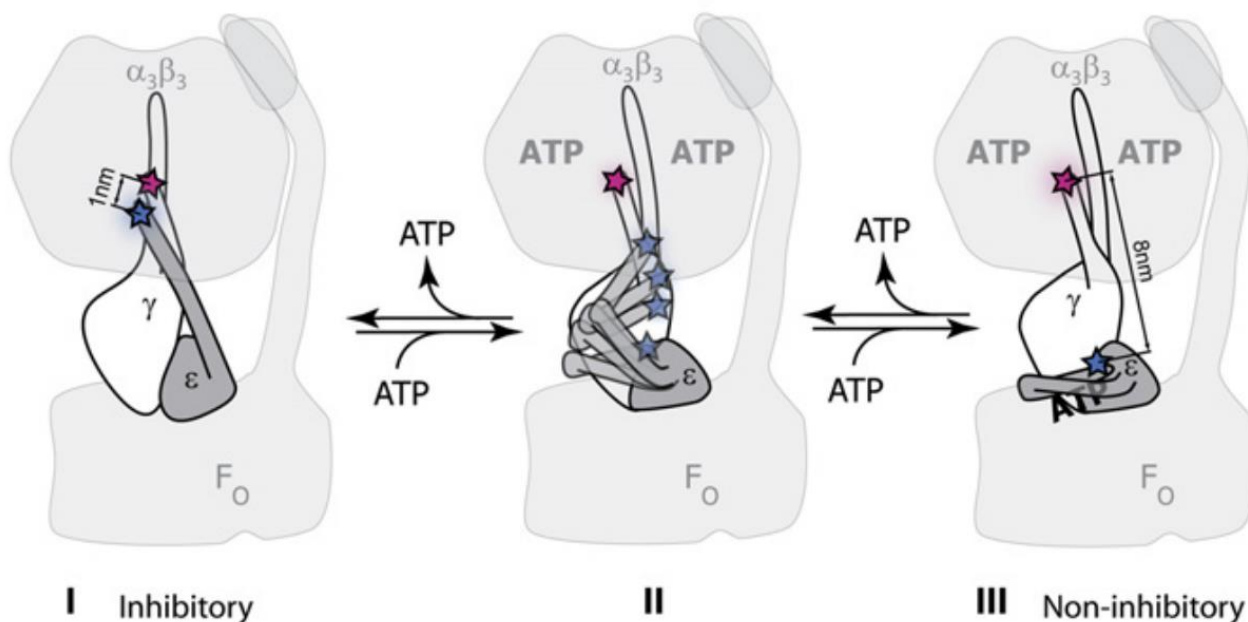


Рис. 4 Переходы между Extended (слева) и Contracted (справа) состояниями (PMID: 30141757)

6. АДФ ингибирование

Для начала рассмотрим механизм АДФ ингибирования, который осуществляется посредством неконкурентного связывания АДФ с каталитическими центрами бета-субъединиц АТФ-синтазы в отсутствие неорганического фосфата.

Конформационные изменения, вызванные связыванием АДФ имеют положительную обратную связь и увеличивают аффинность каталитического сайта к АДФ. Такое связывание инактивирует фермент, предотвращая дальнейший синтез АТФ. При этом обратная каталитическая активность F₀F₁-комплекса не пропадает: реакция гидролиза АТФ может протекать.

Освобождение связанного АДФ и реактивация АТФ-синтазы происходит только при достижении протон-движущей силы определённого порога. При этом стоит отметить, что порог для реактивации прямой каталитической активности фермента выше, необходим для синтеза АТФ в обычных условиях уровень: при низкой трансмембранной разности потенциала фермент остается неактивным. Однако 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.

References

1. 1P. Mitchell, Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism, *Nature* 191 (1961) 144–148.
2. Nakano, A., Kishikawa, Ji., Mitsuoka, K. et al. Mechanism of ATP hydrolysis dependent rotation of bacterial ATP synthase. *Nat Commun* 14, 4090 (2023).
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-39742-5>
3. Mulkidjanian, A. Y., Makarova, K. S., Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (2007) Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases, *Nat. Rev. Microbiol.*, 5, 892-899, doi: 10.1038/nrmicro1767.
4. Gogarten, J. P., and Taiz, L. (1992) Evolution of proton pumping ATPases: rooting the tree of life, *Photosynth. Res.*, 33, 137-146, doi: 10.1007/BF00039176.
5. Kühlbrandt, W., and Davies, K. M. (2016) Rotary ATPases: a new twist to an ancient machine, *Trends Biochem. Sci.*, 41, 106-116, doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.006.
6. Schäfer, G., Engelhard, M., and Müller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 570-620, doi: 10.1128/mmbr.63.3.570-620.1999.
7. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Mar; 35(2):211-25. doi: 10.1007/s10545-011-9382-9. Epub 2011 Aug 27. PMID: 21874297; PMCID: PMC3278611.
8. Зубарева, В.М & Лапашина, А.С & Шугаева, Т.Е & Литвин, А.В & Фенюк, Б.А. (2020). Роторные ион-транслоцирующие АТФазы/АТФ-синтазы: разнообразие, общие черты и отличия. *Биохимия*. 85. 1898-1917. 10.31857/S0320972520120131.
9. Zhou, L., and Sazanov, L. A. (2019) Structure and conformational plasticity of the intact *Thermus thermophilus* V/A-type ATPase, *Science*, 365, doi: 10.1126/science.aaw9144.
10. Ihara, K., Abe, T., Sugimura, K. I., and Mukohata, Y. (1992) Halobacterial A-ATP synthase in relation to V-ATPase, *J. Exp. Biol.*, 172, 475-485.
11. The Journal of Biochemistry, Volume 149, Issue 6, June 2011, Pages 655–664,
<https://doi.org/10.1093/jb/mvr049>
12. Guo H, Suzuki T, Rubinstein JL. Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife*. 2019 Feb 6;8:e43128. doi: 10.7554/eLife.43128. PMID: 30724163; PMCID: PMC6377231.
13. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика. — М.: Издательство Московского университета, 2011. — 360 с. ISBN 978-5-211-05871-2
14. C. Kayalar, J. Rosing, P.D. Boyer, An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 2486–2491
15. Subunit epsilon of *E. coli* F1Fo ATP synthase attenuates enzyme activity by modulating central stalk flexibility. Meghna Sobti, James L. Walshe, Yi C. Zeng, Robert Ishmukhametov, Alastair G. Stewart. *bioRxiv* 2020.09.30.320408; doi:
<https://doi.org/10.1101/2020.09.30.320408>

16. Лапашина, А.С & Фенюк, Б.А. (2018). АДФ-ингибирование H⁺-FOF1-АТФ синтазы. БИОХИМИЯ, 2018, том 83, вып. 10, с. 1427–1449. DOI: 10.1134/S0320972518100019
17. Uhlin U, Cox GB, Guss JM. Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure*. 1997 Sep 15;5(9):1219-30. doi: 10.1016/s0969-2126(97)00272-4. PMID: 9331422.
18. Feniouk BA, Suzuki T, Yoshida M. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):326-38. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.03.022. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16701076.
19. Feniouk BA, Kato-Yamada Y, Yoshida M, Suzuki T. Conformational transitions of subunit epsilon in ATP synthase from thermophilic *Bacillus PS3*. *Biophys J*. 2010 Feb 3;98(3):434-42. doi: 10.1016/j.bpj.2009.10.023. PMID: 20141757; PMCID: PMC2814204.
20. Wilkens, S., F. W. Dahlquist, ., R. A. Capaldi. 1995. Structural features of the 3 subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 2:961–967.
21. Rodgers, A. J. W., and M. C. J. Wilce. 2000. Structure of the g-3 complex of ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.* 7:1051–1054.