**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 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.

**ПЕРЕФОРМУЛИРОВАТЬ ЧЕРЕЗ ВОЗМОЖНЫЕ РЕШЕНИЯ ПРОТИВОРЕЧИЙ**

**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

**ПЕРЕФОРМУЛИРОВАТЬ**

**Литературный обзор**

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

**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 (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 [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.

**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 3α : 3β : 1γ : 1δ : 1ε. 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. A) [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. A) [12].

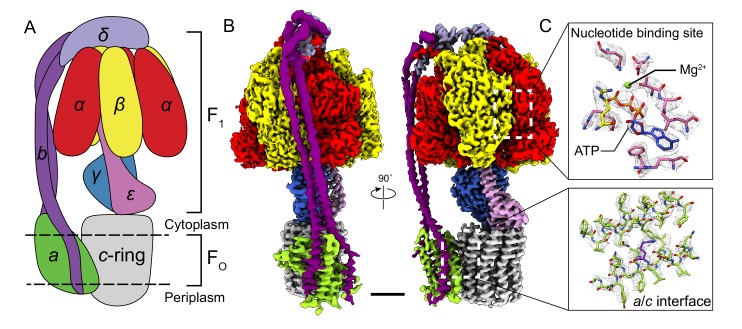


Рис. 1 Структура АТФ-синтазы (PMID: 30724163)

**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: c-субъединиц, которые образуют кольцо.

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 «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 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.

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].

**ДОБАВИТЬ РОЛЬ ЭПСИЛОН СУБЪЕДИНИЦЫ**

**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 (CTH1 и CTH2). N-концевой домен взаимодействует с гамма-субъединицей [15]. C-концевой домен участвует в ингибировании гидролиза АТФ [16].

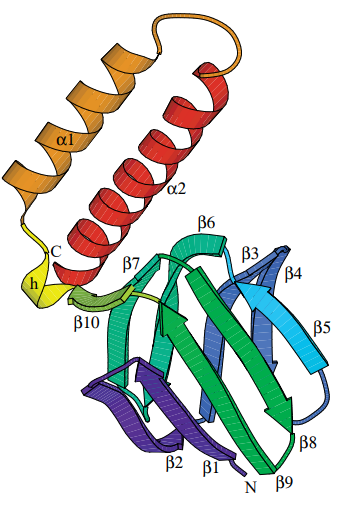


Рис. 2 Структура субъединицы эпсилон АТФ-синтазы в E. coli (PMID: 9331422)

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 C-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].

**Конформации субъединицы эпсилон**

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

1. Contracted: обе альфа-спираль C-концевого домена расположены радом и образуют шпильку (Рис. 3 A, B)
2. Extended: альфа-спирали вытянуты вдоль центрального стержня; вторая альфа спираль взаимодействует с бета-DELSEED последовательностью каталитической субъединицы (Рис. 3 C, D)

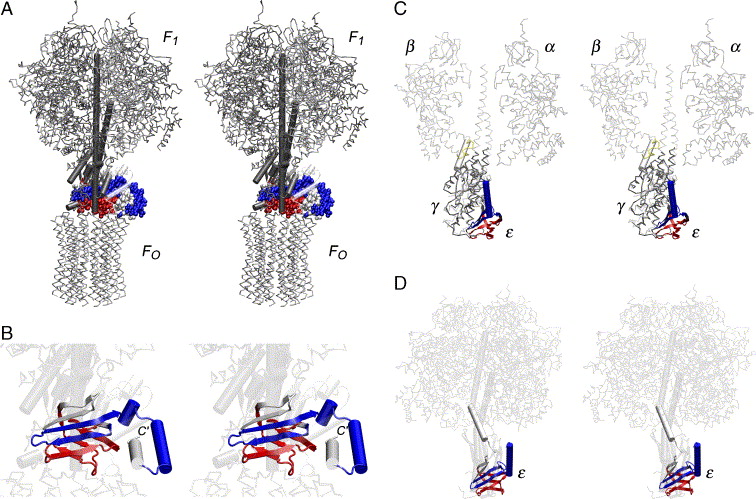


Рис. 3 Extended и Contracted конформации субъединицы эпсилон (PMID: 16701076)

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].

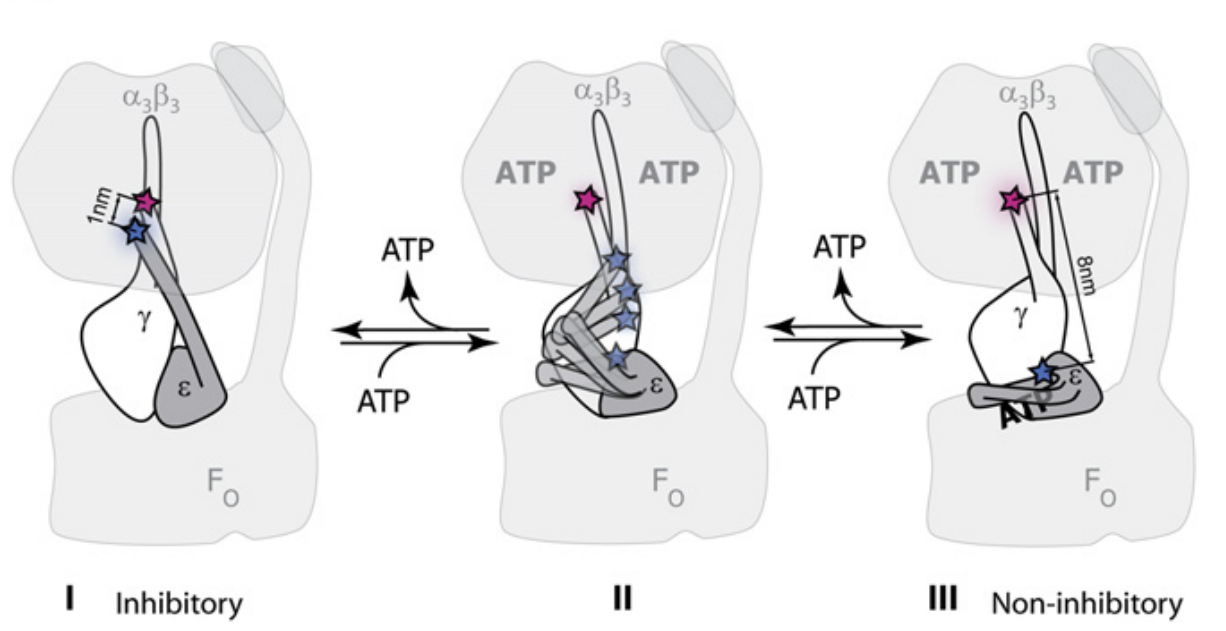


Рис. 4 Переходы между Extended (слева) и Contracted (справа) состояниями (PMID: 30141757)

**АДФ ингибирование**

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

**ВКЛЮЧИТЬ ЭПСИЛОН СУБЪЕДИНИЦУ СЮДА**

**Заключение**

Субъединица эпсилон прокариотической АТФ-синтазы претерпевает значительные конформационные переходы, участвуя, таким образом, в регуляции активности F0F1-комплекса. In vivo она не может инициировать прекращение катализа реакции гидролиза АТФ, однако переход этой субъединицы в Extended конформацию при уже ингибированном другими факторами ферменте стабилизирует АТФ-синтазу в отключённом состоянии и накладывает ограничения на выход из него.

В Contracted конформации субъединица эпсилон не проявляет ингибирующей активности ни к прямой, ни к обратной реакции.