

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi z wyrazami uznania, wdzięczności i sympatii

KRYSTYNA BOGUCA

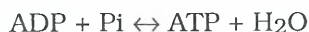
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN  
Pasteura 3, Warszawa

## ATPaza $F_0F_1$ — BUDOWA I FUNKCJA

### WSTĘP

U organizmów z metabolizmem tlenowym przeważająca ilość ATP — uniwersalnego źródła energii dla potrzeb metabolicznych komórki powstaje w procesie oksydacyjnej fosforylacji z udziałem kompleksu enzymatycznego  $F_0F_1$  ATPazy (syntazy ATP).

Enzym katalizuje syntezę ATP zgodnie z reakcją:



Zgodnie z teorią chemiosmotycznego sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji ten endoergiczny proces (zachodzący w mitochondriach, w błonie tylakoidalnej chloroplastów oraz w błonie bakterii) przebiega kosztem energii gradientu protonów, innymi słowy kosztem energii transmembranowego elektrochemicznego gradientu protonów ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) tworzonego przez pompy protonowe funkcjonujące w łańcuchu oddechowym podczas utleniania substratów. W konwencji teorii chemiosmotycznej  $\Delta\mu_{H^+}$  określa się też jako siłę protonomotoryczną.

Do syntezy ATP enzym zużywa energię transportu protonów zachodzącego zgodnie z ich elektrochemicznym gradientem przez kanał w błonie. Protony po przejściu przez kanał kierują się do domen enzymu odpowiadających zmianami konformacyjnymi.

W warunkach beztlenowych lub kiedy transport elektronów w łańcuchu oddechowym nie zachodzi z innego niż brak tlenu powodu hydroliza ATP generuje gradient protonów będący źródłem energii dla transportu jonów w celu zapewnienia komórce równowagi jonowej.

Enzym pełni trzy podstawowe funkcje:

1. kataliza syntezy  $\leftrightarrow$  hydrolizy ATP;

2. translokacja protonów przez błonę;  
3. sprzężenie katalizy z transportem protonów.

W ostatnich latach obserwuje się znaczny postęp w badaniach budowy i funkcji enzymu. Przyczynia się do tego wprowadzenie wyrafinowanych metod, jak na przykład zastosowanie analizy struktury enzymu w kryształach za pomocą rozproszenia promieni X (o znacznej rozdzielczości — 2,8 Å) (ABRAHAMS i współaut. 1994) oraz wprowadzenie do badań mutacji punktowych.

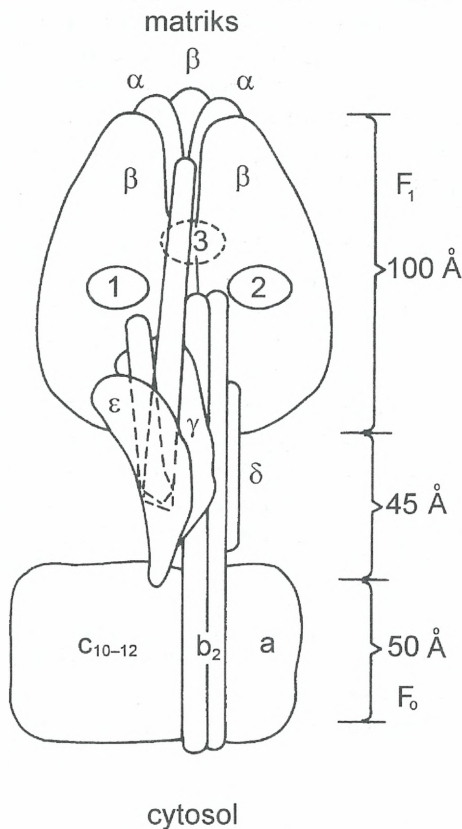
ATPaza  $F_0F_1$  jest skomplikowanym kompleksem enzymatycznym kodowanym częściowo przez geny mitochondrialne a częściowo przez jądrowe. Budowa wielu peptydów (podjednostek enzymu) wchodzących w skład enzymu oraz mechanizm transportu substratów i produktów pozostały w przebiegu ewolucji niemal nie zmienione. ATPazy  $F_0F_1$  ssaków i bakterii *Escherichia coli* mają niemal identyczną budowę miejsca katalitycznego i posługują się takim samym mechanizmem katalizy. Fakt ten rozszerzył znaczenie badań nad enzymem z zastosowaniem mutantów *Escherichia coli*, gdzie możliwość uzyskania dużej ich liczby w krótkim czasie może być praktycznie nieograniczona.

Na temat budowy i funkcji kompleksu enzymatycznego ATPazy  $F_0F_1$  istnieje bogate piśmiennictwo w postaci wielu artykułów przeglądowych (np. AMZEL i PEDERSEN 1983, BOYER 1989, CAPALDI i współaut. 1994, FUTAI i współaut. 1989, NAKAMOTO 1996, PEDERSEN i AMZEL 1993, SENIOR 1988, 1990).

## BUDOWA KOMPLEKSU ATPazy

Masa cząsteczkowa kompleksu ATPazy (syntazy ATP) wynosi około 530 000 daltonów. Kompleks w najprostszej postaci (u prokariotów) zawiera osiem typów podjednostek białkowych podzielonych między dwa sektory —  $F_0$  i  $F_1$ .

Na rycinie 1 przedstawiono schematyczny model cząsteczki kompleksu enzymatycznego ATPazy. Trzema elipsami ponumerowanymi 1–3 zaznaczono domeny zawierające miejsca katalityczne w sektorze  $F_1$ . Długość sektora katalitycznego  $F_1$  „zanurzonego” w przestrzeni zajmowanej przez matryks mitochondrialną wynosi 100 Å. Sektor  $F_0$  (50 Å) o charakterze hydrofobowym dzięki obecności skrajnie hydrofobowego peptydu c (GIRVIN i FILLINGAME 1995) tkwiący głęboko w dwuwarstwie lipidowej błony mitochondrialnej pełni funkcję kanału protono-



Ryc. 1. Schemat budowy mitochondrialnej ATPazy  $F_1F_0$ .

Elipsami zaznaczono miejsca katalityczne enzymu. Peptydy  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  tworzą łącznik między sektorami  $F_1$  i  $F_0$  (w budowie łącznika nie uwzględniono małych peptydów, których funkcja jest mało poznana). Linia przerywana zaznaczono możliwe ruchy peptydów  $\gamma$  i  $\epsilon$ , które mogą zmieniać wiązanie sektora  $F_1$  z  $F_0$  podczas tranlokacji protonów napędzanej przez hydrolizę ATP (w kierunku „do”  $F_0$ ) oraz w kierunku odwrotnym („od”  $F_0$ ) podczas syntezy ATP (CAPALDI i współaut. 1994).

wego. Przez kanał ten podczas syntezy ATP protony są transportowane z cytosolu (w przypadku enzymu mitochondrialnego) w kierunku sektora  $F_1$ . Usuwane z mitochondrialnej matryks podczas utleniania substratów oddechowych protony „powracają” (używamy wyrażenia „powracają” umownie, gdyż w rzeczywistości niekoniecznie są to te same protony) już inną drogą i zdążają do innego regionu błony mitochondrialnej — w kierunku sektora katalitycznego ATPazy.

Przez kanał w sektorze  $F_0$  są także transportowane protony w kierunku odwrotnym (do cytosolu). Proces ten zachodzi podczas hydrolizy ATP.

Sektor  $F_0$  jest kompleksem białkowym zbudowanym z trzech rodzajów peptydów, które w piśmiennictwie dotyczącym ATPazy  $F_0F_1$  przyjęto oznaczać literami alfabetu łacińskiego: a, b, c. Występują one w kompleksie w stosunku liczbowym a : 2 b : 8–12c. Obecnie pojawiają się w piśmiennictwie sugestie (DUNCAN i współaut. 1995), że peptydy c tworzą układ zdolny do rotacji.

W odróżnieniu od kompleksu  $F_0$  peptydy sektora katalitycznego oznaczane są literami alfabetu greckiego:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  i występują w stosunku liczbowym  $3\alpha : 3\beta : \gamma : \epsilon : \delta$ . Peptydy  $\alpha$  i  $\beta$  tworzą charakterystyczny heksagonalny układ przypominający kształtem owoc pomarańczy (patrz ryc. 1). W układzie tym oba rodzaje peptydów są usytuowane na przemian. Patrząc od strony matryks mitochondrialnej widzimy pierścień utworzony przez końce N i C peptydu. Ta centralna helikalna domena utworzona przez część peptydu  $\gamma$  bierze udział w mechanizmie, z udziałem którego zachodzi przenoszenie energii transportu protonów z sektora  $F_0$  do sektora katalitycznego  $F_1$ . Stanowi ona ruchomą oś, która wykonując ruch obrotowy może zmieniać położenie w stosunku do kompleksu peptydów zawierających miejsca katalityczne ( $\alpha_3\text{--}\beta_3$ ) (SENIOR 1988, ZHOU i współaut. 1996). Rotacja peptydu  $\gamma$  jest także sprzężona z sektorem  $F_0$ . Świadczy o tym unieruchomienie peptydu  $\gamma$  (ustanie ruchu obrotowego) podczas zablokowania transportu protonów w kanale sektora  $F_0$ .

Pozostała część peptydu  $\gamma$  wchodzi w skład „łącznika” między sektorem  $F_0$  a sektorem katalitycznym  $F_1$  będącego kompleksem białkowym o 45 Å długości, zawierającym dodatkowo peptydy  $\delta$  i  $\epsilon$  (u bakterii i w chloroplastach). Budowa łącznika w dobrze zbadanym enzymie serca



wołu jest bardziej skomplikowana. Zawiera on kilka dodatkowych peptydów o niejasnej funkcji. Są one obecnie przedmiotem badań zespołu Walkera (COLLINSON i współaut. 1969).

Przedstawioną budowę enzymu przewidziano już w latach 70-tych na podstawie analizy obrazów w mikroskopie elektronowym. Obecnie wspomniana we wstępie analiza krystalicznej postaci enzymu za pomocą promieni X potwierdza w pełni przewidzianą strukturę heksagonalną kompleksu  $F_1$  oraz naprzemienne usytuowanie peptydów  $\alpha$  i  $\beta$  (ABRAHAMS i współaut. 1994).

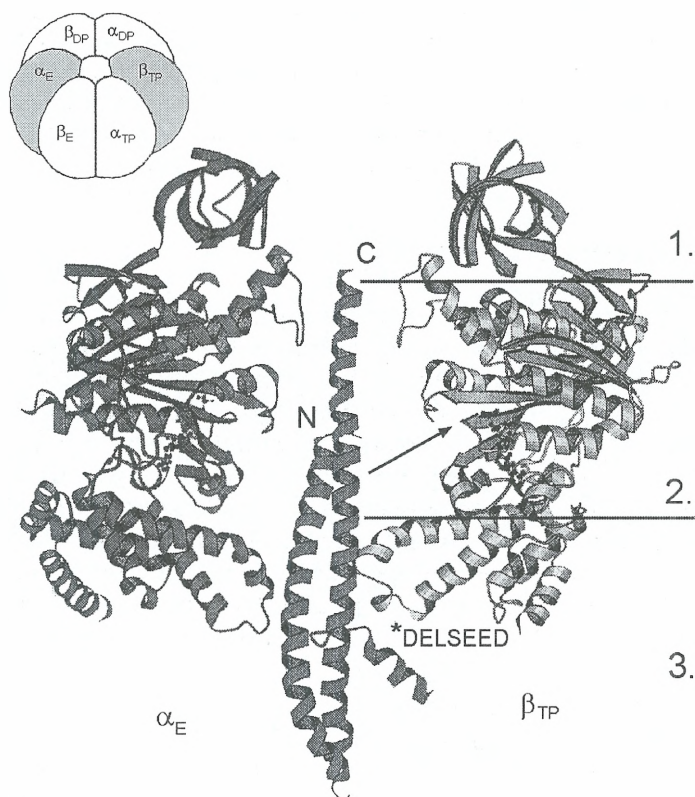
Na rycinie 2 przedstawiono trójwymiarowy model kompleksu peptydów  $\alpha$ - $\beta$  opracowany na podstawie analizy krystalograficznej enzymu, w oparciu o symulację komputerową zachowania się peptydów podczas wiązania nukleotydów. Do miejsc wiążących nukleotydy w kryształach enzymu wprowadzono doświadczalnie ADP lub analog ATP — AMP-PNP (5'-adenyloimido dwufosforan) w celu zbadania zachodzących zmian konfiguracji peptydów kompleksu w zależności od rodzaju związanego nukleotydu.

W przedstawionym przypadku cząsteczka peptydu  $\alpha$  jest „pusta” ( $\alpha_E$  empty) — nie zawiera nukleotydu, natomiast peptyd  $\beta$  zawiera wbudowany nukleotyd — analog ATP — AMP-PNP, co jest schematycznie przedstawione w lewym górnym rogu ryciny.

Peptydy  $\alpha$  i  $\beta$  zawierają wyraźnie dające się wyróżnić trzy obszary: 1. — otoczenie końca N

u „szczytu” cząsteczki, znajdujące się w największym oddaleniu od sektora  $F_0$ . Główną masę tego obszaru stanowi cylinder (barrel) utworzony z  $\beta$ -kartek. 2. — obszar środkowy zawierający domenę wiążącą nukleotydy (szeroko pojęte centrum katalityczne enzymu). Obszar ten jest zbudowany z 9 pasm (strands) i 9  $\alpha$ -heliksów, 3. — otoczenie końca C położone najbliżej sektora  $F_0$ , zawierające 7  $\alpha$ -heliksów, z którymi reaguje peptyd  $\epsilon$  (patrz ryc. 1) i prawdopodobnie peptyd  $\delta$  oraz peptyd b, należący do sektora  $F_0$ . W obszarze tym znajduje się wysoce homologiczna sekwencja aminokwasowa DELSEED (kwas asparaginowy-kwas glutaminowy-leucyna-seryna-kwas glutaminowy-kwas glutaminowy-kwas asparaginowy), która bierze udział w wiązaniu peptydu  $\epsilon$  oraz  $\gamma$  z peptydami  $\alpha$  i  $\beta$ .

Peptydy  $\alpha$  i  $\beta$  mają identyczne połańdowanie cząsteczek oraz niemal identyczną budowę domeny wiążącej nukleotydy. Nukleotydy w domenie peptydu  $\alpha$  związane są ściśle. Stanowią one wolno wymieniającą się pulę o nie znanej roli. Istnieją dane doświadczalne świadczące, że ich obecność w miejscach niekatalitycznych (w peptydach  $\alpha$ ) nie wpływa na przebieg katalizy (WEBER i współaut. 1995). Prawdopodobnie ich wiązanie z białkiem zachodzi już w procesie jego syntezy. W wyniku tego podczas „zbiórki” podjednostek enzymu, czyli formowania kompleksu enzymatycznego peptyd  $\alpha$  wchodzi w jego skład już z wbudowanym nukleotydem (ATP).



Ryc. 2. Trójwymiarowa struktura peptydów  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz części peptydu  $\gamma$  opracowana z zastosowaniem programu komputerowego „MOLSCRIPT” (ABRAHAMS i współaut. 1994)

Cząsteczka peptydu  $\beta$  zawiera wbudowany analog ATP — AMP-PNP (5-adenyloimidodwufosforan  $\beta_{TP}$ ). Peptyd  $\alpha$  jest pusty ( $\alpha_E$ ). Przedstawiono je na rycinie w postaci pół zaciemnionych w kompleksie  $\alpha_3\beta_3\gamma$  (schemat w lewym górnym rogu). Gwiazdką oznaczono pętlę zawierającą sekwencję aminokwasową „DELSEED” biorącą udział w wiązaniu peptydu  $\beta$  z peptydem  $\gamma$  (patrz tekst). Cyframi arabskimi oznaczono obszary peptydów  $\alpha$  i  $\beta$  ATPazy opisane w tekście. W obszarze centralnym znajduje się miejsce wiązania nukleotydów. Na rycinie oznaczone strzałką.

## BUDOWA CENTRUM KATALITYCZNEGO ENZYMU

Aczkolwiek budowa domen wiążących nukleotydy w peptydach  $\alpha$  i  $\beta$  jest niemal identyczna, to jednak tylko domeny trzech peptydów  $\beta$  mogą być centrami katalitycznymi enzymu. Na rycinie 3 przedstawiono budowę szeroko pojętego centrum katalitycznego — domeny wiążącej nukleotydy z uwzględnieniem najważniejszych aminokwasów wchodzących w jego skład. Obszar, w którym wiąże się adenina nukleotydu jest położony w domenie hydrofobowej. Hydrofobowość tej domenie zapewniają aminokwasy aromatyczne — fenyloalanina (F<sub>418</sub>), tyrozyna (Y<sub>345</sub>) i fenyloalanina (F<sub>424</sub>). Budowa centrum katalitycznego a zwłaszcza funkcja poszczególnych aminokwasów wchodzących w jego skład mimo znacznego postępu badań w tej dziedzinie, wciąż jeszcze daleka jest od poznania. Bieżące publikacje przynoszą wciąż nowe informacje. Ostatnio SCHNIZER i SCHUSTER (1996) opublikowali dane dotyczące roli histydyny 211 obecnej w tak zwanej „pętli” P enzymu drożdży.

„Pętla P” jest właściwym centrum katalitycznym, w którym zachodzi „wydarzenie katalityczne” polegające na powstawaniu bezwodnikowego wiązania fosforanowego w ATP podczas jego syntezy lub rozszczepienie tego wiązania podczas hydrolizy ATP. Pętla ta utworzona jest przez cztery aminokwasy — lizynę (K<sub>162</sub>), serynę należącą do peptydu  $\alpha$  ( $\alpha$ -S<sub>344</sub>), glicynę (G<sub>159</sub>) i treoninę (T<sub>163</sub>). Aminokwasy te wchodzi w skład wysoce konserwatywnej sekwencji „GXXXXGKT/S” (glicyna-XXXX-glicyna-lizyna-treonina/seryna), która występuje w wielu białkach wiążących nukleotydy.

Obecność kwasu glutaminowego (E<sub>188</sub>) w peptydzie  $\beta$  w miejscu którego w peptydzie  $\alpha$  znajduje się glutamina (Q<sub>208</sub>) decyduje o tym, że peptydy  $\beta$  (nie zaś  $\alpha$ ) mogą być podjednostkami katalitycznymi enzymu. (E<sub>188</sub> i Q<sub>208</sub> na rycinie 3 zakreślono linią przerywaną). Usytuowanie bocznego łańcucha karboksylowego tego aminokwasu, mogącego tworzyć wiązanie wodorowe z cząsteczką wody ułatwia atak nukleofilowy ADP na fosforan podczas syntezy ATP.

W strukturze kryształu cząsteczki enzymu zawierającej wbudowany AMP-PNP, na podstawie której opracowano schemat przedstawiony na rycinie 3, w odległości 4,4 Å od fosforanu  $\gamma$  jest widoczne „przejaśnienie”. W tym właśnie miejscu cząsteczka wody wiąże się z grupą karboksylową kwasu glutaminowego E<sub>188</sub>.

Niedawno badacze zespołu Walkera (ABRAMS i współaut. 1994) analizując strukturę kryształu enzymu zwrócili uwagę na obecność w obszarze centralnym peptydów  $\alpha$  i  $\beta$  tunelu o charakterystycznym kształcie stożka. Tunel jest utworzony przez  $\alpha$ -heliks. Łączy on miejsce wiążące nukleotydy ze środowiskiem. Ostatnio pojawiają się publikacje dotyczące możliwego mechanizmu funkcjonowania tej drogi transportu substratów i być może produktów reakcji enzymu. Wykazano między innymi, że region cząsteczki peptydu wokół wejścia do tunelu widocznego w strukturze krystalicznej enzymu nie jest „sztywnym” heliksem i może ulegać zmianom konformacyjnym. Kierunek zmian zależy od związanego nukleotydu (ATP lub ADP) mimo znacznej odległości od miejsca jego wiązania (TOZAWA i współaut. 1995).

## MECHANIZM KATALIZY

Dzięki precyzyjnym pomiarom kinetycznym ustalono, że reakcja  $ADP + P_i \leftrightarrow ATP + H_2O$  zachodząca w centrum katalitycznym enzymu jest bliska stanu równowagi.

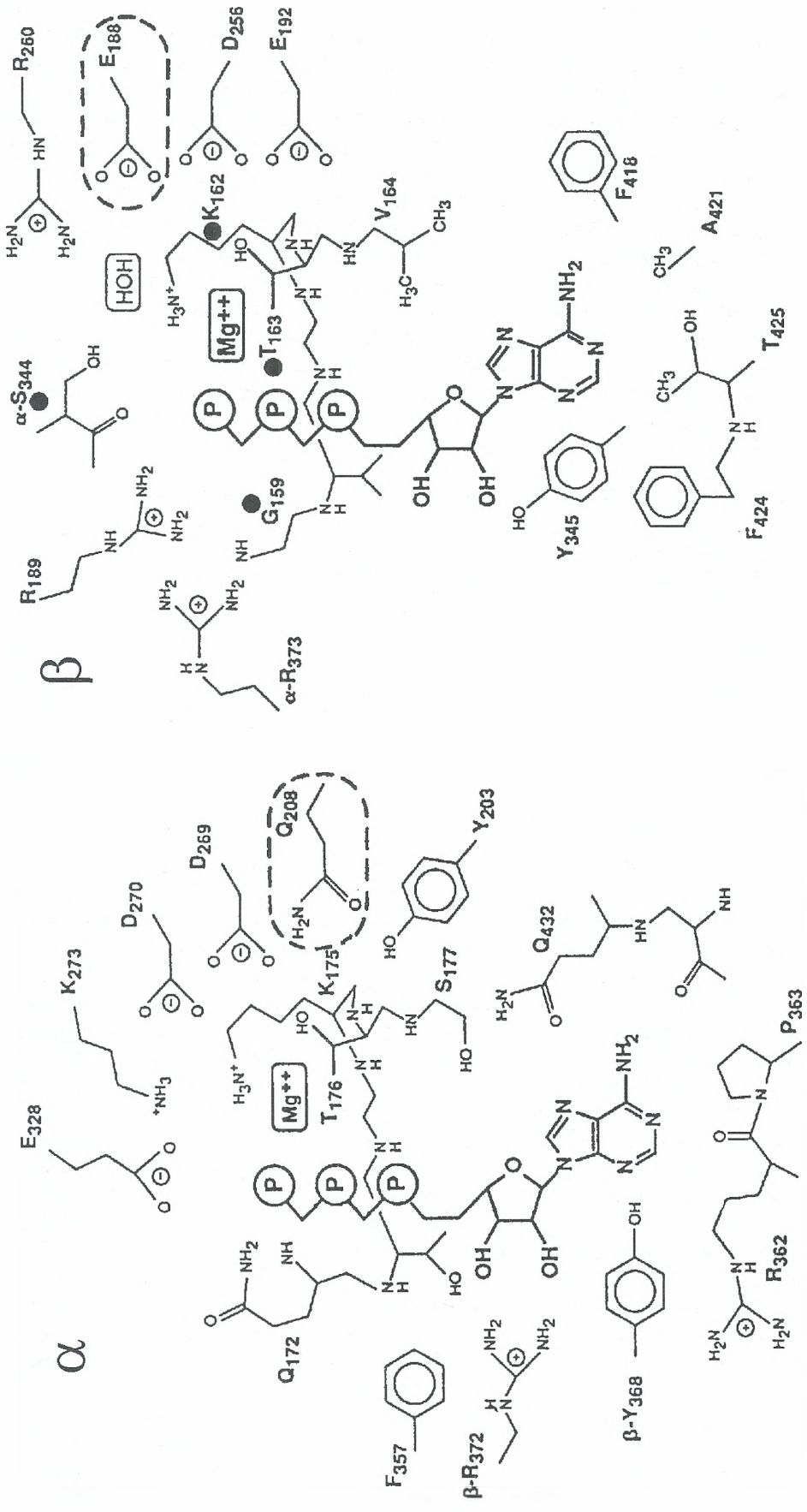
Zatem energia translokacji protonów nie jest użytkowana bezpośrednio w reakcji katalitycznej. Jednakże reakcja ta jest stadium końcowym wielce skomplikowanego procesu sprzęgającego transport z syntezą (lub hydrolizą) ATP. Proces ten wraz z powyższą reakcją stanowią wydarzenie katalityczne.

Obecnie dysponujemy znaczną liczbą dowodów, że energia jest użytkowana podczas syntezy ATP do wiązania substratu oraz usuwania ściśle związanego produktu reakcji katalitycznej. Sposób, w jaki gradient protonów „na-

pędza” wiązanie substratów i usuwanie produktów reakcji katalitycznej jest przedmiotem intensywnych badań w wielu laboratoriach. W procesie tym peptydy  $\gamma$  i  $\epsilon$  odgrywają kluczową rolę. Wszystkie trzy miejsca wiązania nukleotydów w peptydach  $\beta$  ściśle współpracują ze sobą. Wszystkie one stają się kolejno centrami katalitycznymi enzymu. Nigdy nie są nimi jednocześnie! Hydroliza ATP w jednym z trzech miejsc (bez udziału pozostałych) przebiega wolno. Ulega ona  $10^3$ – $10^6$  krotnemu przyspieszeniu na skutek wypełnienia substratem innego miejsca wiążącego.

Na rycinie 4 przedstawiono mechanizm takiej współpracy trzech miejsc wiążących nukleotydy. Każde z nich może znajdować się w



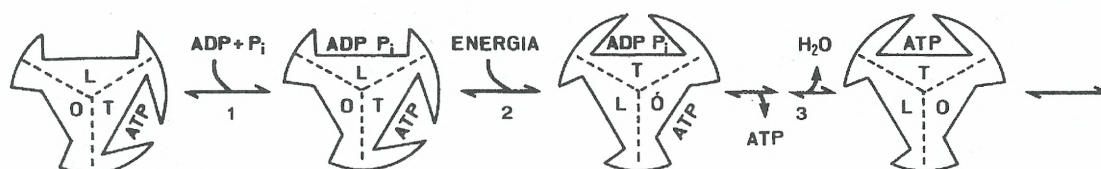


Ryc. 3. Miejsca wiążące nukleotydy w peptydach  $\alpha$  i  $\beta$  ATPazy F<sub>1</sub> serca byka (ABRAHAMS i współaut. 1994).

Wszystkie aminokwasy tworzące „petlę P” znajdują się w obu peptydach —  $\alpha$  i  $\beta$ . Wyjątek stanowią arginina ( $\beta$ -R372) oraz tyrozyna ( $\beta$ -Y368) oraz tyrozyna ( $\beta$ -Y368) i seryna ( $\alpha$ -S344) tworzące „petlę P” w peptydzie  $\alpha$  a należące do peptydu  $\beta$  oraz arginina373 ( $\alpha$ -R373) i seryna344 ( $\alpha$ -S344) tworzące „petlę P” w peptydzie  $\beta$  a należące do peptydu  $\alpha$ . Zaciernionymi kółkami oznaczono aminokwasy tworzące sekwencję homologiczną do sekwencji GXXXXGKT/S (patrz tekst). Liniami przerywanymi (elipsy) oznaczono kwas glutaminowy (E188) w peptydzie  $\beta$  oraz glutaminę (Q208) w peptydzie  $\alpha$ .

jednym z trzech możliwych stanów — luźnym L (loose), otwartym O (open) i ścisłym T (tight). W stanie L ligandy (ADP, Pi) są związane luźno. Stan O charakteryzuje się bardzo niskim powinowactwem wiązania substratów. W stanach L i O nie zachodzi synteza ATP. Natomiast miejsce znajdujące się w stanie T — miejsce ścisłego wiązania nukleotydów, jest miejscem katalitycznym. Zmiany konformacyjne w kompleksie enzymu wywołane przez transport protonów powodują przejście stanu ze ściśle związanym ATP (podczas syntezy ATP) w stan O, podczas trwania którego nukleotyd zostaje usunięty.

Miejsca katalityczne oraz kanał protonowy w sektorze  $F_0$  są sprzężone poprzez zmiany



Ryc. 4. Mechanizm syntezy ATP.

Katalityczne miejsca w peptydach współpracują ze sobą przechodząc kolejno przez trzy stadia (stany): „O” — otwarty, „L” — luźny (w stanie tym substraty są związane luźno) — nieaktywne katalitycznie oraz T — ścisłe (w stanie tym substraty są związane ściśle) — aktywne katalitycznie. Kaskada zmian konformacyjnych w peptydach kompleksu enzymatycznego indukowana przez transport protonów powoduje przejście stanu T w stan O połączone z usuwaniem ATP z centrum katalitycznego (ABRAHAMS i współaut. 1994).

#### MECHANIZM SPRZEŻENIA TRANSPORTU PROTONÓW Z REAKCJĄ KATALITYCZNĄ

Twórca teorii chemiosmotycznego sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji, Peter Mitchell, sugerował istnienie prostego, bezpośredniego transportu protonów przez kanał w błonie do miejsc katalitycznych enzymu (MITCHELL 1985). Jednakże badania prowadzone przez wiele zespołów badawczych wykluczyły taki mechanizm.

Znaczna odległość (100 Å), jaką musiałyby pokonywać protony oraz utrudnienie ich wiązania w „wąskim” przejściu przez łącznik między sektorami  $F_0$  i  $F_1$  implikują inny przebieg wydarzenia katalitycznego. Precyzyjne badania struktury peptydów  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  prowadzone intensywnie w ostatnich latach wskazują, że „komunikacja protonowa” między sektorami  $F_0$  i  $F_1$  polega na kaskadzie zmian konformacyjnych w tych peptydach wywołanych ich uprotonowaniem.

#### ZMIANY KONFORMACYJNE W PEPTYDZIE $\gamma$

Środkowy region peptydu  $\gamma$  utworzony przez  $\beta$ -skrety ( $\beta$  turns) i  $\beta$ -kartki ( $\beta$  sheets) jest przestrzennie izolowany od kompleksu  $\alpha_3\text{-}\beta_3$  (patrz ryc. 1). Potwierdzają to eksperymenty z zasto-

konformacyjne w peptydach (podjednostkach enzymu). W czasie kiedy nukleotyd zostaje usuwany, miejsce znajdujące się w stanie L z luźno związanym ADP i fosforanem przechodzi w stan T (katalityczny) — powstaje następna cząsteczka ATP. Napływające substraty (ADP i Pi) wchodzi do miejsca znajdujące się w stanie O, które przechodzi w stan L i cały cykl powtarza się na nowo. Zatem stanem wymagającym dostarczenia energii w procesie oksydacyjnej fosforylacji jest wiązanie substratów oraz usuwanie produktu reakcji katalitycznej.

Na rycinie 4 pokazano tylko jedną trzecią cyklu katalitycznego. Pełny cykl obejmowałby przejście wszystkich trzech miejsc wiązania nukleotydów przez stan T (katalityczny).

sowaniem proteazy oraz przeciwciał monoklonalnych. Region ten znajduje się w bliskim kontakcie z peptydem  $\epsilon$  tworząc z nim wiązania kowalencyjne (AGGELER i współaut. 1995). Peptyd  $\gamma$  bezspornie zajmuje kluczową pozycję w sprzężeniu procesu katalitycznego z transportem protonów. Wykazano (NAKAMOTO i FUTAI 1994), że mutacja w końcu N peptydu  $\gamma$  *Escherichia coli* powoduje rozprężenie hydrolizy ATP. Oznacza to, że podczas hydrolizy ATP protony nie są transportowane do periplazmy (odpowiednika cytosolu u eukariontów), a co za tym idzie nie jest budowany ich gradient oraz potencjał na błonie.

Z ryciny 1 wynika, że pozycja peptydu  $\gamma$  w kompleksie jest wyjątkowa. Ruch małego heliksu komunikującego się z peptydem  $\epsilon$  (patrz ryc. 2) oraz ruchy końców N i C  $\alpha$ -heliksów peptydu  $\gamma$  stanowią stadium krytyczne sprzężenia energetycznego w kompleksie  $F_0F_1$ .

Zespołowi badaczy kierowanemu przez Capaldi (CAPALDI i współaut. 1994), który zastosował do badań zmian konformacyjnych znaczniki fluorescencyjne oraz metodę krzyżowego wiązania izolowanych peptydów (np.  $\beta$  i  $\gamma$ )



udało się uzyskać bezpośredni dowód zachodzenia zmian strukturalnych w peptydzie  $\gamma$ . Wykazano, że kompleks peptydów  $\alpha_3\text{-}\beta_3\text{-}\gamma\text{-}\epsilon$  zmienia położenie zależnie od wiązanego w miejscu katalitycznym nukleotydu (ATP lub ADP) (TURINA i CAPALDI 1994). Wyniki opublikowane przez KOMATSU-TANAKI (1996) sugerują, że region peptydu  $\gamma$  w enzymie tylakoidów, zawierający lizynę 24 i 30, zmienia konformację w odpowiedzi na iluminację chloroplastów. Badacze zespołu Crossa (DUNCAN i współaut. 1995), uzyskali eksperymentalne potwierdzenie rotacji peptydu  $\gamma$  w rozpuszczalnej ATPazie  $F_1$  *Escherichia coli* w czasie, kiedy zachodziła reakcja katalityczna. Natomiast WALKER z zespołem (ABRAHAMS i współaut. 1994) wykazali rotację tego peptydu analizując strukturę kryształu enzymu serca wołu podczas wiązania różnych nukleotydów w centrum katalitycznym (patrz ryc. 2).

#### ZMIANY KONFORMACYJNE W PEPTYDZIE $\epsilon$

Zmiany konformacyjne w peptydzie  $\gamma$  wykazane wyżej wymienionymi metodami a także metodą mikroskopii krioelektronowej nie zachodzą po usunięciu z kompleksu peptydu  $\epsilon$ . Oznacza to, że peptyd  $\epsilon$  bierze udział w procesie sprzężenia i sugeruje, że peptydy  $\gamma$  i  $\epsilon$  współdziałają ze sobą (ZHANG i współaut. 1994).

Stosując metodę mikroskopii krioelektronowej wykazano, że podczas procesu sprzężenia zachodzą też zmiany konformacyjne w tym peptydzie. Badania te prowadzono pomysłowię i spektakularną metodą z zastosowaniem cząstek złota, dających się obserwować w mikroskopie (WILKENS i CAPALDI 1994). Do peptydu  $\epsilon$  mutanta *Escherichia coli* z cysteiną w pozycji 38 wprowadzono cząstkę złota o średnicy 14 Å w postaci komponenty monomaleimid-złoto. W

sytuacji kiedy w miejscu katalitycznym był związany ATP, cząstkę złota można było obserwować w mikroskopie w pobliżu peptydu  $\beta$ . W przypadku zaś wiązania ADP — w pobliżu peptydu  $\alpha$ . Długość drogi przesunięcia cząstki złota wynosiła 20 Å. Oznacza to, że w peptydzie  $\epsilon$  zachodzi zmiana powinowactwa wiązania z kompleksem  $\alpha_3\text{-}\beta_3$  zależna od wiązanego w miejscu katalitycznym nukleotydu. Zależne od wiązanego nukleotydu zmiany konformacyjne w peptydzie  $\epsilon$  obserwowano także podczas badań z zastosowaniem trawienia proteazą oraz wiązania krzyżowego z innymi peptydami kompleksu enzymatycznego.

#### ROLA PEPTYDU $\delta$

Obecnie stosunkowo niewiele wiadomo o roli peptydu  $\beta$  w procesie sprzężenia. Wydłużona cząsteczka tego peptydu ma wysoce helikalną konformację. Ułatwia to zapewne podtrzymywanie „konstrukcji” łącznika między sektorami  $F_1$  i  $F_0$ . Uważa się, że pełni on głównie funkcję strukturalną. Reakcje peptydu  $\delta$  z innymi peptydami kompleksu enzymatycznego nie są jasne. Ostatnio badacze z zespołu Walkera (ORRIS i współaut. 1996) obserwowali powstawanie dimeru z peptydów  $\delta$  i  $\epsilon$ . Wiadomo też, że cysteina 140 peptydu tworzy wiązanie disulfidowe z peptydem  $\alpha$ . Jednakże wiązanie to nie wpływa na własności enzymu (MENDEL-HARTVIG i CAPALDI 1991). Obserwowano także, że wymiana alaniny i glicyny w mutantach na asparaginę powoduje rozprzęganie procesu katalitycznego. Prawdopodobnie obszar końca C peptydu  $\delta$  reaguje z peptydem  $\alpha$  w sposób istotny dla procesu sprzężenia (HAZARD i SENIOR 1994 a, b).

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI ENZYMU PRZEZ NATURALNY INHIBITOR $IF_1$

Z kompleksem enzymatycznym ATPazy współpracuje mały peptyd ( $IF_1$ ) o masie cząsteczkowej 7–12 daltonów zbudowany z około 80 aminokwasów (PULLMAN i MONROY 1963, HASHIMOTO i współaut. 1990). Peptyd ten może wiązać się z enzymem hamując zarówno jego aktywność ATPazową, jak i syntezę ATP. Wiązanie  $IF_1$  z kompleksem enzymatycznym zachodzi na skutek obniżenia potencjału na błonie mitochondrialnej oraz podczas zakwaszenia cytosolu, a co za tym idzie matriks mitochondrialnej (LEBOWITZ i PEDERSEN 1996). Zakwaszenie matriks *in vivo* zachodzi na skutek wzmożenia aktywności glikolizy podczas ischemii lub niedotlenienia komórki. W takiej sytuacji hamowa-

nie ATPazy przez inhibitor ochrania zasoby ATP w komórce przed hydrolitycznym działaniem enzymu. Hamowanie ATPazy przez inhibitor jest odwracalne (ROUSLIN i BROGE 1989). Przywrócenie komórce normalnego fizjologicznego pH oraz odbudowa potencjału na błonie mitochondrialnej, jakie następują podczas energizacji mitochondriów, inicjują dysocjację  $IF_1$  z kompleksu enzymatycznego zapobiegając hamowaniu syntezy ATP (ROUSLIN 1991).

Peptyd  $IF_1$  wiąże się z kompleksem  $F_0F_1$  w stosunku liczbowym 1:1. Na tej podstawie wnioskuje się, że tylko jedno z trzech potencjalnych miejsc katalitycznych wiąże inhibitor. Analiza produktów krzyżowego wiązania  $IF_1$  z

enzymem z drożdży wykazała, że inhibitor wiąże się z peptydami  $\alpha$  i  $\beta$  (ICHICAWA i współaut. 1996). Prawdopodobnie działanie  $IF_1$  polega na blokowaniu usuwania produktów reakcji z centrum katalitycznego enzymu (blokowaniu przejścia ze stanu T w stan O — patrz ryc. 3). Na skutek tego produkty reakcji zostają niejako uwięzione w miejscu katalitycznym i pełny proces katalityczny nie może się rozwijać.

Pierwszorzędowa struktura peptydu  $IF_1$  jest bardzo podobna u wszystkich eukariontów. Nie występuje on u bakterii i w chloroplastach, u których jego rolę spełnia peptyd  $\epsilon$ .  $IF_1$  hamuje także pasywny transport protonów w kompleksie  $F_0F_1$  (GUERRIERI i współaut. 1987). Mechanizm tego hamowania jest obecnie przedmiotem badań zespołu kierowanego przez Papę (PAPA i współaut. 1996). JACKSON i HARRIS (1986) sugerowali, że helikalny fragment zawierający reszty aminokwasowe 22–79 jest krytycznym miejscem w peptydzie  $IF_1$  odpowiedzialnym za hamowanie enzymu. Pozycje 48, 49, 55, 56 aminokwasów w tym segmencie zajmuje histydyna a obecność jej w pozycji 49 czyni hamowanie enzymu zależnym od pH.

Niedawno badacze z zespołu Papy (PAPA i współaut. 1996) opublikowali wyniki badań z zastosowaniem dwóch zsyntetyzowanych chemicznie segmentów peptydu  $IF_1$  serca wołu.

Segment zawierający aminokwasy w pozycji 42–58 peptydu natywnego oraz segment  $IF_1$  22–46.  $IF_1$  42–58 zachowywał się jak natywny inhibitor — hamował aktywność enzymatyczną izolowanego kompleksu  $F_0F_1$ , aktywność enzymu zubożonych w inhibitor cząstek mitochondrialnych oraz rozpuszczalnej ATPazy  $F_1$ . Natomiast segment 22–46  $IF_1$  hamował tylko ATPazę  $F_1$  pozostając bez wpływu na aktywność ATPazy w kompleksie  $F_0F_1$  oraz na transport protonów w cząstkach submitochondrialnych. Oznacza to, że segment  $IF_1$  (22–46) reaguje w miejscu  $F_1$ , które w kompleksie jest zamaskowane. Hamowanie enzymu przez segment (42–58) jest zależne od pH, podobnie jak w przypadku natywnego inhibitora. Wymiana histydyny lub lizyny na alaninę w tym segmencie obniża aktywność inhibitora oraz osłabia jego zależność od pH. Oznacza to, że aktywność inhibitora zależy od stanu uprotonowania reszt polarnych aminokwasów w  $IF_1$ . Aktywność obu inhibitorów — natywnego i jego fragmentu (42–58) jest wyższa, kiedy reagują one z całym kompleksem  $F_0F_1$  w porównaniu z aktywnością reakcji z rozpuszczalną ATPazą  $F_1$ . Należy zatem przypuszczać, że oprócz reagowania z kompleksem  $F_1$  inhibitor reaguje także z kompleksem  $F_0$  oraz najprawdopodobniej z którymś z peptydów łącznika.

#### UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionych w niniejszym artykule wyników badań nad kompleksem enzymatycznym ATPazy  $F_0$ - $F_1$  można wnioskować, że decydującym stadium sprzężenia energetycznego w kompleksie enzymu jest przesunięcie pozycji peptydu  $\epsilon$  w stosunku do peptydu  $\gamma$  (zmiana konformacyjna). Dzięki zmianom pozycji peptydu  $\epsilon$  w enzymie, który ma kontakt bezpośredni z kanałem protonowym w błonie mitochondrialnej oraz pozycji peptydu  $\gamma$  (rotacji) kontaktującego się bezpośrednio z kompleksem  $\alpha_3$ - $\beta_3$  dokonują się zmiany konformacyjne w tym kompleksie. Dzięki tym zmianom miejsce wiązania nukleotydów może pełnić funkcję centrum katalitycznego enzymu.

Można przypuszczać, że ruchy peptydów  $\gamma$  i  $\epsilon$  podczas hydrolizy ATP (kiedy protony są transportowane w kierunku „od” centrum katalitycznego) ułatwiają protonowanie bocznych łańcuchów aminokwasowych w peptydzie  $c$ , co w konsekwencji powoduje zmiany w sektorze  $F_0$  enzymu ułatwiające translokację protonów przez błonę mitochondrialną do cytosolu komórki. Odwrotnie — translokacja protonów

przez kanał w sektorze  $F_0$  w czasie funkcjonowania łańcucha oddechowego podczas syntezy ATP (kiedy protony są transportowane w kierunku „do” centrum katalitycznego) może zmieniać reakcję peptydu  $\epsilon$  z peptydem  $c$  przez zmianę jonizacji bocznych łańcuchów aminokwasowych w tym peptydzie po stronie  $F_1$  błony mitochondrialnej. Przesunięcie w peptydzie  $\epsilon$  i zmiana konformacyjna w peptydzie  $\gamma$  powodująca jego rotację mogą zmieniać powinowactwo miejsc katalitycznych do wiązanych nukleotydów.

Nad aktywnością hydrolityczną enzymu sprawuje kontrolę naturalny inhibitor  $IF_1$ , który może wiązać się z kompleksem enzymatycznym lub z niego dysocjować w zależności od stanu energetycznego mitochondriów. Może zatem chronić komórkę przed wyczerpaniem zasobów energetycznych w niekorzystnych dla niej warunkach ischemii lub niedotlenienia. Po usunięciu zagrożenia wyczerpania komórkowych zasobów ATP dysocjując z kompleksu  $F_0F_1$  umożliwia enzymowi podjęcie syntezy ATP.



F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase — STRUCTURE AND FUNCTION

## Summary

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase catalyses both ATP-driven proton translocation and proton-gradient-driven ATP synthesis in mitochondria, bacteria and chloroplasts. It is the most complicated membrane-bound enzymic complex that so far was crystallised. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase consists of two distinct sectors: F<sub>1</sub> part is globular and linked by a narrow stalk domain to part F<sub>0</sub>. Part F<sub>1</sub> contains  $\alpha$ -,  $\beta$ - and part of  $\gamma$ -unit, a stalk

contains  $\gamma$ -,  $\delta$ - and  $\epsilon$ -subunits. Peptides  $\beta$  contain the catalytic site. There is an evidence that conformational and positional changes in  $\gamma$ - and  $\epsilon$ - subunits provide the coupling between catalytic sites and proton translocation. The enzyme is regulated by a natural inhibitor — a small peptide which is activated by matrix acidification and deenergization of mitochondria.

## LITERATURA

- ABRAHAMS J. P., LESLIE A. G. W., LUTTER R., WALKER J. E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628.
- AGGELER R., HAUGHTON M. A., CAPALDI R. A., 1995. Disulfide bond formation between COOH-terminal domain of the  $\beta$  subunits and the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 270, 9185–9191.
- AMZEL L. M., PEDERSEN P. L., 1983. Proton ATPases: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 801–824.
- BOYER P. D., 1989. A perspective of binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* 3, 2164–2178.
- CAPALDI R. A., AGGELER R., TURINA P., WILKENS S., 1994. Coupling between catalytic sites and proton channel in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type ATPases. *Trends Biochem. Sci.* 19, 284–289.
- COLLINSON I. R., SKEHEL J. M., FEARNLEY I. M., RUNSWICK M. J., WALKER J. E., 1969. The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase complex from bovine heart mitochondria. The molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> domains. *Biochemistry* 35, 12640–12646.
- DUNCAN M. T., BULYGIN V. V., ZHOU Y., HUTCHEON M. L., CROSS R. L., 1995. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10964–10968.
- FUTAI M., NOUMI T., MAEDA M., 1989. ATP synthase (H-ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 111–136.
- GUERRIERI F., ZANOTTI F., CHE Y. W., SCARFO R., PAPA S., 1987. Inactivation of the mitochondrial ATPase inhibitor protein by chemical modification with diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta* 892, 284–293.
- GIRVIN M. E., FILLINGAME R. H., 1995. Determination of local protein structure by spin label difference 2D NMR. The region neighboring Asp 61 subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> synthase. *Biochemistry* 34, 1635–1645.
- HASHIMOTO T., YOSHIDA Y., TAGAWA K., 1990. Regulatory proteins of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. Role of ATPase inhibitor. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22, 27–38.
- HAZARD A. L., SENIOR A. E., 1994a. Mutagenesis of subunit from *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 418–426a.
- HAZARD A. L., SENIOR A. E., 1994b. Defective energy coupling in  $\beta$ -subunit mutants of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 427–432 b.
- ICHICAWA N., YOSHIDA Y., HASHIMOTO T., TAGAWA K., 1996. An intrinsic ATPase inhibitor binds near the active site of yeast mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biochem.* 119, 193–199.
- JACKSON P. J., HARRIS D. A., 1986. Sites of protein-protein interaction on mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein. *Biochem. J.* 235, 577–583.
- KOMATSU-TANAKI M., 1996. Energizing effects of illumination on the reactivities of lysine residues of  $\gamma$  subunit of chloroplast synthase. *Eur. J. Biochem.* 236, 470–475.
- LEBOWITZ M. S., PEDERSEN P. L., 1993. Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence, overexpression and secondary structural characterization of a functional protein inhibitor. *Archiv. Biochem. Biophys.* 301, 64–70
- LEBOWITZ M. S., PEDERSEN P. L., 1996. Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: Relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. *Archiv. Biochem. Biophys.* 330, 342–354.
- MENDEL-HARTVIG J., CAPALDI R. A., 1991. Structure-function relationships of domain of the  $\gamma$  subunit in *Escherichia coli* adenosine triphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1060, 115–124.
- MITCHELL P., 1985. Molecular mechanics of protonmotive F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis. *FEBS Lett.* 182, 1–7.
- NAKAMOTO R. K., 1996. Mechanisms of active transport in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *J. Membrane Biol.* 151, 101–111.
- NAKAMOTO R. K., FUTAI M., 1994. Three segments of the *Escherichia coli* ATPsynthase  $\gamma$  subunit interact to mediate coupling. *Biophys. J.* 66, A 118, 2.
- NAKAMOTO R. K., MIKI J., MAEDA M., FUTAI M., 1990. Three segments of the *Escherichia coli* ATPsynthase  $\gamma$  subunit interact to mediate coupling. *Biophys. J.* 66, A 118.
- ORRIS G. L., RUNSWICK M. J., COLLINSON I. R., MIRROUX B., FEARNLEY I. M., SHEKEL J. M., WALKER J. M., 1996. The  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits of bovine F<sub>1</sub> ATPase interact to form a heterodimeric subcomplex. *Biochem. J.* 314, 695–700.
- PAPA S., ZANOTTI F., COCCO T., CANDITA C., MINUTO M., 1996. Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 240, 461–467.
- PEDERSEN P. L., AMZEL L. M., 1993. ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism and regulation one of nature most unique machines. *J. Biol. Chem.* 268, 9937–9940.
- PULLMAN M. E., MONROY G. C., 1963. A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235, 3322–3329.
- ROUSLIN W., 1991. Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: Role of the inhibitor subunit. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 873–888.
- ROUSLIN W., BROGE Ch. W., 1989. Factors affecting the reactivation of the mitochondrial adenosine 5-triphosphatase and release of ATPase inhibitor protein during and following the reenergization of mitochondria from ischemic cardiac muscle. *Archiv. Biochem. Biophys.* 275, 385–394.
- SENIOR A. E., 1988. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* 68, 171–231.
- SENIOR A. E., 1990. The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19, 7–41.
- SCHNIZER R. A., SCHUSTER, S. M., 1996. Mutations at histidine 211 of yeast F<sub>1</sub> ATPase b-subunit affect the stability and

- assembly of the ATPase and the structure of the active site. *Archiv. Biochem. Biophys.* 326, 126-136.
- TANG CH., CAPALDI R. A., 1995. Characterization of the interface between  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits of *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase. *J. Biol. Chem.* 271, 3018-3024.
- TOZAWA K., SEKINO N., SOGA M., YAGI H., YOSHIDA M., AKUTSU H. 1995. Conformational dynamics monitored by His-179 and His-200 of isolated thermophilic  $F_1$  ATPase  $\beta$  subunit which reside at the entrance of the „conical” tunnel in holoenzyme. *FEBS Lett.* 376, 190-194.
- TURINA P., CAPALDI R. A., 1994. ATP hydrolysis driven structural changes in  $\gamma$  subunit of *Escherichia coli* ATPase monitored by fluorescence from probes bound at introduced cysteine residues. *J. Biol. Chem.* 269, 13465-13471.
- WEBER J., BOWMAN C., WILKE-MOUNTS S., SENIOR A. E., 1995. Aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase. *J. Biol. Chem.* 270, 21045-21049.
- WILKENS S., CAPALDI R. A., 1994. Asymmetry and structural changes in  $ECF_1$  examined by cryoelectromicroscopy. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 375, 43-51.
- ZHANG Y., OLDENBURG M., FILLINGAME R. H., 1994. Suppressor mutations in  $F_1$  subunit c mutant of *Escherichia coli*  $F_1F_0$  ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 10221-10234.
- ZHOU Y., DUNCAN T. M., BULYGIN V. V., HUTCHEON M. L., CROSS R. L., 1966. ATP hydrolysis by membrane-bound *Escherichia coli*  $F_0F_1$  causes rotation of the  $\gamma$  subunit relative to the  $\beta$  subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 96-100.