**Budowa, biogeneza i mechanizm działania kompleksu mitochondrialnej syntazy ATP**

Monika Wysocka-Kapcińska, Róża Kucharczyk🖂

Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

🖂Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, email.: roza@ibb.waw.pl

**Słowa kluczowe**: mitochondria, syntaza ATP, biogeneza, mechanizm

**Podziękowania**:

Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego 1932/B/P01/2010/39 finansowanego ze środków przyznawanych przez Narodowe Centrum Nauki.

**Wykaz skrótów**: ADP (adenozyno-5’-dwufosforan), Arg - arginina, Asp – kwas asparaginowy, ATP (adenozyno-5’-trójfosforan), Glu – kwas glutaminowy, mtDNA – DNA mitochndrialne, Pi – fosforan nieorganiczny.

**STRESZCZENIE**

Mitochondria to organelle występujące u wszystkich organizmów eukariotycznych. Ich główną funkcją jest wytwarzanie energii w postaci ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Ostatni etap syntezy ATP katalizuje enzym wewnętrznej błony mitochondrialnej - syntaza ATP. Jest to kompleks złożony z co najmniej siedemnastu podjednostek (u drożdży, u kręgowców zidentyfikowano ich dotychczas szesnaście), tworzących część hydrofobową zagłębioną w błonie (nazwaną FO) i hydrofilową, skierowaną do macierzy mitochondrialnej (F1). Geny większości podjednostek znajdują się w genomie jądrowym, ale niektóre z nich, kodujące hydrofobowe podjednostki błonowe, u większości organizmów zachowane zostały w genomie mitochondrialnym. Biogeneza syntazy ATP jest procesem złożonym, wymaga bowiem udziału licznych białek niebędących podjednostkami enzymu, regulujących ekspresję genów syntazy oraz składanie podjednostek w dojrzały enzym. Niniejsze opracowanie stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy o budowie, biogenezie i mechanizmie działania kompleksu syntazy ATP.

**WPROWADZENIE**

Adenozyno-5-trifosforan (ATP) jest głównym nośnikiem energii w komórce. Organizm człowieka wytwarza od 5 do 75 kg ATP dziennie, podobną ilość zużywa w wymagających energii reakcjach syntezy, transportu przez błony czy skurczach mięśni. W warunkach tlenowych ATP syntetyzowane jest w procesie fosforylacji oksydacyjnej, w której ostatnią reakcję - syntezy ATP - przeprowadza enzym syntaza ATP (F1FO-syntaza ATP), zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, należący do rodziny F-pomp jonowych. Syntaza ATP znajduje się również w błonach tylakoidów wewnątrz chloroplastów oraz w błonach komórkowych organizmów prokariotycznych, gdzie również bierze udział w pozyskiwaniu energii na drodze fosforylacji oksydacyjnej (u bakterii oddychających tlenowo) lub fotosyntetycznej (u roślin i innych organizmów fototropicznych, w tym bakterii fotosyntetyzujących, u których ATP powstaje w fazie jasnej fotosyntezy) [[1-3](#_ENREF_1)]. Obok pomp jonowych typu F, w błonach otaczających organelle – wakuole, endosomy czy aparat Golgiego - występują pompy jonowe typu V, o podobnej strukturze i mechanizmie działania [[4](#_ENREF_4)]. Zgodnie z chemiosmotyczną hipotezą Petera Mitchella, syntaza ATP przekształca energię zawartą w elektrochemicznym gradiencie protonów, generowanym podczas przenoszenia elektronów przez kompleksy łańcucha oddechowego, w chemiczną energię komórkową – ATP [[5](#_ENREF_5)]. Reakcja katalizowana przez enzym przedstawia się następująco:

ADP + Pi ATP

Syntaza ATP funkcjonuje także w przeciwnym kierunku, kiedy spada potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. Przeprowadza wówczas reakcję hydrolizy ATP do ADP i fosforanu nieorganicznego, pompując jednocześnie protony do przestrzeni międzybłonowej.

**BUDOWA SYNTAZY ATP**

Syntaza ATP jest kompleksem złożonym z wielu podjednostek o masie powyżej 500 kDa. Najlepiej poznana jest struktura syntazy ATP wołu, której uzyskano kryształy poszczególnych domen [[6-10](#_ENREF_6)]. W budowie syntazy ATP wyróżnia się trzy odrębne części: domenę F1 wraz z ramieniem centralnym,domenę FO i ramię zewnętrzne (Ryc. 1). Domena F1, ma charakter hydrofilowy i skierowana jest do macierzy mitochondrialnej. Stanowią ją trzy podjednostki α i trzy podjednostki β, ułożone naprzemiennie tworząc heksamer, oraz podjednostki γ, δ, ε, tworzące ramię centralne enzymu (ang. *central stalk*). Podjednostka γ stanowi trzon enzymu i jednym końcem łączy się z centrum heksameru α3β3, a drugim z pierścieniem podjednostek *c* domeny FO. Połączenie pomiędzy ramieniem centralnym a domeną FO stanowią też podjednostki δ i ε. Miejsca katalityczne znajdują się w każdej z trzech podjednostek β, w punkcie styku pomiędzy podjednostkami α i β ułożonymi naprzemiennie wokół 2 α-helis podjednostki γ [[6](#_ENREF_6)]. FO jest hydrofobową domeną enzymu zlokalizowaną w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i stanowi kanał dla przepływających protonów. Tworzą ją podjednostki *c* (9), *a* (6), 8 (A6L), *b* (4) – N-końcowa domena błonowa, *e*, *f*, *g* oraz niedawno zidentyfikowana *k* [[11](#_ENREF_11)]. Spośród nich znana jest jedynie struktura podjednostki *c*, która tworzy pierścień podjednostek *c* w liczbie od 8 do 15, różnej u różnych organizmów. Na przykład u wołu i prawdopodobnie większości kręgowców wynosi 8 [[12](#_ENREF_12)], u drożdży [[6](#_ENREF_6)] i *E. coli* jest ich 10 [[13](#_ENREF_13)], 11 u *Ilyobactor tartaricus* [[14](#_ENREF_14), [15](#_ENREF_15)], *Propionigenium modestum* [[16](#_ENREF_16)] i *Clostridium paradpxum* [[17](#_ENREF_17)], 13 u *Bacillus* [[18](#_ENREF_18)], 14 w chloroplastach szpinaku [[19](#_ENREF_19)] i 15 u *Spirulina platensis* [[20](#_ENREF_20)]. Podjednostka *c* ma strukturę szpilki do włosów złożonej z dwu α-helis połączonych pętlą. Podjednostki *c* tworzą pierścień poprzez ułożenie się w błonie tak, że C-końcowe części helis wystają do przestrzeni a pętla - do macierzy mitochondrialnej. Uważa się, że pierścień podjednostek *c* wraz z podjednostką *a* tworzą kanał przepływu protonów. Struktura krystaliczna podjednostki *a* nie jest znana. W jej skład wchodzi 5 domen trans-błonowych, z których szczególne znaczenie dla przepływu protonów mają helisy 4 i 5 [[21-23](#_ENREF_21)]. Domena F1 połączona jest z błoną za pomocą podjednostek OSCP, *b* – C końcowa część, *d*, *F6* tworzących ramię zewnętrzne (ang. *peripheral stalk*) [[24](#_ENREF_24)]. N-końcowa część OSCP oddziałuje z N-końcową częścią podjednostki α, C-końcowa część OSCP oddziałuje z C-końcową helisą podjednostki *b* [[10](#_ENREF_10)]. Podjednostka *b* rozciąga się w kierunku błony wewnętrznej mitochondrium, a jej struktura jest usztywniona przez helisy podjednostek *d* i *F6*.

Struktura syntazy ATP jest silnie konserwowana w świecie żywym. Najprostsza forma enzymu, występująca u bakterii, zbudowana jest z ośmiu podjednostek: trzech podjednostek α i trzech β, γ, δ (odpowiadająca podjednostce OSCP u eukariontów), ε (odpowiadająca podjednostce δ u eukariontów), *a*, dwóch podjednostek *b* oraz pierścienia podjednostek *c* w liczbie od 10 do 15. Brak w jej ramieniu centralnym podjednostki ε, uważa się, że druga podjednostka *b* pełni funkcję podjednostek *d* i *F6*. Struktura syntazy ATP u drożdży *S. cerevisiae* jest również dobrze poznana. Różni się ona od syntazy ATP wołu liczbą podjednostek *c* oraz nazewnictwem podjednostek [[25](#_ENREF_25)].

### BIOGENEZA MITOCHONDRIALNEJ SYNTAZY ATP

Biogeneza syntazyATP jest to skomplikowany proces zależny od skoordynowanej ekspresji genomu jądrowego i mitochondrialnego. Kontrola procesu składania syntazy ATP jest niezbędna nie tylko z powodu kodowania podjednostek w obu genomach, ale przede wszystkim by zapobiec tworzeniu się niekontrolowanego kanału dla protonów, którego obecność prowadziłaby do destabilizacji potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej i w efekcie do śmierci komórki.

 GENY KODUJĄCE PODJEDNOSTKI ENZYMU

U bakterii *E. coli* geny kodujące pięć podjednostek domeny F1 i trzy podjednostki domeny FO są częścią jednego operonu *unc* [[26](#_ENREF_26), [27](#_ENREF_27)]. Ekspresja tego operonu regulowana jest przez promotor i terminator transkrypcji, a ilość podjednostek regulowana jest potranslacyjnie [[28-30](#_ENREF_28)]. W przeciwieństwie do bakteryjnej, mitochondrialna syntaza ATP jest kodowana przez dwa genomy – jądrowy i mitochondrialny. Wyjątkiem są np. zielone glony których podjednostki syntazy ATP kodowane są wyłącznie w genomie jądrowym [[31-33](#_ENREF_31)]. Geny, które kodują podjednostki wchodzące w skład F1 oraz ramienia zewnętrznego, występują zazwyczaj w genomie jądrowym, ale u roślin gen kodujący podjednostkę α występuje w mtDNA [[34](#_ENREF_34), [35](#_ENREF_35)]. Białka kodowane przez geny jądrowe syntetyzowane są w cytoplazmie, w postaci prekursora z sekwencją sygnałową, i stamtąd transportowane są do mitochondriów. Białka domeny FO kodowane są przez mtDNA. U roślin i u drożdży geny kodujące podjednostki 6, 8 i 9 kodowane są przez mtDNA, ale u innych grzybów i u ssaków gen *ATP9*, kodujący podjednostkę 9, wykazuje dużą różnorodność genetyczną. Wiele grzybów, jak np. drożdże, ma jeden gen *ATP9* w mtDNA. U *Neurospora crassa* i *Aspergillus nidulans* są dwie kopie genu *ATP9* – jedna w mitochondrialnym, a druga w jądrowym DNA [[36](#_ENREF_36), [37](#_ENREF_37)]. U *Podospora anserina* występują również dwie kopie tego genu – obie w jądrowym DNA [[38](#_ENREF_38)]. U ludzi podjednostka 9 kodowana jest w jądrze przez trzy izogeny P1, P2, P3, które różnią się jedynie sekwencją sygnałową kierującą je do mitochondriów [[39-41](#_ENREF_39)]. Geny kodujące podjednostki syntazy ATP są wysoce konserwowane od bakterii do kręgowców. Białko kodowane przez ludzki gen *hATP6* wykazuje 36% identyczności i 57% podobieństwa aminokwasowego z białkiem *S. cerevisiae* kodowanym przez gen *ATP6.* Gen *hATP9* koduje białko o 59% identyczności i 41% podobieństwa do białka drożdżowego.

 Geny kodowane w mitochondrialnym DNA ulegają kotranskrypcji z sąsiednimi genami. U drożdży pierwotny transkrypt z genem *ATP9*, zawierający też geny *tRNAser* i *VAR1*, ulega endonukleolitycznej obróbce, w wyniku której powstają trzy oddzielne transkrypty [[42](#_ENREF_42)]. Dojrzały transkrypt *ATP9* ma długość 900 pb, gdzie 630 pb od 5’ końca nie ulega translacji. Geny *ATP6* i *ATP8* są transkrybowane razem z genem *COX1* (Cytochrome c OXidase) [[43](#_ENREF_43)]. W trakcie obróbki fragment kodujący gen *COX1* jest odcinany od fragmentu kodującego geny *ATP6* i *ATP8* w dwóch miejscach, w wyniku czego powstaje mRNA genu *COX1* i mRNA kodujące oba geny *ATP6* i *ATP8*. Ze względu na dwa miejsca cięcia pierwotnego transkryptu, powstają dwa transkrypty mRNA genów *ATP6* i *ATP8* różniące się długością i występujące zwykle w podobnej ilości w mitochondriach [[44](#_ENREF_44)].

EKSPRESJA GENÓW KODUJACYCH PODJEDNOSTKI SYNTAZY ATP

Informacje dotyczące regulacji ekspresji genów syntazy ATP pochodzą z eksperymentów wykonanych na drożdżach *S. cerevisiae*. Geny jądrowe tego enzymu są eksprymowane konstytutywnie i nie podlegają regulacji w zależności od źródła węgla, w przeciwieństwie do genów podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego, które podlegają silnej represji, kiedy komórki drożdży hodowane są na glukozie [[45](#_ENREF_45)]. W warunkach wzrostu na glukozie zaobserwowano jedynie dwukrotne obniżenie aktywności hydrolitycznej syntazy ATP jako miary ilości kompleksów enzymu, co wskazuje na istotną rolę syntazy ATP w utrzymaniu potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, także w warunkach kiedy łańcuch oddechowy i cykl Krebsa są aktywne jedynie na podstawowym poziomie [[46](#_ENREF_46)]. Ekspresja mitochondrialnych genów syntazy ATP podlega regulacji przez produkty genów jądrowych.

**Białka niezbędne do ekspresji genu *ATP6***

Pięć jądrowych genów – *NCA2*, *NCA3*, *AEP3, NAM1, ATP22* - koduje białka mitochondrialne niezbędne do ekspresji mitochondrialnego transkryptu *ATP6/8*. Białka Nca2 i Nca3 biorą udział w obróbce pierwotnego transkryptu zawierającego *COX1, ATP6* i *ATP8*, ale również są niezbędne do translacji podjednostek 6 i 8 (w szczepach drożdży z mutacjami w genach *NCA2* i *NCA3* wykazano obniżoną translację białek Atp6 i Atp8) [[47](#_ENREF_47), [48](#_ENREF_48)]. Białko Aep3 potrzebne jest do obróbki pierwotnego mRNA *COX1,* *ATP6* i *ATP8*, które akumuluje się w mutancie *aep3*, oraz do stabilności dojrzałego mRNA [[49](#_ENREF_49)]. Na stabilność *ATP8/6* mRNA wpływa również białko Nam1 [[50](#_ENREF_50), [51](#_ENREF_51)]. Ekspresja genów *ATP6* i *ATP8* jest zależna od obecności rozpuszczalnej formy domeny F1 w macierzy mitochondrialnej, co wskazuje na ścisłą kontrolę ekspresji podjednostek kodowanych w mtDNA przez obecność domeny F1 [[52](#_ENREF_52)]. Translacja mRNA podjednostki 6 - ale nie 8 - jest zależna od funkcji białka Atp22, gdyż w mutantach *atp22* obserwuje się brak podjednostki 6 przy prawidłowej ilości podjednostek 8 i 9 [[53](#_ENREF_53), [54](#_ENREF_54)].

**Białka niezbędne do ekspresji genu *ATP9***

Kilka białek kontroluje stabilność monotranskryptu i ekspresję genu *ATP9*: Atp25, Aep1 i Aep2. C-końcowa część białka Atp25 stabilizuje mRNA genu *ATP9*, ale może też mieć znaczenie dla aktywacji translacji [[55](#_ENREF_55)]. Również białka Aep1 i Aep2 są niezbędne do prawidłowej transkrypcji i translacji mRNA *ATP9*. W mutantach *aep2* akumuluje się prekursor mRNA zawierający gen *ATP9* wraz z genem *tRNASer*, co wskazuje na udział tego białka w obróbce mRNA. W niektórych mutantach zaobserwowano brak syntezy podjednostki 9 pomimo obecności mRNA *ATP9*, co wskazuje na funkcje białka Aep2 także w procesie translacji *ATP9*. Białko Aep1 pełni funkcję w procesie translacji *ATP9*, ale wtórnym skutkiem zaburzenia translacji jest również niestabilność mRNA genu *ATP9* w mutantach *aep1* [[56-60](#_ENREF_56)].

CZYNNIKI ASYSTUJĄCE W PROCESIE SKŁADANIA KOMPLEKSU SYNTAZY ATP

**Białka potrzebne do składania domeny F1**

W składaniu domeny F1 u drożdży biorą udział trzy białka: Atp11, Atp12 i Fmc1. Geny *ATP11* i *ATP12* kodują białka mitochondrialne oddziałujące odpowiednio z podjednostkami α i β i promują składanie ich w heksamer. Gdy brak produktów genów *ATP11* i *ATP12*, białka α i β tworzą agregaty w macierzy mitochondrialnej, co sugeruje mechanizm kontrolny podczas składania enzymu, bowiem dla oligomeryzacji podjednostek α i β istotna jest ich rozpuszczalność [[61-63](#_ENREF_61)]. Mutacje w genie *FMC1* (Formation of Mitochondrial Complexes) również powodują agregację α i β w macierzy, ale tylko w podwyższonej temperaturze. Ten defekt znoszony jest przez nadekspresję genu *ATP12*. W oparciu o ten wynik zaproponowano, że białko Fmc1 jest potrzebne do prawidłowego składania białka Atp12 w podwyższonej temperaturze [[64](#_ENREF_64)].

**Białka potrzebne do składania domeny FO**

Białka potrzebne do dojrzewania prekursora podjednostki Atp6

Gen *ATP6*, pomimo jego lokalizacji w mtDNA, ma peptyd sygnalny – pierwszych 9 aminokwasów, których brak w dojrzałej podjednostce 6. Gen *ATP23* koduje metaloproteazę zlokalizowaną w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, która odcina pierwszych 9 aminokwasów białka Atp6 [[65-67](#_ENREF_65)]. W szczepie z delecją genu *ATP23* obserwuje się nie tylko niedojrzałą formę białka Atp6, ale również niefunkcjonalną syntazę ATP. W mutantach w domenie katalitycznej tej metaloproteazy obserwowano tylko defekt w dojrzewaniu Atp6, ale syntaza ATP była w pełni funkcjonalna. To sugeruje, że białko Atp23 oprócz obróbki podjednostki 6 pełni również inne funkcje ważne dla składania enzymu. Peptyd sygnałowy w białku Atp6 jest niezbędny do efektywnego oddziaływania podjednostki Atp6 z podjednostką Atp9. Brak peptydu sygnałowego w białku Atp6 powodował akumulację w mitochondriach subkompleksu Atp6/Atp8, prawdopodobnie przeznaczonego do degradacji [[68](#_ENREF_68)]. Peptyd sygnalny służy więc do interakcji pomiędzy podjednostkami Atp6 i Atp9 lub do integracji białka Atp6 w odpowiednim miejscu wewnętrznej błony mitochondrialnej w celu efektywnego oddziaływania z pierścieniem Atp9.

Składanie pierścienia Atp9

Dotychczasowe dane literaturowe wskazują na spontaniczne tworzenie się pierścienia Atp9, ale białko Atp25 asystuje temu procesowi: C-końcowa część tego białka wpływa na stabilność mRNA genu *ATP9*, a N-końcowa ma znaczenie dla oligomeryzacji pierścienia [[55](#_ENREF_55)].

Czynniki potrzebne do składania podjednostki 6 z pierścieniem Atp9.

Trzy białka odgrywają wspomagającą rolę w interakcji białka Atp6 z pierścieniem Atp9: Atp10, Atp23 i Oxa1. Białko Atp10 jest potrzebne do oddziaływania podjednostki 6 z pierścieniem Atp9 na etapie potranslacyjnym, ale nie odgrywa roli w tworzeniu pierścienia [[69](#_ENREF_69), [70](#_ENREF_70)]. Składanie domeny FO zależy również od białek: Atp23 (opisanego wyżej) i Oxa1 (*OXA1* - *cytochrome OXidase Activity*). Funkcje białek Atp10 i Atp23 częściowo się pokrywają, o czym świadczy fakt, że składanie syntazy ATP jest zaburzone na tym samym etapie w mutantach *atp10* i *atp23*. W mutantach *atp10* zaobserwowano zmniejszoną efektywność obróbki propeptydu białka Atp6, fenotyp częściowo znoszony przez obecność dzikiej kopii genu *ATP23* [[71](#_ENREF_71)]. Białko Oxa1 jest translokazą niezbędną do lokalizacji białek mitochondrialnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [[72](#_ENREF_72)]. Mutanty *oxa1* mają pierścień Atp9 zintegrowany z domeną F1, ale ten subkompleks nie jest zdolny do integracji z białkiem Atp6. Pokazano, że Oxa1 oddziałuje z pierścieniem Atp9, zanim ten zostanie złożony z resztą enzymu. Wyniki te sugerują, że oddziaływanie subkompleksu Atp9/F1 z Oxa1 umożliwia dalsze oddziaływanie z podjednostką Atp6 w sposób zależny od Atp10 i Atp23 [[73](#_ENREF_73)].

**Modele składania syntazy ATP**

Kontrola procesu składania syntazy ATP jest niezbędna, by zapobiec tworzeniu się niekontrolowanego kanału przepływu protonów, którego obecność prowadziłaby do destabilizacji potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej i do śmierci komórki. Jest to proces niezwykle złożony, wymagający prawidłowego rozpoznania i integracji podjednostek, jak również aktywności wyżej opisanych białek wspierających etapy ekspresji podjednostek oraz koordynacji tych etapów ze składaniem kompleksu. Defekty funkcji tego enzymu spowodowane są więc nie tylko mutacjami w genach strukturalnych, ale także w genach kodujących czynniki wspomagające, działających na etapach transkrypcji, translacji, modyfikacji potranslacyjnych lub podczas składania enzymu.

Obecnie istnieją dwa modele proponujące kolejność składania podjednostek syntazy ATP w aktywny enzym. Uważa się, że syntetyzowane w macierzy białka Atp9 oligomeryzują tworząc pierścień, do którego dołączana jest domena F1 (Ryc. 2A). Do tego subkompleksu dołączana jest podjednostka Atp8, a potem ramię zewnętrzne enzymu. Na końcu składana jest podjednostka Atp6, co zabezpiecza przed tworzeniem się niekontrolowanego przez F1 kanału protonów i w konsekwencji niestabilności potencjału przez wewnętrzną błonę mitochondrialną [[74](#_ENREF_74), [75](#_ENREF_75)]. Ostatnio zespół profesora Tzagoloffa zaproponował inny model składania syntazy ATP, oparty na eksperymentach, w których znakowano produkty translacji białek mitochondrialnych i rozdzielano subkompleksy na żelach niedenaturujących (Ryc. 2B) [[76](#_ENREF_76)]. Autorzy zaproponowali istnienie dwóch niezależnych ścieżek składania prekursorów syntazy ATP. Według nich pierścień Atp9 i domena F1 składane są jako niezależne subkompleksy i tworzą subkompleks F1/Atp9, niezależny od kompleksu Atp6/Atp8. Subkompleks Atp6/Atp8/ramię zewnętrzne jest następnie dołączany do subkompleksu F1/Atp9 i powstaje kompletny enzym. Autorzy nie wykluczają możliwości, że ramię zewnętrzne jest również niezależnym modułem oddziałującym z już utworzonym dimerem białek Atp6/Atp8.

### MECHANIZM DZIAŁANIA SYNTAZY ATP

MECHANIZM SYNTEZY/HYDROLIZY ATP

Syntaza ATP działa jak motor rotacyjny. W czasie syntezy ATP enzym wykorzystuje elektrochemiczny gradient protonów poprzek błony wewnętrznej, który jest siłą napędową rotacji rotora. W skład rotora wchodzą ramię centralne domeny F1 oraz pierścień podjednostek *c* domeny FO enzymu [[77](#_ENREF_77)]. W czasie syntezy rotor obraca się zgodnie z ruchem wskazówek zegara (widok od strony przestrzeni międzybłonowej) [[78](#_ENREF_78)]. W wyniku rotacji asymetria ramienia centralnego, w szczególności rotacja podjednostki γ, wymusza zmiany konformacyjne w miejscach katalitycznych w podjednostce β [[8](#_ENREF_8), [79](#_ENREF_79), [80](#_ENREF_80)]. W trakcie syntezy każda podjednostka β przechodzi kolejno cztery stany konformacyjne (Ryc. 3):

* ΒHC – konformacja „w połowie zamknięta” (ang. *half-closed*), o średnim powinowactwie do nukleotydów - wiąże najpierw Pi potem ADP­,
* βDP - zajęta przez związane ADP i Pi oraz­ βTP – zajęta przez ATP – konformacje „zamknięte” (ang. *closed*), aktywne w katalizie
* βE – konformacja „pusta” (ang. *empty*), o niskim powinowactwie do nukleotydów – w tej konformacji następuje uwolnienie ATP.

Struktura występujących naprzemiennie podjednostek α i β jest niezmiernie ważna dla właściwego kontaktu pomiędzy miejscami katalitycznymi i ich zmian konformacyjnych. Zaproponowana przez Boyera, uhonorowana nagrodą Nobla w 1997 roku, powyższa hipoteza (ang. *binding change mechanism, rotational catalysis*) zakłada również, że do syntezy jednej cząsteczki ATP, a więc do przejścia danego miejsca katalitycznego przez wszystkie 4 konformacje niezbędny jest obrót podjednostki γ o 120º [[81](#_ENREF_81), [82](#_ENREF_82)]. Synteza ATP może funkcjonować jako pompa protonowa, wykorzystując energię uwolnioną podczas hydrolizy ATP. Rotor obraca się wówczas w kierunku odwrotnym do wskazówek zegara (widok od strony przestrzeni błonowej), a protony są pompowane z macierzy do przestrzeni błonowej, co prowadzi do podnoszenia potencjału na błonie wewnętrznej mitochondrium. Jest to funkcja pozwalająca na utrzymanie potencjału błony wewnętrznej, bardzo ważna dla organizmów potrafiących zaadaptować się do warunków beztlenowych – np. bakterii i grzybów. Model syntezy i hydrolizy ATP związany z występowaniem miejsc katalitycznych w różnych konformacjach został przedstawiony na rycinie 3 [[81](#_ENREF_81)].

DZIAŁANIE KANAŁU PRZEPŁYWU PROTONÓW

Kanał przepływu protonów usytuowany jest pomiędzy pierścieniem podjednostek *c* a podjednostką *a*. Aminokwasy kluczowe w transporcie protonów u *Escherichia coli*, na której wykonano badania kanału, to arginina w pozycji 210 (Arg210) podjednostki *a* (Arg186 u drożdży) i kwas asparaginowy w pozycji 61 (Asp61) podjednostki *c* (Glu59 u drożdży), zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie (Ryc. 4AB) [[83-88](#_ENREF_83)]*.* Uważa się, że rotacja pierścienia jest indukowana przez protonację i deprotonację kwasu asparaginowego w pozycji 61 [[89](#_ENREF_89)]. W podjednostce *a* wyróżnia się dwa pół-kanały – jeden, periplazmatyczny, umożliwiający dostęp protonów z przestrzeni periplazmatycznej do Asp61 podjednostki *c*, a drugi, cytozolowy, pozwalający na ich ewakuację z drugiej strony membrany [[90-93](#_ENREF_90)]. Aminokwasy o charakterze hydrofilowym w podjednostce *a* zaangażowane w transport protonów znajdują się w helisie II, IV i V tego białka, w którym kanał periplazmatyczny umiejscowiony jest pomiędzy tymi helisami, a kanał cytozolowy pomiędzy helisą IV i V a podjednostką *c*. Nie jest znany mechanizm transportu protonów, zwłaszcza, że nie jest znana struktura podjednostki *a*. Proponowane modele tego mechanizmu bazują na analizie topologicznej oraz eksperymentach wykonanych na enzymie bakteryjnym.

Wg modelu Vic i Antonio, zaproponowanego w 1994 roku, rotacja pierścienia podjednostek *c* zależy od oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy aminokwasami *a*-Arg210 i *c*-Asp61 [[90](#_ENREF_90)]. Oddziaływanie protonu pochodzącego z przestrzeni periplazmatycznej z Asp61 przerywa jego oddziaływanie z Arg210. Jednocześnie z Asp61 sąsiedniej podjednostki *c* uwalniany jest proton po stronie cytozolu. Wolny od protonu Asp61 oddziałuje z Arg210, co powoduje rotację pierścienia.

Inny model zaproponowali w 1999 roku Rastogi i Girvin w oparciu o analizę NMR, która pokazała, że podjednostka *c* ma różne konformacje w zależności od tego, czy jest związana z protonem (pH 5) czy też nie (pH 8) [[91](#_ENREF_91), [94](#_ENREF_94)]. Według autorów obrotowi pierścienia towarzyszy rotacja helisy TMH2 podjednostki *c* wokół własnej osi, zależnie od stanu protonacji: w stanie związanym z protonem Asp61 jest zlokalizowany wewnątrz pierścienia (konformacja w pH=5), podczas gdy w stanie niezwiązanym z protonem – wyeksponowany na zewnątrz (konformacja w pH=8). Związanie protonu przez Asp61 powoduje rotację helisy TMH2 o 140° wskutek czego Asp61-H+ plasuje się wewnątrz pierścienia podjednostek *c*. Towarzyszy temu rotacja pierścienia o jedną podjednostkę *c*. Z sąsiedniej podjednostki *c*, która po obrocie pierścienia znalazła się w pobliżu *a*-Arg210, następuje uwolnienie protonu po stronie cytozolowej, co powoduje rotację helisy TMH2 o 140° - przyjmuje ona wtedy konformację w pH=8, dzięki czemu możliwe jest wiązanie kolejnego protonu do Asp61.

Model ten został zmodyfikowany w 2002 roku przez Fillingame [[86](#_ENREF_86), [87](#_ENREF_87)]. Według autorów bliskość *a*-Arg210 wpływa na stałą dysocjacji H+ od grupy COOH *c*-Asp61, wskutek czego zmienia się położenie tych aminokwasów względem siebie w trakcie transportu H+. Rotacjom THM2 podjednostki *c* towarzyszą rotacje helis THM4 i THM5 podjednostki *a*. W pierwszym etapie helisa *c*-THM2 obraca się o 140°, co prowadzi do umiejscowienia *c*-Asp61-H+ w pobliżu *a*-Arg210. W tym położeniu stała dysocjacji (pKa) grupy COOH kwasu asparaginowego jest obniżona, co sprzyja odłączeniu protonu po stronie cytoplazmatycznej. Następnie helisy *a*-TMH4 i *a*-TMH5 rotują się względem siebie, co powoduje oddalenie *a*-Arg210 od *c*-Asp61, wzrost pKa i wiązanie protonu do Asp61. W trakcie rotacji pierścienia o jedną podjednostkę *c* helisy *c*-THM2, *a*-TMH4 i *a*-TMH5 wracają do pozycji wyjściowej, a jednocześnie z nimi rotuje się THM2 sąsiedniej podjednostki *c*, która znalazła się po obrocie w pobliżu *a*-Arg210, i następuje uwolnienie jej protonu (Ryc. 4b). Niezależnie od modelu transport protonów przez błonę i rotacja pierścienia są bezpośrednio związane ze sobą. Rotacja ta prowadzi do syntezy ATP przez domenę F1.

W wielkim skrócie mechanizm syntezy ATP można podzielić na dwa etapy:

* przepływ protonów przez kanał protonowy utworzony przez podjednostki 6 i 9 domeny FO
* zmiany konformacyjne w F1 spowodowane obrotem pierścienia Atp9ppodczas przepływu protonów i synteza ATP w miejscach katalitycznych podjednostek β domeny F1.

W wyniku każdej rotacji rotoru o 360º powstają i zostają uwolnione trzy cząsteczki ATP. Liczba protonów przypadających na każdy obrót pierścienia o 360º jest taka samajak liczba podjednostek *c* (pod warunkiem, że każda podjednostka *c* zostanie zaangażowana w protonację i deprotonację). W drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* znajduje się 10 podjednostek *c*, więc koszt energetyczny wynosi 3,3 protony na jedną cząsteczkę ATP. Enzym wołu (i ludzki najprawdopodobniej również) ma 8 kopii białka *c* w pierścieniu, więc syntezie jednej cząsteczki ATP towarzyszy transport 2,7 protonów. Rotor obraca w przybliżeniu 100 razy na sekundę, co skutkuje utworzeniem 300 cząsteczek ATP w ciągu 1 sekundy [[12](#_ENREF_12)].

**PODSUMOWANIE – KIERUNKI DALSZYCH BADAŃ**

Syntaza ATP jest wciąż obiektem zainteresowań naukowców. Nie znany jest zarówno mechanizm transportu protonów, jak również regulacja ekspresji genów kodujących podjednostki enzymu u organizmów eukariotycznych, zwłaszcza tych kodowanych w organellarnym DNA, oraz proces składania kompleksu. Syntaza ATP to bardzo ważny enzym w komórkach, nie tylko z powodu jego funkcji, ale również dlatego, że defekty jego funkcjonowania powodujących choroby mitochondrialne [[25](#_ENREF_25), [95-98](#_ENREF_95)]. Dokładne poznanie regulacji funkcji syntazy ATP może przyczynić się do rozwoju terapii tych obecnie nieuleczalnych chorób.

**PIŚMIENNICTWO**

1. Velours J, Arselin G (2000) The Saccharomyces cerevisiae ATP synthase. J Bioenerg Biomembr32: 383-90.

2. Sambongi Y, Ueda I, Wada Y, Futai M (2000) A biological molecular motor, proton-translocating ATP synthase: multidisciplinary approach for a unique membrane enzyme. J Bioenerg Biomembr32: 441-8.

3. Wilkens S (2000) F1F0-ATP synthase-stalking mind and imagination. J Bioenerg Biomembr32: 333-9.

4. Beyenbach KW, Wieczorek H (2006) The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J Exp Biol209: 577-89.

5. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature191: 144-8.

6. Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science286: 1700-5.

7. Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2000) The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 A resolution. Nat Struct Biol7: 1055-61.

8. Menz RI, Walker JE, Leslie AG (2001) Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. Cell106: 331-41.

9. Dickson VK, Silvester JA, Fearnley IM, Leslie AG, Walker JE (2006) On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. EMBO J25: 2911-8.

10. Rees DM, Leslie AG, Walker JE (2009) The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. Proc Natl Acad Sci U S A106: 21597-601.

11. Meyer B, Wittig I, Trifilieff E, Karas M, Schagger H (2007) Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. Mol Cell Proteomics6: 1690-9.

12. Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A107: 16823-7.

13. Jiang W, Hermolin J, Fillingame RH (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10. Proc Natl Acad Sci U S A98: 4966-71.

14. Meier T, Polzer P, Diederichs K, Welte W, Dimroth P (2005) Structure of the rotor ring of F-Type Na+-ATPase from Ilyobacter tartaricus. Science308: 659-62.

15. Stahlberg H, Muller DJ, Suda K, Fotiadis D, Engel A, Meier T, Matthey U, Dimroth P (2001) Bacterial Na(+)-ATP synthase has an undecameric rotor. EMBO Rep2: 229-33.

16. Meier T, Matthey U, von Ballmoos C, Vonck J, Krug von Nidda T, Kuhlbrandt W, Dimroth P (2003) Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases. J Mol Biol325: 389-97.

17. Meier T, Ferguson SA, Cook GM, Dimroth P, Vonck J (2006) Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from Clostridium paradoxum. J Bacteriol188: 7759-64.

18. Meier T, Morgner N, Matthies D, Pogoryelov D, Keis S, Cook GM, Dimroth P, Brutschy B (2007) A tridecameric c ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase from the thermoalkaliphilic Bacillus sp. strain TA2.A1 facilitates ATP synthesis at low electrochemical proton potential. Mol Microbiol65: 1181-92.

19. Seelert H, Poetsch A, Dencher NA, Engel A, Stahlberg H, Muller DJ (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. Nature405: 418-9.

20. Pogoryelov D, Yu J, Meier T, Vonck J, Dimroth P, Muller DJ (2005) The c15 ring of the Spirulina platensis F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory. EMBO Rep6: 1040-4.

21. Long JC, Wang S, Vik SB (1998) Membrane topology of subunit a of the F1F0 ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. J Biol Chem273: 16235-40.

22. Valiyaveetil FI, Fillingame RH (1998) Transmembrane topography of subunit a in the Escherichia coli F1F0 ATP synthase. J Biol Chem273: 16241-7.

23. Wada T, Long JC, Zhang D, Vik SB (1999) A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase. J Biol Chem274: 17353-7.

24. Collinson IR, van Raaij MJ, Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM, Orriss GL, Miroux B, Walker JE (1994) ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F1-ATPase and in its absence. J Mol Biol242: 408-21.

25. Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, Caubet SD, di Rago JP (2009) Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. Biochim Biophys Acta1793: 186-99.

26. Downie JA, Gibson F, Cox GB (1979) Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells. Annu Rev Biochem48: 103-31.

27. Kanazawa H, Tamura F, Mabuchi K, Miki T, Futai M (1980) Organization of unc gene cluster of Escherichia coli coding for proton-translocating ATPase of oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A77: 7005-9.

28. Pati S, DiSilvestre D, Brusilow WS (1992) Regulation of the Escherichia coli uncH gene by mRNA secondary structure and translational coupling. Mol Microbiol6: 3559-66.

29. Matten SR, Schneider TD, Ringquist S, Brusilow WS (1998) Identification of an intragenic ribosome binding site that affects expression of the uncB gene of the Escherichia coli proton-translocating ATPase (unc) operon. J Bacteriol180: 3940-5.

30. Schneppe B, Deckers-Hebestreit G, McCarthy JE, Altendorf K (1991) Translation of the first gene of the Escherichia coli unc operon. Selection of the start codon and control of initiation efficiency. J Biol Chem266: 21090-8.

31. Gray MW, Boer PH (1988) Organization and expression of algal (Chlamydomonas reinhardtii) mitochondrial DNA. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci319: 135-47.

32. Denovan-Wright EM, Nedelcu AM, Lee RW (1998) Complete sequence of the mitochondrial DNA of Chlamydomonas eugametos. Plant Mol Biol36: 285-95.

33. Kroymann J, Zetsche K (1998) The mitochondrial genome of Chlorogonium elongatum inferred from the complete sequence. J Mol Evol47: 431-40.

34. Braun CJ, Levings CS (1985) Nucleotide Sequence of the F(1)-ATPase alpha Subunit Gene from Maize Mitochondria. Plant Physiol79: 571-7.

35. Boutry M, Briquet M, Goffeau A (1983) The alpha subunit of a plant mitochondrial F1-ATPase is translated in mitochondria. J Biol Chem258: 8524-6.

36. Juhasz A, Pfeiffer I, Keszthelyi A, Kucsera J, Vagvolgyi C, Hamari Z (2008) Comparative analysis of the complete mitochondrial genomes of Aspergillus niger mtDNA type 1a and Aspergillus tubingensis mtDNA type 2b. FEMS Microbiol Lett281: 51-7.

37. Viebrock A, Perz A, Sebald W (1982) The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from Neurospora crassa. Molecular cloning and sequencing of the mRNA. EMBO J1: 565-71.

38. Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, Da Silva C, Jaillon O, Porcel BM, Couloux A, Aury JM, Segurens B, Poulain J, Anthouard V, Grossetete S, Khalili H, Coppin E, Dequard-Chablat M, Picard M, Contamine V, Arnaise S, Bourdais A, Berteaux-Lecellier V, Gautheret D, de Vries RP, Battaglia E, Coutinho PM, Danchin EG, Henrissat B, Khoury RE, Sainsard-Chanet A, Boivin A, Pinan-Lucarre B, Sellem CH, Debuchy R, Wincker P, Weissenbach J, Silar P (2008) The genome sequence of the model ascomycete fungus Podospora anserina. Genome Biol9: R77.

39. Dyer MR, Walker JE (1993) Sequences of members of the human gene family for the c subunit of mitochondrial ATP synthase. Biochem J293 ( Pt 1): 51-64.

40. Yan WL, Lerner TJ, Haines JL, Gusella JF (1994) Sequence analysis and mapping of a novel human mitochondrial ATP synthase subunit 9 cDNA (ATP5G3). Genomics24: 375-7.

41. Higuti T, Kawamura Y, Kuroiwa K, Miyazaki S, Tsujita H (1993) Molecular cloning and sequence of two cDNAs for human subunit c of H(+)-ATP synthase in mitochondria. Biochim Biophys Acta1173: 87-90.

42. Christianson T, Rabinowitz M (1983) Identification of multiple transcriptional initiation sites on the yeast mitochondrial genome by in vitro capping with guanylyltransferase. J Biol Chem258: 14025-33.

43. Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett440: 325-31.

44. Simon M, Faye G (1984) Organization and processing of the mitochondrial oxi3/oli2 multigenic transcript in yeast. Mol Gen Genet196: 266-74.

45. Forsburg SL, Guarente L (1989) Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Annu Rev Cell Biol5: 153-80.

46. Tzagoloff A, Meagher P (1971) Assembly of the mitochondrial membrane system. V. Properties of a dispersed preparation of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase of yeast mitochondria. J Biol Chem246: 7328-36.

47. Pelissier P, Camougrand N, Velours G, Guerin M (1995) NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of S. cerevisiae. Curr Genet27: 409-16.

48. Camougrand N, Pelissier P, Velours G, Guerin M (1995) NCA2, a second nuclear gene required for the control of mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of ATP synthase in Saccharomyces cerevisiae. J Mol Biol247: 588-96.

49. Ellis TP, Helfenbein KG, Tzagoloff A, Dieckmann CL (2004) Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H+-translocating ATP synthase of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem279: 15728-33.

50. Asher EB, Groudinsky O, Dujardin G, Altamura N, Kermorgant M, Slonimski PP (1989) Novel class of nuclear genes involved in both mRNA splicing and protein synthesis in Saccharomyces cerevisiae mitochondria. Mol Gen Genet215: 517-28.

51. Groudinsky O, Bousquet I, Wallis MG, Slonimski PP, Dujardin G (1993) The NAM1/MTF2 nuclear gene product is selectively required for the stability and/or processing of mitochondrial transcripts of the atp6 and of the mosaic, cox1 and cytb genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol Gen Genet240: 419-27.

52. Rak M, Tzagoloff A (2009) F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. Proc Natl Acad Sci U S A106: 18509-14.

53. Helfenbein KG, Ellis TP, Dieckmann CL, Tzagoloff A (2003) ATP22, a nuclear gene required for expression of the F0 sector of mitochondrial ATPase in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem278: 19751-6.

54. Zeng X, Hourset A, Tzagoloff A (2007) The Saccharomyces cerevisiae ATP22 gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor. Genetics175: 55-63.

55. Zeng X, Barros MH, Shulman T, Tzagoloff A (2008) ATP25, a new nuclear gene of Saccharomyces cerevisiae required for expression and assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATPase. Mol Biol Cell19: 1366-77.

56. Ackerman SH, Gatti DL, Gellefors P, Douglas MG, Tzagoloff A (1991) ATP13, a nuclear gene of Saccharomyces cerevisiae essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. FEBS Lett278: 234-8.

57. Payne MJ, Schweizer E, Lukins HB (1991) Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial oli1 gene of Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet19: 343-51.

58. Finnegan PM, Ellis TP, Nagley P, Lukins HB (1995) The mature AEP2 gene product of Saccharomyces cerevisiae, required for the expression of subunit 9 of ATP synthase, is a 58 kDa mitochondrial protein. FEBS Lett368: 505-8.

59. Payne MJ, Finnegan PM, Smooker PM, Lukins HB (1993) Characterization of a second nuclear gene, AEP1, required for expression of the mitochondrial OLI1 gene in Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet24: 126-35.

60. Ziaja K, Michaelis G, Lisowsky T (1993) Nuclear control of the messenger RNA expression for mitochondrial ATPase subunit 9 in a new yeast mutant. J Mol Biol229: 909-16.

61. Ackerman SH, Tzagoloff A (1990) Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F1-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A87: 4986-90.

62. Wang ZG, Ackerman SH (1996) Identification of functional domains in Atp11p. Protein required for assembly of the mitochondrial F1-ATPase in yeast. J Biol Chem271: 4887-94.

63. Wang ZG, Ackerman SH (1998) Mutational studies with Atp12p, a protein required for assembly of the mitochondrial F1-ATPase in yeast. Identification of domains important for Atp12p function and oligomerization. J Biol Chem273: 2993-3002.

64. Lefebvre-Legendre L, Vaillier J, Benabdelhak H, Velours J, Slonimski PP, di Rago JP (2001) Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F(1)-ATPase in heat stress conditions. J Biol Chem276: 6789-96.

65. Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T (2007) Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. Mol Biol Cell18: 627-35.

66. Jongeneel CV, Bouvier J, Bairoch A (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. FEBS Lett242: 211-4.

67. Becker AB, Roth RA (1992) An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. Proc Natl Acad Sci U S A89: 3835-9.

68. Zeng X, Kucharczyk R, di Rago JP, Tzagoloff A (2007) The leader peptide of yeast Atp6p is required for efficient interaction with the Atp9p ring of the mitochondrial ATPase. J Biol Chem282: 36167-76.

69. Tzagoloff A, Barrientos A, Neupert W, Herrmann JM (2004) Atp10p assists assembly of Atp6p into the F0 unit of the yeast mitochondrial ATPase. J Biol Chem279: 19775-80.

70. Paul MF, Barrientos A, Tzagoloff A (2000) A single amino acid change in subunit 6 of the yeast mitochondrial ATPase suppresses a null mutation in ATP10. J Biol Chem275: 29238-43.

71. Zeng X, Neupert W, Tzagoloff A (2007) The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. Mol Biol Cell18: 617-26.

72. Altamura N, Capitanio N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G (1996) The Saccharomyces cerevisiae OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. FEBS Lett382: 111-5.

73. Jia L, Dienhart MK, Stuart RA (2007) Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex. Mol Biol Cell18: 1897-908.

74. Hadikusumo RG, Meltzer S, Choo WM, Jean-Francois MJ, Linnane AW, Marzuki S (1988) The definition of mitochondrial H+ ATPase assembly defects in mit- mutants of Saccharomyces cerevisiae with a monoclonal antibody to the enzyme complex as an assembly probe. Biochim Biophys Acta933: 212-22.

75. Rak M, Tetaud E, Godard F, Sagot I, Salin B, Duvezin-Caubet S, Slonimski PP, Rytka J, di Rago JP (2007) Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. J Biol Chem282: 10853-64.

76. Rak M, Gokova S, Tzagoloff A (2011) Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. EMBO J30: 920-30.

77. Boyer PD (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. Annu Rev Biochem66: 717-49.

78. Diez M, Zimmermann B, Borsch M, Konig M, Schweinberger E, Steigmiller S, Reuter R, Felekyan S, Kudryavtsev V, Seidel CA, Graber P (2004) Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F0F1-ATP synthase. Nat Struct Mol Biol11: 135-41.

79. Boyer PD (1993) The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. Biochim Biophys Acta1140: 215-50.

80. Boyer PD (2000) Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. Biochim Biophys Acta1458: 252-62.

81. Wada Y, Sambongi Y, Futai M (2000) Biological nano motor, ATP synthase F(o)F(1): from catalysis to gammaepsilonc(10-12) subunit assembly rotation. Biochim Biophys Acta1459: 499-505.

82. Gao YQ, Yang W, Karplus M (2005) A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase. Cell123: 195-205.

83. Valiyaveetil FI, Fillingame RH (1997) On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the Escherichia coli F0F1-ATP synthase. J Biol Chem272: 32635-41.

84. Fillingame RH (1997) Coupling H+ transport and ATP synthesis in F1F0-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. J Exp Biol200: 217-24.

85. Cain BD (2000) Mutagenic analysis of the F0 stator subunits. J Bioenerg Biomembr32: 365-71.

86. Fillingame RH, Angevine CM, Dmitriev OY (2002) Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. Biochim Biophys Acta1555: 29-36.

87. Fillingame RH, Dmitriev OY (2002) Structural model of the transmembrane Fo rotary sector of H+-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking in situ. Biochim Biophys Acta1565: 232-45.

88. Jiang W, Fillingame RH (1998) Interacting helical faces of subunits a and c in the F1Fo ATP synthase of Escherichia coli defined by disulfide cross-linking. Proc Natl Acad Sci U S A95: 6607-12.

89. Fillingame RH, Angevine CM, Dmitriev OY (2003) Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. FEBS Lett555: 29-34.

90. Vik SB, Antonio BJ (1994) A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. J Biol Chem269: 30364-9.

91. Rastogi VK, Girvin ME (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. Nature402: 263-8.

92. Angevine CM, Herold KA, Fillingame RH (2003) Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane. Proc Natl Acad Sci U S A100: 13179-83.

93. Angevine CM, Herold KA, Vincent OD, Fillingame RH (2007) Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5. J Biol Chem282: 9001-7.

94. Rastogi VK, Girvin ME (1999) 1H, 13C, and 15N assignments and secondary structure of the high pH form of subunit c of the F1F0 ATP synthase. J Biomol NMR13: 91-2.

95. Wojewoda M, Duszynski J, Szczepanowska J (2011) NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation. Int J Biochem Cell Biol43: 1178-86.

96. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. J Inherit Metab Dis35: 211-25.

97. Schon EA, Santra S, Pallotti F, Girvin ME (2001) Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. Semin Cell Dev Biol12: 441-8.

98. Houstek J, Pickova A, Vojtiskova A, Mracek T, Pecina P, Jesina P (2006) Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. Biochim Biophys Acta1757: 1400-5.

**TYTUŁY I OBJAŚNIENIA RYCIN**

**Rycina 1.** Schemat budowy mitochondrialnej syntazy ATP.Domenę F1 stanowią - 3 podjednostki α, 3 podjednostki β, podjednostkiγ, δ i ε; domena FO to podjednostki: 6 (*a*), 9 (*c*), 4 (*b*) – N-końcowa domena błonowa, 8, f, g, k; ramię zewnętrzne to podjednostki: OSCP, 4 (*b*) – C-końcowa część białka, d, F6. I – IV – kompleksy łańcucha oddechowego od I do IV; PM – przestrzeń międzybłonowa; BW – błona wewnętrzna; M – macierz mitochondrialna. Rycina wykonana według [[12](#_ENREF_12)].

**Rycina 2.** Modele składania drożdżowej syntazy ATP.A. Model sekwencyjnego przyłączania się do pierścienia podjednostek 9 kolejno: domeny F1 z ramieniem zewnętrznym, podjednostki 8 i na końcu podjednostki 6. B. Model dwutorowego procesu składania syntazy ATP, gdzie część FOF1 i podjednostki 6 i 8 tworzą równolegle subkompleksy, które w ostatnim etapie składane są wraz z ramieniem zewnętrznym w kompletny enzym. Rycina wykonana w oparciu o publikacje [[25](#_ENREF_25), [76](#_ENREF_76)].

**Rycina 3.** Schemat syntezy i hydrolizy ATP związany z występowaniem miejsc katalitycznych w różnych konformacjach. W domenie F1 trzy podjednostki β występują każda w innej konformacji i stanie (E1). Rotacja podjednostki γ w centrum domeny F1 powoduje zmiany konformacyjne w obrębie podjednostki β, które umożliwiają syntezę ATP. Rycina pokazuje zmiany konformacji jakie mają miejsce w trakcie rotacji podjednostki γ o 120°. A. Synteza ATP. Obrót o 30° powoduje zmianę miejsca βE na βHC, które wiąże substraty ADP i Pi (E2). Kolejny obrót o 90°C transformuje miejsce βHC w βDP (E1). W trakcie kolejnej rotacji o 120° miejsce βDP przechodzi w konformację βTP, która powoduje kondensację ADP i Pi. Trzecia rotacja o 120° prowadzi do transformacji βTP w βE i następuje uwolnienie ATP. W trakcie pełnego obrotu podjednostki γ, z każdej podjednostki β uwalniana jest jedna cząsteczka ATP.

B. W trakcie hydrolizy ATP podjednostki β zmieniają konformacje odwrotnie niż podczas syntezy ATP.

**Rycina 4.** Schemat przedstawiający kanał przepływu protonów przez półkanały utworzone przez podjednostki *a* i *c* syntazy ATP. A.Kanał protonowy tworzą pierścień podjednostek *c* (lub Atp9) i podjednostka *a* (Atp6) oddziałująca z pierścieniem, usytuowana po jego zewnętrznej stronie. Prezentowany model oparty jest na badaniach podjednostek *a* i *c* w *E. coli*. Kolor niebieski – pierścień podjednostek *c*; kolor zielony – podjednostka *a*, czerwona linia – droga wskazująca przepływ protonów, P – przestrzeń periplazmatyczna, C – cytoplazma. B. Model rotacji helis podjednostek *a* i *c*, które towarzyszą transportowi protonów, zaproponowany przez Fillingame i wsp. 2002. Etap 1: wszystkie podjednostki *c* pierścienia są uprotonowane, helisa THM2 centralnej podjednostki *c* obraca się, co zbliża aminokwasy katalityczne do siebie. Etap 2: *a*-Arg210 obniża pKa *c*-Asp61, co powoduje uwolnienie H+ po stronie cytozolowej. Etap 3: helisy *a*-TMH4 i *a*-TMH5 obracają się, wskutek tego *a*-Arg210 oddala się od *c*-Asp61, co eksponuje *c*-Asp61 wolny od H+. Etap 4: proton H+ pochodzący z przestrzeni periplazmatycznej wiąże się do *c*-Asp61. Etap 5: jednoczesny obrót czterech helis i powrót do stanu wyjściowego oraz obrót pierścienia o jedną podjednostkę *c*. Na rycinie zaznaczono kolorem położenie fragmentów helis *c*-THM2 i *a*-THM4, które oddziałują ze sobą fizycznie w eksperymentach *cross-linking*.

**Structure, biogenesis and mechanism of function of the mitochondrial ATP synthase complex.**

Monika Wysocka-Kapcińska, Róża Kucharczyk🖂

Department of Genetics, Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences Warsaw

🖂 Department of Genetics, Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, 5A Pawińskiego Str, 02-106 Warsaw, email.: roza@ibb.waw.pl

**Key words**: mitochondria, ATP synthase, biogenesis, mechanism

ABSTRACT

Mitochondria are organelles present in all eukaryotic organisms. Their primary function is production of energy in the form of ATP by oxidative phosphorylation. The final step of this process is catalyzed by an enzyme of internal mitochondrial membrane - ATP synthase. The ATP synthase consists of the seventeen subunits (in yeast, in vertebrate sixteen is identified to date) organized in hydrophobic, membrane localized unit, referred to as FO, andhydrophilic domain F1 directed into mitochondria matrix. Genes encoding the ATP synthase subunits are mainly nuclear, but few of them, encoding hydrophobic subunits, are retained in mitochondrial genome in most Eukaryotes. Biogenesis of the ATP synthase is a sophisticated process, depending on the activity of proteins, which are not ATP synthase subunits, coordinating expression of the nuclear and mitochondrial genes and their assembly in active complex. This review summarizes the present knowledge about structure, biogenesis and mechanism of ATP synthase complex function.

**Rycina 1.**

****

**Rycina 2.**

****

**Rycina 3.**

****

**Rycina 4A.**

****

**Rycina 4B.**

****