

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Dieu Hien Ho**

Nové komponenty a funkce mitochondriální ATP syntázy  
New components and functions of the mitochondrial ATP synthase

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Mgr. Petr Pecina, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 05. 2015

Podpis

## **Poděkování**

Moje díky patří především mému školiteli Mgr. Petru Pecinovi, Ph.D. za trpělivost, čas a cenné rady, se kterými mi pomáhal napsat tuto práci. Chtěla bych poděkovat i celému oddělení bioenergetiky, ve kterém je radost věnovat se vědě; jejich ochota odpovídat mi na všelijaké dotazy a opora při pronikání do tajů výzkumu je nedocenitelná. Děkuji Šimonovi Rozsívalovi za pomoc s editací obrázků a formátováním a Vítovi Hejnému za pomoc s překladem. A nakonec bych chtěla poděkovat svému blízkému okolí za jejich podporu a pevnou víru v to, co dělám, protože i podle nich to má smysl.

**ABSTRAKT:**

System oxidativní fosforylace neboli dýchací řetězec v mitochondrii dodává eukaryotické buňce naprostou většinu energie, kterou buňka využívá, ve formě ATP. Enzym  $F_1F_0$ -ATPáza, poháněn proton-motivní silou, je za syntézu ATP přímo zodpovědný. Nemoci spojené s ATP syntázou mohou proto mít až letální následky. O potřebě mít detailně zmapovanou strukturu tohoto enzymu tudíž není pochyb. Zbývá ještě odhalit strukturu transmembránových proteinů  $F_0$  domény, které se sice nepodílejí na samotné syntéze, mohou ale mít např. stabilizační úlohu či funkci asemblačního faktoru. Mimo syntázovou aktivitu se dimery  $F_1F_0$ -ATPázy patrně podílí na formování krist vnitřní membrány mitochondrie. V poslední době je také zvažována role enzymu při tvorbě mitochondriálního póru přechodné permeability.

**Klíčová slova:** mitochondrie,  $F_1F_0$ -ATP syntáza, DAPIT, MLQ, MPTP, dimerizace, kristy

**ABSTRACT:**

The system of oxidative phosphorylation, or respiratory chain in mitochondria gives the eukaryotic cell total majority of the energy it receives and uses in the form of ATP.  $F_1F_0$ -ATP synthase, powered by the proton-motive force is directly responsible for the ATP synthesis. Diseases connected to the ATP synthesis can have even lethal consequences. There is therefore no doubt about the need for a detailed analysis of the structure of this enzyme. What is left is to reveal the structure of the transmembrane domains, which are not involved in the synthesis itself, but they can for example work as stabilisers or assembly factors. Outside the synthesis activity the dimers of  $F_1F_0$ -ATP synthase are apparently taking part in the formation of the cristae of the inner membrane of a mitochondrion. Recently, the role of the enzyme is also considered in the creation of the mitochondrial permeability transition pore.

**Key words:** mitochondria,  $F_1F_0$ -ATP synthase, DAPIT, MLQ, MPTP, dimerization, cristae

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. ATP syntázy.....	2
2.1 Mitochondriální $F_1F_o$ -ATPáza v dýchacím řetězci.....	2
2.1.1 Struktura mitochondriální $F_1F_o$ -ATP syntázy.....	5
2.1.1.1 $F_1$ doména.....	6
2.1.1.2 $F_o$ doména.....	8
2.1.1.3 Asemblace podjednotek $F_1F_o$ -ATP syntázy.....	10
2.1.2 Funkce $F_1F_o$ -ATP syntázy.....	12
2.1.2.1 Rotační mechanismus ATP syntázy.....	13
2.1.2.2 Syntéza ATP.....	15
3. Nové komponenty a funkce ATP syntázy.....	16
3.1 DAPIT a 6,8 kDa protein.....	16
3.1.1 Funkce obou proteinů.....	19
3.2 Dimerizace ATP syntázy, formování krist v mitochondrii.....	20
3.3 Mitochondriální pór přechodné propustnosti.....	23
4. Závěr.....	25
5. Reference.....	26

## Seznam zkratek

Å	Ångström – jednotka délky (1 Å = 0,1 nm)
A-ATPáza	archeální ATP syntáza
ADP	adenosin difosfát
AGP	označení pro DAPIT dle prvních aminokyselin v sekvenci
AMP	adenosin monofosfát
ANT	přenašeč adeninových nukleotidů ( <i>adenine nucleotides transporter</i> )
ATP	adenosin trifosfát
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
COX	cytochrom c oxidáza
Cyt	cytochrom
Da	Dalton - jednotka relativní molekulové hmotnosti (1 Da = 1,660 538 921(73)×10 <sup>-27</sup> kg)
DAPIT	protein asociovaný s diabetem ve tkáních regulovaných inzulinem ( <i>diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
e <sup>-</sup>	elektron
F-ATPáza	mitochondriální ATP syntáza
FAD	flavin adenin nukleotid
FMN	flavin mononukleotid
Fe-S centra	železosírná centra
FMC1	formování mitochondriálních komplexů 1 ( <i>formation of mitochondrial complexes</i> )
FMN	flavin mononukleotid
GLUT	glukózový přenašeč ( <i>glucose transporter</i> )
H <sup>+</sup>	proton, vodíkový kation
Hsp60p, Hsp70p	chaperony, „proteiny teplotního šoku“ ( <i>heat shock proteins</i> )
IF <sub>1</sub>	inhibitor F <sub>1</sub> domény ATP syntázy

KD	knockdown
mM	milimolární ( $10^{-3}$ mol/dm <sup>3</sup> )
MMC	mitochondriální megakanál ( <i>mitochondrial megachannel</i> )
MLQ	označení pro 6,8 kDa protein dle prvních aminokyselin v sekvenci
MPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti ( <i>mitochondrial permeability transition pore</i> )
mRNA	mediátorová RNA ( <i>messenger RNA</i> )
mt	mitochondriální
mtDNA	mitochondriální DNA
MTP	mitochondriální targetovací presekvence ( <i>mitochondrial targeting presequence</i> )
NADH/NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná/oxidovaná forma)
OSCP	protein zodpovědný za citlivost vůči oligomycinu ( <i>oligomycin sensitivity conferral protein</i> )
P <sub>i</sub>	anorganický fosfát
QH <sub>2</sub> / ·Q <sup>-</sup>	ubichinol/ semichinonový radikál
ROS	kyslíkové radikály ( <i>reactive oxygen species</i> )
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )
shRNA	vlásenková RNA ( <i>short hairpin RNA</i> )
STZ	streptozotocin
Tim11	translokáza vnitřní mitochondriální membrány ( <i>translocase of inner mitochondrial membrane</i> )
TMEM70	transmembránový protein 70 ( <i>transmembrane protein 70</i> )
Usmg5	zvýšená exprese během růstu kosterních svalů ( <i>up-regulated during the skeletal muscle growth</i> )
UQ, Q, CoQ	ubichinon, koenzym Q
V-ATPáza	vakuolární ATP syntáza
VDAC	napětově závislý aniontový kanál ( <i>voltage-dependent anion channel</i> )
Δp	proton-motivní síla

# 1. Úvod

Organismy od rostlin po člověka jsou závislé na energii ve formě ATP, které je buňkami získáváno především prostřednictvím systému oxidativní fosforylace. Nachází se na plasmatické membráně dýchajících či fotosyntetizujících bakterií, tylakoidních membránách chloroplastů a na vnitřní membráně mitochondrií. Protonový gradient vybudovaný prvními čtyřmi komplexy elektron transportního řetězce využívá k vlastní syntéze ATP enzym  $F_1F_o$ -ATP syntáza.

První poznatky o její struktuře byly získány už v roce 1960, kdy rakouský biochemik Efraim Racker a jeho skupina z bovinního srdce poprvé izolovali a purifikovali první enzym účastnící se dýchacího řetězce, kterou pojmenovali Faktor 1 nebo  $F_1$  ATPáza (Pullman et al. 1960). O šest let později se Rackerovi a Yasuovi Kagawovi podařilo identifikovat membránovou část kotvící  $F_1$  ATPázu a tu nazvali  $F_1$ -vázající faktor  $F_o$ . Index „o“ značí citlivost  $F_o$  vůči inhibitoru oligomycinu (Kagawa & Racker 1966).

Jiným významným milníkem v historii ATP syntázy byla chemiosmotická teorie Petera Mitchella postulovaná v roce 1961 (Mitchell 2011) a blíže popsána dále v textu. Získal za ni v roce 1978 Nobelovu cenu, ale trvalo dlouho, než byla teorie přijata širší odbornou veřejností, do té doby se věřilo, že zdrojem energie pro transport elektronů v dýchacím řetězci je nějaký stabilní intermediát s vysokým energetickým potenciálem.

Průkopníkem v detailním výzkumu struktury ATP syntázy je sir John E. Walker. Podařilo se mu (a jeho vědeckému týmu) vizualizovat většinu částí enzymu pomocí rentgenové krystalografie. Spolu s Paulem Boyerem, který objasnil mechanismus syntézy ATP, získali Nobelovu cenu v roce 1997.

Cílem této práce byla snaha shrnout dosavadní poznatky a výsledky výzkumu o struktuře ATP syntázy a jejich možných funkcích mimo samotnou syntézu ATP.



## 2. ATP syntázy

ATP syntázy (také F-ATPázy) jsou velmi konzervovanými proteiny – jsou integrovány do energií přenášejících membrán bakterií, mitochondrií a chloroplastů (Walker 1998). Jejich konzervovanost vyplývá z endosymbiotické hypotézy, která předpokládá, že mitochondrie - stejně jako chloroplasty - byly původně samostatně žijící jednobuněčné organismy pohlcené jinými jednobuněčnými heterotrofními organismy, které se díky tomuto mohly přizpůsobit zvýšené koncentraci kyslíku v atmosféře. Tímto daly vzniknout eukaryotickým buňkám (Sagan 1967).

Jsou příbuzné vakuolárním ATPázám (V-ATPázy), ty se nacházejí na membránách různých organel eukaryotických buněk, kde fungují jako ATP-dependentní protonové pumpy; na rozdíl od F-ATPáz budují protonový gradient. (Nelson et al. 2000) Se strukturálně podobnými ATPázami (A-ATPázy) operují i Archaea. (Denda et al. 1989)

### 2.1 Mitochondriální $F_1F_o$ -ATPáza v dýchacím řetězci

Mitochondriální ATP syntáza neboli  $F_1F_o$ -ATPáza (někdy také označována jako komplex V) je pátým a klíčovým multiproteinovým komplexem v mitochondriálním respiračním řetězci (také elektron transportní řetězec). Molekula ATP je majoritním zdrojem energie pro fungování buňky; naprostá většina je syntetizována právě  $F_1F_o$ -ATPázou.

Dýchací řetězec se nachází na vnitřní mitochondriální membrány. Kromě pěti multimerních enzymových komplexů I až V ho tvoří i dva mobilní přenašeče cytochrom c (cyt c) a koenzym Q (CoQ) neboli ubichinon (UQ, Q). Elektron transportní řetězec je zodpovědný za tzv. oxidativní fosforylaci, ze které pochází většina energie v eukaryotických buňkách. Oxidativní fosforylaci se rozumí dva spřažené procesy – respirace a syntéza ATP (Fernández-Vizarra et al. 2009). Respirace probíhá jako přenos elektronů pocházejících z oxidace redukčních ekvivalentů NADH a  $FADH_2$  z matrix

mitochondrie přes redoxní centra v řetězci, kdy nakonec dojde k redukci kyslíku na vodu. Oxidacemi se uvolňuje množství volné energie, která je následně využita k pumpování protonů ( $H^+$ ) z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie. Buduje se takto protonový gradient potřebný k samotné syntéze ATP.

Komplex I - NADH dehydrogenáza (také NADH-UQ oxidoreduktáza) je největším a nejsložitějším enzymem řetězce. Skládá se ze 45 podjednotek o celkové molekulové hmotnosti ~980 kDa. Svým tvarem připomíná písmeno L – jedno rameno se nachází v membráně (hydrofobní část), hydrofilní rameno vyčnívá směrem do matrix. Jedná se o velmi konzervovaný enzym; prokaryotický komplex I má velmi podobnou strukturu se 14 podjednotkami (o molekulové hmotnosti ~550 kDa), jejichž analogy v savčí NADH dehydrogenáze tvoří katalytické jádro enzymu. Mitochondriální genom potom kóduje 7 z těchto konzervovaných podjednotek, ostatní jsou kódovány jaderným genomem (shrnují Baradaran et al. 2013; Carroll et al. 2006; Sazanov 2014). Komplex I reverzibilně katalyzuje přenos elektronů ( $e^-$ ) z  $NADH^+$  z matrix mitochondrie přes svá redoxní centra (flavin mononukleotid – FMN, 7 železosirných (Fe-S) center) na ubichinon. Přenos  $2e^-$  je spřažen s pumpováním  $4H^+$  z matrix do mezimembránového prostoru. (Galkin et al. 2006)

Druhým enzymem je sukcinát dehydrogenáza – komplex II (také sukcinát-CoQ oxidoreduktáza). Se 4 podjednotkami (124 kDa (Sun et al. 2005)) se jedná o nejmenší komplex elektron transportního řetězce. Také je to jediný enzym v řetězci, kde geny pro jeho podjednotky nese pouze jaderná DNA. Na rozdíl od komplexů I, III a IV nepumpuje  $H^+$ , je ale klíčovým enzymem v Krebsově cyklu, kde oxiduje sukcinát na fumarát pomocí pevně vázaného redukčního kofaktoru FAD ve své solubilní části (sukcinát dehydrogenázová aktivita komplexu II). Elektrony získané z této oxidace jsou transportovány přes tři Fe-S klastry a hemovou skupinu *b* ke kapsám vázajícím ubichinon v membránové části enzymu. Tam ve dvou krocích redukuje koenzym Q na semichinonový radikál  $\cdot Q$  (stabilizovaný jednou z kapes) a pak na ubichinol (sukcinát-CoQ oxidoreduktázová aktivita komplexu). (shrnují Hägerhäll 1997; Sun et al. 2005; Yankovskaya et al. 2003; Rutter et al. 2010)

Mobilní lipofilní ubichinoly z komplexů I a II přenesou elektrony na komplex III (cyt  $bc_1$  komplex, CoQ-cyt  $c$  oxidoreduktáza). Mitochondriální komplex III je homodimer; každý z monomerů má 11 podjednotek o molekulové hmotnosti ~240 kDa. Podjednotka cyt  $b$  je jako jediná kódována mtDNA. V katalytickém centru enzymu se nacházejí cyt  $b$  s redoxními hemy  $b_L$  a  $b_H$ , Rieskeho protein (2Fe-2S klastr) a cyt  $c_1$  obsahující hem  $c_1$  (Iwata 1998). V cyt  $bc_1$  komplexu se uplatňuje tzv. Q-cyklus, původně vyslovená hypotéza P. Mitchellem, později modifikována dalšími vědci. Redukovaný  $QH_2$  se naváže na jeden z cyt  $b$ ; na části enzymu blíže mt matrix je navázán oxidovaný Q. Z  $QH_2$  se uvolní dva  $e^-$  – jeden  $e^-$  putuje přes Rieskeho protein na hem  $c_1$ , kde je vně vnitřní mt membrány redukován mobilní cyt  $c$  – ten dále pokračuje na komplex IV. Druhý  $e^-$  se přes hemy  $b_L$  a  $b_H$  dostane až k Q, který redukuje – vzniká  $^{\bullet}Q$ . Cyklus se poté opakuje, je redukován další cyt  $c$ , dále je redukován i  $^{\bullet}Q$  na Q. Během transportu  $2e^-$  jsou z matrix přepumpovány  $4H^+$ . Molekulární podstata Q-cyklu ještě stále není úplně rozluštěna (shrnují Meunier et al. 2013; Fernández-Vizarra et al. 2009).

Cytochrom  $c$  oxidáza (tzv. COX, komplex IV) je čtvrtým enzymem dýchacího řetězce a terminálním příjemcem elektronů, které použije na redukci  $O_2$  na  $H_2O$ . Homodimer COX tvoří dva monomery, každý se 13 podjednotkami o molekulové hmotnosti 204 kDa (celý enzym má tedy 408 kDa). Tři z jeho podjednotek (I, II a III) formují katalytické jádro enzymu a zároveň mají svůj původ v mtDNA. Redoxními skupinami jsou zde v podjednotce I hemy  $a, a_3$  a  $Cu_B$ , v podjednotce II se nachází skupina  $Cu_A$  (Tsukihara et al. 1996). Dva redukováné cyt  $c$  odevzdají postupně dva  $e^-$  binukleárnímu centru dvou molekul mědi –  $Cu_A$ , elektrony jsou pak dopraveny přes hemy  $a$  a  $a_3$  na třetí molekulu  $Cu_B$ . Tam jsou v tzv. kanálu K z matrix dopraveny  $2H^+$  pro redukci  $\frac{1}{2}O_2$  na  $1H_2O$ . Současně je s tímto procesem spřaženo pumpování dalších  $2H^+$  tzv. kanálem D do mezimembránového prostoru. Na celkovou redukci  $1O_2$

je třeba  $4e^-$  a  $4H^+$  za vzniku  $2H_2O$  a transportu dalších  $4H^+$  přes membránu (shrnují Nicholls & Ferguson 2013a; Fernández-Vizarra et al. 2009).

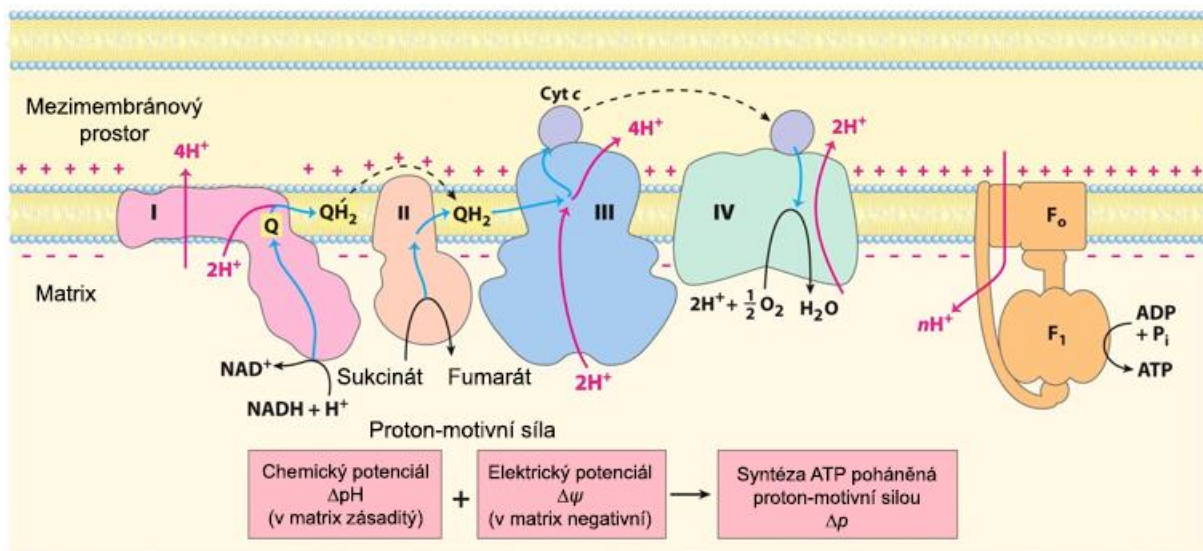


Figure 19-19  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

**Obrázek 1 | Schéma elektron-transportního řetězce na vnitřní membráně mitochondrie** (převzato z Nelson et al. 2013, upraveno)

Enzymy dýchacího řetězce se *in vivo* seskupují do supramolekulárních struktur - tzv. superkomplexů (Schägger & Pfeiffer 2000). Sdružují se protony pumpující komplexy I, III a IV. Ačkoliv supramolekulární uspořádání není esenciální pro katalytickou činnost enzymů, analýzy metabolické kontroly prokázaly kinetickou výhodu superkomplexů a pravděpodobnou přítomnost substrátového channelingu mezi jejich jednotlivými enzymovými komponenty (Blanchi et al. 2004). Další funkcí superkomplexů je i omezení tvorby kyslíkových radikálů v respiračním řetězci (Lenaz et al. 2010).

### 2.1.1 Struktura mitochondriální F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy

F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntáza se nachází na vnitřní mitochondriální membráně. 16 různých podjednotek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$ ,  $g$ , A6L, F<sub>6</sub>, OSCP a IF1 – viz obr. 2) o celkové molekulové hmotnosti ~600 kDa tvoří dohromady dva hlavní subkomplexy – hydrofobní doménu F<sub>o</sub> a solubilní F<sub>1</sub> doménu, která zasahuje do matrix mitochondrie. Domény spojuje tzv. periferní stonek (neboli stator) vázající se k podjednotce  $a$  F<sub>o</sub>

domény a k  $\alpha_3\beta_3$  subkomplexu  $F_1$  domény (toto tvoří statickou část enzymu).  $F_0$  doména je spojena s  $\alpha_3\beta_3$  subkomplexem také pomocí tzv. centrálního stonku, který se v  $F_0$  doméně váže na rotor  $c$ .

Jediné dva proteiny – ATP6 (neboli podjednotka  $a$ ) a ATP8 (neboli podjednotka A6L u savců, Aap1 u *Saccharomyces cerevisiae*) jsou produktem mitochondriální DNA, geny pro ostatní podjednotky nese jaderný genom. (Fearnley & Walker 1986)

### 2.1.1.1 $F_1$ doména

$F_1$  doména má katalytickou funkci – syntetizuje se zde ATP z ADP a  $P_i$  (poslední krok v oxidativní fosforylaci). Skládá se z pěti globulárních proteinů  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (centrální stonky),  $\delta$  a  $\epsilon$  ve stechiometrii  $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ . (Walker et al. 1985; Esch & Allison 1979; Senior & Brooks 1971). Primární strukturu podjednotky  $\alpha$  tvoří 510 aminokyselin, u  $\beta$  je to 482 aminokyselin, u podjednotky  $\gamma$  272,  $\delta$  146 a  $\epsilon$  50 aminokyselin (Abrahams et al. 1994).  $F_1$  část má molekulovou hmotnost ~350 kDa (Walker 2012).

Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  tvoří statickou část  $F_1$  domény. Jsou střídavě uspořádány vedle sebe kolem  $\alpha$ -helixu centrálního stonku tvořeného C-terminálními aminokyselinami  $\gamma$  podjednotky. Oligomer připomíná svým tvarem paličku šestidílného česneku (Abrahams et al. 1994; Gibbons et al. 2000). Hexamer  $\alpha_3\beta_3$  měří v průměru 100 Å.  $\alpha$  a  $\beta$  jsou homologními proteiny (přibližně ze 22 % mají identické sekvence (Walker et al. 1982)) - obě podjednotky obsahují  $\beta$ -barely složených z 6  $\beta$ -listů na svém N-konci, středovou doménu s vazebným místem pro nukleotidy tvořenou  $\alpha$ -helixy i  $\beta$ -vláknky a C-koncový svazek se 7  $\alpha$ -helixy v  $\alpha$ -podjednotce a 6  $\alpha$ -helixy v případě  $\beta$ -podjednotky.  $\beta$ -barely a nukleotidy vázající domény jsou v podjednotkách odděleny. Katalytická místa se nacházejí na  $\beta$ -podjednotkách na rozhraních  $\alpha_3\beta_3$  (Abrahams et al. 1994). Místa pro vazbu nukleotidů na  $\alpha$ -podjednotkách nejsou katalytická, nepodílejí se přímo na syntéze ATP. (Watt et al. 2010)

Centrální stonky obsahuje tři podjednotky –  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ . Na C-konci  $\gamma$  je aminokyselinami  $\gamma$ 209-272 formován  $\alpha$ -helix (o délce 90 Å). Na druhém konci struktury  $\gamma$  je další  $\alpha$ -helix složený z aminokyselin  $\gamma$ 1-45 – tvoří se spodní polovinou C-koncového

$\alpha$ -helixu antiparalelní nadšroubovici. Tu pak obklopuje oligomer  $\alpha_3\beta_3$ . Zbytek stonku vystupuje směrem k  $F_0$  doméně ve vzdálenosti 30 Å. Spolu s podjednotkami  $\delta$  a  $\epsilon$  na bázi stonku tvoří jakousi „nohu“  $F_1$  domény; která je pevně připojena k  $F_0$  doméně.  $\delta$  a  $\epsilon$  toto spojení posilují a stabilizují. (Gibbons et al. 2000; Abrahams et al. 1994) S podjednotkami centrálního stonku se váže a komunikuje c podjednotka pomocí polárních smyček mezi svými transmembránovými  $\alpha$ -helixy. (Stock et al. 1999)

Názvy podjednotek ATP syntázy u bakterií a mitochondrií mohou být matoucí. Podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$ , a  $\gamma$  si v mitochondriích a v bakteriích funkčně odpovídají. Mitochondriální podjednotka  $\delta$  je homologem bakteriální  $\epsilon$  podjednotky (mají stejnou funkci), zatímco mitochondriální  $\epsilon$  nemá strukturní protějšky ani v bakteriích, ani v chloroplastech. Ekvivalentem bakteriální  $\delta$  je mitochondriální OSCP, protein, který je součástí periferního stonku (obr. 2) (Walker et al. 1985).

#### 2.1.1.1.1 IF<sub>1</sub>

ATP syntáza je regulována především dostupností substrátu a protonovým gradientem. Za nefyziologických podmínek (např. při ischemii, kdy se v systému postupně vyčerpají zásoby kyslíku a jiných látek nutných pro oxidativní fosforylaci, nebo při poškození elektron-transportního řetězce vedoucímu k vyčerpání protonového gradientu) se může snížit  $\Delta p$  natolik, že  $F_1F_0$ -ATPáza přestane vykonávat svou původní funkci a začne hydrolyzovat cytoplasmické ATP z glykolýzy. K reverzi dochází, protože se enzym snaží obnovit přirozený membránový potenciál, který je potřebný nejen pro syntézu ATP, ale také pro import proteinů a jejich asemblaci (Martin et al. 1991). Tím se ale zbytečně vyčerpávají zásoby ATP, a to může vést až k apoptóze (shrnuje Faccenda & Campanella 2012).

Tomu brání podjednotka IF<sub>1</sub> (inhibitor  $F_1$  domény), tzv. regulační protein o délce 84 aminokyselin (Pullman & Monroy 1963). Protein zaujímá při acidifikaci matrix (pH ~6,7 a nižší) konformaci homodimeru – dva dlouhé  $\alpha$ -helixy spolu na C-koncové části

tvoří antiparalelní nadšroubovici, každým svým N-koncem jsou schopny se vázat na dvě různé  $F_1$  domény (Cabezón et al. 2000). Nad hodnotou pH 8 tvoří  $IF_1$  neaktivní dimery dimerů a vyšší struktury (Cabezon et al. 2000). Navázáním se do katalytických míst na rozhraní  $\beta_{DP}$  a  $\alpha_{DP}$  boviního enzymu inhibují; krátkým  $\alpha$ -helixem komunikují i s  $\gamma$ -podjednotkou (Walker 2012).  $IF_1$  inhibuje hydrolýzu, nikoliv ale syntézu ATP (Walker 1994). Protein má své homology v boviní i lidské ATPáze, v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida utilis*, i v rostlinách (shrnuje Faccenda & Campanella 2012).

### 2.1.1.2 $F_o$ doména

Na rozdíl od  $F_1$  domény, jejíž stavbu známe dobře, je stále spousta neobjasněných struktur v hydrofobní  $F_o$  doméně. Hůře se izoluje kvůli své povaze integrálního membránového proteinu. Pouze c-oligomer se daří krystalizovat společně se solubilními částmi enzymu. Víme, že napříč organismy se  $F_o$  doména skládá z podjednotek *a*, *b* a *c* (Stock et al. 1999).

Spolu s centrálním stonkem tvoří c-oligomer rotor enzymu. Každý monomer boviního  $c_8$ -kruhu obsahuje dva  $\alpha$ -helixy spojené krátkou matrixovou smyčkou. Z N-koncových helixů se skládá vnitřní kruh, z C-koncových vnější kruh. C-oligomery vypadají jako přesýpací hodiny – boviní podjednotka má na vrcholech v průměru 47 Å, v nejužším místě uprostřed měří 42 Å (Watt et al. 2010). Komplex  $\gamma\delta\epsilon$ -c-kruh je roztáčen proton-motivní silou, kdy přes stále strukturně nedefinovanou podjednotku *a* proudí protony vyrovnávající koncentrační gradient z mezimembránového prostoru mitochondrie do matrix.

Struktura podjednotky *a* (nebo také ATP6) je dlouho dobývaným tajemstvím mitochondriálního výzkumu, bez její znalosti nelze zcela přesně charakterizovat funkci enzymu. Velkým pokrokem v této oblasti je nedávná práce, která na základě single-particle kryoelektronové mikroskopie s využitím ATPázy izolované z mitochondrií řasy *Polytomella* popisuje struktury podjednotky *a* v rozlišení 6,2 Å (Allegretti et al. 2015). Dle této studie obsahuje podjednotka *a* čtyři dlouhé helixy, které oproti původním předpokladům protínají membránu téměř horizontálně a jsou vzhledem k c-oligomeru

orientovány v úhlu 70°. Struktura ukazuje i přítomnost dvou hydrofilních kavit přístupných z opačných stran membrány, které s největší pravděpodobností představují protonové kanály.

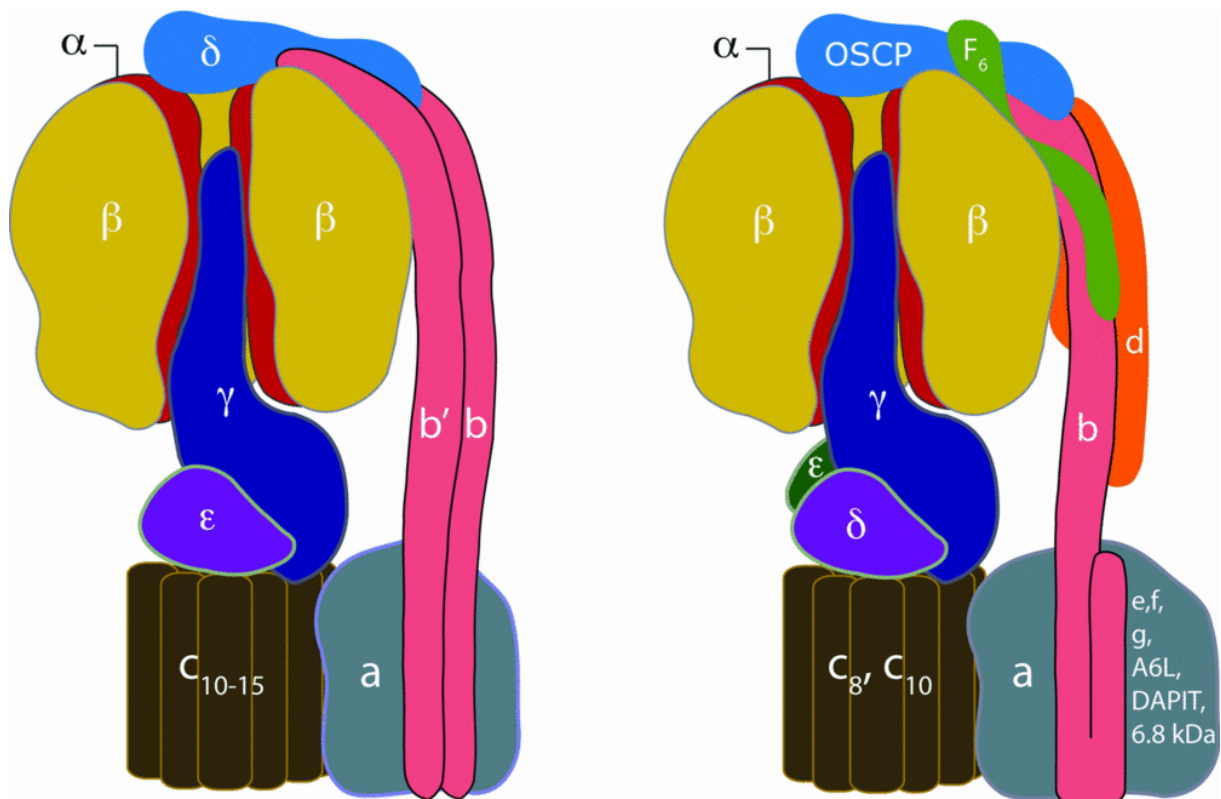
V  $F_0$  doméně se nachází další proteiny, jejichž strukturu se ještě nepodařilo popsat na základě krystalografických dat - ATP8, *e*, *f*, *g* (shrnuje Walker 2012), DAPIT (protein asociovaný s diabetem ve tkáních regulovaných inzulinem) a 6,8 kDa proteolipid (také MLQ) (Chen et al. 2007; Meyer et al. 2007). Všechno to jsou malé proteiny ve velikosti od 6,3 kDa do 11,4 kDa (shrnuje Lee et al. 2015). Nejsou to příliš konzervované proteiny - nemají orthology v bakteriálním enzymu. Pravděpodobně nehrají zásadní roli v syntázové či hydrolázové aktivitě ATP syntázy. V kvasinkách *S. cerevisiae* jsou orthology savčích podjednotek *e* a *g*. Každý z nich je pravděpodobně tvořen jedním transmembránovým  $\alpha$ -helixem. Mapování chemicky indukovaných kovalentních vazeb mezi lysinovými postranními řetězci (kroslinkování) podjednotek ATPázy prokázalo předpokládanou uniformní topologii těchto transmembránových proteinů – N-konce jaderně kódovaných podjednotek jsou lokalizovány v matrix mitochondrií a C-konce zůstávají v mezimembránovém prostoru (Lee et al. 2015). Topologie mitochondriálně kódované ATP8 je opačná, její C-konec je navíc natažený až 70 Å od membrány, kde interaguje s podjednotkou *b* a přispívá tak ke stabilizaci spojení  $F_0$  domény a periferního stonku (Lee et al. 2015). V *S. cerevisiae* jsou orthology savčích podjednotek *e* a *g* esenciální pro dimerizaci ATP syntázy, lze tedy odhadovat podobnou funkci proteinů i v savčích buňkách (Arnold et al. 1998; Davies et al. 2012).

#### 2.1.1.2.1 Periferní stonk

V bovinním periferním stonku nalezneme podjednotky OSCP (protein zodpovědný za citlivost vůči oligomycinu), *b*, *d*,  $F_6$  (Collinson et al. 1994) se stechiometrií 1:1:1:1 (Collinson et al. 1996). K  $F_1$  doméně je stonk navázán přes N-konec proteinu OSCP, kterým se váže na N-konec jednoho z  $\alpha$  peptidů (Carbajo et al. 2007). Periferní stonk hraje důležitou úlohu v syntéze ATP – spojuje  $\alpha_3\beta_3$  hexamer  $F_1$  subkomplexu s podjednotkou *a* subkomplexu  $F_0$  a znehybňuje obě struktury vůči pohybu rotoru



a centrálního stonku. Pomáhá tak spřáhat translokaci protonů a chemickou syntézu. Také se podílí na tvorbě dimerů enzymu (Davies et al. 2012).



**Obrázek 2 | Struktury dvou odlišných ATP syntáz** – vlevo je složení enzymu v bakteriích a chloroplastech, vpravo je mitochondriální ATP syntáza. (převzato z Walker 2012)

Stejně barevné části jsou si navzájem homologní. V bakteriích a chloroplastech se podjednotka b vyskytuje v dimeru bb'. Mitochondrie mají navíc podjednotky F<sub>6</sub>, ε, e, f, g, A6L, DAPIT, 6,8 kDa.

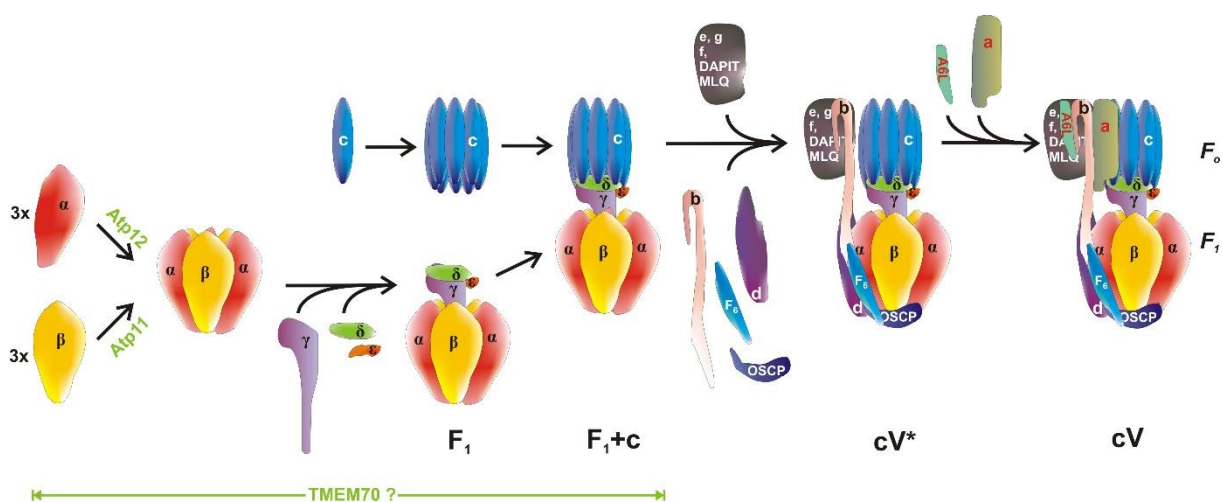
### 2.1.1.3 Asemblace podjednotek F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy

Biogeneze podjednotek mitochondriální F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy je komplikovaný komplexní proces, který ještě nebyl zcela popsán. Současným modelem pro biogenezi mitochondriální ATP syntázy je asemblace podjednotek *S. cerevisiae* (shrnuje Rak et al. 2009). Iničiace i konečná fáze asemblace probíhá u savců patrně velmi obdobně (Wittig et al. 2010), jak ale vypadají intermediáty asemblace, je zatím hypotetické.

Pravděpodobně se nejdříve nezávisle na sobě sestavují v matrix solubilní F<sub>1</sub> doména a hydrofobní c-oligomer, na kterou se F<sub>1</sub> doména následně naváže. Asemblace pokračuje připojením periferního stonku, poté navázáním malých membránových podjednotek e, f, g, DAPIT a MLQ. Úplně nakonec se přidávají podjednotky a a A6L (Wittig

et al. 2010). To, že je podjednotka a zařazena až ve finální fázi biogeneze ATP, může mít svoje opodstatnění – aktivní protonová pumpa by mohla v nekompletně sestavené ATP syntáze disipovat protonový gradient (Wittig et al. 2010; Tzagoloff et al. 2004). Schéma celého procesu je naznačeno na obr. 3.

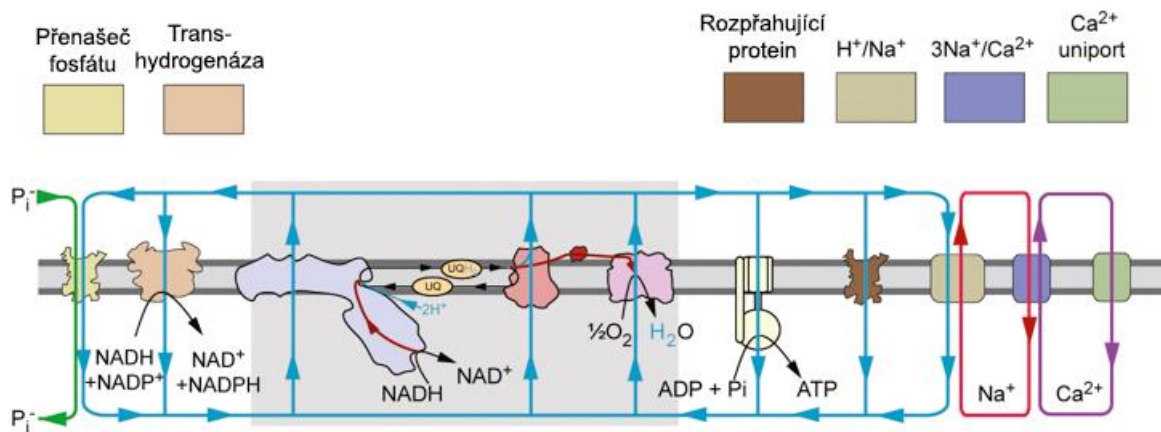
V asemblaci hrají důležitou roli pomocné proteiny, jejichž činnost je přísně koordinovaná. Kromě klasických chaperonů (Hsp70 a Hsp60 – pomáhají proteinům zaujmout správnou konformaci) jsou to i tzv. asemblační faktory. Některé se podílejí např. na udržení asemblace schopné konformace (Tzagoloff et al. 2004), další mohou stabilizovat mRNA nebo mají svou úlohu v samotné translaci proteinu (shrnuje Hejzlarová et al. 2014). Mezi nižšími a vyššími eukaryoty se asemblační faktory částečně liší – v případě *S. cerevisiae* jich bylo popsáno podstatně více než v savcích (např. Atp11p, Atp12p, FMC1 fungující jako chaperony pro  $F_1$  doménu; Atp10p jako chaperon  $F_0$  domény; Atp23p má roli v procesování podjednotky *a* a v její následné asociaci s *c*-oligomerem; a mnoho dalších (shrnují Ackerman & Tzagoloff 2005; Rak et al. 2009)). V savcích jsou pak známy jen homology kvasinkových Atp11p a Atp12p, které také napomáhají formaci  $\alpha_3\beta_3$  hexameru, částečný homolog Atp23p, jehož funkce je neznámá (shrnuje Hejzlarová et al. 2014), a nedávno charakterizovaný TMEM70 (Čížková et al. 2008), při jehož absenci dochází k narušení asemblačního procesu ATP syntázy a její deficienci (Houšťek et al. 2009).



**Obrázek 3 | Asemblace podjednotek  $F_1F_0$ -ATP syntázy** - (převzato z Hejzlarová et al. 2014, upraveno)

## 2.1.2 Funkce F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntázy

V aerobních podmínkách zajišťuje F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntáza produkci ATP, přičemž využívá proton-motivní síly protonového gradientu, který je budovaný dýcháním v elektron-transportním řetězci (anebo fotosyntézou v případě chloroplastů). Roli protonového gradientu v syntéze ATP popisuje chemiosmotická teorie Petera Mitchella (Mitchell 2011). Protony jsou ještě ne zcela objasněným způsobem pumpovány komplexy I, III a IV dýchacího řetězce z matrix mitochondrií do mezimembránového prostoru, odkud po gradientu putují nazpět do matrix přes F<sub>o</sub> subkomplex ATP syntázy. Protonového gradientu využívají i jiné pumpy, např. antiport pro Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> (obr. 4).

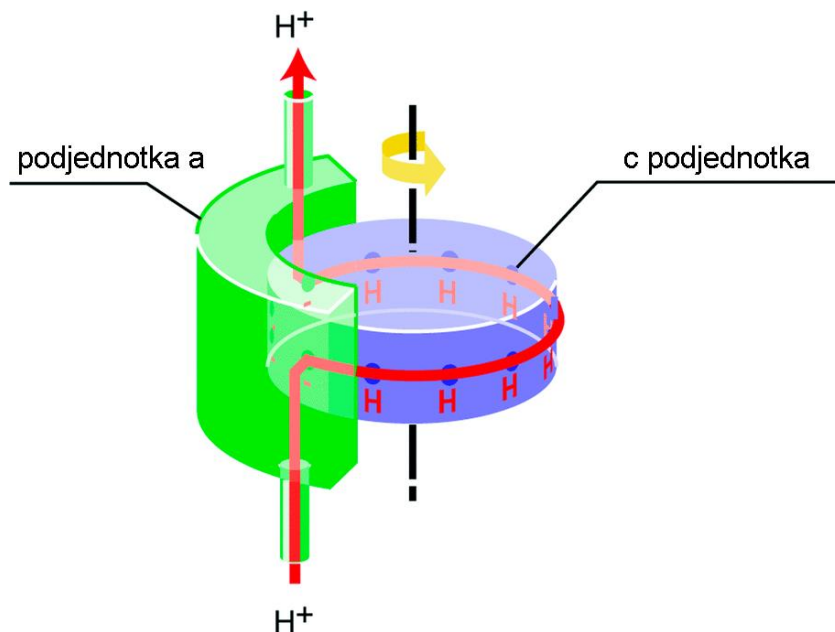


**Obrázek 4 | Schéma mitochondriálního respiračního řetězce s dalšími pumpami využívajícími  $\Delta p$**  (převzato z Nicholls & Ferguson 2013b, upraveno)

V modrošedém rámečku jsou zvýrazněny komplexy I-IV elektron-transportního řetězce, bílý enzym syntetizující ATP je ATP syntáza.

### 2.1.2.1 Rotační mechanismus ATP syntázy

Přímý důkaz ATP-dependentní rotace bakteriální  $\gamma$  podjednotky a chloroplastové  $\epsilon$  podjednotky vzhledem k imobilizovanému  $\alpha_3\beta_3$  hexameru byl proveden v letech 1996-97 (Noji et al. 1997; Kato-Yamada et al. 1998). Podpořili tak Boyerovu teorii o syntéze ATP.



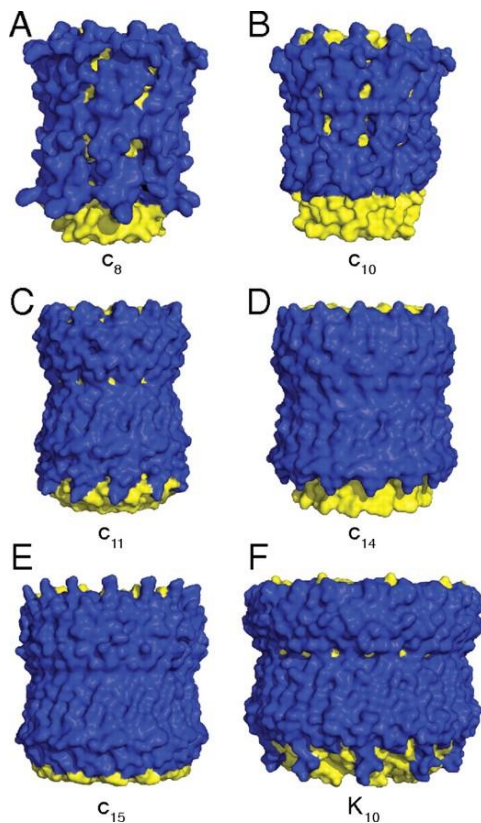
**Obrázek 5 | Generování rotace v  $F_0$  podjednotce.** (převzato z Walker 2012, upraveno; originál z Junge et al. 1997)

Na obr. 5 je schematicky znázorněn mechanismus generování rotace c-kruhu. Podle Jungova modelu putují protony z mezimembránového prostoru k negativně nabitému karboxylovému zbytku (aspartátu nebo glutamátu, záleží na druhu organismu) na rozhraní podjednotky *a* a c-kruhu, který neutralizují. Tato neutralizovaná karboxylová skupina ztratí elektrostatickou interakci s kladně nabitým argininem podjednotky *a* a Brownovým pohybem se posune do hydrofobního prostředí membránové lipidové dvouvrstvy, čímž se otočí celá podjednotka *c* o 1 svůj monomer. Odhalí se tím další negativní karboxylový zbytek mezi c-kruhem a podjednotkou *a*, který může reagovat s dalším protonem, a tak dochází k pohánění rotace.

Negativní karboxylové zbytky vázající protony v předpokládaných polokanálech podjednotky *a* patří v kvasinkách aminokyselinám histidin 195 a glutamát 233,

v bakteriích homolognímu glutamátu 219 a histidinu 245. (shrnuje Devenish et al. 2000) Uprostřed C-koncového  $\alpha$ -helixu se nachází v kvasinkách negativně nabitý glutamát 59 (v bakteriích aspartát 61) interagující s argininem 186 podjednotky *a* (v bakteriích arginin 210).

Každé otočení *c*-kruhu o  $360^\circ$  má za následek tvorbu 3 molekul ATP. Nejeefektivnější je takto *c*-kruh skládající se z 8 monomerů – na 8 translokovaných protonů připadají



**Obrázek 6 | C-oligomery různých organismů** (převzato z Watt et al. 2010)

C-koncová část je vyznačena modře, N-koncová žlutě.

(A) Bovinní *c*-oligomer, (B) *Sacharomyces cerevisiae*, (C) *Ilyobacter tartaricus*, (D) *Spinacea oleracea*, (E) *Spirulina platensis*; (F) K-kruh pocházející z V-ATPázy *Enterococcus hirae*

3 syntetizované molekuly ATP; cena za 1 ATP je tedy 2,7 protonů. Oktamer *c*-kruhu se pravděpodobně vyskytuje ve všech obratlovcích a téměř všech bezobratlých. ATP syntázy ostatních organismů (prokaryot, hub, chloroplastů) jsou méně produktivní – jejich *c*-podjednotky obsahují 10 až 15 monomerů (viz obr. 6), je tedy potřeba více protonů na otočení celého kruhu o  $360^\circ$  (3,3 až 5  $H^+$ ) (Watt et al. 2010). Lze jen spekulovat, zda bylo zeefektivnění syntézy ATP jednou z klíčových adaptací pro vývoj taxonu mnohobuněčných živočichů. Dá se též předpokládat, že pootočení *c*<sub>8</sub> oligomeru je energeticky náročnější než rotace kruhů s vyšší stechiometrií *c* podjednotek. Je otázkou, zda se u živočichů vyvinuly unikátní mechanismy, které by otáčení usnadňovaly.

### 2.1.2.2 Syntéza ATP

V roce 1975 Paul D. Boyer částečně souhlasil s většinou vědců uznávajících chemiosmotickou teorii Petera Mitchella (Mitchell 2011). Na základě této teorie Boyer vyslovil velmi průlomovou hypotézu (Boyer 1975) – navrhnul, že chemická syntéza ATP může být s protonovým tokem či gradientem spřažena mechanickou rotací podjednotek ATP syntázy, která je přímo zodpovědná za konformační změny v enzymu vedoucí k samotné chemické reakci (v angličtině „*binding-change mechanism*“). Teprve až po necelých 30 letech byla teorie ATP syntázy jakožto rotačního motoru přijata širokou odbornou veřejností, když John E. Walker se svým týmem odhalil strukturu boviní F<sub>1</sub>-ATP syntázy ve vysokém rozlišení (2,8 Å) (Abrahams et al. 1994).

F<sub>1</sub>-ATPáza je asymetrický enzym – uprostřed  $\alpha\beta$  hexameru se nachází  $\gamma$ -superhelix, jehož C-konec se tyčí výš než N-konec. Nepravidelná  $\gamma$ -podjednotka takto může komunikovat s  $\alpha\beta$  hexamerem, interaguje s nimi hlavně vodíkovými můstky a udává jim, jakou konformaci zaujmout. Katalytická nukleotidy vazebná místa se nacházejí na  $\beta$ -podjednotkách při rozhraní podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ ;  $\alpha$ -podjednotka také váže nukleotidy, zůstává ale v zavřeném stavu a není známo, že by se přímo podílela na syntéze ATP.  $\beta$ -podjednotka existuje v katalytickém cyklu ve třech konformacích s rozdílnou afinitou k nukleotidům –  $\beta_E$  není schopná vázat žádné nukleotidy,  $\beta_{DP}$  váže ADP + P<sub>i</sub> a  $\beta_{TP}$  váže ATP. Katalýza je popisována také stavy „*open*“ (otevřený), „*loose*“ (volný, nepřipevněný), „*tight*“ (těsný, pevný). V „otevřeném“ stavu se nachází  $\beta_E$ , ve „volném“ navázala  $\beta_{DP}$  ADP+P<sub>i</sub>, ale až s další konformační změnou se zavře katalytické místo a v „těsném“ stavu  $\beta_{TP}$  je syntetizována ATP. Poté je molekula ATP vypuštěna do prostoru matrix mitochondrie a monomer přechází opět do „volného“ stavu  $\beta_E$  připraven navázat další nukleotidy (Abrahams et al. 1994; shrnuje Walker 2012). Každá konverze  $\beta$ -monomeru vyžaduje, aby se centrální stonek otočil o 120° (respektive o 80° a poté o 40° (Masaike et al. 2008)). Na jedno otočení centrálního stonku o 360° se syntetizují 3 molekuly ATP.

### 3. Nové komponenty a funkce ATP syntázy

#### 3.1 DAPIT a 6,8 kDa protein

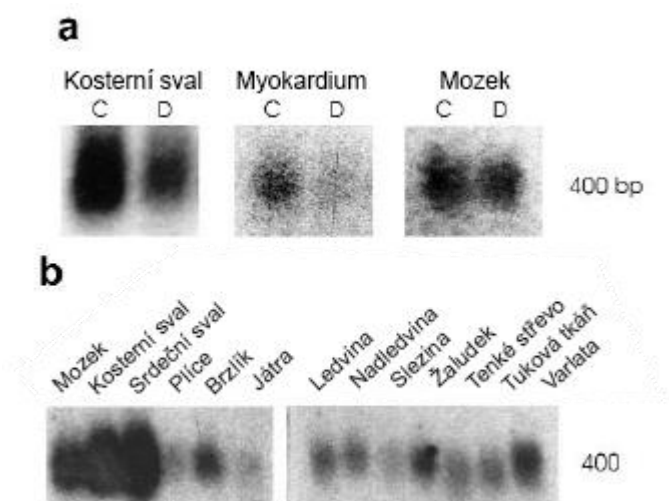
DAPIT (také AGP podle prvních tří aminokyselin) je hydrofobní protein skládající se z 58 aminokyselin obsahující jeden transmembránový helix na C- konci (Meyer et al. 2007). Jeho molekulová hmotnost je 6 303 Da. (Chen et al. 2007). Byl objeven roku 2001 ve studii srovnávající vliv streptozotocinu (STZ) na genovou expresi v různých tkáních. Jeho exprese se zvyšuje během růstu kosterních svalů (odtud také pochází další označení pro gen produkující tento protein - *Usmg5*). (Päivärinne & Kainulainen 2001)

V případě zvýšené hladiny glukózy v krvi (zpravidla po příjmu potravy) začnou pankreatické  $\beta$ -buňky produkovat inzulin, který pak systematicky snižuje koncentraci glukózy v krvi na fyziologických 5 mM (příliš vysoká koncentrace je pro organismus toxická). Inzulin se navazuje na inzulinové receptory kosterních svalů a tukové tkáně, čímž se spustí signální kaskáda aktivující protein kinázu B. To vede k uvolnění intracelulárních vezikulů s GLUT4 glukózovými přenašeči na povrch buněk. GLUT4 transportuje glukózu z krve do buněk. Když skončí inzulinová signalizace, GLUT4 jsou endocytovány zpět do prostředí buňky. Izoformou GLUT4 je GLUT2 v pankreatických  $\beta$ -buňkách a v hepatocytech. Tam inzulin inhibuje syntézu glukózy a posiluje syntézu zásobního glykogenu. Zničením pankreatických  $\beta$ -buněk (autoimunitně či například pomocí STZ) dochází k inzulinové deficienci a tím k dramatickým změnám v glukózovém metabolismu. Tento stav je označován jako diabetes mellitus I. typu.

STZ je toxin, který jako strukturální analog glukózy proniká do  $\beta$ -buněk v Langerhansových ostrůvcích přes GLUT2 glukózový přenašeč. V buňkách se nejzávažněji projevují účinky NO skupiny toxinu, která může vytvářet ROS (reactive oxygen species, velmi reaktivní skupiny obsahující kyslík jako např.  $-\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , superoxid  $\text{O}_2^-$ ) a spolu s alkylační skupinou v STZ poškozují DNA - dochází

k fragmentaci DNA a k dalším změnám především v metabolismu buňky; buňka následně nekrotizuje (shrnují Szkudelski 2001; Chaudhry et al. 2013).

V modelových potkanech finští vědci indukovali onemocnění diabetes mellitus I. typu pomocí STZ. Analýzou Northern blot vyšlo najevo, že v myokardu a kosterních svalech, tkáních citlivých vůči inzulinu, měly nemocné tkáně potlačenou expresi 400bp mRNA oproti kontrolním vzorkům zdravých jedinců; mozek jako inzulin-nesenzitivní tkáň nevykazoval žádnou změnu. Při analýze dalších tkání zdravých potkaních jedinců byla daná mRNA detekována nejvíce v kosterních svalech, ve srdečním svalu a v mozku. V ostatních tkáních (plíce, brzlík, játra, atd. – viz obr. 9) byla exprese nízká. (Päivärinne & Kainulainen 2001)



**Obrázek 7 | Northern blot analýza mRNA DAPIT** (převzato z Päivärinne & Kainulainen 2001, upraveno)  
Na obrázku a) jsou porovnané exprese mRNA DAPIT ve třech tkáních; C je označení pro kontrolní jedince, D pro diabetické.  
Na obrázku b) je analýza exprese mRNA zdravých jedinců v nejrůznějších tkáních.

Vyšší výskyt mRNA ve zdravém mozku, srdci a kosterních svalech si můžeme dnes vysvětlit tím, že DAPIT je podjednotkou  $F_1F_0$ -ATP syntázy a v těchto tkáních se vyskytují mitochondrie v abundantním množství kvůli jejich energetické náročnosti.

V protikladu k těmto výsledkům byly v roce 2012 publikovány údaje o zvýšené expresi samotného proteinu DAPIT v diabetickém myokardu, v kosterním svalu i v tukové tkáni varlat potkanů, ale naopak tomu bylo v raných stádiích diabetu (Kontro



et al. 2012). Jakým způsobem je DAPIT spojen s diabetem a hladinou inzulínu, zůstává stále předmětem výzkumu.

6,8 kDa proteolipid (též C14orf2 nebo MLQ dle prvních tří aminokyselin v sekvenci) je protein skládající se z 60 aminokyselin také s jedním predikovaným transmembránovým helixem na C-konci (molekulová hmotnost je 6 834 Da). Byl poprvé izolován metodou chloroform/metanolové extrakce z bovinního srdce (Terzi et al. 1990).

V roce 2007 byly publikovány dvě vědecké studie, které nezávisle na sobě identifikovali DAPIT a vedle něj i 6,8 kDa protein jako podjednotky  $F_1F_0$ -ATP syntázy (Meyer et al. 2007; Chen et al. 2007). Práce z roku 2012 potvrdila jejich mitochondriální lokalizaci, oba proteiny byly navíc detekovány i ve V-ATP syntázách lysozomů na základě imunohistochemických experimentů. (Kontro et al. 2012)

Oba proteiny jsou těžko zachytitelné při purifikaci mitochondriálních membránových proteinů s použitím silných detergentů. Proto byly v komplexech mitochondriálních ATPáz detekovány pouze při použití velmi jemných detergentů (digitonin nebo n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid) či při izolaci ATPázy v přítomnosti exogenních fosfolipidů. Protože byly přítomny v monomerech i v dimerech bovinního enzymu, lze vyloučit jejich specifitu v dimerech (Meyer et al. 2007). Výsledky ale naznačují nepříliš silnou interakci se zbytkem enzymu.

MLQ a DAPIT jsou oba bazické proteiny ( $pI = \sim 10$ ), také nebyly zatím detekovány jejich post-translační modifikace. Jejich přítomnost či absence nemají vliv na hydrolytickou aktivitu ATP syntázy. (Meyer et al. 2007)

Stanovení stechiometrie těchto malých proteinů v rámci ATPázy je klíčové pro tvorbu hypotéz o funkci těchto podjednotek. Protože primární struktura DAPIT obsahuje právě jeden cystein, stejně jako například podjednotky *b*, *d* nebo *f*, je možné relativní stechiometrii stanovit pomocí značení radioaktivním jodoacetamidem. Dodecyl-maltosidem purifikovaná ATPáza obsahovala DAPIT v substechiometrickém, přibližně polovičním množství oproti ostatním značeným podjednotkám. MLQ bohužel

neobsahuje žádný cystein, jeho stechiometrie nemohla být touto metodou stanovená. (Chen et al. 2007).

### 3.1.1 Funkce obou proteinů

Jakou má podjednotka DAPIT v  $F_1F_0$ -ATP syntáze úlohu, ještě není stále jasné. Jeho orthology můžeme nalézt v obratlovcích a bezobratlých živočiších, ale nejsou v *S. cerevisiae* (v analýzách se objevuje nízká (čili pravděpodobně náhodná) či žádná shoda DAPITu a MLQ s podjednotkou *k* z *S. cerevisiae*), ani v jiných houbách říše Fungi (Chen et al. 2007; Meyer et al. 2007). Můžeme se tedy domnívat vzhledem ke konzervovanosti struktury a funkce ATP syntázy napříč organismy, že DAPIT i MLQ budou mít postradatelnou roli ve funkci enzymu (Ohsakaya et al. 2011).

O funkci proteinů DAPIT a MLQ byly publikovány zatím dvě studie – Ohsakaya a kol. snížili pomocí RNA interference množství translatovaného proteinu DAPIT a sledovali změny tzv. knockdownovaných (KD) buněk oproti kontrolním shMock buňkám (kontrolní skupina, na které se pozná, zdali za změny v expresích může daná shRNA nebo samotný proces transfekce). Metodou nativní elektroforézy a následného Western blotu bylo zjištěno, že v buněčných kulturách, kde byla signifikantně potlačena exprese DAPIT, došlo k redukci množství ATP syntázy (až na 25% celkové populace ve shMock kulturách). S tímto údajem dobře koreloval i pokles aktivity enzymu až o 60 % oproti kontrolám. Nezměněné množství transkriptů pro podjednotky ATPázy naznačují, že jejich proteosyntéza by měla v KD buňkách probíhat beze změn. Taktéž transport translatovaných proteinů do mitochondrií v knockdownovaných buňkách se zdá být nepoškozen – nebyly nalezeny volné prekurzory  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek s MTP (mitochondria targeting presequence – sekvence, která „navádí“ proteiny k mitochondriálním membránám, aby pak byly následně dopraveny na cílové místo v mitochondriích). Protein DAPIT ve svojí struktuře obsahuje hydrofobní část, která pravděpodobně asociuje s intramembránovou  $F_0$  doménou. DAPIT by tak mohl napomáhat stabilizaci právě této domény, čímž by ovlivňoval výsledné množství

enzymu v mitochondriích. Druhou možnou příčinou poklesu obsahu ATP syntázy může být nesprávná asemblací jejích podjednotek – DAPIT by v tomto případě mohl hrát roli jakéhosi chaperonu v asemblačním procesu, který s ostatními podjednotkami interaguje jen přechodně (Ohsakaya et al. 2011). Tuto hypotézu podporuje výše zmíněný nález substechiometrického množství DAPITu oproti ostatním ATPázovým podjednotkám, což je typický znak asemblačních faktorů (Hejzlarová et al. 2011). Na druhou stranu ale byl protein DAPIT detekován v nativních gelech pouze společně s plně asemblovanou ATPázou a ne v menších proteinových komplexech, které by mohly představovat asemblační intermediáty enzymu.

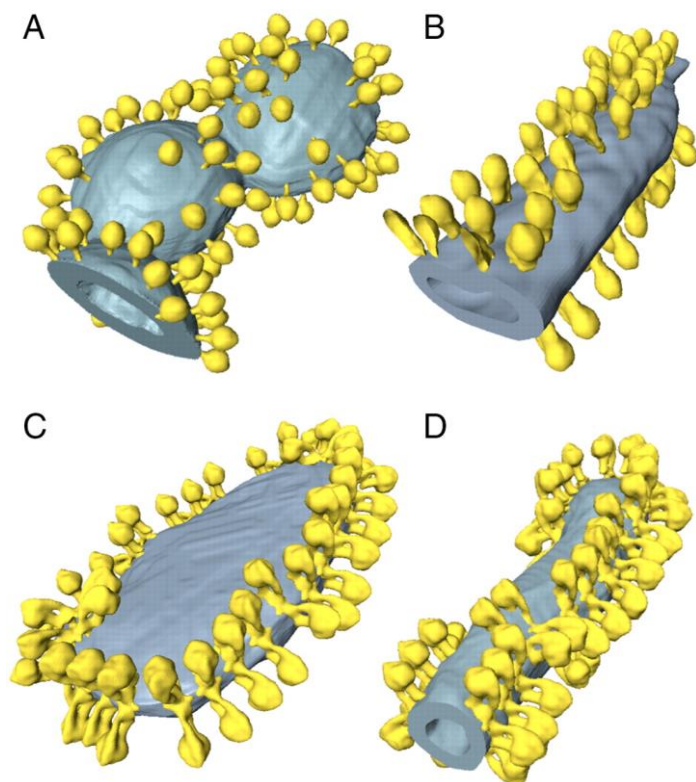
Tentýž výzkumný tým v roce 2014 publikoval stejně koncipovanou studii s podjednotkou MLQ (Fujikawa et al. 2014). Snížená exprese MLQ v buňkách pomocí shRNA. způsobila pokles množství podjednotek ATPázy i celého enzymového komplexu. Buňky vykazovaly nižší kapacitu tvorby ATP v mitochondriích a sníženou schopnost proliferace při kultivaci bez glukózy. Tyto změny jdou na vrub poklesu množství ATPázy, množství ostatních enzymů elektron-transportního řetězce ani velikost protonového gradientu nebyly sníženou expresí MLQ. Podobně jako DAPIT v jejich předchozí práci, i MLQ byl pomocí nativní elektroforézy detekován pouze v proužku plně-asemblované ATPázy. To naznačuje spíš stabilizační než asemblační úlohu proteinu. Mapování chemicky indukovaných kovalentních vazeb mezi lysinovými postranními řetězci (kroslinkování) podjednotek ATPázy prokázalo proximitu MLQ s dalšími podjednotkami  $F_0$  domény – DAPIT, e, f - což dále podporuje hypotézu stabilizačního faktoru (Lee et al. 2015).

### **3.2 Dimerizace ATP syntázy, formování krist v mitochondrii**

Zatímco se v prokaryotických buňkách vyskytují ATP syntázy jen ve formě monomerů, v eukaryotech enzym tvoří dimery nebo i vyšší oligomerní konformace. První dimery  $F_1F_0$ -ATP syntázy byly izolovány ze *S. cerevisiae* spolu se třemi dalšími

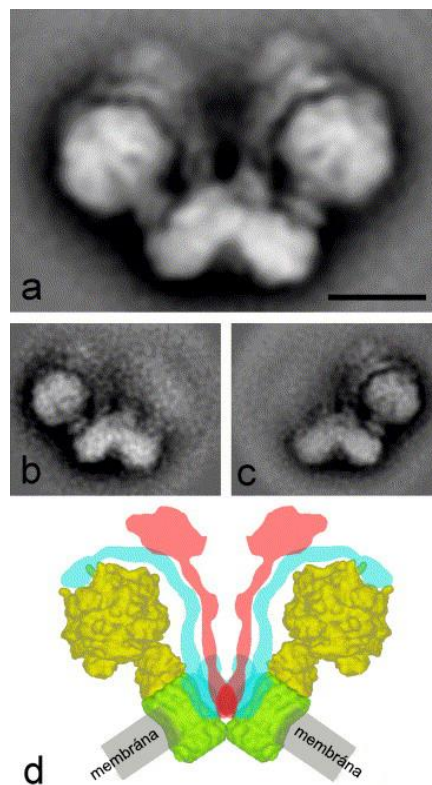
proteiny (kvasinkové podjednotky *k*, *g*, *e*/Tim11), které byly dimer-specifické – nebyly vůbec asociovány s monomerní formou. Podjednotky nebyly důležité pro katalytickou činnost enzymu, ale Su *g* a Su *e*/Tim11 se zdály být esenciální pro tvorbu dimeru (Arnold et al. 1998). Brunner a kol. publikovali práci o nezbytnosti Su *e* pro dimerizaci; za nepřítomnosti Su *g* byl enzym schopný dimerizovat aspoň v omezeném množství, za nepřítomnosti Su *e* nikoliv. Su *g* má jen podpůrnou funkci a stabilizuje Su *e* (Brunner et al. 2002). Další studie ale izolovaly dimery i za absence Su *e* a zahrnuly i další podjednotky F<sub>o</sub> domény podílející se na interakci dvou monomerů ATP syntáz (Gavin et al. 2005; Wittig et al. 2008). Navíc jsou v monomeru bovinní ATP syntázy podjednotky *e* a *g* pevně navázané; pojem dimer-specifický proto patrně platí jen pro kvasinkové homology (Meyer et al. 2007).

Podjednotky *e* a *g* se ukázaly být klíčové i pro tvorbu mitochondriálních krist (Paumard et al. 2002). Kristy zvětšují povrch vnitřní mitochondriální membrány, čímž umožňují fungování většího množství enzymů oxidativní fosforylace. Mitochondrie s delecí Su *g* a Su *e* neobsahují dimery ATP syntáz a vnitřní mitochondriální membrána je organizována do dvou nebo tří koncentrických vrstev připomínajících vrstvení cibule. V buňkách z bovinního srdce a potkaních jater byly vizualizovány pomocí elektronové krytomografie řady dimerů nacházejících se v nejvíce zahnutých částech vnitřní membrány - přesněji byly pozorovány vždy dvě rovnoběžné řady F<sub>1</sub> hlaviček vzdálené od sebe ~28 nm. Střední F<sub>o</sub> domén od sebe dělí ~13 nm (viz obr. 8). Úhel sklonu mezi periferními stonky se pohybují mezi 55° a 95° pro bovinní dimery, u potkanů byl tento úhel ~70° (Strauss et al. 2008). Výskyt dimerů v zakřivených místech membrány byly dříve zpozorovány i v nezelené řase *Polytomella* (Dudkina et al. 2005). Přestože dokážou lipidy samy dávat tvar lipidovým dvojvrstvám, na vnitřní mitochondriální membráně hrají dimery ATP syntáz hlavní roli ve tvorbě velkých zakřivení. Mají pravděpodobně esenciální vliv na morfologii krist. (Davies et al. 2012)



**Obrázek 8 | Dimery ATP syntázy v izolované mt membráně** (převzato z Davies et al. 2012)

A), B) – monomerické uspořádání ATP syntáz kvasinek postrádajících *Su g*, rozprostírají se na plochých či málo zakřivených místech membrány  
 C), D) – normální ATP syntázy v dimerickém uspořádání nacházejících se na místech největšího zakřivení



**Obrázek 9 | Dimer** (převzato z Dudkina et al. 2005, upraveno)

Na obrázcích a), b) a c) jsou projekce dimerů ATP syntázy na základě analýzy z elektronové mikroskopie. Dimerům b) a c) chybí vždy jedna specifická  $F_1$  doména.

Obrázek d) je interpretace dimeru. Žlutá část -  $F_1$  doména, zelená - c-rotor, modrá - periferní stonek, červená - dimer-specifické komponenty

### 3.3 Mitochondriální pór přechodné propustnosti

MPTP (nebo mitochondriální megakanál – MMC) je nespecifický pór otevírající se při příliš vysoké koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů v mitochondriální matrix (Haworth & Hunter 1979), v průměru má ~2,3 nm (Crompton et al. 1987). Otevírá se na vnitřní membráně a propouští molekuly do velikosti 1 500 Da oběma směry (Haworth & Hunter 1979), dochází k vyrovnávání osmotického tlaku a koncentrací látek v mt matrix a v cytosolu buňky. Pór může být specificky inhibován cyklosporinem A, lipofilním imunosupresivem (Crompton et al. 1988), který se váže na cyklofilin D, protein zvyšující citlivost MPTP vůči  $\text{Ca}^{2+}$  (Halestrap et al. 1998).

Problematika MPTP se studuje především v srdeční svalovině, kde se podílí na reperfučním poškození. Reperfuze nastává po ischemii, kdy dochází k obnově zásobování tkáně krví. V důsledku hypoxie došlo k dočasnému narušení mt respirace, vyčerpávání zásob ATP a výrazné zvýšení koncentrace ADP, AMP a  $\text{P}_i$  (Halestrap 2010). Disipace protonového gradientu také obrátila cyklus  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, jehož koncentrace je přirozeně udržována nižší než v cytosolu pomocí  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporteru (viz obr. 4) (shrnuje Crompton 1999), a to vede ke kumulování intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Čím déle ischemický stav trvá, tím větší je rozsah poškození. Při dostatečně dlouhé ischemii nedojde po reperfuzi k obnově funkce dýchacího řetězce a koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je v mt matrix tak vysoká, že spolu s oxidativním stresem, přítomností většího množství  $\text{P}_i$  a nedostatkem ATP otevírá MPTP. Otevření tohoto nespecifického kanálu působí velké škody – v mitochondrii se úplně vyruší protonový gradient, vyrovnají se koncentrační gradienty všech iontů mezi matrix a cytosolem (včetně  $\text{Ca}^{2+}$  gradientu). Mitochondrie začne na základě toho bobtnat, kvůli čemuž může popraskat jak vnitřní, tak i vnější mt membrána. V případě takové ruptury je do cytosolu vypuštěn cyt c a další proteiny, které mohou spustit signální kaskádu vedoucí k apoptóze buňky (shrnuje Halestrap 2009). Studium stále neobjasněné molekulární podstaty MPTP má tedy velký význam pro výzkum

kardioprotekce, ale MPTP figuruje samozřejmě i jinde, např. v muskulárních dystrofiích (Palma et al. 2009).

Struktura tohoto póru je stále neznámá; nejprve se vědci domnívali, že zvýšená permeabilita membrány je způsobená činností fosfolipázy A<sub>2</sub> citlivé vůči Ca<sup>2+</sup> (Pfeiffer et al. 1979), ale to bylo vyvráceno inhibicí MPTP cyklosporinem A bez účinku na aktivitu fosfolipázy (Broekemeier et al. 1989). Další teorie mluvila o póru složeného z komplexu VDAC/ANT (napětově závislý aniontový kanál/přenašeč adeninových nukleotidů) (Crompton et al. 1998), ale v buňkách s deletovanými geny pro oba proteiny stále vznikal MPTP inhibovatelný cyklosporinem A (Baines et al. 2007; Kokoszka et al. 2004).

Nejnovější hypotézy hovoří o podílu F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPázy na tvorbě kanálu. Cyklofilin D se totiž při vyšších koncentracích P<sub>i</sub> váže na OSCP podjednotku hydrolyzující ATP syntázy a snižuje její aktivitu (Giorgio et al. 2009; Giorgio et al. 2013). Giorgio a kol. označili dimery ATP syntázy jako MPTP, její inhibitor benzodiazepin 423 má stejné vazebné místo jako cyklofilin D a zároveň měl podobně podpůrný efekt na vznik MPTP. U monomerů Giorgio a kol. nezpozorovali žádný proud solutů či iontů typický pro MPTP. Stejný jev byl sledován v savčí i kvasinkové ATP syntáze (Carraro et al. 2014; Giorgio et al. 2013). Jiná vědecká skupina předpokládá, že je MPTP tvořen podjednotkou c F<sub>o</sub> domény. Domnívají se tak, protože zatímco snížená exprese F<sub>1</sub> domény neměla na MPTP žádný vliv, absence F<sub>o</sub> domény potlačila aktivitu póru stejně jako cyklosporin A (Bonora et al. 2013). Naproti tomu Alavian a kol. navrhují ještě třetí model pro MPTP. Zjistili, že purifikované c-oligomery nejsou citlivé vůči hladině Ca<sup>2+</sup> a nejsou inhibovány cyklosporinem A, ale potvrdili inaktivní MPTP při úbytku c-podjednotky. Podle Alaviana a kol. je pravděpodobně hlavní citlivou částí MPTP F<sub>1</sub> doména, která reguluje otevírání nescifického póru rozvolněním struktury c-oligomeru v F<sub>o</sub> doméně (Alavian et al. 2014).

Je celkem pravděpodobné, že se tento megakanál otevírá díky F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPáze vzhledem k výše publikovaným zjištěním; přesnou molekulární podstatu MPTP ale bude třeba dále zkoumat.

## 4. Závěr

$F_1F_0$ -ATP syntáza je posledním a zásadním enzymem dýchacího řetězce, který je přímo zodpovědný za syntézu naprosté většiny ATP v buňce. Při vyřazení tohoto enzymu je dalším významným zdrojem ATP glykolýza, to ale zdaleka nepokryje energetické nároky tkání, což má pak fatální důsledky pro celý organismus. Znátk strukturu ATP syntázy a události s ní spojené (jako například assemblace) je proto zcela klíčové pro výzkum a léčbu patologií způsobených jejím poškozením.

Protože podoba  $F_1$  domény a c-oligomeru už je celkem známa, bádání se v posledních letech soustředí na odhalení struktur nových transmembránových podjednotek ATP syntázy u živočichů. Stechiometrie těchto podjednotek ještě není zcela vyjasněna. Předpokládá se, že všechny obsahují jeden transmembránový helix a stabilizují membránovou část enzymu. Méně pravděpodobně pomáhají enzym asemblovat, ale ani to nelze vyloučit. Dosavadní výzkum proteinů DAPIT a MLQ toho příliš o jejich úloze neříká. Je nezbytná tvorba dalších buněčných modelů a podrobnější charakterizace ATP syntázy při omezení či odstranění jejich exprese. Tkáňově rozdílná exprese a regulace množství DAPIT insulinem by mohly představovat dynamický prostředek k regulaci množství ATP syntázy v mitochondriích.

ATP syntáza má asi ještě další, na první pohled nezřejmé funkce – podílí se pravděpodobně na zakřivení krist, významně tak přispívá ke zvětšení povrchu vnitřní mitochondriální membrány a celkové efektivitě metabolické činnosti mitochondrie. Vedle toho je velmi zajímavý potenciální podíl enzymu na fenoménu MPTP. To, že mitochondrie spouští apoptózu, je známý fakt. Představa o přímé účasti ATPázy na tomto procesu je proto opodstatněná, ale poslední publikované výsledky se zatím dosti liší. Molekulární podstata MPTP je důležitá pro studium kardioprotekce, očekávám proto, že výzkum MPTP bude intenzivně pokračovat.



## 5. Reference

- Abrahams, J.P. et al., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370(6491), pp.621–628.
- Ackerman, S.H. & Tzagoloff, A., 2005. Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 80, pp.95–133.
- Alavian, K.N. et al., 2014. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29), pp.10580–5.
- Allegretti, M. et al., 2015. Horizontal membrane-intrinsic  $\alpha$ -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*, 521, pp.237–240.
- Arnold, I. et al., 1998. Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: Identification of three dimer-specific subunits. *EMBO Journal*, 17(24), pp.7170–7178.
- Baines, C.P. et al., 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature cell biology*, 9(5), pp.550–555.
- Baradaran, R. et al., 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), pp.443–8.
- Blanchi, C. et al., 2004. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: Kinetic evidence using flux control analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), pp.36562–36569.

- Bonora, M. et al., 2013. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(4), pp.674–83.
- Boyer, P.D., 1975. A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. *FEBS Letters*, 58(1-2), pp.1–6.
- Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E. & Pfeiffer, D.R., 1989. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 264(14), pp.7826–7830.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V. & Stuart, R. a., 2002. Structure of the yeast F1F0-ATP synthase forms homodimers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), pp.48484–48489.
- Cabezón, E. et al., 2000. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), pp.25460–25464.
- Cabezón, E. et al., 2000. Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *The Journal of biological chemistry*, 275(37), pp.28353–5.
- Carbajo, R.J. et al., 2007. How the N-terminal domain of the OSCP subunit of bovine F1Fo-ATP synthase interacts with the N-terminal region of an alpha subunit. *Journal of molecular biology*, 368(2), pp.310–8.
- Carraro, M. et al., 2014. Channel Formation by Yeast F-ATP Synthase and the Role of Dimerization in the Mitochondrial Permeability Transition. *The Journal of biological chemistry*, 289(23), pp.15980–15985.
- Carroll, J. et al., 2006. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), pp.32724–32727.

- Collinson, I.R. et al., 1994. ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F1-ATPase and in its absence. *Journal of molecular biology*, 242(4), pp.408–421.
- Collinson, I.R. et al., 1996. The F1F0-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F1 and F0 domains. *Biochemistry*, 35(38), pp.12640–6.
- Crompton, M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical journal*, 341 ( Pt 2, pp.233–249.
- Crompton, M., Costi, a & Hayat, L., 1987. Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *The Biochemical journal*, 245, pp.915–918.
- Crompton, M., Ellinger, H. & Costi, a, 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *The Biochemical journal*, 255(1), pp.357–360.
- Crompton, M., Virji, S. & Ward, J.M., 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European journal of biochemistry / FEBS*, 258(2), pp.729–735.
- Čížková, A. et al., 2008. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Nature genetics*, 40(11), pp.1288–1290.
- Davies, K.M. et al., 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), pp.13602–13607.

- Denda, K. et al., 1989. A gene encoding the proteolipid subunit of *Sulfolobus acidocaldarius* ATPase complex. *J. Biol. Chem.*, 264(13), pp.7119–7121.
- Devenish, R.J. et al., 2000. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(5), pp.507–516.
- Dudkina, N. V. et al., 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Letters*, 579(25), pp.5769–5772.
- Esch, F.S. & Allison, W.S., 1979. On the subunit stoichiometry of the F<sub>1</sub>-ATPase and the sites in it that react specifically with p-fluorosulfonylbenzoyl-5'-adenosine. *Journal of Biological Chemistry*, 254(21), pp.10740–10746.
- Faccenda, D. & Campanella, M., 2012. Molecular Regulation of the Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF1). *International Journal of Cell Biology*, 2012, pp.1–12.
- Fearnley, I.M. & Walker, J.E., 1986. Two overlapping genes in bovine mitochondrial DNA encode membrane components of ATP synthase. *The EMBO journal*, 5(8), pp.2003–2008.
- Fernández-Vizarra, E., Tiranti, V. & Zeviani, M., 2009. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(1), pp.200–11.
- Fujikawa, M. et al., 2014. Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ). *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 19(2), pp.153–60.

- Galkin, A., Dröse, S. & Brandt, U., 2006. The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(12), pp.1575–81.
- Gavin, P.D., Prescott, M. & Devenish, R.J., 2005. Yeast F1F0-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(2), pp.55–66.
- Gibbons, C. et al., 2000. The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature structural biology*, 7(11), pp.1055–61.
- Giorgio, V. et al., 2009. Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp.33982–33988.
- Giorgio, V. et al., 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp.5887–92.
- Hägerhäll, C., 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(2), pp.107–141.
- Halestrap, A.P., 2010. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochemical Society transactions*, 38, pp.841–860.
- Halestrap, A.P. et al., 1998. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366, pp.79–94.
- Halestrap, A.P., 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), pp.821–831.

- Haworth, R. a & Hunter, D.R., 1979. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195(2), pp.460–467.
- Hejzlarová, K. et al., 2011. Expression and processing of the TMEM70 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(1), pp.144–149.
- Hejzlarová, K. et al., 2014. Nuclear Genetic Defects of Mitochondrial ATP Synthase. *Physiological Research*, 63, pp.S57–S71.
- Houštěk, J., Kmoch, S. & Zeman, J., 2009. TMEM70 protein - A novel ancillary factor of mammalian ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(5), pp.529–532.
- Chaudhry, Z. et al., 2013. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Laboratory Animals*, 47(4), pp.257–265.
- Chen, R. et al., 2007. Association of two proteolipids of unknown function with ATP synthase from bovine heart mitochondria. *FEBS Letters*, 581(17), pp.3145–3148.
- Iwata, S., 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex. *Science*, 281(5373), pp.64–71.
- Junge, W., Lill, H. & Engelbrecht, S., 1997. ATP synthase: an electrochemical ransducer with rotatory mechanics. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11), pp.420–423.
- Kagawa, Y. & Racker, E., 1966. Partial Resolution of the Enzymes Oxidative Phosphorylation X. RECONSTRUCTION OF OLIGOMYCIN-SENSITIVE ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. *Journal of Biological Chemistry*, 241(10), pp.2467–2474.
- Kato-Yamada, Y. et al., 1998. Direct Observation of the Rotation of ε Subunit in F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), pp.19375–19377.

- Kokoszka, J.E. et al., 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427(6973), pp.461–465.
- Kontro, H. et al., 2012. Cellular and tissue expression of DAPIT, a phylogenetically conserved peptide. *European Journal of Histochemistry*, 56(2), pp.1–6.
- Lee, J. et al., 2015. Organisation of Subunits in the Membrane Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc.M115.645283.
- Lenaz, G. et al., 2010. Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), pp.633–40.
- Martin, J., Mahlke, K. & Pfanner, N., 1991. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import:  $\Delta\Psi$  Drives the movement of presequences. *Journal of Biological Chemistry*, 266(27), pp.18051–18057.
- Masaïke, T. et al., 2008. Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F(1)-ATPase correlate with 80 degrees and 40 degrees substep rotations. *Nature structural & molecular biology*, 15(12), pp.1326–1333.
- Meunier, B. et al., 2013. Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(11-12), pp.1346–61.
- Meyer, B. et al., 2007. Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol Cell Proteomics*, 6(10), pp.1690–1699.
- Mitchell, P., 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(12), pp.1507–38.

- Nelson, D., Cox, M.M. & Lehninger, A.L., 2013. *Lehninger principles of biochemistry*, New York: W.H. Freeman.
- Nelson, N. et al., 2000. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *The Journal of experimental biology*, 203, pp.89–95.
- Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J., 2013a. *Bioenergetics*, Elsevier.
- Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J., 2013b. *Bioenergetics*, Elsevier.
- Noji, H. et al., 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622), pp.299–302.
- Ohsakaya, S. et al., 2011. Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 286(23), pp.20292–6.
- Päivärinne, H. & Kainulainen, H., 2001. DAPIT, a novel protein down-regulated in insulin-sensitive tissues in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetologica*, 38(2), pp.83–86.
- Palma, E. et al., 2009. Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice. *Human Molecular Genetics*, 18(11), pp.2024–2031.
- Paumard, P. et al., 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO Journal*, 21(3), pp.221–230.
- Pfeiffer, D.R. et al., 1979. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca<sup>2+</sup> plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry*, 254(22), pp.11485–11494.



- Pullman, M. et al., 1960. Partial Resolution Oxidative of the Enzymes Phosphorylation Catalyzing oxidative phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 235(11), pp.3322–3329.
- Pullman, M.E. & Monroy, G.C., 1963. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 238(11), pp.3762–3769.
- Rak, M. et al., 2009. Assembly of F<sub>0</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(1), pp.108–116.
- Rutter, J., Winge, D.R. & Schiffman, J.D., 2010. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, 10(4), pp.393–401.
- Sagan, L., 1967. On the Origin of Mitosing Cells. *Journal of Theoretical Biology*, pp.225–274.
- Sazanov, L. a., 2014. The mechanism of coupling between electron transfer and proton translocation in respiratory complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, pp.247–253.
- Senior, A.E. & Brooks, J.C., 1971. The subunit composition of the mitochondrial oligomycin-insensitive ATPase. *FEBS Letters*, 17(2), pp.327–329.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal*, 19(8), pp.1777–1783.
- Stock, D., Leslie, A.G. & Walker, J.E., 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5445), pp.1700–1705.
- Strauss, M. et al., 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *The EMBO journal*, 27(7), pp.1154–60.

- Sun, F. et al., 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), pp.1043–57.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50(6), pp.537–546.
- Terzi, E. et al., 1990. Isolation and amino acid sequence of a novel 6.8-kDa mitochondrial proteolipid from beef heart. Use of FAB-MS for molecular mass determination. *FEBS Letters*, 260(1), pp.122–126.
- Tsukihara, T. et al., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5265), pp.1136–1144.
- Tzagoloff, A. et al., 2004. Atp10p Assists Assembly of Atp6p into the F<sub>0</sub> Unit of the Yeast Mitochondrial ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), pp.19775–19780.
- Walker, J.E., 1998. ATP synthesis by rotary catalysis (Nobel lecture). In *Angewandte Chemie - International Edition*. pp. 2308–2319.
- Walker, J.E. et al., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*, 1(8), pp.945–951.
- Walker, J.E. et al., 1985. Primary structure and subunit stoichiometry of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 184(4), pp.677–701.
- Walker, J.E., 2012. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, p.S1.
- Walker, J.E., 1994. The regulation of catalysis in ATP synthase. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), pp.912–918.

- Watt, I.N. et al., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), pp.16823–16827.
- Wittig, I. et al., 2010. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), pp.1004–11.
- Wittig, I. et al., 2008. Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 7(5), pp.995–1004.
- Yankovskaya, V. et al., 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5607), pp.700–704.