

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Filip Sklenář

Fyziologické regulace aktivity mitochondriální ATP syntázy
Physiological regulation of mitochondrial ATP synthase activity

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Andrea Dlasková, Ph.D.
Garant: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením Ing. Andrey Dlaskové, Ph.D. a uvedl jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval především své školitelce Ing. Andree Dlaskové, Ph.D. za trpělivé a velmi odpovědné vedení mé práce. Velké poděkování také patří mé manželce a rodičům za podporu mého studia, i této práce.

Abstrakt

ATP syntáza je klíčovým enzymem celého energetického metabolismu. Nachází se ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je součástí respiračního řetězce produkujícího energii ve formě adenosin trifosfátu. Regulace její aktivity je důležitá především kvůli udržování přiměřené hladiny ATP v buňce, která se mění dle aktuálních fyziologických nároků. Náhlé snížení aktivity ATP syntázy může vést k hyperpolarizaci mitochondriální membrány, spojené se zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů z respiračního řetězce. Takto navozený oxidativní stres může buňku fatálně poškodit a vést k programované buněčné smrti, apoptóze. Není proto překvapivé, že změny regulace aktivity ATP syntázy byly popsány u různých patologických stavů, jako například ischemie, nebo karcinogeneze. Cílem této práce je shrnout současné poznatky týkající se fyziologické regulace aktivity ATP syntázy, zejména na úrovni interakčních partnerů, Ca^{2+} iontů, post-translačních modifikací a v neposlední řadě i na úrovni supramolekulární organizace enzymu.

Klíčová slova

mitochondrie, ATP, ATP syntáza, inhibiční faktor 1 (IF1), Ca^{2+} signalizace, posttranslační modifikace, supramolekulární organizace enzymu

Abstract

ATP synthase is a key enzyme of energy metabolism. It is located in the inner mitochondrial membrane, where it is a part of respiratory chain, which produces energy in the form of adenosine triphosphate. Regulation of its activity is important, primarily to maintain an adequate level of ATP in a cell, which is variable according to the current physiological demands. Sudden decrease in ATP synthase activity may lead to hyperpolarization of the mitochondrial membrane associated with increased production of reactive oxygen radicals from the respiratory chain. Oxidative stress induced in this way can fatally damage the cell and lead to a programmed cell death, apoptosis. It is therefore not surprising that changes in the regulation of ATP synthase activity have been described in various pathological conditions such as ischemia or carcinogenesis. The aim of this work is to summarize the current knowledge about the physiological regulation of ATP synthase activity, especially at the level of interaction partners, Ca^{2+} ions, post-translational modifications and, last but not least, at the level of supramolecular organization of the enzyme.

Key words

mitochondria, ATP, ATP synthase, ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1), Ca^{2+} signalling, post-translational modification, supramolecular organization of the enzyme

Obsah

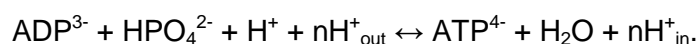
1. Úvod	1
2. Mitochondriální ATP syntáza	3
3. Ca^{2+} ionty	5
4. Interakční partneři ATP syntázy	7
4.1. Inhibiční faktor 1 (IF1)	7
4.2. Protein kináza C δ	10
4.3. Faktor B	10
4.4. Cyklofilin D	11
4.5. CaBI - 6,8 kDa proteolipid	11
4.6. S100A1	11
5. Post-translační modifikace ATP syntázy	12
5.1. Fosforylace	13
5.2. Acylace a acetylace	14
5.3. Methylace	15
5.4. ATP syntázová nitrace tyrosinu	16
5.5. Cysteinové redoxní reakce	18
6. Supramolekulární organizace ATP syntázy, dimerizace a oligomerizace	19
7. Závěr	21
Reference	23

Seznam zkratek

ADP	Adenosin difosfát
ATP	Adenosin trifosfát
Arg	Arginin
CoA	Koenzym A
CsA	Cyklosporin A
CyD	Cyklofilin D
Cys	Cystein
Glu	Kyselina glutamová
IF1	Inhibiční faktor 1
Lys	Lysin
mPTP	Mitochondriální permeabilně transientní pór
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NO	Oxid dusnatý
NO ₂	Oxid dusičitý
Phe	Fenylalanin
PKA	Protein kináza A
PKC	Protein kináza C
Pro	Prolin
PTM	Post-translační modifikace
PTMs	Post-translační modifikace
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
Ser	Serin
SIRT	Sirtuin
TBT	Tributyltin
Thr	Treonin
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
[Ca ²⁺] _c	Koncentrace cytosolického Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _m	Koncentrace mitochondriálního Ca ²⁺

1 Úvod

ATP syntáza je klíčový enzym metabolismu, především kvůli její roli v syntéze nukleotidových molekul, adenosintrifosfátu. Adenosintrifosfát, (dále jen ATP) je důležitý nukleotid, respektive nukleosidtrifosfát, obsahující vysoké množství energie dále využívané v široké škále buněčných procesů. Jedná se o makroergickou sloučeninu, skládající se z jedné molekuly adenosinu a třech molekul fosfátu navázaných na 5' uhlíku cukru ribózy. Proto se řadí mezi takzvané 5' ribonukleotidy. Dostatečné množství ATP v buňce je životně důležité a je potřeba ho průběžně doplňovat. S nulovou regenerací ATP by buňka přežila jen jednu až dvě minuty (Alberts, Bruce, et al. 2002). Tento klíčový jev zajišťuje mimo jiné enzym ATP syntáza, jak již bylo zmíněno výše. Endergonní enzymatickou reakcí, přesněji transferázovou, fosforyluje molekulu adenosindifosfátu (ADP) jedním monofosfátem (P_i , přesně HPO_4^{2-}). Hnací silou je proud vodíkových iontů procházejících enzymem z mezimembránového prostoru, ve snaze vyrovnat koncentrace na obou stranách membrány. Každé 3,3 až 4,4 ionty vodíku prošlé ATP syntázou dají vzniku jedné molekule ATP (David G. Nicholls, et.al. 2002). Pomocí chemické rovnice lze tento děj popsat takto:



Syntézu ATP doprovází rotace enzymové F_o domény, jenž jest ukotvena v membráně a společně s γ podjednotkou (náležící doméně F_1), tvoří tak zvaný rotor enzymu. Při opačném směru rotace dochází i k opačné exergonní chemické reakci, tedy k hydrolýze ATP a pumpování vodíkových iontů zpět do intermembránového prostoru. Tento jev se hojně vyskytuje například za anoxických podmínek.

Ve většině eukaryotických buněk je ATP tvořeno především ATP syntázou, avšak může vznikat i jinými způsoby. Například regenerací z kreatinfosfátu, či některými reakcemi glykolýzy. Tyto mechanismy však nebudou předmětem této práce, ve které se především zaměřím na ATP syntázu, respektive regulaci její aktivity ve fyziologii buňky.

Regulace ATP syntázy probíhá na dvou základních úrovních. Na úrovni genové exprese, označované jako stabilní regulace, a enzymové aktivity, známé jako dynamické regulace. Do první kategorie patří tyto mechanismy: transkripce, post-transkripční úpravy a skládání dílčích proteinových komponent enzymového komplexu. Tato skupina stabilních regulací není předmětem této práce, proto ji nebudu dále

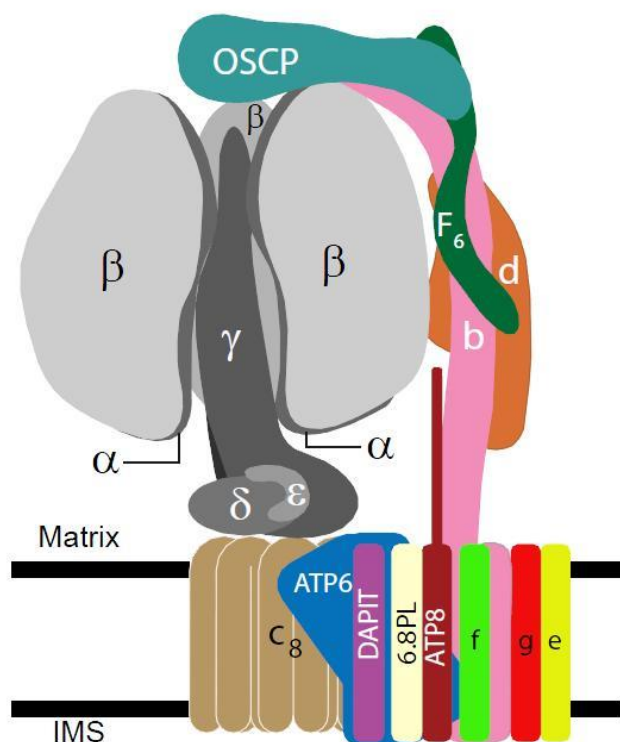
rozebírat. Druhá skupina regulací dynamických, která je předmětem této práce, zahrnuje účinky Ca^{2+} iontů, post-translačních modifikací a interakčních proteinů. Nedovolím si však opomenout regulace způsobené supramolekulárními organizacemi enzymu, dimerizaci a oligomerizaci. Interakční proteiny zmíněné dále v práci jsou: IF1, CaBI, cyklofilin D, Bcl-xL, S100A1, faktor B a PKC δ .

Kromě tvorby ATP má ATP syntáza klíčovou úlohu při buněčné smrti, zejména při otevírání mitochondriálního póru přechodné propustnosti, označovaného mPTP. Současný pohled předpokládá, že hlavní částí struktury mPTP je právě samotná ATP syntáza (Alavian et al., 2014). Jsou to pravděpodobně ATP syntázové dimery, které tvoří, respektive otevírají permeabilní přechodný pór PTP a působí vnitřní mitochondriální membránu propustnou pro malé soluty, což způsobí buněčnou smrt a dovede buňku k "bodu ze kterého není návratu." Nepříliš překvapivě je tedy aktivita ATP syntázy mimo jiné spojována s procesy stárnutí a s tím spojenými chorobami (Chin et al., 2014; Sun et al., 2014).

Cílem této práce je shrnout aktuální poznatky týkající se fyziologických regulací aktivity mitochondriální ATP syntázy, počínaje od Ca^{2+} iontů, přes interakce se skupinou určitých proteinů, až k chemickým modifikacím konkrétních aminokyselinových zbytků ATP syntázy.

2 Mitochondriální ATP syntáza

ATP syntáza se skládá celkem z 29 podjednotek 18 typů proteinů (i s IF1) a její molekulová hmotnost se pohybuje okolo 592 kDa (Abrahams et al., 1994; Cabezón et al., 2003; He et al., 2018). Nejdříve se však dělí na dvě základní domény, F_1 a F_0 . První ATP syntázová doména F_1 je vnější a zasahuje do intermembránového prostoru. Skládá se ze tří podjednotek α , tří podjednotek β a jedné podjednotky γ , která ale z části zasahuje do membrány. Druhá ATP syntázová doména F_0 je v membráně a skládá se z 8 až 10 do kruhu uspořádaných c podjednotek, a dále z f, g a e podjednotky. Obě dvě domény F_1 a F_0 jsou vzájemně propojeny periferním stonkem, složeného z více různých podjednotek (b, F₆, d, ATP6, ATP8, OSCP) a centrálním stonkem, který společně s γ podjednotkou F_1 domény, obsahuje jednu δ a jednu ϵ podjednotku. Druhá část γ podjednotky je kovalentně vázaná k membránové části F_0 , konkrétně k podjednotkám δ a ϵ . Membránová, ATP syntázová doména F_0 , tvoří cylindrickou hydrofobní strukturu složenou z c podjednotek, které jsou společně s γ , δ a ϵ podjednotkami rotující částí enzymu.



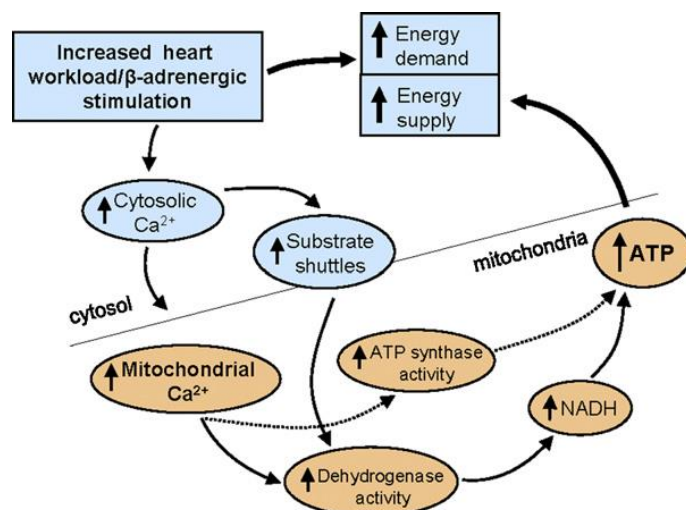
Obrázek 1. Uspořádání jednotlivých podjednotek savčí ATP syntázy, převzato z práce (He et al., 2018).

U lidí a ostatních obratlovců jsou podjednotky ATP6 a ATP8 kódovány z genů mitochondriální DNA a translatovány uvnitř mitochondrie. Ostatní podjednotky jsou kódovány v jaderném genomu, translatovány v cytoplazmě a posléze transportovány do mitochondrie.

Katalytická aktivita ATP syntázy vychází z nesouměrného uspořádání γ podjednotky vůči F_1 -ATPázové doméně. Podjednotka γ každým pootočením o 120° aktivuje vždy jednu ze třech podjednotek β do konformace náležité její lokalizaci vůči podjednotce γ . Každá β podjednotka postupně projde třemi konformacemi s několika dílčími kroky (Sekiya et al., 2017). V první zaujaté konformaci naváže β podjednotka adenosin difosfát (ADP) a volný anorganický fosfát (Pi). Následným přechodem dále mechanicky spojí obě molekuly dohromady. Vznikne tak adenosin trifosfát (ATP), který hraje klíčovou roli v mnoha enzymatických procesech. Poté přejde β podjednotka do třetího typu konformace, uvolní vzniklé ATP a umožní navázání další molekuly ADP s anorganickým fosfátem. V tomto procesu hrají důležité role specifické fosforylace α a β podjednotek (Kane et al., 2010). K syntéze ATP je potřeba hnací síla ve formě elektrochemického protonového gradientu. Pumpování protonů do intermembránového prostoru vytváří I., III., a IV. komplex dýchacího řetězce. Vzniklý elektrochemický potenciál ΔP má dvě složky, elektrickou a chemickou, přičemž v mitochondriích hraje podstatnější úlohu elektrická složka. V opačném směru rotace γ podjednotky enzym hydrolyzuje molekuly ATP a generuje protonový gradient v intermembránovém prostoru. Strukturu ATP syntázy a mechanismus syntézy ATP poprvé popsal Paul D. Boyer, J. E. Walker a J. C. Skou, za což dostali v roce 1997 Nobelovu cenu.

3 Regulace Ca^{2+} ionty

Regulace Ca^{2+} ionty je důležitým regulačním mechanismem enzymové aktivity ATP syntázy. Například v srdečním svalu se hladina intramitochondriálního Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_m$ přechodně mění v kontraktilním a relaxačním cyklu a indukuje nárůst v celkové mitochondriální ATP produkci, potřebné k udržení srdečního chodu (Bell et al., 2006). Obecně se tedy předpokládá, že Ca^{2+} aktivuje nebo inhibuje respirační řetězec, podle aktuálních energetických nároků.



Obrázek 2, funkce Ca^{2+} iontů v buňce. Převzato z práce (Tarasov et al., 2012)

Nárůst koncentrace cytosolického Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_c$ spustí aktivaci Ca^{2+} regulovaných mitochondriálních přenašečů typu uniport (MCU), pokračuje nárůstem Ca^{2+} v matrix a následně aktivuje mitochondriální dehydrogenázy (například pyruvát dehydrogenázu, viz. níže) a ATP syntázu. Rovněž je známo, že β podjednotka F_1 domény váže Ca^{2+} , ale stále není známo za jakým účelem (Hubbard and McHugh, 1996). Běžná koncentrace mitochondriálního Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_m$ je kontrolována aktivitou přenašečů MCU a odtokem Ca^{2+} , který zajišťuje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportní přenašeč (mNCX). Příjem Ca^{2+} do mitochondrie je závislý na respiraci. Vysoké míry absorpce Ca^{2+} mohou tedy účinně snížit potenciál mitochondriální membrány ($\Delta\Psi_m$) (Gunter and Pfeiffer, 1990). Tento jev je však pozorovatelný pouze u izolovaných mitochondrií, s vysokou koncentrací extramitochondriálního Ca^{2+} . U izolovaných kardiomyocytů za fyziologických podmínek, s běžným příjmem Ca^{2+} do mitochondrie, není pozorován pokles membránového potenciálu $\Delta\Psi_m$. Z toho vyplývá, že za fyziologických podmínek příjem Ca^{2+} do mitochondrie nesnižuje membránový potenciál, ani neinhibuje ATP syntézu. Přesto

však může dojít k mírným poklesům potenciálu mitochondriální membrány během zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} v jiných systémech. To může být pozorováno například v pankreatických β buňkách. Dřívější studie prováděné na izolovaných mitochondriích charakterizovaly přenašeče MCU jako nízko-afinitní, vysoko-kapacitní transportéry Ca^{2+} , zatímco antiportní přenašeč mNCX má mnohem nižší V_{max} , saturující při $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ pod 1 μM (Gunter and Pfeiffer, 1990; Nicholls and Crompton, 1980). Tedy se předpokládalo, že přítok Ca^{2+} do mitochondrie započne pouze tehdy, kdy externí koncentrace Ca^{2+} vzroste nad 500 nM, tedy mnohem výše než je běžné $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 100-200 nM (Miyata et al., 1991). Tato hypotéza byla potvrzena na krysích myocytech, neboť $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ zůstala nižší než $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, dokud se tato koncentrace externího Ca^{2+} nezvýšila na 500 nM (Miyata et al., 1991). Ve studii Tarasov et al., 2012, použili Ca^{2+} aktivovaný fotoprotein aequorin zacílený do mitochondrií (Tarasov et al., 2012). Objevili, že mitochondrie jsou schopny převzít Ca^{2+} velice rychle, díky jejich blízkosti k intracelulárním Ca^{2+} zásobám a mohou bezpečně rozeznávat mnohem vyšší koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ (Rizzuto et al., 1992). V některých buňkách se koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ mění v reakci na pouhé nanomolární změny koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, ale například v kardiomyocytech jsou reflektované změny $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ malé, většinou od 10 do 20 nM (Andrienko et al., 2009).

Jak bylo naznačeno výše, Ca^{2+} v mitochondrii aktivuje dehydrogenázy, konkrétně například multienzymový 50 MDa komplex pyruvát dehydrogenázy (PDH). Ta nevratně katalyzuje: $\text{pyruvát} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{NADH}_2 + \text{CO}_2$. Důležitý acetyl-CoA poté vstupuje do citrátového cyklu, nebo do syntézy mastných kyselin. Aktivita komplexu PDH je jedním z kroků v oxidaci glukózy a tedy má přímý dopad na celkovou rychlost buněčného dýchání a syntézy ATP v savčích tkáních (Randle, 1995).

To, že rychlost produkce ATP může být regulována nezávisle na rychlosti respirace nebo potenciálu mitochondriální membrány ($\Delta\Psi_{\text{m}}$), bylo prokázáno v intaktních krysích mitochondriích (Territo et al., 2000). Nedávné in vitro (Harris and Das, 1991) a in vivo (Scholz and Balaban, 1994) studie uváděly ATP syntázu jako potenciální cíl těchto regulací. I když se ukázalo, že ATP syntáza váže Ca^{2+} přímo (Hubbard and McHugh, 1996), je spíše pravděpodobnější, že regulace je zprostředkována přes post-translační modifikace, konkrétně fosforylace γ podjednotky, která je na mitochondriální Ca^{2+} ionty citlivá v μM rozsahu (Hopper et al., 2006). Nedávné práce však identifikovaly protein S100A1, který se váže k ATP syntáze Ca^{2+} dependentním způsobem a působí tak nárůst v syntetické produkci ATP (Boerries et al., 2007).

4 Interakční partneři ATP syntázy

Některé proteiny asociují s ATP syntázou, přičemž nejsou její stabilní součástí nebo podjednotkou a jsou často zapojené do regulace její aktivity. V *tabulce 1* jsou shrnuty interakční proteiny ATP syntázy a jejich potenciální funkce v regulaci enzymové aktivity.

Tabulka 1

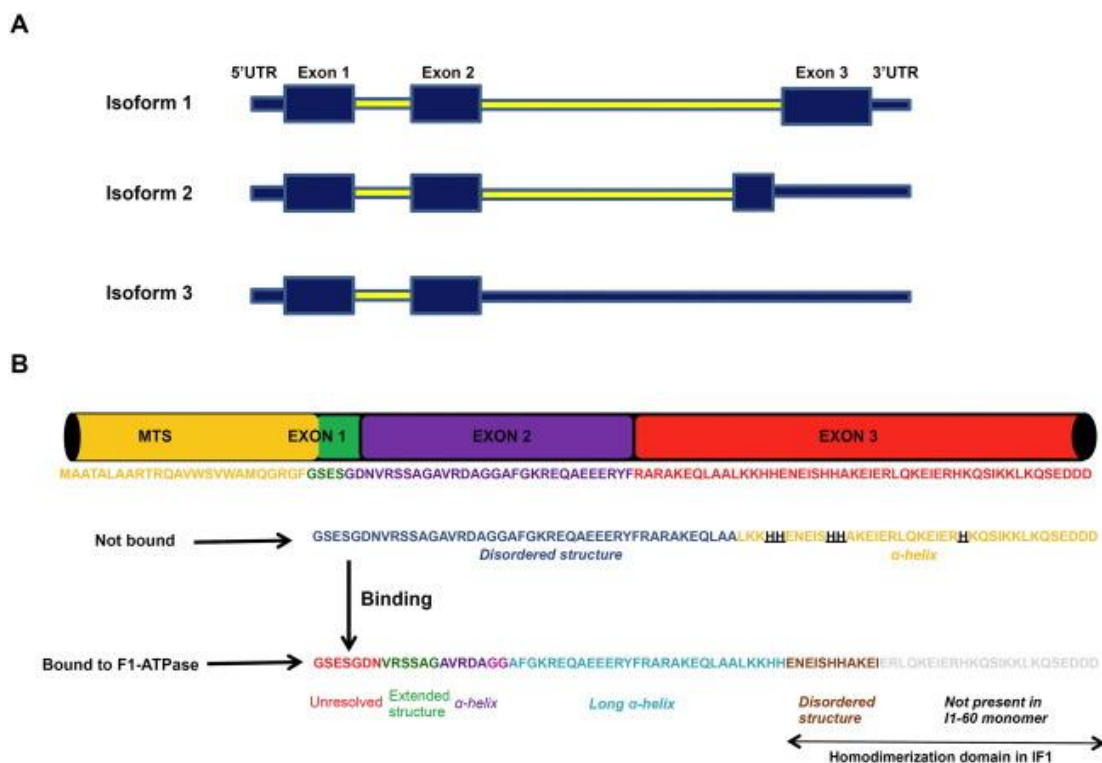
Interakční partner	Interakce	Funkce	Citace
IF1	F ₁ α, F ₁ β	Inhibice hydrolytické aktivity ATP syntázy	(García-bermúdez and Cuezva, 2016)
Cyklofilin D	OSCP, podjednotka d a podjednotka b	Inhibice chodu ATP syntázy a inhibice aktivity mPTP	(Bernardi et al., 2015a)
Bcl-xL	F ₁ α, F ₁ β	Otevírání mPTP a apoptóza	(Formentini et al., 2014)
S100A1	F ₁ α, F ₁ β	Nárůst syntézy ATP	(Boerries et al., 2007)
Faktor B	F ₁ α, OSCP	Komponent pro formování komplexů ATP syntázy a nárůst syntézy ATP	(Belogradov, 2010)
PKCδ	Podjednotka d	Inhibuje syntézu ATP	(Harischandra et al., 2014)
CaBI	F _O doména	Nárůst syntézy a inhibice hydrolýzy ATP	(Yamada and Huzel, 1989)

4.1 Inhibiční faktor 1 (IF1)

Inhibiční faktor 1 byl objeven v roce 1963, Pullmanem a Monroym (Pullman and Monroy, 1963) v mitochondriích hovězího srdce. Dnes již však bylo izolováno mnoho homologních IF1 například u člověka (Ichikawa et al., 1999), potkanů (Chan and Barbour, 1976), kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Hashimoto et al., 1981), *Candida utilis* (Satre et al., 1975) a rostlin (Norling et al., 1990). Inhibiční faktor 1 je malý, tepelně stabilní protein o velikosti přibližně 10 kDa (Faccenda and

Campanella, 2012). U savců je zralá forma polypeptidu složena z aminokyselinových zbytků, pohybujících se v rozmezí od 81 u lidí, myší, šimpanzů a psů, až po 84 aminokyselin například u skotu. Inhibiční faktor 1 nacházíme převážně v mitochondriích, přestože některé studie naznačují, že je IF1 přítomen i v cytosolu a na plazmatické membráně (Cortés-Hernández et al., 2005) a rovněž bylo ukázáno, že je sekretován do extracelulárního prostředí za účelem modulace aktivit endotelových buněk (Burwick, Wahl, Fang, 2005).

Inhibiční faktor 1 je kódován ATPIF1 genem lokalizovaným u lidí a myší na chromozomech 1 a 4, a je syntetizován jako propeptid nesoucí vysoce konzervovanou N-koncovou pre-sekvenci, důležitou pro finální transport do mitochondrie. Alternativním sestřihem primárního transkriptu lidské IF1 mRNA, můžou vzniknout tři různé mRNA lišící se délkou a sekvencí a mohou tak tvořit tři různé izoformy proteinu. Nejdelší IF1 protein (12,24 kDa, pI 9,34) vychází z izoformy 1, obsahující tři exony a krátkou nepřekládanou oblast 3'UTR. Taktéž mRNA izoforma 2



Obrázek 3, A) mRNA izoformy IF1; B) genové oblasti, exony; převzato z práce (García-bermúdez and Cuezva, 2016)

(7,91 kDa, pI 7,96) obsahuje tři exony, avšak poslední z exonů je odlišný, což při translaci vede ke kratšímu proteinu s odlišnou C-koncovou sekvencí. Poslední izoforma 3 se překládá do nejkratšího proteinu IF1 (6,59 kDa, pI 8,34) a obsahuje jen

první dva exony s velmi dlouhou 3'UTR. Tyto tři proteiny s délkami aminokyselinových řetězců 106, 71 a 60, jsou však po transportu do mitochondrie kratší, neboť poté dochází ke štěpení N-terminální, 25 aminokyselinové mitochondriální cílové sekvence.

Inhibiční faktor 1 interaguje s katalytickou podjednotkou ATP syntázy, přičemž nekompetitivně inhibuje hydrolýzu ATP za podmínek podporujících reverzní aktivitu enzymu (Faccenda and Campanella, 2012). Když je H^+ elektrochemický gradient zredukován, například při hypoxických, či ischemických stavech, mění enzym svoji syntetickou aktivitu na hydrolyzační, s účelem přechodně obnovit snížený protonový gradient $\Delta\Psi_m$ (Harris et al., 1979; Lippe et al., 1988). Inhibiční faktor 1 se tedy váže na vazebné místo v katalytické doméně F_1 mezi α a β podjednotkou, hluboko zasahujíc směrem do středu domény v zarovnání s α -helixy, umístěnými na C-konci α a β podjednotek. V této pozici interaguje N-konec IF1 s oblastí podjednotky γ , která zaujímá konformaci nadšroubovicového vinutí a zastavuje chod ATP syntázy (Cabezón et al., 2001; Cabezón et al., 2003; Gledhill et al., 2007). Tento regulační protein je tedy nepostradatelnou složkou v ochraně buňky před úplným vyčerpáním ATP a apoptózou. Aktivita IF1 je silně ovlivňována pH (Vinogradov and Panchenko, 1985) a především při nízkém pH je jeho inhibiční aktivita nejsilnější, což je právě při hypoxických a ischemických stavech. Inhibiční faktor 1 se váže na polární F_1 doménu, ve stechiometrii 1:1 v přítomnosti Mg^{2+} a ATP (Green and Grover, 2000). Bránění hydrolýze je důležité, aby nedošlo k již výše zmíněnému vyčerpání buněčného ATP.

Dlouho bylo IF1 považováno čistě za inhibitora hydrolytické aktivity ATP syntázy, avšak novější studie ukazují, že při potlačení IF1 exprese došlo v buňkách k nárůstu celkové koncentrace ATP (García-bermúdez and Cuezva, 2016), (Kahancová et al., 2018). Rovněž bylo dokázáno, že při overexpresi IF1 došlo ke snížení koncentrace buněčného ATP a metabolismus buněk se značně podobal metabolismu rakovinných buněk, především využívajících energii z glykolýzy (Esparza-Moltó and Cuezva, 2018). Nicméně úloha IF1 v inhibici syntetické aktivity zatím nebyla jednoznačně akceptována.

Jak bylo naznačeno výše, v případě rakovinných, ale i embryonálních, či nediferenciovaných buněk nalézáme vícero odlišností od běžných buněk, například převažující glykolytický metabolismus a značně sníženou mitochondriální respiraci. Navýšení glykolýzy v rakovinných buňkách je často doprovázeno zvýšenou expresí IF1, oproti běžným vzorkům primárních buněk (Sánchez-Cenizo et al., 2010), (Sánchez-Aragó et al., 2013). Zvýšená exprese IF1 posléze vede ke snížení mitochondriální syntézy ATP a zvýšení metabolismu glykolýzy. V opačném případě,

kdy potlačíme expresi IF1, dochází ke snížení glykolýzy a nárůstu v metabolismu oxidativní fosforylace (Sánchez-Cenizo et al., 2010). Podstatné je, že při inhibici oxidačního řetězce dochází k mitochondriální hyperpolarizaci, kvůli zamezenému zpětnému toku H^+ iontů zpět do matrix (Santamaría et al., 2006), (Sánchez-Aragó et al., 2013). Mitochondrie poté začne produkovat superoxidové radikály (ROS), které posléze mohou být příčinou buněčné smrti. Reaktivní kyslíkové radikály také mohou mít kromě apoptotických účinků tkáňově specifické mitohormické účinky. Mitohormeze obecně je adaptační jev buňky na stresové podmínky. Nedávné výzkumy prokázaly, že zvýšená exprese IF1 v rakovinných buňkách běžně není dobrým indikátorem pro přežití pacientů, konkrétně v tumorech jater, močového měchýře a střeva, avšak jsou tkáně, ve kterých naopak zvýšená exprese IF1 měla účinky pozitivní (Esparza-Moltó and Cuezva, 2018). V jaterním tumoru podporovalo IF1 angiogenezi a metastáze, v močovém měchýři a střevě zvýšenou proliferaci buněk (Ruipeng et al., 2014). Účinky IF1 byly pozorovány i v případě anémie, konkrétně s negativním vlivem na syntézu hemu (Jouaville et al., 1999). Mitochondriální myopatie zvaná Luftova nemoc je neuronálního původu a je provázená absencí IF1. Charakteristická je ne-thyroidním hypermetabolismem a poškozenými kristami. Bazální ATP syntázové aktivity u jednoho ze dvou pacientů byly sedmkrát vyšší, než v normálních zdravých buňkách (DiMauro et al., 1976). Inhibiční faktor 1 také ovlivňuje oligomerizaci ATP syntáz, čímž by stabilizoval strukturu krist (Formentini et al., 2014).

4.2 Protein kináza C δ

Protein kináza C δ , která je Ca^{2+} signálním proteinem, může regulovat aktivitu ATP syntázy navázáním k d podjednotce F_o domény (Nguyen et al., 2008, 2010). Interakcí s podjednotkou d inhibuje syntézu ATP. Protein kináza C δ sehrává důležité proteolytické úlohy v prionových onemocněních a její zvýšená exprese vede k indukci apoptózy (Harischandra et al., 2014; Zhao et. al, 2012).

4.3 Faktor B

Již od prvních studií byl faktor B uznán jako základní součást mechanismu odpovědného za energetickou syntézu ATP. Zdálo se, že leží na pomezí přenosu energie mezi respiračním řetězcem a komplexem ATP syntázy. Novější studie odhalily funkci faktoru B při formování mitochondriálních krist a tedy mitochondriální

morfologii. Dimery ATP syntáz na apikálních vrcholech krist společně s tetramery faktoru B, mohou být prostředkem ke zvýšení účinnosti konečného kroku oxidativní fosforylace v živočišných mitochondriích (Belogradov, 2009). Některé studie ukázaly, že přidáním rekombinantního lidského faktoru B, se zvýšila výměnná aktivita komplexu ATP- P_i přibližně 2,5krát (Belogradov 2002), tedy se může jednat o významný fyziologický prvek, v regulaci ATP syntázové aktivity.

4.4 Cyklofilin D

Tento protein patří do cyklofilinové rodiny chaperonů. Může se konstitutivně vázat na ATP syntázu a tím snižovat syntetický i hydrolytický chod enzymu. Tyto regulace jsou konkrétně zprostředkovávány interakcí cyklofilinu D s laterálním ramenem ATP syntázy. Interaguje přes podjednotky periferního stonku OSCP, b a d, a tím snižuje hydrolázovou aktivitu ATP syntázy (Giorgio et al., 2009). Cyklofilin D mimo jiné hraje zásadní úlohu v procesech buněčné smrti. Cyklosporin A se váže na cyklofilin D a ten potlačuje aktivitu mPTP, čímž může konečné apoptóze zabránit (Forte and Bernardi, 2011).

4.5 CaBI - 6,8 kDa proteolipid

Dřívější studie dokázaly, že Ca^{2+} reguluje ATP syntázu přes 6,8 kDa protein CaBI, který interaguje s její F_o doménou (Yamada and Huzel, 1988). Aktivní CaBI potom stimuluje syntézu ATP a inhibuje hydrolýzu ATP (Yamada and Huzel, 1989). To však funguje jen v případě fyziologické mitochondriální hladiny membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) (Yamada and Huzel, 1988).

4.6 S100A1

Protein S100A1, také známý jako Ca^{2+} vázající protein, se nejhojněji vyskytuje na Z discích svalových sarkomer a na sarkoplasmatickém retikulu. Možná se do budoucna jedná o vhodného kandidáta pro genovou terapii post-infarktických srdečních tkání, díky jeho rozmanitým regulačním funkcím. Protein S100A1 interaguje s F_1 doménou ATP syntázy a podporuje její syntetické mechanismy Ca^{2+} dependentním způsobem (Boerries et al., 2007).

5 Post-translační modifikace

Post-translační modifikace, dále jen PTMs, patří mezi zásadní mechanismy, tvořící diverzitu funkcí, struktury a stability proteinů v buňce. Strukturální změny proteinů provedené po translaci, esenciální pro jejich funkci, nalézáme v buňce dvojího typu: vratné a nevratné. Můžeme je zhruba rozdělit do čtyř skupin: 1) proteolytické změny, konkrétně štěpení proteinu na kratší polypeptidové řetězce, případně aminokyseliny; 2) přidání proteinu/peptidu ubiquitynylací; 3) přidání neproteinové organické molekuly jako jsou cukry (glykosylace), nebo hydrokarbonáty (isoprenylace); 4) chemická modifikace, vzniklá navázáním nové funkční skupiny, nebo transformací existujícího zbytku aminokyselinového postranního řetězce. Poslední skupina umožňuje široké možnosti variací modifikací, jako například: acylace, acetylace, metylace, fosforylace, hydroxylace, sulfhydratace a NO-protein interakce. Tato skupina je aktuálně považována za nejdůležitější typ modifikací, umožňující rozsáhlé enzymatické funkce (Wang et al., 2013).

Tabulka 2. Post-translační modifikace ATP syntázy

Typ PTM	Interakce	AK zbytky	Fyziologický význam
Fosforylace	α , β , γ , e, f, c, A6L, (IF1)	α Ser-184, α Ser-419, α Thr-432, β Ser-106, β Ser-263, β Thr-312, β Thr-368 a Tyr-52, $_{IF1}$ Ser-39, $_{IF1}$ Ser-63	inhibice/indukce ATP syntézy, flexibilita perif. stonku, funkce mPTP, konformační změny při syntéze ATP
Acylace a acetylace	α , β , γ , OSCP	$_{OSCP}$ Lys-139, β Lys-430, β Lys-209	snížení syntézy ATP, zvýšení u deacetylace
Methylace	c	$_c$ Lys-43	stabilizace F_O rotoru v membráně
Nitrace	β	β Tyr-345, β Tyr-368, β Phe-424, β Glu-188	inaktivace ATP syntázy
Cys-redoxní modifikace	α , c	α Cys-251, α Cys-201, α Cys-78, $_c$ Cys-65	inhibice/indukce ATP syntézy, mPTP

Nemalá část post-translačních modifikací (PTMs) má pravděpodobně spojitost s modulací mPTP přes cyklofilin D. Fosforylace a acetylace cyklofilinu D glykogensyntáza kinázou-3 a sirtuin-3 (SIRT3) může otevírat kanál mPTP. Opačně, specifické cys-nitrosylace cyklofilinu D mohou mPTP inhibovat. Zdá se, že komplexní síť acetylací, fosforylací a nitrosylací na enzymovém komplexu, významně ovlivňuje otevírání mPTP kanálu (Shulga and Pastorino, 2010).

5.1 Fosforylace

Proteinová fosforylace je pravděpodobně nejznámějším, regulačním mechanismem, který nacházíme u eukaryot, i prokaryot. Jedná se o vznik esterové vazby mezi fosfátovou skupinou a hydroxylovou skupinou (OH) aminokyselin serinu, threoninu, nebo tyrosinu. Při fyziologickém pH nese fosforylová skupina dva negativní náboje, čímž utváří vysoce polární strukturu, a výrazně mění funkce enzymatické aktivity. Jedná se o takzvanou allosterickou regulaci. Fosforylaci proteinů provádí proteinkinázy, defosforylaci fosfatázy. V případě fosforylace ATP syntázy nalézáme šedesát sedm různých fosforylací na dvanácti různých podjednotkách (Covian and Balaban, 2012). Mohlo by se tedy zdát, že tento typ PTM, tak jako i v jiných biologických systémech, hraje hlavní roli v regulaci enzymové aktivity. Fosforylace často vyžaduje výskyt alkoholových skupin, konkrétně serinových, nebo threoninových zbytků. Většinu fosforylací nacházíme na hydrofilní F_1 doméně mitochondriální ATP syntázy, podle všeho se tedy hlavní podíl regulace zaměřuje na katalýzu. Transmembránové podjednotky c, e, f a ATP6 taktéž obsahují fosforylační místa, přičemž tři fosforylační místa se vyskytují na přídatné podjednotce IF1 a na faktoru B (Covian and Balaban, 2012). Konkrétní dvě fosforylační místa na lidském IF1 (Ser-39 a Ser-63), však nenalézáme u žádných jiných živočišných forem. Fosforylace na Ser-39 pravděpodobně řídí navázání IF1 na ATP syntázu (Gledhill et al., 2007). Fosforylace Ser-39 na N-terminálním konci IF1, zabraňuje jeho α -helixu navázání na β podjednotku ATP syntázy. Oproti známé funkci Ser-39, role fosforylace na Ser-63 nejsou známy (Covian and Balaban, 2012). Zdá se být zřejmé, že biologický význam fosforylace α i β podjednotky, reguluje mechanismy vazebních změn při katalýze (Kane et al., 2010). Fosforylační místa na α podjednotce se skládají pouze ze serinových, nebo threoninových zbytků. V izolovaných mitochondriích z myšího srdce jsou tyto aminokyselinové zbytky na N-terminálních koncích důležité pro započítí interakce s OSCP podjednotkou statoru enzymu (Rees et al., 2009). Fosforylace serinových

zbytků na α podjednotce v těsné blízkosti β podjednotky na lidských svalových mitochondriích, prasečích a myších srdečních mitochondriích vzrůstají, pokud jsou mitochondrie vyživovány ATP (Zhao et al., 2011). Nicméně, během uzavírání katalytické domény se zapojují pouze fosforylace α Ser-184, α Ser-419 a α Thr-432 (Covian and Balaban, 2012). Na králičí β podjednotce ATP syntázy, fosforylace β Ser-106, β Ser-263, β Thr-312 a β Thr-368, zajišťuje správné sestavení monomerního komplexu ATP syntázy a fosforylace β Ser-106 a β Ser-263 snižuje ATP syntázovou aktivitu, zatímco fosforylace β Thr-312 blokuje ATP syntázu úplně. Fosforylace Tyr-52 na γ podjednotce může měnit torzní mechanismy zodpovědné za konformační změny hexameru $\alpha_3\beta_3$ a bránit tak rotaci rotoru (Francesca et al., 2006). Dále se předpokládá, že fosforylace podjednotek periferního stonku modulují flexibilitu statoru, případně ovlivňují dimerizaci enzymů (Covian and Balaban, 2012). Nedávné výzkumy poukázaly také na c podjednotky ATP syntázy, hrající důležité role při funkcích mPTP. Fosforylace c podjednotek proteinkinázou A (PKA) stimuluje aktivitu ATP syntázy, zatímco Ca^{2+} ionty a CsA-senzitivní defosforylace mohou podpořit otevření kanálu mPTP (Azarashvili et al., 2014).

5.2 Acylace a acetylace

Ac(et)ylace obvykle přidává ac(et)ylovou skupinu, přenesenou z ac(et)yl koenzymu A na ϵ amino skupinu lysinu, který nese kladný náboj. Neutralizace lysinu zruší elektrický náboj a může změnit biologické předpoklady celého proteinu. Podobně acetylace histonů je známá jako reversibilní, epigenetický mechanismus, regulující přístupnost DNA. Nehistonové acetylace hrají srovnatelně důležité role, v modulaci metabolismu, cirkadiálních rytmech a buněčném cyklu. Acetylace je reversibilní, prováděná lysin acetyl-transferázami a deacetylázami, nebo také neenzymatickými mechanismy (Menzies et al., 2015).

V regulaci ATP syntázy hrají acetylace lysinu velmi důležité role. Podjednotky α , β , γ a OSCP přirozeně obsahují acetyl-Lys, který může podstoupit reverzibilní acetylaci (Vassilopoulos et al., 2013). Acetylace ATP syntázy je řízena skupinou NAD^+ -dependentních lysinových deacetyláz, sirtuinů (SIRT). V mitochondriích nacházíme tři ze sedmi známých sirtuinů, konkrétně SIRT3, SIRT4 a SIRT5 (Morris, 2013). Z těchto tří však pouze SIRT3 vykazuje deacetylázovou aktivitu a vůbec řízení lysinové deacetylace v mitochondriích (Lombard et al., 2007). Acetylace podjednotek ATP

syntázy je doprovázena snížením enzymové aktivity. Tedy SIRT3, jakožto NAD⁺-dependentní deacetyláza, funguje v podmínkách s nízkou koncentrací živin. Hladovění, nízkokalorický příjem v potravě a sport podporují deacetylaci ATP syntázy, zatímco vysoký příjem tuků a kalorií obecně, její acetylaci podporuje (Vassilopoulos et al., 2013). Sirtuin 3 se váže a deacetyluje Lys-139 podjednotky OSCP, která náleží perifernímu stonku, zajišťující spojení mezi F₁ a F₀ doménou (He et al., 2018), a působí nárůst v ATP syntázové aktivitě (Vassilopoulos et al., 2013), (Wu et al., 2013). V průběhu stárnutí dochází ke zhoršení, někdy i poškození aktivity ATP syntázy a snížení deacetylase OSCP pomocí SIRT3 (Vassilopoulos et al., 2013), což dále vede ke zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) v mitochondriích. Reaktivní kyslíkové radikály jsou významnými stimulanty v otevírání mPTP, a to může být pro buňku fatální. Zdá se, že acetylase OSCP neutralizací pozitivního náboje lysinu a tedy celkové zvýšení hydrofobicity, způsobí konformační změny, hrající podstatné role při vázání cyklofilinu D. Oxidativní stres snižuje expresi SIRT3, tedy nepřímo podporuje OSCP acetylaci a vázání cyklofilinu D, vedoucí k otevření mPTP (Bernardi et al., 2015b).

Katalytická aktivita ATP syntázy je též silně redukována acetylací podjednotek β (Rahman et al., 2014). V tomto případě, Lys-209 a Lys-430 β podjednotek je hyperacetylován také díky nepřítomnosti SIRT3. Nahrazení jednoho až dvou lysinů kyselinou glutamovou (Glu) může acetylaci připomínat, a tedy může snižovat aktivitu enzymu. Pokud však dojde k nahrazení za arginin (Arg), který nese pozitivní náboj, chová se systém jako při deacetylaci a dochází k nárůstu enzymové aktivity (Rahman et al., 2014). Zdá se, že acetylase může podobně jako fosforylace, vést až ke konformačním změnám v samotném aktivním místě enzymu (Rahman et al., 2014).

5.3 Methylace

Pro methylovou i acetylovou modifikaci je zásadní výskyt metabolitů, jako je S-adenosylmethionin a acetyl-CoA, které fungují jako jedno, nebo dvou-uhlíkaté donory ve smyslu substrátu (Su et al., 2016). Proteinová methylace znamená především přidání methylové skupiny na lysin, nebo arginin a působí tak lokální nárůst hydrofobicity. Tyto dvě aminokyseliny mohou být methylovány až třemi methylovými skupinami najednou (mono-, di-, trimethylace). Proces methylace je zprostředkováván a řízen pomocí methyltransferáz a demethyláz (Black et al., 2012).

V případě ATP syntázy se methylace týkají především F_0 domény, konkrétně prstence c, tedy do kruhu uspořádaných podjednotek c, tvořící rotor enzymu. Podjednotky c patří mezi proteolipidy a řadí se mezi nejhydrofóbnější proteiny doposud nalezené v přírodě (Fillingame, 1976; Watt et al., 2010). V polární oblasti c podjednotky (hydrofilní, nebo-li polární smyčky) se nachází lysinový zbytek Lys-43, který je trimethylován na ϵ -aminoskupině (Chen et al., 2004). Trojitá methylace tvoří z polární smyčky hydrofóbní prostředí a umožňuje tak vázání kardiolipinu na ATP syntázu (Walpole et al., 2015). Přestože se kardiolipin může vázat i na jiné aminokyselinové zbytky, jako třeba ϵ -Lys-7, vypadá to, že upřednostňuje výše zmíněný a trojitě methylovaný ϵ -Lys-43 (Duncan et al., 2016). Lysinová trimethylace zabraňuje asociaci jiných fosfolipidových skupin, respektive si zařídí vazebné místo, speciálně pro kardiolipin. Navázaný kardiolipin na trimethylovaný Lys-43 stabilizuje c-prsteneček v membráně a napomáhá jeho rotaci v rámci lipidového prostředí. Navíc, kardiolipin navázaný na trimethylovaný ϵ -Lys-43, obohacený fosfolipidovým negativním nábojem, může usnadnit přechod protonů. Aminokyselinový zbytek ϵ -Lys-43 je velice důležitý pro správnou funkci ATP syntázy a jeho trimethylace je více než vhodný nástroj k přednostnímu vázání kardiolipinu, který beze sporu patří mezi hlavní regulátory aktivity membránově vázaného mitochondriálního enzymu, díky protein-lipidové interakci.

5.4 ATP syntázová nitrace tyrosinu

Nitrooxidativní stres obecně často vyvolává post-translační modifikace na tyrosinových zbytcích (Lancaster, 2006). Speciálně 3-nitro-Tyr, které nalézáme na ATP syntáze, představují známý ukazatel nitrooxidativního stresu (Aulak et al., 2001). V β podjednotce nacházíme nitrované tyrosiny obvykle dva odlišné: β Tyr-345 a β Tyr-368. Obě tyto nitrace působí inaktivaci chodu ATP syntázy. Nitrace β Tyr-368 je silnější než β Tyr-345 a působí silnější inaktivaci ATP syntázy a nitrace obou tyrosinových zbytků působí její kompletní inaktivaci (Fujisawa et al., 2009). C-nitrace β Tyr-345 jedné β podjednotky vypůsobí inaktivaci ATP syntázové aktivity a nitrace všech tří β podjednotek působí její kompletní inaktivaci (Bullough and Allison, 1986a, 1986b). Vzhledem ke krystalové struktuře F_1 domény, β Tyr-345 a β Tyr-368 náleží ke katalytické β i nekatalytické α podjednotce (Abrahams et al., 1994). Konkrétně β Tyr-345 a β Phe-424 utvářejí oblast ("kapsu"), v níž dochází k mechanické tvorbě, či hydrolýze ATP (Rees et al., 2012). Nitrace však destabilizuje vázání nukleotidu a brání tak hydrolýze

ATP. Navíc, Mg^{2+} iont nemůže v přítomnosti β Tyr-345 elektrostaticky interagovat s β fosfátem ATP. Tedy dále v rámci F_1 domény jsou potřebné konformační signály pro hydrolyzu destabilizovány (Weber and Senior, 1997). Nekatalytické oblasti váží ATP v uzavřené konformaci. Aminokyselinový zbytek β Tyr-368 je klíčovým aminokyselinovým zbytkem, který přispívá k vázání nukleotidu na α podjednotce, ale pokud je nitrován, mění se pozice některých aminokyselin takzvaného "Walker A" motivu, tudíž nekatalytické oblasti jsou drženy v otevřené konformaci, která způsobí odloučení ATP z podjednotky α . V opačném případě se α podjednotka vyskytuje jen v uzavřené konformaci, aby zamezila inhibici ADP v katalytickém místě β podjednotky (Weber et al., 1995).

Dalším známým post-translačním modifikátorem tyrosinových zbytků ATP syntázy jsou reaktivní dusíkaté sloučeniny (RNS), speciálně oxid dusičitý (NO_2). Radikálový NO_2 podporuje kombinaci dvou sousedních tyrosinů na ATP syntáze za účelem vzniku dityrosinu. Účinek na aktivitu ATP syntázy závisí na dvojvazném kationtu navázaném na katalytické místo (Nesci et al., 2016). V důsledku tvorby dityrosinu dojde k inhibici Ca-dependentních funkcí ATP syntázy, zatímco Mg-dependentní procesy zůstávají nedotčené (Nesci et al., 2017a). Nepřímá nekompetitivní inhibice spuštěná tvorbou NO_2 ukazuje, že tvorba komplexu enzym-ATP probíhá současně s tvorbou tyrosylových radikálů indukovaných NO_2 . Tvorba dityrosinu tedy zahrnuje generování dvou aromatických tyrosylových radikálů a jejich spojení, které je podpořeno konformační změnou $\alpha_3\beta_3$ podjednotek během hydrolyzy ATP (Boyer, 2002; Nesci et al., 2016). Předpokládáme-li, že Ca-dependentní režim ATP syntázy se podílí na otevírání kanálu mPTP a následných letálních událostech, pak selektivní nitrátová inhibice mitochondriální ATP syntázy, v případě regulace Ca^{2+} , může představovat ochrannou enzymatickou strategii v řízení buněčné smrti a cytotoxické reperfuze (Nesci et al., 2017b).

Ve výsledku tedy C-nitrace β Tyr-345 a β Tyr-368 negativně ovlivňuje výměnné mechanismy na F_1 doméně (Fujisawa et al., 2009). Z kinetických analýz je vidět, že nitrace β podjednotek vykazuje chování nekompetitivního inhibitoru, což vyvolává pokles enzymatické aktivity a působí invariance v afinitě k substrátu. Nitrace β podjednotek jsou spojeny se sníženou katalytickou aktivitou a významně urychlují procesy stárnutí (Haynes et al., 2010).

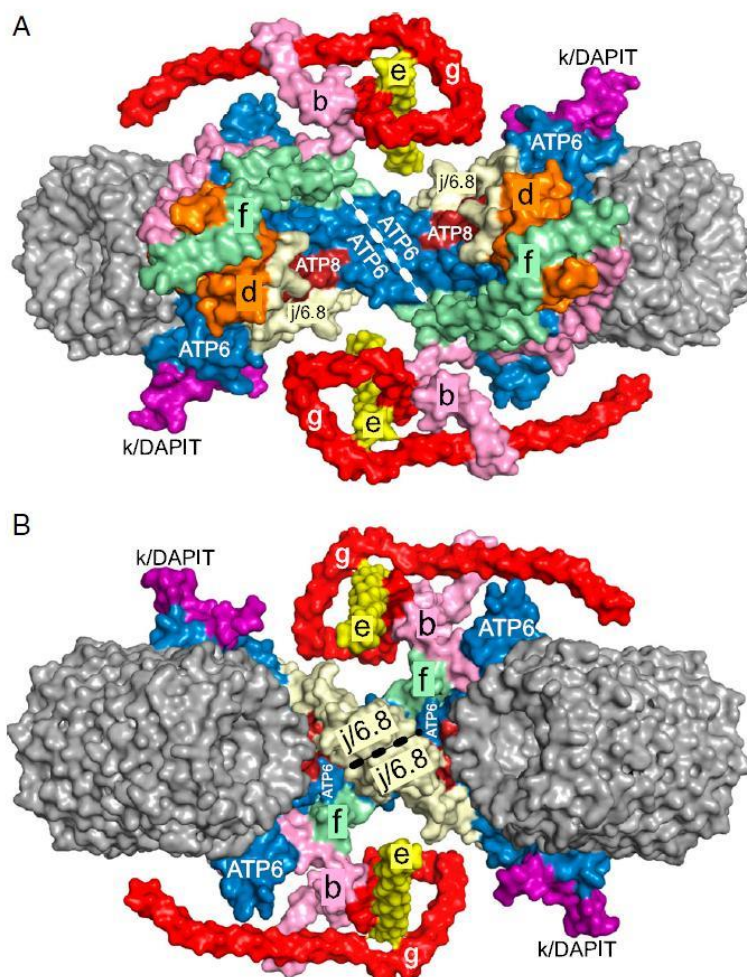
5.5 Cysteinové redoxní reakce

Cysteinové sirmé alkoholy, nebo-li thioly (dříve merkaptany), jsou podle všeho nejuniverzálnější skupinou, která může podstoupit širokou škálu různých post-translačních modifikací. Tak jako u všech předešlých PTMs, jsou i tyto poměrně nedávno popsane tvorby hydropersulfidů velice důležitou regulační složkou enzymových aktivit. Například u pacientů se srdečním onemocněním se funkce ATP syntázy mění v důsledku cysteinové oxidace a tvorby disulfidů, zejména na cysteinech podjednotek α . Disulfidové vazby se tvoří konkrétně na α Cys-251 mezi dvěma α podjednotkami a mezi α a γ podjednotkou na α Cys-251 a γ Cys-78 (Zweier et al., 2011). Obě disulfidové vazby znamenají u pacientů se srdečním onemocněním pokles enzymové aktivity a sníženou produkci ATP (Wang et al., 2011). Kardioprotekce a navýšení syntetické aktivity ATP syntázy se naopak projevuje u S-nitrosací na α Cys-251 a γ Cys-78 (Chouchani et al., 2013).

Změny redoxního potenciálu cysteinových thiolů F_O domény činí ATP syntázu odolnou proti mnohým F_O doménovým inhibitorům (Nesci et al., 2014). To mohou způsobit kovalentní vazby některých kovů. Například již dlouho známý tributyltin (TBT), který je známý svou inhibiční schopností v interakci s F_O doménou enzymu (Dawson and Selwyn, 1975). Tributyltin se kovalentně, reverzibilně váže k Cys-65 na C-terminálním α -helixovém konci podjednotky c a učiní tak ATP syntázu odolnou proti jinak silnému inhibitoru syntetické aktivity enzymu, oligomycinu (Nesci et al., 2011; Salvatore et al., 2012; von Ballmoos et al., 2004).

6 Supramolekulární organizace ATP syntázy, oligomerizace

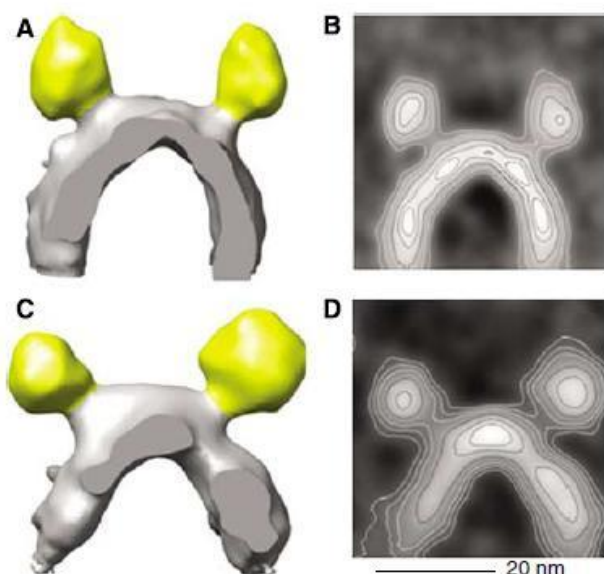
Poprvé byla struktura ATP syntázových dimerů popsána v roce 1998 na modelu kvasinek (Arnold et al., 1998). Je známo, že podjednotky F_0 domény ATP6, ATP8 a f hrají roli v indukci dimerizace ATP syntázy. DAPIT a podjednotka b v periferním stonku enzymu, je známa svoji významnou úlohou, v indukci vyšších oligomerů ATP syntázy (He et al., 2018). Oligomery ATP syntáz působí zakřivení membrány na apikálních



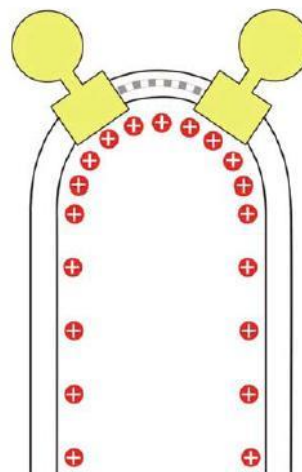
Obrázek 4, model ATP syntázových dimerů a jednotlivých podjednotek. V šedé barvě jsou podjednotky c, ostatní mají vlastní popisky. A) pohled na ATP syntázové dimery z matrix; B) pohled z intermembránového prostoru. Převzato z práce (He et al., 2018).

vrcholech krist a umožňují tak zakoncentrování protonů v těchto apikálních vrcholech. Byla tedy vyslovena hypotéza, že dimerizace ATP syntázy a posléze oligomerizace,

zvyšuje účinnost syntézy ATP oproti monomerním enzymům (Strauss et al., 2008), především kvůli zakoncentrování protonů v apikálních vrcholech krist.



Obrázek 5, model ATP syntázových dimerů z elektronové tomografie. A) dimery z krysích jater; C) dimery v hovězím srdci; B, D) početní pole úhlů. Převzato z práce (Strauss et al., 2008)



Obrázek 6, hustota výskytu protonů v blízkosti dimerů na apikálním vrcholu kristy, převzato z práce (Strauss et al., 2008)

Úhel, který svírají dva protilehlé centrální stonky dimeru ATP syntázy, se běžně pohybuje okolo 70° , převážně v rozmezí 55° až 95° (Strauss et al., 2008). Záleží na celkovém rozložení membrány. Zakřivení membrány významně ovlivňují též fosfolipidy a přes různorodost fosfolipidů vykazuje konkrétně kardiolipin unikátní dimerickou strukturu, jejíž kuželovitý tvar indukuje negativní zakřivení vnitřního listu membrány (Huang and Ramamurthi, 2010). Spojení s trimetylovaným Lys-43 c-prstence na matrixové straně membrány, by mohlo pomáhat v zakřívování krist na místech výskytu oligomerů ATP syntáz a usnadnit jejich skládání do dimerních superkomplexů, které tvoří lineární řady na apikálních vrcholech krist (Dudkina et al., 2005).

7 Závěr

Mitochondriální ATP syntáza je složitý enzymový komplex, jehož aktivita je životně důležitá pro správné fungování buňky. Cílem této práce bylo shrnout poznatky o regulačních prvcích aktivity ATP syntázy a poukázat na jejich fyziologický význam. Škála těchto mechanismů je široká, počínaje přímou regulací ionty, přes interakce s určitými proteiny, až po chemické modifikace konkrétních aminokyselinových zbytků enzymu.

Regulace ATP syntázy Ca^{2+} ionty je všeobecně dobře akceptovaným jevem, který byl v minulosti hojně studován. Většina studií týkajících se regulace hladiny ATP pomocí Ca^{2+} iontů byla prováděna na kardiomyocytech, avšak kvůli technické náročnosti měření zatím nebyly tyto mechanismy zcela objasněny.

Zřejmě nejrozmanitějším regulačním mechanismem ATP syntázy jsou post-translační modifikace, které patří mezi zásadní mechanismy, tvořící diverzitu funkcí, struktury a stability proteinů v buňce. Podílejí se například na samotné katalytické aktivitě ATP syntázy, neboť konkrétně zajišťují konformační změny jednotlivých podjednotek F_1 domény. Jejich funkční rozsah je velmi široký a sahá až po kompletní inhibici chodu ATP syntázy. Dá se předpokládat, že vzhledem k velikosti a složitosti ATP syntázy bude počet objevených post-translačních modifikací fyziologicky regulujících její aktivitu v budoucnu dále narůstat.

V poslední době se do popředí zájmu dostávají také proteiny interagující s ATP syntázou, především inhibiční faktor IF1, studovaný i v souvislosti s karcinogenezí a jeho úlohou v patofyziologii. Mnohé z interakčních proteinů regulují aktivitu ATP syntázy Ca^{2+} dependentním způsobem a některé, jako například protein S100A1 by mohly do budoucna významně sloužit lékařským účelům, například v post-infarktických srdečních tkáních.

Regulace hladiny ATP je důležitá pro správné fungování buněčného metabolismu a celkovou fyziologii buňky. Inhibice syntetické aktivity ATP syntázy, popřípadě její opačná hydrolytická aktivita, mohou být pro buňku ohrožující ve smyslu zvýšené produkce ROS, nebo úplného vyčerpání buněčného ATP a mohou vést až k buněčné smrti. Překvapivě, nedávné studie ukazují, že mírná inhibice dopředného, tedy syntetického chodu ATP syntázy, může nastartovat adaptační mechanismy, které usnadní přežívání buňky při stresové zátěži. Navíc, ATP i ROS hrají významné role v regulaci signálních drah a jsou tedy pro buňku nezbytné.

Studium fyziologických regulací ATP syntázy jistě není zcela probádáno a má tedy smysl dále se tímto tématem zabývat a odkrývat nám stále neznámé mechanismy tohoto složitého enzymu. Vývoj nových fluorescenčních "real time" sond, pro měření okamžité hladiny buněčného ATP, by mohl vést k objasnění těchto zatím ne zcela známých jevů.

Reference

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628. [dx.doi.org/10.1038/370621a0](https://doi.org/10.1038/370621a0)
- Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H., Licznarski, P., Li, H., 2014. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1 FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *PNAS* vol: 111, 10580-10585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401591111>
- Andrienko, T.N., Picht, E., Bers, D.M., 2009. Mitochondrial free calcium regulation during sarcoplasmic reticulum calcium release in rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.015>
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schägger, H., 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: Identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* 17, 7170–7178. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170>
- Aulak, K.S., Miyagi, M., Yan, L., West, K.A., Massillon, D., Crabb, J.W., Stuehr, D.J., 2001. Proteomic method identifies proteins nitrated during inflammatory challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12056-12061. www.pnas.org/content/98/21/12056.abstract
- Azarashvili, T., Odínokova, I., Bakunts, A., Ternovsky, V., Krestinina, O., Tyynelä, J., Saris, N.-E.L., 2014. Potential role of subunit c of F0F1-ATPase and subunit c of storage body in the mitochondrial permeability transition. Effect of the phosphorylation status of subunit c on pore opening. *Cell Calcium* 55, 69–77. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.12.002)
- Bell, C.J., Bright, N.A., Rutter, G.A., Griffiths, E.J., 2006. ATP regulation in adult rat cardiomyocytes: time-resolved decoding of rapid mitochondrial calcium spiking imaged with targeted photoproteins. *J. Biol. Chem.* 281, 28058–28067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604540200>
- Belogrudov, G.I., 2010. Coupling factor B affects the morphology of mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42(1): 29-35. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9263-1>
- Belogrudov, G.I., 2009. RECENT ADVANCES IN STRUCTURE-FUNCTIONAL STUDIES OF MITOCHONDRIAL FACTOR B. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41(2): 137-143. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9210-1>

- Bernardi, P., Di Lisa, F., Fogolari, F., Lippe, G., 2015a. From ATP to PTP and back: A dual function for the mitochondrial ATP synthase. *Circ. Res.* 116(11): 1850-1862. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306557>
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., Lippe, G., 2015b. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 95, 1111–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>
- Black, J.C., Van Rechem, C., Whetstone, J.R., 2012. Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Mol. Cell* 48, 491–507. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>
- Boerries, M., Most, P., Gledhill, J.R., Walker, J.E., Katus, H.A., Koch, W.J., Aebi, U., Schoenenberger, C.-A., 2007. Ca²⁺-Dependent Interaction of S100A1 with F1-ATPase Leads to an Increased ATP Content in Cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4365–4373. <https://doi.org/10.1128/MCB.02045-06>
- Boyer, D. P., 2002. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* 512, 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02293-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02293-7)
- Bullough, D.A., Allison, W.S., 1986a. Inactivation of the bovine heart mitochondrial F1-ATPase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl [3H] inosine is accompanied by modification of tyrosine 345 in a single beta subunit. *J. Biol. Chem.* 261, 14171–14177.
- Bullough, D.A., Allison, W.S., 1986b. Three copies of the beta subunit must be modified to achieve complete inactivation of the bovine mitochondrial F1-ATPase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine. *J. Biol. Chem.* 261, 5722–5730.
- Cabezón, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2003. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat. Struct. Biol.* 10, 744. [dx.doi.org/10.1038/nsb96610.0.4.14/nsb966](https://doi.org/10.1038/nsb96610.0.4.14/nsb966)
- Cabezón, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2001. The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J.* 20, 6990-6996. [emboj.embojpress.org/content/20/24/6990.abstract](https://www.emboj.org/content/20/24/6990.abstract)
- Chan, S., L. Barbour, R., 1976. Purification and properties of ATPase inhibitor from rat liver mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* vol: 430, 426-433. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90018-9)
- Chen, R., Fearnley, I.M., Palmer, D.N., Walker, J.E., 2004. Lysine 43 is trimethylated in subunit c from bovine mitochondrial ATP synthase and in storage bodies associated with Batten

- disease. *J. Biol. Chem.* 279, 21883–21887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402074200>
- Chin, R.M., Fu, X., Pai, M.Y., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V.S., Monsalve, G.C., Hu, E., Whelan, S.A., Wang, J.X., Jung, G., Solis, G.M., Fazlollahi, F., Kaweeteerawat, C., Quach, A., Nili, M., Krall, A.S., Godwin, H.A., Chang, H.R., Faull, K.F., Guo, F., Jiang, M., Trauger, S.A., Saghatelian, A., Braas, D., Christofk, H.R., Clarke, C.F., Teitell, M.A., Petrascheck, M., Reue, K., Jung, M.E., Frand, A.R., Huang, J., 2014. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* 510, 397. [dx.doi.org/10.1038/nature13264](https://doi.org/10.1038/nature13264)
- Chouchani, E.T., Methner, C., Nadtochiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., James, A.M., Cochemé, H.M., Reinhold, J., Lilley, K.S., Partridge, L., Fearnley, I.M., Robinson, A.J., Hartley, R.C., Smith, R.A.J., Krieg, T., Brookes, P.S., Murphy, M.P., 2013. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nature Medicine* 19, 753. [dx.doi.org/10.1038/nm.3212](https://doi.org/10.1038/nm.3212)
- Cortés-Hernández, P., Domínguez-Ramírez, L., Estrada-Bernal, A., Montes-Sánchez, D.G., Zentella-Dehesa, A., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., García, J.J., 2005. The inhibitor protein of the F₁F₀-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 844–849. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.064](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.064)
- Covian, R., Balaban, R.S., 2012. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 303, 940–966. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00077.2012>
- Dawson, A.P., Selwyn, M.J., 1975. The action of tributyltin on energy coupling in coupling-factor-deficient submitochondrial particles. *Biochem. J.* 152, 333–339. www.biochemj.org/content/152/2/333.abstract
- DiMauro, S., Bonilla, E., Lee, C.P., Schotland, D.L., Scarpa, A., Conn, H., Chance, B., 1976. Luft's disease: Further biochemical and ultrastructural studies of skeletal muscle in the second case. *J. Neurol. Sci.* 27, 217–232. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90063-0)
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J., Braun, H.P., 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* 579, 5769–5772. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.065>
- Duncan, A.L., Robinson, A.J., Walker, J.E., 2016. Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- Esparza-Moltó, P.B., Cuezva, J.M., 2018. The Role of mitochondrial H⁺-ATP synthase in cancer. *Front. Oncol.* vol: 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00053>
- Faccenda, D., Campanella, M., 2012. Molecular Regulation of the Mitochondrial F₁ F₀-ATPsynthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF₁). *Int. J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1155/2012/367934>
- Fillingame, R.H., 1976. Purification of the carbodiimide-reactive protein component of the ATP energy-transducing system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 251, 6630–6637. <http://www.jbc.org/content/251/21/6630.long>
- Formentini, L., Pereira, M.P., Sánchez - Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J.J., Navarro, C., Martínez - Serrano, A., Cuezva, J.M., 2014. inhibition of the mitochondrial ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J.* 33, 762-778. emboj.embopress.org/content/33/7/762.abstract
- Forte, M.A., Bernardi, P., 2011. Cyclophilin D in Mitochondrial Pathophysiology, *NIH Public Access* 1797, (6-7), 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2009.12.006> Cyclophilin
- Francesca, D.P., Elena, B., Vera, A., Irene, M., Gennaro, E., Giovanna, L., 2006. Differential steady - state tyrosine phosphorylation of two oligomeric forms of mitochondrial F₀F₁ATPsynthase: A structural proteomic analysis. *Proteomics* 6, 921–926. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500077>
- Fujisawa, Y., Kato, K., Giulivi, C., 2009. Nitration of tyrosine residues 368 and 345 in the β -subunit elicits F-ATPase activity loss. *Biochem. J.* 423, 219-231. www.biochemj.org/content/423/2/219.abstract
- García-bermúdez, J., Cuezva, J.M., 2016. *Biochimica et Biophysica Acta* The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival ☆. *BBA - Bioenerg.* 1857, 1167–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.02.004>
- Giorgio, V., Bisetto, E., Soriano, M.E., Dabbeni-Sala, F., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P., Lippe, G., 2009. Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J. Biol. Chem.* 284, 33982–33988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020115>
- Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2007. How the regulatory protein IF1, inhibits F-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15671-15676. www.pnas.org/content/104/40/15671.abstract

- Green, D.W., Grover, G.J., 2000. The IF1 inhibitor protein of the mitochondrial F1F0-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1458, 343–355. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00085-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00085-2)
- Gunter, T.E., Pfeiffer, D.R., 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258, 755–786. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755>
- Harischandra, D.S., Kondru, N., Martin, D.P., Kanthasamy, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2014. Role of proteolytic activation of protein kinase C δ in the pathogenesis of prion disease. *Prion* 8, 143–153. <https://doi.org/10.4161/pri.28369>
- Harris, D.A., Das, A.M., 1991. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* 280, 561–573. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1130493/
- Harris, D.A., Von Tscharner, V., Radda, G.K., 1979. The ATPase inhibitor protein in oxidative phosphorylation The rate-limiting factor to phosphorylation in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 548, 72–84. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728\(79\)90188-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728(79)90188-9)
- Hashimoto, T., Negawa, Y., 1981. Binding of Intrinsic ATPase Inhibitor to Mitochondrial ATPase Stoichiometry of Binding of Nucleotides and Enzyme. 90, 1151–1157. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/90/4/90_4_1151/_article
- He, J., Ford, H.C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I.M., Walker, J.E., 2018. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 201722086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
- Hopper, R.K., Carroll, S., Aponte, A.M., Johnson, D.T., French, S., Shen, R.-F., Witzmann, F.A., Harris, R.A., Balaban, R.S., 2006. Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* 45, 2524–2536. <https://doi.org/10.1021/bi052475e>
- Huang, K.C., Ramamurthi, K.S., 2010. Macromolecules that prefer their membranes curvy. *Mol. Microbiol.* 76, 822–832. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07168.x>
- Hubbard, M.J., McHugh, N.J., 1996. Mitochondrial ATP synthase F1- β -subunit is a calcium-binding protein. *FEBS Lett.* 391, 323–329. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00767-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00767-3)
- Ichikawa, N., Ushida, S., Kawabata, M., Masazumi, Y., 1999. Nucleotide Sequence of cDNA Coding the Mitochondrial Precursor Protein of the ATPase Inhibitor from Humans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 2225–2227. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.2225>
- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., Rizzuto, R., 1999. Regulation of

mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming.

- Kahancová, A., Sklenář, F., Ježek, P., Dlasková, A., Dlasková, C.A., 2018. Regulation of glucose-stimulated insulin secretion by ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1). *FEBS Letters* 592(6):999-1009. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12991>
- Kane, L.A., Youngman, M.J., Jensen, R.E., Van Eyk, J.E., 2010. Phosphorylation of the F1Fo ATP synthase β subunit: Functional and structural consequences assessed in a model system. *Circ. Res.* 106(3): 504-513 <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214155>
- Lancaster, J.R., 2006. Nitroxidative, Nitrosative, and Nitrative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry Under Biological Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1160–1174. <https://doi.org/10.1021/tx060061w>
- Lippe, G., Sorgato, M.C., Harris, D.A., 1988. Kinetics of the release of the mitochondrial inhibitor protein. Correlation with synthesis and hydrolysis of ATP. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 933, 1–11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728\(88\)90050-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90050-3)
- Lombard, D.B., Alt, F.W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R.S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M.D., Bronson, R.T., Haigis, M., Guarente, L.P., Farese, R. V., Weissman, S., Verdin, E., Schwer, B., 2007. Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8807–8814. <https://doi.org/10.1128/MCB.01636-07>
- Menzies, K.J., Zhang, H., Katsyuba, E., Auwerx, J., 2015. Protein acetylation in metabolism — metabolites and cofactors. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 43. [dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.181](https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.181)
- Mildazien, V., Baniene, R., Nauciene, Z., Marcinkeviciute, A., Morkuniene, R., Borutaite, V., Kholodenko, B., Brown, G.C., 1996. Ca²⁺ stimulates both the respiratory and phosphorylation subsystems in rat heart mitochondria. *Biochem. J.* 320, 329–334. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217935/
- Miyata, H., Silverman, H.S., Sollott, S.J., Lakatta, E.G., Stern, M.D., Hansford, R.G., 1991. Measurement of mitochondrial free Ca²⁺ concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 261, 1123–1134. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.4.H1123>
- Morris, B.J., 2013. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radicals Biology and Medicine* 56, 133–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525>
- Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., Pirini, M., Pagliarani, A., 2017a. Kinetic properties of the

- mitochondrial F₁F₀-ATPase activity elicited by Ca²⁺ in replacement of Mg²⁺. *Biochimie* 140, 73–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.013>
- Nesci, S., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Borgatti, A.R., Pagliarani, A., 2011. Tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) differently inhibit the mitochondrial Mg-ATPase activity in mussel digestive gland. *Toxicol. Vit.* 25, 117–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.10.001>
- Nesci, S., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Pagliarani, A., 2017b. Mini-review. Nitrite as novel pore-shutter: hints from the preferential inhibition of the mitochondrial ATPase when activated by Ca²⁺, *SCIENZE E RICERCHE* 44, 57-63.
- Nesci, S., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Pagliarani, A., 2016. Preferential nitrite inhibition of the mitochondrial F₁F₀-ATPase activities when activated by Ca²⁺ in replacement of the natural cofactor Mg²⁺. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860, 345–353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.11.004>
- Nesci, S., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Pagliarani, A., 2014. Thiol oxidation of mitochondrial F₀-c subunits: A way to switch off antimicrobial drug targets of the mitochondrial ATP synthase. *Med. Hypotheses* 83, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.05.004>
- Nguyen, T., Ogbi, M., Johnson, J.A., 2008. Delta Protein Kinase C Interacts with the d Subunit of the F(1)F(0) ATPase in Neonatal Cardiac Myocytes Exposed to Hypoxia or Phorbol Ester: IMPLICATIONS FOR F(1)F(0) ATPase REGULATION. *J. Biol. Chem.* 283, 29831–29840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801642200>
- Nguyen, T.T., Ogbi, M., Yu, Q., Fishman, J.B., Thomas, W., Harvey, B.J., Fulton, D., Johnson, J.A., 2010. Modulation of the protein kinase Cdelta interaction with the “d” subunit of F₁F₀-ATP synthase in neonatal cardiac myocytes: development of cell-permeable, mitochondrially targeted inhibitor and facilitator peptides. *J. Biol. Chem.* 285, 22164–22173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077578>
- Nicholls, D.G., Crompton, M., 1980. Mitochondrial calcium transport. *FEBS Lett.* 111, 261–268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80806-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80806-4)
- Nick R. Burwick, Miriam L. Wahl, J. Fang, et al., 2005. An inhibitor of the F₁ subunit of ATP synthase (IF₁) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.028>. Cadmium-induced
- Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B., Glaser, E., 1990. Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria: Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*

- 188, 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15396.x>
- Pullman, M.E., Monroy, G.C., 1963. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase Occurring Adenosine Inhibitor of Mitochondrial Triphosphatase *. J. Biol. Chem. 238, 3762–3769.
- Rahman, M., Nirala, N.K., Singh, A., Zhu, L.J., Taguchi, K., Bamba, T., Fukusaki, E., Shaw, L.M., Lambright, D.G., Acharya, J.K., Acharya, U.R., 2014. Drosophila SIRT2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase β and regulates complex V activity. J. Cell Biol. 206, 289-305. jcb.rupress.org/content/206/2/289.abstract
- Randle, P.J., 1995. Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. Proc. Nutr. Soc. 54, 317–327. <https://doi.org/10.1079/PNS19950057>
- Rees, D.M., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2009. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 21597-21601. www.pnas.org/content/106/51/21597.abstract
- Rees, D.M., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2012. Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F-ATPase from bovine heart mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 11139-11143. www.pnas.org/content/109/28/11139.abstract
- Rizzuto, R., Simpson, A.W., Brini, M., Pozzan, T., 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. Nature 358, 325–327. <https://doi.org/10.1038/358325a0>
- Ruipeng, S., Huiwen, S., Yingjian, L., Dalong, Y., Heng, Z., Tongsen, Z., Jiabei, W., Zhaoyang, L., Xuan, S., Tiemin, P., Youyou, Q., Yuejin, L., Changming, X., Boshi, S., Huawen, S., Shuai, L., Xianzhi, M., Guangchao, Y., Shangha, P., Jiyuan, Z., Shuyi, Q., Hongchi, J., Zhiyong, Z., Lianxin, L., 2014. Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF - κ B drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis. Hepatology 60, 1659–1673. <https://doi.org/10.1002/hep.27312>
- Salvatore, N., Vittoria, V., Fabiana, T., Maurizio, P., Alessandra, P., 2012. Tri-n-butyltin binding to a low-affinity site decreases the F1FO-ATPase sensitivity to oligomycin in mussel mitochondria. Appl. Organomet. Chem. 26, 593–599. <https://doi.org/10.1002/aoc.2904>
- Sánchez-Aragó, M., Formentini, L., Martínez-Reyes, I., García-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sánchez-Cenizo, L., Willers, I.M., Aldea, M., Nájera, L., Juarránz, Á., López, E.C., Clófent, J., Navarro, C., Espinosa, E., Cuezva, J.M., 2013. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. Oncogenesis 2, 46.

<https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.9>

- Sánchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, Á.D., García-Huerta, P., Sánchez-Aragó, M., Cuezva, J.M., 2010. Up-regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a warburg phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 25308–25313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146480>
- Santamaría, G., Martínez-Diez, M., Fabregat, I., Cuezva, J.M., 2006. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺ -ATP synthase . *Carcinogenesis* 27, 925–935. [dx.doi.org/10.1093/carcin/bgi315](https://doi.org/10.1093/carcin/bgi315)
- Satre, M., De Jerphanion, M.-B., Huet, J., Vignais, P. V, 1975. ATPase inhibitor from yeast mitochondria. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 387, 241–255. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90107-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90107-3)
- Scholz, T.D., Balaban, R.S., 1994. Mitochondrial F1-ATPase activity of canine myocardium: effects of hypoxia and stimulation. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 266, 2396–2403. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.6.H2396>
- Sekiya, M., Sakamoto, Y., Futai, M., Nakanishi-Matsui, M., 2017. Role of α/β interface in F1ATPase rotational catalysis probed by inhibitors and mutations. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 615–621. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.089>
- Shulga, N., Pastorino, J.G., 2010. Ethanol sensitizes mitochondria to the permeability transition by inhibiting deacetylation of cyclophilin-D mediated by sirtuin-3. *J. Cell Sci.* 123, 4117–4127. <https://doi.org/10.1242/jcs.073502>
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R., Kühlbrandt, W., 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 27, 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>
- Su, X., Wellen, K.E., Rabinowitz, J.D., 2016. Metabolic control of methylation and acetylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 30, 52–60. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.030](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.030)
- Sun, X., Wheeler, C.T., Yolitz, J., Laslo, M., Alberico, T., Sun, Y., Song, Q., Zou, S., 2014. A Mitochondrial ATP Synthase Subunit Interacts with TOR Signaling to Modulate Protein Homeostasis and Lifespan in Drosophila. *Cell Rep.* 8, 1781–1792. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.022>
- Tarasov, A.I., Griffiths, E.J., Rutter, G.A., 2012. Regulation of ATP production by mitochondrial

- Ca²⁺. *Cell Calcium* 52, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.003>
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., Balaban, R.S., 2000. Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, 423-435. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C423>
- Vassilopoulos, A., Pennington, J.D., Andresson, T., Rees, D.M., Bosley, A.D., Fearnley, I.M., Ham, A., Flynn, C.R., Hill, S., Rose, K.L., Kim, H.-S., Deng, C.-X., Walker, J.E., Gius, D., 2013. SIRT3 Deacetylates ATP Synthase F₁ Complex Proteins in Response to Nutrient- and Exercise-Induced Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 551–564. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5420>
- Vinogradov, D., Panchenko, V., 1985. Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein Active / inactive slow pH-dependent. *FEBS Lett.* 184, 226–230.
- von Ballmoos, C., Brunner, J., Dimroth, P., 2004. The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11239-11244. www.pnas.org/content/101/31/11239.abstract
- Walpole, T.B., Palmer, D.N., Jiang, H., Ding, S., Fearnley, I.M., Walker, J.E., 2015. Conservation of Complete Trimethylation of Lysine-43 in the Rotor Ring of c-Subunits of Metazoan Adenosine Triphosphate (ATP) Synthases. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 828–840. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.047456>
- Wang, S.-B., Foster, D.B., Rucker, J., Rourke, B., Kass, D.A., Van Eyk, J.E., 2011. Redox Regulation of Mitochondrial ATP Synthase: Novelty and Significance. *Circ. Res.* 109, 750-757.
- Wang, Y.-Ch., Peterson, S.E., Loring, J.F., 2013. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res.* 24, 143. [dx.doi.org/10.1038/cr.2013.151](https://doi.org/10.1038/cr.2013.151)
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16823-16827.
- Weber, J., Bowman, C., Wilke-Mounts, S., Senior, A.E., 1995. Aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 270, 21045–21049. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21045>
- Weber, J., Senior, A.E., 1997. Catalytic mechanism of F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1319, 19–58. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00121-1)

- Wu, Y.-T., Lee, H.-C., Liao, C.-C., Wei, Y.-H., 2013. Regulation of mitochondrial FoF1ATPase activity by Sirt3-catalyzed deacetylation and its deficiency in human cells harboring 4977bp deletion of mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1832, 216–227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.002)
- Yamada, E.W., Huzel, N.J., 1989. Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of Ca²⁺. *Biochemistry* 28, 9714–9718.
- Yamada, E.W., Huzel, N.J., 1988. The calcium-binding ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 263, 11498–11503.
- Zhao, X., León, I.R., Bak, S., Mogensen, M., Wrzesinski, K., Højlund, K., Jensen, O.N., 2011. Phosphoproteome Analysis of Functional Mitochondria Isolated from Resting Human Muscle Reveals Extensive Phosphorylation of Inner Membrane Protein Complexes and Enzymes. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.000299. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000299>
- Zweier, J.L., Chen, C.-A., Talukder, M.A.H., 2011. Cardiac Resynchronization Therapy and Reverse Molecular Remodeling. *Circ. Res.* 109, 716-719. circres.ahajournals.org/content/109/7/716.abstract

Další zdroje:

David G. Nicholls and Stuart J. Ferguson, 2002. *Bioenergetics* 3

ALBERTS, Bruce, et al. *The Molecular Biology of the Cell*. [s.l.]: Garland Science, 2002. (4th. ed). ISBN 0-8153-3218-1.