

UNIKÁTNE ŠTRUKTÚRNE A FUNKČNÉ VLASTNOSTI A_1A_0 ATPÁZ/syntáz Z ARCHAEA

MONIKA VIDOVÁ a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
monika.vidova@savba.sk

Došlo 25.11.09, prijato 25.1.10.

Kľúčové slová: Archaea, metanogény, A_1A_0 ATPáza/syntáza

Obsah

1. Úvod
2. Klasifikácia ATPáz
3. Štruktúra a funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy
 - 3.1. Funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy
 - 3.2. Spriahajúci ión
 - 3.3. Štruktúra A_1A_0 ATPázy/syntázy
 - 3.4. Vlastnosti A_1A_0 ATPázy/syntázy
4. Genetický a molekulový prístup k štúdiu A_1A_0 ATPázy/syntázy u metanoarchaea
 - 4.1. Genetický prístup u metanoarchaea
5. Záver

1. Úvod

Veľká skupina prokaryotov, ktoré sa významne odlišujú od ostatných baktérií geneticky, biochemicky a štruktúrne, bola zaradená do samostatnej vývojovej domény Archaea. Mnohé z nich žijú v extrémnych environmentálnych podmienkach – v ľudskom ponímaní, nezlučiteľných so životom: striktná anaerobióza, vysoké tlaky, teploty nad 100 °C, v hĺbkach baní či na morských dnách, v kombinácii s vysokou slanosťou morskej vody (až 5 M), v blízkosti termálnych prameňov, vulkánov, poprípade v pH rozmedzí od takmer 0 až po 11,5 (cit.¹). V súčasnosti sa ale ukazuje, že archaea sa nachádzajú aj v iných, nespočetných lokalitách biosféry.

Archaea v sebe nesú tajomstvo evolúcie, ktorého podhalenie má istú dávku atraktívnosti. Je pochopiteľné, že vedci v posledných rokoch pátrajú po týchto nezvyčajných organizmoch, po ich biochemických mechanizmoch, prvopočiatočných spôsoboch konzervácie energie, po bunkových zložkách, pomocou ktorých odolávajú uvádzaným extrémnym podmienkam. Nie je jasné, ako je chránená citlivá genetická informácia, ako sa realizujú opravy a chyby DNA, keď po 3,5 miliardách rokov v takých ex-

trémnych podmienkach si uchovávajú svoje unikátne vlastnosti.

Z bioenergetického hľadiska nachádzame u týchto mikroorganizmov okrem substrátovej fosforylácie a chemiosmózy nové unikátne formy konzervácie energie², ktoré nám podhaľujú bioenergetické princípy a mechanizmy vznikajúce v počiatočných fázach života. Ústredným enzýmom bunkovej bioenergetiky je aj u Archaea, ktoré patria medzi najstaršie organizmy na Zemi (najnovšie poznatky v tomto smere odhadujú ich vek na 3,5–3,8 miliardy rokov)^{3,4}, podobne ako u baktérií a eukaryotov – enzým ATP syntáza. Archaeálna ATPáza reprezentuje novú triedu ATPáz – A_1A_0 ATPázu. V tejto práci sa zameriame na popisovanie súčasných poznatkov o štruktúre a funkcii A_1A_0 ATPáz u Archaea, ale obzvlášť sa zameriame na popisovanie tohto enzýmu u metanogénov. Poznávanie tohto enzýmu obohacuje naše poznatky o evolúcii bioenergetických systémov, ale zároveň otvára možnosti na poznávanie molekulových mechanizmov fungovania ATP syntázy. Všetky tieto poznatky okrem teoretických prínosov vytvárajú nový potenciál pre moderné biotechnológie a nanotechnológie budúcnosti.

2. Klasifikácia ATPáz

Molekuly ATP patria medzi centrálné komponenty energetického metabolizmu ako univerzálne energetické platidlo všetkých typov buniek – Archaea, Prokaryoty a Eukaryoty. Podstatné množstvo ATP je v bunkách tvorené ATP syntázami. Tieto enzýmy sú multisubjednotkové, membránovo viazané komplexy, ktoré sa vyskytujú u všetkých foriem života a reprezentujú najdôležitejšie bioenergetické enzýmy buniek. Reakcia katalyzovaná ATP syntázou je reverzibilná a smer reakcie je kontrolovaný termodynamicky.

Pederson a Carafoli v roku 1987 na základe štruktúrnych a funkčných kritérií kategorizovali protón-translokujúce ATPázy do troch skupín: P-ATPáza, V-ATPáza a F-ATPáza (cit.⁵). V 90. rokoch minulého storočia bola do tejto skupiny ATPáz zaradená aj novo objavená ATPáza. Napriek podobnostiam sa nedala jednoznačne priradiť ani k jednému z už klasifikovaných typov ATPáz. Z tohto dôvodu bola vytvorená nová trieda ATPáz, nesúca pomenovanie podľa organizmov, v ktorých sa nachádza, teda archaeálna A-ATPáza (cit.⁶). Pre úplnosť v krátkosti spomenieme základné črty jednotlivých typov ATPáz/syntáz.

F-ATPáza/syntáza využíva elektrochemický potenciál H^+ iónov ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) alebo Na^+ iónov ($\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$) na poháňanie syntézy ATP. Na druhej strane je schopná pracovať reverzibilne a využiť energiu hydrolýzy ATP na vytváranie elektrochemického gradientu protónov alebo sodných ió-

nov. Nachádza sa v cytoplazmatickej membráne väčšiny baktérií, a u eukaryotov na vnútornej membráne mitochondrií a v tylakoidných membránach chloroplastov.

V-ATPáza, na rozdiel od F-ATPázy, počas evolúcie stratila schopnosť syntetizovať ATP a energiu z hydrolyzy ATP využíva na vytvorenie strmého iónového gradientu (najmä H^+) cez membránu. Vzniknutý elektrochemický potenciál sa využíva na poháňanie transportu rôznych živín, využíva sa pri rozličných aktivitách v endomembránach, vedie k aktivácii hydrolytických enzýmov v lyzozómoch⁷. Možno ju nájsť v eukaryotických vakuolách, najmä vo vakuolách rastlín a húb (podľa toho nesie pomenovanie – vakuolárna V-ATPáza), taktiež bola nájdená u niektorých baktérií a archaea.

P-ATPáza patrí do veľkej rodiny transmembránových púmp. Ide o široko distribuovaný membránový enzým v rámci celého fylogenetického stromu, ktorý efektívne premieňa energiu hydrolyzy ATP do elektrochemického iónového gradientu. Tento typ ATPáz sa podieľa na poháňaní transmembránového pohybu širokej škály anorganických iónov ako sú: H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , prípadne ióny kovov: Cu, Zn, Pb, Ag. Okrem toho niektoré P-ATPázy sa podieľajú na transporte lipidov⁸. Označenie P-ATPáza odráža molekulový mechanizmus práce tohto enzýmu, pri ktorej vzniká vysoko-energetický aspartylfosfoenzýmový medziprodukt (phosphoryl-enzyme intermediate) a svojou štruktúrou sa výrazne odlišuje od ostatných ATPáz⁹.

Poznatky o týchto ATPázach/syntázach sú už mnohonasobne popísané v moderných učebniciach biochémie, kde sú sprevádzané veľmi dobrou, farebnou i grafickou vizualizáciou. Navyše, na internete je možné nájsť aj animácie, ktoré umožňujú získať predstavu o molekulových mechanizmoch tvorby ATP^{10,11}.

Následne sa sústredíme hlavne na analýzu poznatkov, ktoré sa dotýkajú archaeálnej A_1A_0 ATPázy/syntázy.

3. Štruktúra a funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy

Napriek veľkej variabilite a zároveň unikátnosti energie konzervujúcich mechanizmov u Archaea, podieľajúcich sa na energizácii membrán, majú tieto mechanizmy jednu membránovú komponentu spoločnú. Je to archaeálna ATPáza/syntáza, ktorá má kľúčové postavenie v bunkovej bioenergetike. Predpokladalo sa, že aj archaea ATP syntáza bude vykazovať špecifické, ale hlavne rozdielne vlastnosti od prokaryotov a eukaryotov. Už počiatočné štúdiá naznačili na rozdielnosť archaeálnej ATP syntázy od F- a V-typov ATPáz. Z týchto dôvodov bola, ako už bolo vyššie uvedené, vytvorená nová skupina – A_1A_0 ATPáz/syntáz.

Archaeálna A-ATPáza bola popísaná ako energiu premieňajúca, s blízkym vzťahom k vakuolárnej V-ATPáze, vyšších eukaryotov, ako aj k F-ATPázam, vyskytujúcich sa v eubaktériách, mitochondriách a chloroplastoch. A-ATPáza využíva ako spriahajúci ión H^+ , prípadne Na^+ ión, a je zložená z 10 podjednotiek ($A_3 : B_3 : C : D :$

$E : F : G : H : I : K_x$), pričom aktuálna stechiometria podjednotky K je závislá od organizmu ($x = 12, 6, 4$ alebo iba 1)¹². Vzhľadom k štruktúrnym poznatkom, podjednotkovému zloženiu a aminokyselinovej sekvencii sa viac podobá na V-ATPázu. Na druhej strane, na základe schopnosti pracovať ako ATP syntáza a syntetizovať bunkové ATP, za využitia iónového gradientu, sa funkčne podobá na F-ATPázu¹³. Nakoľko ATPáza/syntáza z metanoarchaea patrí medzi najpreskúmanejšie z hľadiska A_1A_0 ATPáz/syntáz a zároveň metanoarchaea sú najpočetnejšia skupina Archaea, zameriame sa na analýzu tohto enzýmu hlavne u týchto mikroorganizmov.

3.1. Funkcia A_1A_0 ATPázy/syntázy u metanoarchaea

Je známe, že tvorba metánu nie je spojená so substrátovou fosforyláciou, ale s fosforyláciou poháňanou iónovým gradientom. Práce Blauta a Gottschalka poskytli prvý dôkaz pre prítomnosť chemiosmotického mechanizmu v procese konzervácie energie u metanogénov¹⁴. Títo autori preukázali postupnú sekvenciu udalostí pri tvorbe elektrochemického potenciálu protónov, metánu a ATP u buniek *Methanosarcina berkeri*. Ich experimentálne výsledky jasne ukazujú poradie udalostí a to: metanogéza \rightarrow tvorba elektrochemického potenciálu $\mu_{H^+} \rightarrow$ syntéza ATP; z čoho vyplýva, že ATP u metanogénov je tvorené chemiosmotickým mechanizmom, a že A-ATP syntáza je pravdepodobne zodpovedná za tvorbu ATP aj u týchto mikroorganizmov^{13,14}.

Kompletné génové sekvencie metanogénov naznačujú na prítomnosť génov kódujúcich len A-ATPázu. Keďže fosforylácia poháňaná elektrochemickým gradientom iónov je jediná cesta pre tieto organizmy ako syntetizovať ATP (sú striktné chemiosmotické)¹⁵, je to veľmi dôležitý indikátor, že A-ATPáza pracuje ako ATP syntáza *in vivo*. Zo získaných experimentálnych údajov možno konštatovať, že purifikované A-ATPázy, vrátane A-ATPázy/syntázy z metanoarchaea, sú veľmi nestabilné. Doposiaľ používané izoláčnne a purifikačné metódy viedli k izolácii nekompletných enzýmov a izolovaný enzým je nestabilný. Len nedávno sa podarilo izolovať a purifikovať A_1A_0 ATP syntázu z termofilu *Methanocaldococcus jannaschii*¹⁶. Napriek tomu sa tento enzým nepodarilo využiť pre rekonštitúciu do lipozómov, nakoľko tieto sú pri teplote 80 °C nestabilné.

Získať priamy experimentálny dôkaz o tom, že archaeálna ATPáza je skutočne ATP syntáza, bolo komplikované. V roku 2007 sa v laboratóriu prof. Müllera podarilo vyvinúť molekulárnu stratégiu umožňujúcu nadprodukciiu A_1A_0 ATPázy/syntázy vo funkčnom stave v *Escherichia coli*. Tento experimentálny prístup otvoril možnosti pre štúdium biochemických vlastností tohto enzýmu¹⁷.

3.2. Spriahajúci ión

Mechanizmus energetického spriahnutia u Archaea nie je doposiaľ jasný. Existuje určitá neistota o spriahajúcom ióne, ktorý metanoarchaeálna A-ATPáza

využíva. Nakoľko sú metanogény striktné závislé na Na^+ iónoch a v priebehu metanogenézy vytvárajú $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ a $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ súčasne, bola navrhnutá hypotéza, že oba tieto gradienty môžu byť priamo využívané na poháňanie tvorby ATP A-ATPázou/syntázou. Experimentálne údaje podporujúce túto hypotézu boli získané u viacerých metanoarchaea: Müller a spol.^{18–20} a Šmigáň a spol.²¹. Pre ťažkosti získať celistvý, purifikovaný enzým nebola iónová špecificita A-ATPázy/syntázy doteraz jednoznačne určená. Metanoarchaea sú jediné mikroorganizmy, ktoré produkujú dva primárne, elektrochemické gradienty, sodný $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ a protonový $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, paralelne. Z týchto dôvodov sa metanogény musia vysporiadať s problémom, ako využiť oba gradienty pri syntéze bunkového ATP. Jedna z predstáv uprednostňuje mechanizmus, v ktorom $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ vytváraný metyltransferázovou reakciou je konvertovaný prostredníctvom Na^+/H^+ antiportera na $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, a ten sa následne využíva na poháňanie syntézy ATP prostredníctvom H^+ - A_1A_0 ATPázy/syntázy. Otázka, či existuje jedna A-ATPáza, ktorá vie využívať oba gradienty $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ a $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ súčasne, a môže meniť špecificitu podľa stavu a dostupnosti toho-ktorého iónu alebo má špecificitu iba pre jeden ión (H^+ alebo Na^+) a kooperuje s Na^+/H^+ antiporterom, je napriek veľkému úsiliu stále otvorená.

Otvára sa niekoľko ďalších otázok, ktoré doposiaľ neboli vyriešené. U Archaea organizmov boli v genóme nájdené génové klastre pre F-ATPázu, hoci sa nepotvrdila ich syntéza. Zo štúdií s F-ATPázou je známe, že modifikácii iba niekoľkých aminokyselín sa zmení iónová špecificita tohto enzýmu. Taktiež by mohli v teoretickej rovine na membráne existovať až dve A-ATPázy (jedna pre H^+ , druhá pre Na^+), hoci na základe experimentálnych dát sa od tejto hypotézy upúšťa. Nedávno bol v genóme *Methanothermobacter thermoautotrophicus* medzi neznámymi proteínmi anotovaný Na^+/H^+ antiporter a taktiež bol na proteolipide u niektorých A-ATPáz nájdený väzbový motív pre Na^+ ión¹⁸. Komplexnosť tohto problému je dôvodom, prečo sa ho nepodarilo doposiaľ vyriešiť.

Protón-translokujúca ATPáza/syntáza je vo všeobecnosti prezentovaná ako evolučne primárna forma tohto enzýmu, zatiaľ čo Na^+ -translokujúca ATPáza/syntáza niektorých prokaryotov je zvyčajne predstavovaná ako exotická adaptácia na prežitie v drsných enviromentálnych podmienkach. Detailným štúdiom štruktúry F- a V-typu ATPáz, ich podjednotkového zloženia a porovnaním fylogenetických analýz sa dostáva do popredia nová hypotéza. Táto hypotéza poukazuje na evolučné vzťahy medzi protón- a sodík-translokujúcimi ATPázami/syntázami. Naznačuje, že Na^+ -translokujúce ATPázy sa vyskytujú síce ojedinele, no využitie Na^+ gradientu pre syntézu ATP prostredníctvom Na^+ -translokujúcej ATPázy predstavuje najstaršiu formu membránovej bioenergetiky. Je pravdepodobné, že prapôvodná, pre Na^+ nepriepustná membrána, ale priepustná pre H^+ , obsahujúca sadu Na^+ -transportných enzýmov, bola evolučným predchodcom štruktúrne zložitejšej membrány, nepriepustnej pre H^+ . Využívanie H^+ , ako spriahajúceho iónu, sa zdá byť evolučne mladšou inováciou²².

Odpoveď ohľadne iónovej špecificity A-ATPázy ostáva zatiaľ otvorená. Nie je však vylúčené, že ako H^+ tak aj Na^+ môžu v doméne Archaea slúžiť ako spriahajúce ióny.

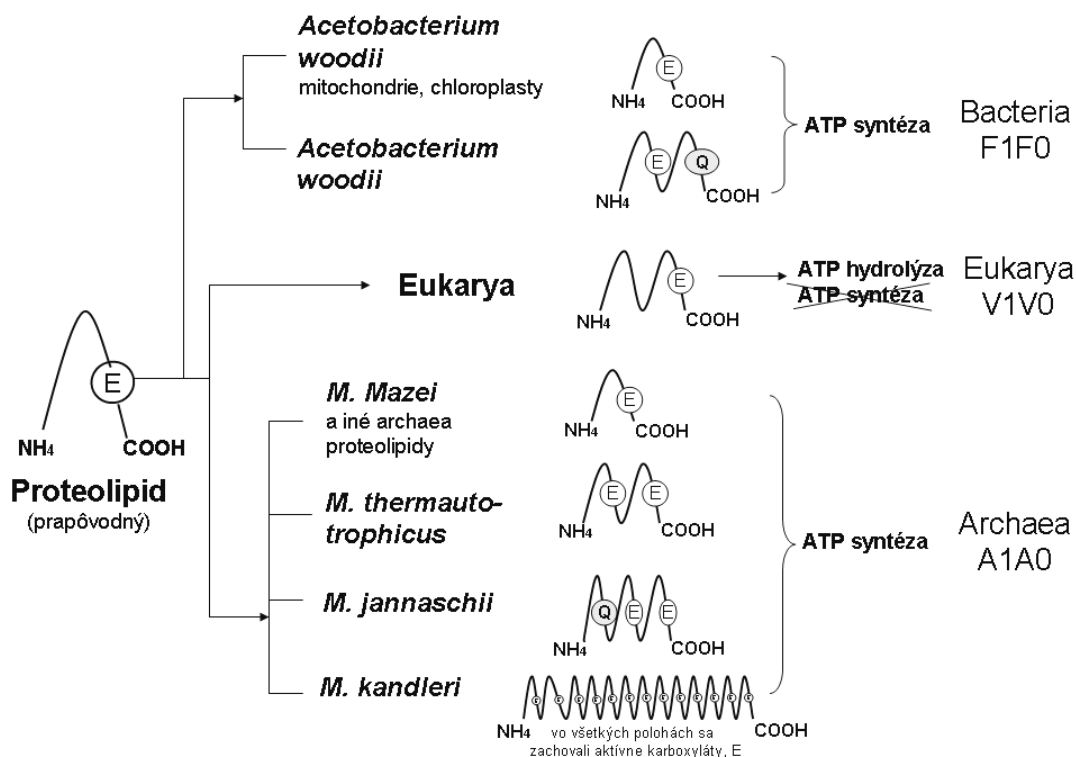
3.3. Štruktúra A_1A_0 ATPázy/syntázy

Sekvenčné analýzy ukazujú, že V-, F- a A-ATPázy sú homológické, a že sa vyvinuli zo spoločného, prapôvodného génu, tzv. progénu. Z týchto dôvodov A-ATPáza/syntáza zdieľa vlastnosti jednak eukaryotických V_1V_0 ATPáz a F_1F_0 ATP syntáz (prítomných v baktériách, chloroplastoch a mitochondriách). Tento enzým má morfológicky, podobne ako ATPázy F- a V-typu, 2 hlavné časti: membránovo-viazanú časť A_0 , ktorá tiež obsahuje iónový kanál pre transportovaný ión, časť A_1 exponovanú do cytoplazmy. Obe časti sú prepojené spojovacou časťou, tzv. „stopkou“.

Membránová A_0 doména

Na rozdiel od F- a V-typu ATPáz, obsahuje iba dve podjednotky označované I a K. Molekulová hmotnosť podjednotky I sa pohybuje v rozmedzí 72–76 kDa a je veľmi podobná podjednotke *a* V-ATPázy. Obsahuje hydrofilný N-terminálny a hydrofóbny C-terminálny koniec. U hydrofilnej N-terminálnej časti sa predpokladá, že je vysoko α -helikálna a funkčne podobná podjednotke *b* F-ATPázy. Hydrofóbná C-terminálna časť podjednotky I má sedem transmembránových helixov a u tejto časti je predpoklad, že je funkčne podobná *a* podjednotke V-/F-ATPázy. V podjednotke I je zachovaný arginínový aminokyselinový zvyšok, ktorý je nositeľom kladného náboja v A_0 časti a je predpoklad, že tento arginínový zvyšok je esenciálny pre translokáciu spriahajúceho iónu. Jeho lokalizácia sa môže vzhľadom na organizmus odlišovať¹⁹.

Druhá podjednotka A_0 domény je podjednotka K, pre svoje hydrofóbne vlastnosti je označovaná ako proteolipid. Proteolipidy z metanoarchaea sú vo všeobecnosti vzájomne veľmi podobné (do 50 %) a taktiež zdieľajú identitu s inými archaea proteolipidmi. Až do 33 % sú podobné s bakteriálnymi a eukaryotickými proteolipidmi V-ATPáz. Purifikované a charakterizované proteolipidy z niektorých archaea, takmer vo všetkých prípadoch, vykazovali molekulovú hmotnosť približne 8 kDa a štruktúrne tvorili 2 transmembránové helixi¹⁹. Navyše aj genómová sekvenácia u archaea predpokladá 8 kDa proteolipid. Spomínaná 8 kDa veľkosť proteolipidu z archaea organizmov korešponduje s veľkosťou proteolipidu z F-ATPázy a predpokladalo sa, že práve táto skutočnosť je zodpovedná za to, že A-ATPáza vykazuje funkčné vlastnosti F-ATPázy, čím sa myslí hlavne na jej funkciu ATP syntázy. Ďalšie štúdium ukázalo, že enzymatická schopnosť A-ATPázy syntetizovať ATP nesúvisí s veľkosťou proteolipidu, ale s počtom protonizovateľných skupín pripadajúcich na proteolipid. F-ATPáza má 12, A-ATPáza z *M. jannaschii* 8 a V-ATPáza len 6 protonizovateľných skupín pripadajúcich na *c* subjednotku. Toto v prepočte znamená, že u V-ATPázy majú iba 2 protonizovateľné skupiny na katalytické centrum. Takéto množstvo je ale nedostatočné na to,



Obr. 1. Rôznosť proteolipidov (c, K subjednotiek) u ATPáz¹⁸. V priebehu evolúcie došlo k duplikácii až triplikácii proteolipidu u niektorých ATPáz. V obrázku sú vyznačené aktívne karboxyláty podieľajúce sa na transporte protónov. Písmeno E označuje kyselinu glutámovú, písmeno Q označuje glutamín. Substitúcia Q za E predstavuje stratu väzbového miesta pre protón. Glutamín sa na prenosu H⁺ nemôže podieľať

aby V-ATPáza katalyzovala syntézu ATP. Na druhej strane ale V-ATPáza umožňuje vytvoriť značný protónový gradient (funkčná vlastnosť V-ATPázy), ktorého tvorba je poháňaná hydrolýzou ATP¹⁴.

V priebehu evolúcie došlo u ATPáz, síce v rozsahu celého fylogenetického stromu, no len u niektorých organizmov, k duplikácii a triplikácii (u *Methanopyrus kandleri* až k polyplikácii) proteolipidu²³, príklad je uvedený na obr. 1. Je tu ilustrovaný v prírode ojedinelý typ Na⁺-F₁F₀ ATPázy z *Acetobacterium woodii*, je to zatiaľ jediná objavená ATPáza s danými vlastnosťami. Táto ATPáza obsahuje vo svojom rotore zmes c podjednotiek – typu F₀ a typu V₀ a na základe bunkovej potreby je schopná prepínať medzi syntézou a hydrolýzou ATP²⁵.

Jednou zo zaujímavých črt A-ATP syntázy je, že so spomínanou duplikáciou či triplikáciou proteolipidu sa automaticky nezachoval počet väzbových miest pre translokujúci protón na subjednotke c. V priebehu evolúcie došlo k substitúcii aktívneho karboxylového zvyšku kyseliny glutámovej (E, Glu), podieľajúcej sa na väzbe a translokácii protónu, na glutamínový zvyšok (Q, Gln), ktorý už nemôže viazať H⁺. Počet väzbových miest pre translokujúci H⁺ na subjednotke c závisí od daného organizmu. U *M.*

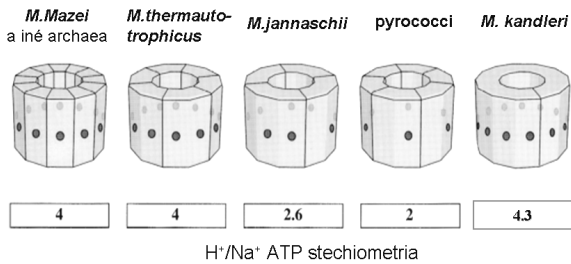
thermautotrophicus došlo k duplikácii a väzbové miesto je zachované na druhom a štvrtom helixe, ale u *M. jannaschii* (triplikácia) je väzbové miesto zachované iba vo štvrtom a šiestom helixe, pretože v druhom helixe sa vyskytuje vo väzbovom mieste spomínaná glutamínová substitúcia²³ (obr. 1).

Popísané proteolipidy sú v membráne zoskupené a tvoria rotor A-ATPázy, podobne ako to bolo preukázané u F- a V-ATPáz. U väčšiny archaea sa často vyskytuje vzájomné zoskupenie 12 proteolipidov, u *M. thermautotrophicus* a pyroccocov je to len 6 kópií a 4 kópie u *M. jannaschii*. Počet podjednotiek závisí od teploty rastu daného organizmu a platí, že čím je teplota rastu vyššia, tým je počet podjednotiek proteolipidu, ktoré tvoria rotor, nižší. Na druhej strane, s rastúcou teplotou stúpa počet kovalentných väzieb medzi podjednotkami a zvyšuje sa stabilita a funkcia v cytoplazmatickej membráne^{23,24} (obr. 2).

Cytoplazmatická A₁ doména

Obsahuje katalytické miesta pre ATP/ADP a má pseudo-hexagonálne usporiadanie podjednotiek A a B. Toto usporiadanie bolo navrhnuté pomocou elektrónmik-

roskopickej analýzy 2D obrazu proteínu z termoacidofilnej archaea *Sulfolobus acidocaldarius* a *Methanosarcina mazei* Gö1. Sekvenovaný operón A-ATPázy z *M. mazei* Gö1 otvoril cestu klonovania. Génové fragmenty operónu A-ATPázy z *M. mazei* Gö1 obsahujúce gény jednotlivých podjednotiek A-ATPázy boli nadexprimované v *E. coli*. Následne bola rozlúštená štruktúra A₁ komplexu získaná

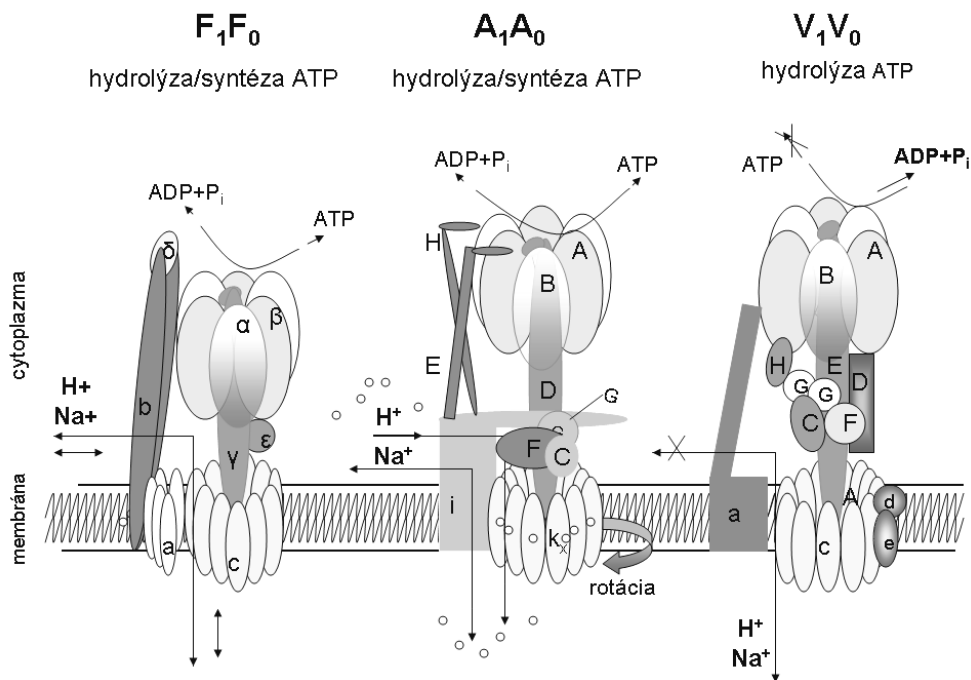


Obr. 2. Rôznosť rotorov u A₁A₀ ATPáz/syntáz¹⁸. Detailný schématický obrázok zoskupenia proteolipidických podjednotiek u uvedených archaea organizmov. Čiarové rozdelenie kruhu symbolizuje počet proteolipidových jednotiek tvoriacich rotor. Bodky určujú počet väzbových miest pre translokovaný protón na danú podjednotku. Stechiometrické číslo udáva počet translokovaných protónov vzhľadom k syntéze 1 molekuly ATP. Počet monomérov bol experimentálne určený. Detailnejšie vysvetlenie je uvedené v texte

metódou small-angle X-ray scattering (nízko-uhľový röntgenový rozptyl). Vykazovala nasledovné podjednotkové zloženie: A₃, B₃, C, D, E, H F (E, H – periférne podjednotky, tzv. druhá stopka; subjednotka F priečne uložená v membráne)²⁴. Nápadná štruktúrna homológia sa vyskytuje vo väzbách medzi spomínanou A a B podjednotkou A₁ domény a α a β podjednotkami F₁ domény F-ATPázy (A, B a α, β podjednotky vytvárajú tzv. „hlavičku“ enzýmu). Podjednotky C a F A₁-časti sú z enzýmového komplexu odkryté a sú citlivé na peptidolytické činidlá, zatiaľ čo podjednotka D je vo vnútri A₁ časti, „hlavičky“, a tým je chránená pred pôsobením trypsínu²⁴ (obr. 3). (Taktiež s nápadnou homológiou ako u γ-podjednotky F-ATPázy, ktorá je obkolesená podjednotkami α a β, či E podjednotky V-ATPázy, ktorá je obkolesená A a B podjednotkami).

Celková štruktúra A-ATPázy je ale veľmi podobná V-ATPáze. Obdobne tvorí hlavičku a stopku. A- a V-ATPáza majú oproti F-ATPáze výrazne dlhšiu stopku a tým sa aj v celkovom 3D obraze odlišujú od F-ATPázy (obr. 3).

Paradoxom je, že napriek štruktúrnej odlišnosti F- a A-ATPázy, sa vyskytuje väzbová a funkčná podobnosť cytoplazmatických podjednotiek F- a A-ATPázy. Taktiež sekvenčným porovnaním génov podjednotiek F- a V-ATPázy sa odhalila homológia medzi ich katalytickými a membránovými podjednotkami. Vzájomné podobnosti jednotlivých ATPáz, či už štruktúrne alebo funkčné, sa



Obr. 3. Štruktúra jednotlivých ATPáz (podjednotková topológia vypracovaná podľa biochemických a štruktúrnych údajov^{18,36}). Podjednotkové priestorové usporiadanie platí: v prípade F₁F₀ ATPázy/syntázy pre *Escherichia coli*, v prípade A₁A₀ ATPázy/syntázy pre *Methanosarcina mazei* Gö1 a v prípade V₁V₀ ATPázy pre *Manduca sexta*. Detailnejšie vysvetlenie je uvedené v texte

vysvetľujú existenciu spoločného, dávneho progénu, ktorý tvoril základ pre evolučnú diferenciáciu jednotlivých ATPáz²⁵.

Sekvenčné porovnávanie génov jednotlivých ATPáz však poukázali na veľké nezhody medzi podjednotkami spojovacích stopiek. Na základe týchto homologických šablón sa do popredia dostáva domienka, že pozícia centrálnej spojovacej stopky bola v prvopočiatkoch evolúcie obsadená translokujúcim polymérom, a ten bol v najväčšej miere pozmenený v priebehu evolúcie²⁶.

3.4. Vlastnosti A₁A₀ ATPázy/syntázy

Štúdium tohto enzýmu je komplikované pre problémy spojené s jeho purifikáciou a problémy získať ho v kompletnom podjednotkovom zložení a v dostatočnom množstve. Napriek tomu inhibičné a funkčné mechanizmy sledované v natívnych podmienkach v kooperácii

s poznatkami s izolovaným enzýmom podávajú čiastočný obraz o tomto enzýme.

Všetky doposiaľ preštudované ATPázy metanogénov majú pH optimum približne okolo 5,0–5,2. Výnimkou je enzým z *Methanosarcina thermophila* a *Methanocaldococcus jannaschii*, ktoré majú optimum pH 7,0. Hydrolyzujú substráty v preferencii ATP > GTP > ITP > TTP > UTP > CTP. Sú stimulované dvojmocnými kationmi Mg²⁺ a Mn²⁺, ale nie Na⁺ iónmi. Sulfidy, glycerol a etanol stimulujú ich enzýmovú aktivitu¹⁹.

Pre pochopenie molekulových mechanizmov ATPáz vyskytujúcich sa u Archaea sa našiel a využíva sa celý rad inhibítorov. Archaeálne ATPázy sa značne líšia citlivosťou k inhibítorom ATPáz prokaryotov a eukaryotov. V tomto sa môže odrážať práve ich rozdielna primárna štruktúra. Pre utvorenie si obrazu o inhibítoroch, ktoré sa používajú pri štúdiu A-ATPázy/syntázy, a ostatných ATPáz, je priložená prehľadná tabuľka I známych inhibítorov spolu s popísaným spôsobom inhibície^{7,28}.

Tabuľka I
Prehľadná tabuľka známych inhibítorov ATPáz^{7,28}.

Typ ATPázy	Inhibitor ^a	Spôsob inhibície
V-ATPáza	NEM	špecifický inhibítor V-ATP viažuci sa na cysteinové zvyšky podjednotky A (viaže nukleotid) a pôsobí ako sférická prekážka
	NBC-Cl, azido-ATP	štruktúrny analóg ATP
	DCCD	reaguje s proteolipidom (karboxylová skupina kys. glutámovej), blokácia transportu protónu
	DES	inhibuje membránovo-viazanú časť
	ADP, exogénne fosforečnany	kompetitívna a nekompetitívna inhibícia ATP-hydrolyzy
	NO ₃ ⁻	oxidačný efekt, chaotropná látka, spôsobuje vzájomné oddelenie V ₁ a V ₀ častí, inhibuje membránovo-viazanú časť (IC ₅₀ 40mM)
	bafilomycín A1 dinukleotidy VO ₃ ⁻ , triton, alkylové zlúčeniny, makrolidové antibiotiká: bafilomycín, konkanamycín	špecifický inhibítor alosterická inhibícia
F-ATP	Oligomycín, alkylové zlúčeniny azid sodný DCCD	odpojovač, inhibuje cytochrómoxidázu obdobne ako u V-ATP reaguje s proteolipidom, blokácia transportu protónu
	NO ₃ ⁻ , VO ₃ ⁻	oxidačný efekt, chaotropná látka
	DES	inhibuje membránovo-viazanú časť
	P-ATP	VO ₃ ⁻ azidy, ouabain
A-ATP	NO ₃ ⁻ bafilomycín A, DCCD, DES	inhibícia cytoplazmatickej časti inhibuje membránovo-viazanú časť

^aNEM – N-etylmaleínimid, NBC-Cl – 4-chlor-7-nitrobenzofurazán, DCCD – N,N'-dicyklohexylkarbodiimid, DES – dietylstilbestrol

Vo všeobecnosti je A-ATPáza necitlivá k azidu, oligomycínu a vanadičnanu. Na druhej strane ju inhibuje N,N' -dicyklohexylkarbodiimid (DCCD), bafilomycín, dietylstilbestrol (DES) a dusičnany.

Metanoarchaeálna A-ATPáza je inhibovaná bafilomycínom A_1 , ale v koncentráciách o tri poriadky vyšších, ako sú potrebné pre inhibíciu V_1V_0 -ATPázu.

Dusičnany pri vysokých koncentráciách môžu pôsobiť ako chaotropné látky. Majú podobný účinok ako detergenty a spôsobujú oddelenie cytoplazmatickej – hydrofilnej A_1 od membránovej – hydrofóbnej A_0 časti. Vzhľadom k tomu, že dusičnany môžu fungovať ako oxidačné činidlo, môžu v A-ATPáze oxidovať –SH skupiny enzýmu. To samozrejme môže ovplyvniť aktivitu enzýmu, hlavne, ak sú –SH skupiny prítomné v katalytickom mieste, resp. v jeho blízkosti. To je možné práve u halobakteriálnej A_1A_0 -ATPázy, ktorá obsahuje cysteínové zvyšky v blízkosti katalytického miesta na podjednotke A. Za vhodných podmienok dusičnany môžu interagovať s ktoroukoľvek podjednotkou podieľajúcou sa na prenose iónu, resp. samotného rotačného momentu a tým znížiť aktivitu enzýmu²⁷.

Metanoarchaeálna A_1A_0 -ATPáza nie je inhibovaná N -etylmaleinidom (NEM), zatiaľ čo halobakteriálna A_1A_0 -ATPáza je. Túto odlišnosť možno pripísať rozdielnej primárnej štruktúre týchto ATPáz. Podjednotka A halobakteriálnej A_1A_0 -ATPázy obsahuje dosť cysteínových zvyškov v blízkosti katalytického miesta, na rozdiel od metanoarchaeálnej A_1A_0 -ATPázy, ktorá ich neobsahuje¹⁹.

4. Genetický a molekulový prístup k štúdiu ATPázy/syntázy u metanoarchaea

Pre hlbšie a detailnejšie poznanie biochemických a molekulových mechanizmov syntézy ATP u metanoarchaea sa okrem klasických biochemických metód, genetických metód (izolácia spontánnych alebo mutagénom indukovaných mutáňov), využíva prístup založený na metódach molekulovej biológie.

4.1. Genetický prístup u metanoarchaea

Systematický genetický prístup k štúdiu transformácie energie u baktérií a kvasiniek priniesol celý rad významných zistení a vysvetlení molekulových mechanizmov syntézy ATP. U metanoarchaea sme genetický prístup k riešeniu týchto problémov zaviedli v našom laboratóriu v roku 1997. Zistenia, že je možné pripraviť u *M. thermotrophicus* ΔH mutantov so zmenami v systémoch transformácie energie, umožnili aplikáciu metód a techník bakteriálnej genetiky (za striktno anaeróbných podmienok) na štúdium A-ATPázy/syntázy.

V rámci genetického prístupu k štúdiu A_1A_0 -ATPázy/syntázy u metanoarchaea sa v našom laboratóriu podarilo pripraviť niekoľko spontánnych mutantov kmeňa *M. thermotrophicus* ΔH rezistentných k relevantným inhibítorom súvisiacich s transformáciou energie: N,N' -di-

cyklohexylkarbodiimidu (DCCD)²⁹, harmalínu, tributylcín chloridu (TBT)³⁰, neomycínu³³, dusičnanom, 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilidu (TCS)^{34,35}, amiloridu³⁷. Ide o sériu mutantov, u ktorých sa na základe použitých inhibítorov predpokladalo, že došlo k léziám v dvoch hlavných membránovo-viazaných enzýmových komplexoch, ktoré sa významne podieľajú na bioenergetických procesoch. Ide o enzýmové komplexy: A-ATPázy a Na^+/H^+ -antiporter. Štúdium týchto mutantov už prinieslo celý rad zaujímavých výsledkov dotýkajúcich sa transformácie energie u metanoarchaea^{29,30,32–35}.

Získané experimentálne výsledky potvrdili naše predpoklady a analýzy vyizolovaných mutantov ukázali (okrem iného), že niektoré majú zmeny v ATPázovom systéme. Z tohto hľadiska treba spomenúť hlavne TBT mutant, ktorý pri detailnejšom štúdiu vykazoval zmeny citlivosti oproti divému kmeňu v ATPázových systémoch aj v procese metanogenézy. Toto naznačovalo, že došlo u TBT rezistentného mutantu k zmene v A_1A_0 -ATPázovom operóne a táto zmena by mohla byť zodpovedná za danú rezistenciu. Sekvenácia kompletneho A_1A_0 -ATPázového operónu u TBT rezistentného mutantu odhalila tri mutačné zmeny v dvoch podjednotkách A_1A_0 -ATPázy. A to v podjednotke A – Val₃₃₈Ala a v podjednotke B – Leu₂₅₂Ile a Ser₂₉₃Ala. Tieto výsledky implikujú, že za zmeny senzitivity TBT-rezistentného mutantu sú zodpovedné mutačné substitúcie v A_1A_0 -ATP syntázovom operóne³⁰.

Aj iný selektívny inhibítor ATPáz, DCCD, sa ukázal ako extrémne cenný pri dešifrovaní komplexnosti syntézy ATP. U viacerých metanogénov je ATPáza tiež ihibovaná týmto inhibítorom. Z týchto dôvodov sme predpokladali, že mutant rezistentný k DCCD by mohol mať pozmenenú A_0A_1 ATP syntázu, čo by ponúkalo potenciálny experimentálny nástroj pre štúdium tohto enzýmového komplexu aj u metanogénov. Prekvapujúco, mutant rezistentný k DCCD nevykazoval zmeny v štruktúrnych génoch (atp) pre A_0A_1 ATP syntázu. Experimentálne údaje získané pri štúdiu DCCD rezistentného kmeňa naznačujú, že DCCD rezistencia je dôsledkom zvýšenej expície A_0A_1 ATP syntázy. Z tohto je možné usudzovať, že za rezistenciu k DCCD sú zodpovedné gény podieľajúce sa na regulácii expície A_0A_1 ATP syntázy²⁹. Ukazuje sa, že systematický genetický prístup k problémom konzervácie energie u metanoarchaea môže byť veľmi nápomocný, tak ako to je u baktérií a kvasiniek.

Tieto štúdiá tiež otvárajú cestu k pochopeniu evolúcie membránových ATPáz/syntáz a pomáhajú porozumieť evolúcii bioenergetických systémov. Zároveň otvára nové pohľady na evolúciu samotných biologických membrán, ktorá bola kooperačným procesom tak bioenergetických systémov, ako aj lipidickej dvojvrstvy a membránových proteínov^{26,31}.

5. Záver

V poslednom období bol zaznamenaný obrovský pokrok v poznávaní štruktúry, funkcie a molekulových mecha-

nizmov kľúčového enzýmu ATPázy/syntázy, ktorý je zodpovedný za syntézu ATP v bakteriálnej cytoplazmatickej membráne, vo vnútornej mitochondriálnej membráne a v membráne tylakoidov v chloroplastoch. Poznávanie bioenergetických mechanizmov tvorby bunkového ATP u Archaea, ktoré žijú z hľadiska človeka v extrémnych podmienkach, ukázalo celý rad významných odlišností tvorby bunkového ATP. Cieľom tohto prehľadného článku je poukázať na progres, ktorý bol dosiahnutý pri štúdiu archaeálnej A_1A_0 ATPázy/syntázy. Experimentálne zistenia získané pri štúdiu A_1A_0 ATPázy/syntázy jednoznačne preukázali, že A_1A_0 ATPáza/syntáza reprezentuje novú skupinu ATPáz, nakoľko sa výrazne odlišuje od F_1F_0 ATPáz a V_1V_0 ATPáz. A_1A_0 ATPázy/syntázy boli doposiaľ najlepšie preštudované u metanoarchaea. Tieto štúdie ukázali, že A_1A_0 ATPázy/syntázy sú zložené z dvoch domén, ktoré pracujú ako dva rotačné motory a sú spojené prostredníctvom dvoch stopiek – centrálnej a periférnej, podobne ako u F_1F_0 ATPáz. U Archaea je A_0 doména odlišná a jej zloženie, ktoré je variabilné, závisí od rastových podmienok. Práce, ktoré sa sústreďujú na poznávanie tohto enzýmu, poskytujú celú radu nových poznatkov súvisiacich so štruktúrou a molekulovými mechanizmami funkcie tohto enzýmu. Napriek veľkému pokroku pri štúdiu A_1A_0 ATPázy/syntázy, molekulové mechanizmy tvorby bunkového ATP prostredníctvom tohto enzýmu zostávajú nevyjasnené. Je dôležité zdôrazniť, že tieto štúdia otvárajú nové pohľady na tvorbu ATP u extrémne starých mikroorganizmov, ktoré obývajú našu planétu približne 3,5 miliardy rokov, ale aj sprístupňujú pochopenie evolúcie kľúčového bioenergetického enzýmu – ATPázy a umožňujú nazrieť na prvotné procesy života týchto organizmov a ich energiu konzervujúce mechanizmy.

LITERATÚRA

1. http://books.google.sk/books?id=j71AYPZick4C&pg=PA24&lpg=PA24&dq=pH+scale+of+living+Archaea&source=bl&ots=Ah5clb2_EY&sig=daq7J3NU0-N0a02PARsOwG-P2kH0&hl=sk&ei=tbmfSuegLouknQPb0cXNDw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2#v=onepage&q=pH%20scale%20of%20living%20Archaea&f=false, stiahnuté 3. 9. 2009.
2. Thauer R. K., Kaster A.-K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579 (2008).
3. <http://www.biologyreference.com/Ar-Bi/Archaea.html>, stiahnuté 3. 9. 2009.
4. http://en.wikipedia.org/wiki/Archaea#Origin_and_evolution, stiahnuté 3. 9. 2009.
5. Pedersen P. L., Carafoli E.: *Trends Biochem. Sci.* 12, 186 (1987).
6. Fox G. E., Pechman K. R., Woese C. R.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 44 (1977).
7. Finbow E., Herrison M.: *J. Biochem.* 324, 697 (1997).
8. Puts C. F., Holthuis J. C. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 603 (2009).
9. Scarborough G. A.: *J. Exp. Biol.* 203, 147 (2000).
10. <http://www.youtube.com/watch?v=3y1dO4nNaKY&feature=related>, stiahnuté 3.9.2009.
11. <http://www.youtube.com/watch?v=uOoHKCMAUMc>, stiahnuté 3. 9. 2009.
12. Roth R., Bachofen R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1201, 271 (1994).
13. Blaut M., Gottschalk G.: *J. Biochem.* 141, 217 (1984).
14. Grüber G., Wieczorek H., Harvey W., Müller V.: *J. Exp. Biol.* 204, 2597 (2001).
15. Mitchell P.: *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research, Bodmin 1968.
16. Lingl A., Stetter K. O., Mayer F., Kellermann J., Müller V.: *Extremophiles* 7, 249 (2003).
17. Schmidt S., Pflüger K., Kögl S., Spanheimer R., Müller V.: *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 44 (2007).
18. Müller V.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 115 (2004).
19. Müller V., Ruppert C., Lemker T.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 15 (1999).
20. Coskun U., Radermachers M., Müller V., Ruiz T., Grüber G.: *J. Biol. Chem.* 279, 22759 (2004).
21. Šmigáň P., Majerník A., Greksák M.: *FEBS Lett.* 349, 424 (1994).
22. Mulkidjanian A. Y., Galperin M. Y., Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V.: *Biol. Direct* 3, 13 (2008).
23. Ruppert C., Wimmers S., Lemker T., Müller V.: *J. Bacteriol.* 180, 3448 (1998).
24. Müller V., Lemker T., Lingl A., Weidner C., Coskun U., Grüber G.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10, 167 (2005).
25. Müller V., Lingl A., Lewalter K., Fritz M.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 455 (2005).
26. Mulkidjanian A. Y., Makarova K. S., Galperin M. Y., Koonin E. V.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 892 (2007).
27. Hirata T., Iwamoto-Hihara A., Sun-Wada G.-H., Okajima T., Wada Y., Futai M.: *J. Biol. Chem.* 278, 23714 (2003).
28. Chen W., Koninsky J.: *J. Bacteriol.* 175, 5677 (1993).
29. Nováková Z., Šurín S., Blaško J., Majerník A., Šmigáň P.: *F. Microbiol.* 53, 237 (2008).
30. Nováková Z., Bobálová J., Vidová M., Hapala I., Šmigáň P.: *FEMS Mikrobiol. Lett.* 298, 255 (2009).
31. Mulkidjanian A. Y., Galperin M. Y., Koonin E. V.: *Trends Biochem. Sci.* 34, 206 (2009).
32. Šmigáň P., Polák P., Majerník A., Greksák M.: *FEBS Lett.* 420, 93 (1997).
33. Majerník A., Čuboňová L., Polák P., Šmigáň P., Greksák M.: *Anaerobe* 9, 31 (2003).
34. Čuboňová L., Šurín S., Majerník A., Šmigáň P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 23 (2004).
35. Čuboňová L., Majerník A., Šmigáň P.: *F. Microbiol.* 49, 147 (2004).
36. Kish-Trier E., Wilkens S.: *FEBS Lett.* 583, 3121 (2009).
37. Šurín S., Čuboňová L., Majerník A., Šmigáň P.: *F. Microbiol.* 51, 313 (2006).
38. Ihara K., Abe T., Sugimura K. I., Mukohata Y.: *J. Exp. Biol.* 172, 475 (1992).

M. Vidová and P. Šmigáň (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Unique Structural and Functional Properties of A_1A_0 ATPase/Synthase from Archaea**

ATP synthases are present in every life form being the key enzymes of cellular bioenergetics. The enzyme from the Archaea forms a new class of ATPases, A_1A_0 ATP synthase. This enzyme has unusual structural and functional features, which separate it from F_1F_0 and V_1V_0 ATPases as a distinct enzyme class – A_1A_0 ATPase/synthase. It contains the transmembrane A_0 domain and the cytoplasmatic A_1 domain, including a specific site for ATP synthesis. The A_1 domain is linked to the A_0 part by D-subunit, a structural and functional analog of the γ -subunit of F_1F_0 ATPase. The genomic approach to the study of this enzyme combined with methods of molecular biology, biochemistry and structural biology, will extend the study of A_1A_0 ATPase/synthase and ATP synthesis to the molecular level.