

УДК 577.152.6

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ОБРАТИМОСТИ СИНТЕЗА И ГИДРОЛИЗА АТФ $F_0 \cdot F_1$ -АТФазой (гидролазой)

Обзор

© 2019 А.Д. Виноградов*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: adv@biochem.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 19.06.2019

После доработки 08.07.2019

Принята к публикации 08.07.2019

$F_0 \cdot F_1$ -АТФазы митохондрий, бактерий и хлоропластов трансформируют «протон-движущую силу» (разность электрохимических потенциалов ионов водорода по разные стороны сопрягающей мембраны) в свободную энергию фосфорильного потенциала АТФ. Почти общепринято рассматривать $F_0 \cdot F_1$ -АТФазы как *обратимые* хемо-механо-электрические молекулярные машины, обеспечивающие в зависимости от физиологических условий существования организмов либо синтез, либо гидролиз АТФ, принимая как аксиому принцип микрообратимости ферментативного катализа. В течение многих лет (1980–2000 гг.) автор придерживался точки зрения, согласно которой механизмы реакций синтеза и гидролиза АТФ, катализируемых комплексом $F_0 \cdot F_1$, различаются (Vinogradov, A.D. (2000) *J. Exp. Biol.*, **203**, 41–49). В этом обзоре собственных работ автор предлагает новую модель, рассматривая существование в сопрягающих мембранах двух неравновесных изоформ $F_0 \cdot F_1$, однонаправленно катализирующих синтез и/или гидролиз АТФ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: $F_0 \cdot F_1$ -АТФаза, обратимость ферментативного катализа.

DOI: 10.1134/S0320972519110034

Для решения множества проблем физиологии всегда можно найти животное или животных, использование которых наиболее удобно для изучения той или иной проблемы. Я не сомневаюсь, что существуют организмы, «специально созданные» для анализа таких проблем, но опасаясь, что они неизвестны исследователям, для которых они были «созданы».

«Принцип Круга», выдающегося датского физиолога, Нобелевского лауреата 1921 г.
(Krogh, A. (1929) *The progress of physiology, Am. J. Physiol.*, **90**, 243–251)

Автор этой статьи проработал преподавателем кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова более 50 лет (с 1967 г.), будучи убежденным, что занятие научной работой – почетная обязанность любого преподавателя Московского университета. Примерно четверть всех работ, выполненных мною в разное время с разными соавторами – сотрудниками, аспирантами и студентами кафедры био-

химии, – посвящена изучению АТФазы митохондрий – фермента, занимающего одно из центральных положений в процессе окислительного фосфорилирования. Окислительное фосфорилирование открыто и количественно охарактеризовано в 30-х гг. прошлого века В.А. Энгельгардтом и В.А. Белицером в СССР. Для меня почетно сознавать себя одним из продолжателей отечественной школы биоэнергетиков, в становлении которой роль кафедры биохимии общеизвестна. Время от времени, лучше чаще, чем реже, полезно оглянуться на пройденный путь, чтобы, во-первых, суммировать сделанное, а во-вторых, наметить путь дальнейших исследований. Настоящий обзор не является обзором в общепринятом смысле этого слова. Этот очерк скорее соответствует понятию «progress report»,

Принятые сокращения: $F_0 \cdot F_1$ – H^+ -АТФаза, F_0 – гидрофобная часть, F_1 – гидрофильная часть, IF_1 – белковый ингибитор митохондриальной АТФазы, p – протон-движущая сила, СМЧ – субмитохондриальные частицы, Pd-СБЧ – инвертированные плазматические мембраны *Paracoccus denitrificans*.

* Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

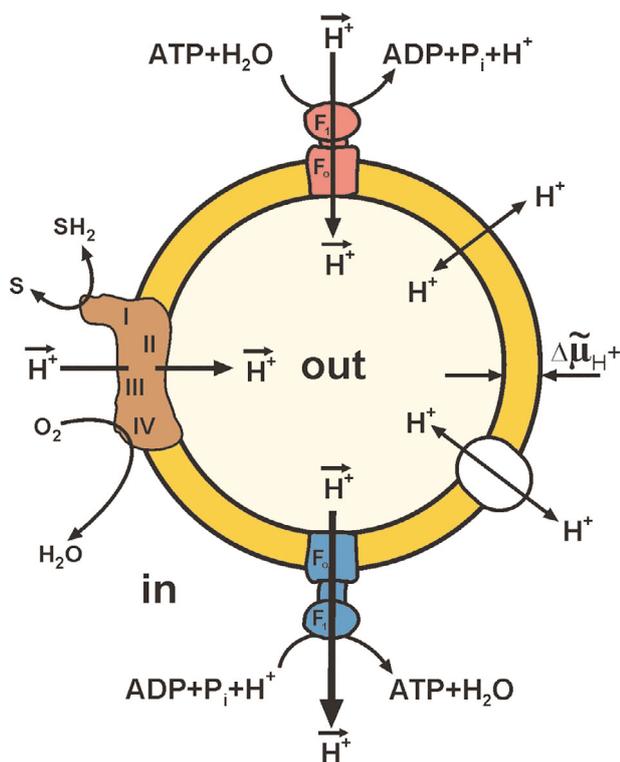


Рис. 1. Схема процессов, происходящих при окислительном фосфорилировании. На рисунке изображен замкнутый фрагмент внутренней мембраны митохондрий (СМЧ) или цитоплазматической мембраны бактерии (Pd-СБЧ). Поверхность, свободно доступная для окружающего раствора, обращена в матрикс митохондрий или цитоплазму бактерий. Генератор протон-движущей силы (p) представлен дыхательной цепью – комплексами I (NADH:убихинон-), III (убихинол::цитохром c -) и IV (цитохром c :кислород-) оксидоредуктазами. Кроме указанных комплексов дыхательной цепи в митохондриях существуют и другие убихинон-редуктазы, не показанные на рисунке (дегидрогеназа электронпереносящего флавопротеина, α -глицеролфосфатдегидрогеназа, дигидроорататдегидрогеназа и др.). F_0F_1 -АТР-синтезирующий (синий) или АТР-гидролизующий (красный) комплексы состоят из гидрофильного F_1 , обеспечивающего «химическую» часть катализа, и гидрофобного F_0 – протонпроводящего устройства, механического привода, обеспечивающего вращение γ -субъединицы F_1 . В правой части фрагмента показаны спонтанный перенос протонов через фосфолипидную мембрану и их перенос через другие, не связанные непосредственно с окислительным фосфорилированием компоненты (транслоказа АТР и АDР, так называемые «разобщающие» (УСР)-белки, катион-транслоказы и др.). С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

и, конечно, не хотелось бы, чтобы он стал окончательным отчетом о проделанной работе. Обзоры со ссылками на оригинальные работы были опубликованы мною ранее [1–3]. В этой статье в специальном выпуске журнала «Биохимия», посвященном 80-летию кафедры биохимии био-

логического факультета МГУ, я буду ссылаться только на публикации собственных работ, начатых в 1972 г., а ряд утверждений буду приводить как хорошо установленные факты без ссылок на первоисточники. В тексте совсем не обсуждаются данные о F_0F_1 хлоропластов – еще более сложно регулируемой машине: ряд открытий, сделанных при изучении этого объекта, внес существенный вклад в общее понимание ее механизма и регулирования.

Максимально упрощенная схема окислительного фосфорилирования показана на рис. 1. Окисление кислородом (или другими окислителями у некоторых организмов) продуктов (SH_2), низкомолекулярных соединений, образующихся в результате распада пищи, катализируется комплексом оксидоредуктаз – так называемой дыхательной цепью. Это окисление сопряжено с векторным переносом протонов из одного отсека (in) в другой (out), разделенных мембраной, ограничивающей спонтанное перемешивание содержимого обоих отсеков и, что особенно важно, медленно, по сравнению со скоростью векторной транслокации, проницаемой для протонов (катионов гидроксония). В результате возникает разность электрохимических потенциалов ионов водорода по разные стороны мембраны ($\Delta\tilde{\mu}_H^+$ или «протон-движущая сила», p ; последнее обозначение будет использоваться в дальнейшем). Перемещение протонов по градиентам электрического поля и рН через F_0F_1 -АТР-синтезирующий (синий) или АТР-гидролизующий (красный) комплексы, встроенный в мембрану, сопряжено с синтезом АТР из АDР и P_i (реакция, показанная в нижней части рис. 1) за счет энергии p . Обратная реакция – гидролиз АТР (показан в верхней части рис. 1) – происходит, когда дыхание по каким-либо причинам отсутствует, и сопровождается возникновением p .

Поглощение кислорода, сопряженное с образованием АТР, в физиологических условиях клеток и тканей регулируется многочисленными факторами, среди которых простейший и хорошо известный – так называемый дыхательный контроль. Это явление, впервые предсказанное и обнаруженное В.А. Белицером, продолжили изучать десятилетие спустя две независимые американские группы – Б. Чанса и Г. Ларди – с использованием в качестве объекта препаратов интактных изолированных митохондрий. Дыхательный контроль сводится к следующему. В среде, не содержащей субстратов для синтеза АТР (АDР и P_i), поглощение кислорода (окисление субстратов дыхания) происходит медленно и ограничивается скоростью «утечки» протонов за счет специфической и неспецифической проницаемости мембраны. Добавление АDР и P_i силь-

но или слабо (в зависимости от конкретного препарата митохондрий) активирует дыхание, которое продолжается до тех пор, пока добавленные ADP и P_i не превратятся в АТФ, и *p* не «уравновесится» фосфорильным потенциалом АТФ/ADP·P_i. Изучение параметров АТФ-синтазной или гидролазной активностей F₀·F₁ с использованием интактных митохондрий практически невозможно. В синтезе, как и в гидролизе АТФ интактными митохондриями, участвуют несколько ферментов: специфические переносчики P_i, адениновых нуклеотидов, субстратов дыхания (интермедиатов цикла Кребса), каждый из которых зависимо или независимо регулируется *p*. Схема на рис. 1 упрощенно показывает функционирование F₀·F₁ в «вывернутых» (inside-out) субмитохондриальных частицах (СМЧ) — замкнутых фрагментах внутренней (сопрягающей) мембраны митохондрий или плазматической мембраны бактерий. Внешняя сторона мембраны таких фрагментов соответствует матриксу интактных митохондрий, а внутренняя — их межмембранному пространству. Активные центры компонентов дыхательной цепи и нуклеотид-связывающие центры F₁ в этих фрагментах доступны для субстратов и катализируют зависящий от дыхания синтез АТФ. К сожалению, дыхание СМЧ и бактериальных препаратов плазматических мембран слабо или вовсе не контролируется активностью F₀·F₁, и в таких препаратах синтез АТФ удается проследить только с использованием «ловушек» АТФ (обычно используют глюкозу и гексокиназу или люциферин-люциферазную систему детекции АТФ). Уместно подчеркнуть, что подавляющее большинство многочисленных работ, содержащих выводы о механизме энергозависимого синтеза АТФ, основаны на изучении АТФ-гидролазной реакции (эту реакцию существенно проще измерить), катализируемой либо растворимым F₁, либо F₀·F₁ в составе мембран, либо, наконец, на отслеживании АТФ-зависимых параметров механохимии индивидуальных молекул фермента. Очевидно, что эти выводы вполне оправданы только при безусловном принятии принципа микрообратимости ферментативного катализа. И еще одно замечание: оправдано ли употребление выражения «уравновешивается», использованное выше при описании явления дыхательного контроля? Нужно подчеркнуть, что все процессы, связанные с генерацией или использованием *p* и характеризующие их параметры, должны рассматриваться как *стационарные*, а не как *равновесные*. По моему мнению, биоэнергетики часто «злоупотребляют» термодинамическими представлениями, которые применимы только для действительно равновесных состояний.

Общепринятая схема, описывающая события, которые происходят в нуклеотид-связывающих центрах тримера, построенного из пар α-β-субъединиц F₁, в ходе *p*-зависимого синтеза АТФ показана на рис. 2. Еще раз подчеркнут, что

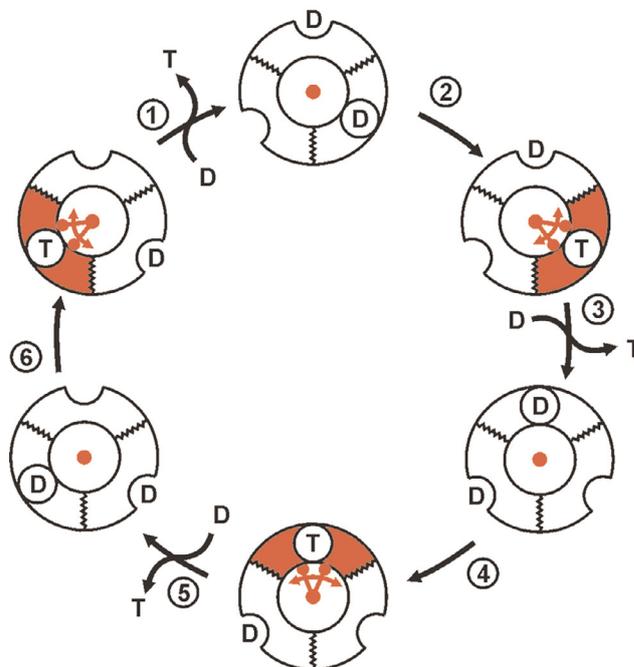


Рис. 2. Минимальная схема и последовательность событий, в результате которых происходит *p*-зависимый синтез АТФ из ADP и P_i «вращательным механизмом чередующегося сродства» (rotational alternating binding site change mechanism). F₁ представлен тримером, построенным из α-β-субъединиц и единственной γ-субъединицы (показана красным), расположенной внутри этого тримера. Субстрат- (ADP + P_i, обозначено как D) и продукт- (Т) связывающие центры, локализованные на границах между α- и β-субъединицами тримера, существуют в двух состояниях: открытом (полукруг на поверхности плоского кольца) и закрытом (D и Т прочно связаны в центрах, замкнутый круг на поверхности). D связывается в единственном субстратсвязывающем центре F₁, уже содержащем D и Т. Выталкивание Т и освобождение субстратсвязывающего центра для D происходит за счет подвижной внутри кольца γ-субъединицы, приводимой во вращательное движение током протонов через F₀. Тример F₁ в составе F₀·F₁ закреплен, так что его вращение исключено. Поворот γ-субъединицы на 120° синхронизован с появлением АТФ (Т) в окружающем растворе. Единичный акт появления продукта реакции в растворе приводит к регенерации свободного фермента, отличающегося от его исходной формы *только* положением γ-субъединицы (поворот на 120° относительно исходного). Два последующих поворота γ-субъединицы (каждое на 120°) сопровождаются последовательным выбросом еще двух молекул продукта (АТФ), и вся конструкция возвращается в ее начальное состояние. Красным цветом обозначены сегменты кольца димеров α-β-субъединиц, в которых образованный АТФ (Т) готов для выталкивания в окружающую среду. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

эта и многочисленные аналогичные схемы разной степени детализации в подавляющем большинстве основаны на экспериментальных данных об АТР-гидролазной реакции (кинетика, изотопный обмен, структура изолированных препаратов, вообще не катализирующих синтез АТР). Схема описывает (сокращенно) «механизм» последовательного образования трех молекул АТР из трех молекул ADP и P_i , который принято обозначать как «вращательный механизм чередующего сродства» (rotational alternative binding site mechanism), предложенный К. Репке и Р. Шоном в 1973 г. и ставший общепринятым в результате детальных работ П. Бойера. Краткое описание последовательности событий дано в подписи к рис. 2. Очевидны три принципиально важных аспекта такого механизма:

1) собственно синтез (образование фосфоангидридной связи между β - и γ -фосфорильными остатками АТР) происходит «спонтанно» (не требует энергии) за счет очень высокого сродства продукта реакции (АТР) к активному центру фермента;

2) энергия p тратится на выталкивание прочно связанного АТР из активного центра в окружающую среду механическим воздействием γ -субъединицы F_1 , расположенной в сердцевине трехдольного «апельсина» (три α - β -пары) и вращающейся током протонов через F_0 ;

3) стехиометрия строго задана: три молекулы АТР на полный (360°) поворот γ -субъединицы.

Очевидная трудность для такого механизма возникает в случаях, когда количество c -субъединиц в кольце F_0 (механический привод вращения) не кратно трем (10–15 для F_0 разных видов). Система, оперирующая с переменной стехиометрией «АТР: векторно перенесенный протон», была бы физиологически целесообразной и служила бы важным элементом регулирования энергетики клеток.

АТР-ГИДРОЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ $F_0 \cdot F_1$

Мембраносвязанный комплекс $F_0 \cdot F_1$ СМЧ или растворимая часть комплекса F_1 катализирует гидролиз АТР и других пуриновых нуклеотидов. Суммарная реакция гидролиза АТР при рН 8,0 в водном растворе соответствует уравнению:



Нужно подчеркнуть, что протон в правой части уравнения (так называемый стехиометрический протон) не относится к компонентам

системы векторной транслокации протонов — H^+ на рис. 1. Скорость такой реакции легко регистрируется в слабо забуференных средах по кинетике закисления с помощью либо стеклянного рН-электрода, либо подходящего рН-индикатора (удобно использовать феноловый красный). При измерении АТРазной активности растворимыми частично очищенными препаратами F_1 , полученными из ацетоновых порошков митохондрий, уже в самом начале наших исследований мы обнаружили несколько проявлений «аномальной» кинетики реакции [4], каждое из которых стало причиной нашего дальнейшего разбирательства.

Перечисленные ниже наблюдения были сделаны нами и опубликованы в самом начале нашего интереса к изучению механизма F_1 -АТРазы. Тогда мы использовали в качестве объекта растворимый «фактор F_1 », солюбилизованный и очищенный с использованием в качестве исходного материала ацетонового порошка митохондрий сердца крупного рогатого скота [4, 5]. Вскоре нам стало ясно, что изучение функционирования F_1 в процессе окислительного фосфорилирования целесообразно только на «полном» ферменте ($F_0 \cdot F_1$) в составе мембран, способных к генерации или использованию p . Для этого мы разработали способ получения сопряженных СМЧ (рис. 1), катализирующих все реакции, перечисленные в подписи к рис. 1, и, начиная с 1979 г., все наши работы были выполнены с использованием СМЧ. Ряд наблюдений, обнаруженных при изучении растворимого F_1 , был подтвержден и при использовании СМЧ. Наблюдения сводились к следующему:

1) реакция оказалась малоспецифичной для Mg^{2+} : фермент катализировал гидролиз в присутствии других двухвалентных катионов с наибольшей активностью с Co^{2+} ;

2) начальная скорость реакции быстро (в минутной шкале времени) снижалась, и это снижение не могло быть объяснено ни инактивацией белка, ни изменением текущих концентраций субстрата (АТР) и/или продукта (ADP и P_i);

3) активность фермента стимулировалась стандартным протонофорным разобщителем — 2,4-динитрофенолом [5]. Это явление в начале 70-х гг. представлялось сильным аргументом против теории Митчелла об электроосмотическом механизме сопряжения;

4) зависимость начальных скоростей реакции от концентрации АТР хорошо соответствовала простой гиперболической зависимости.

Последнее заслуживает краткого обсуждения в свете современных представлений о механизме функционирования $F_0 \cdot F_1$ и многочисленных опубликованных данных об аномальной

(не Михаэлисовской) зависимости F₁ и F₀·F₁-АТРаза от концентрации АТРа. Твердо установлено, что все F₁-АТРаза построены из тримеров комплексов α-β-пар субъединиц и имеют три быстро обмениваемых центра связывания нуклеотидов-субстратов или продуктов реакции. Потенциальная возможность заполнения этих центров показана на рис. 3. Катализ по механизму чередующегося сродства, как любой каталитический процесс, должен начинаться с некоторой формы фермента, связывающей субстрат, и заканчиваться после высвобождения продукта реакции такой же формой. Исходной и регенерируемой в результате последующих превращений формой фермента при описании либо гидролиза, либо синтеза АТРа механизмом чередующегося сродства служит F₁, имеющий единственный центр связывания нуклеотида-субстрата, который заполняется либо АТРа для «гидролазного» пути, либо АDР для «синтезазного» пути, а два других постоянно содержат АТРа и АDР (ср. рис. 2 и 3). Существование единственного центра связывания субстрата/продукта соответствует простой гиперболической зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Полный гексамер – «свободный фермент» – может формироваться из свободных от нуклеотидов субъединиц или субъединицы заполняются нуклеотидами еще до формирования активного фермента. На рис. 3 показано количество возможных вариантов заполнения потенциальных активных центров F₁: оно равно 10 для симметричного тримера при связывании только АТРа и АDР без учета связывания P_i в центрах, заполненных АDР. Ясно, что количество возможных форм F₁ с учетом связывания только одной молекулы P_i в АDР-заполненных центрах или до трех в центрах, не содержащих нуклеотидов, сильно возрастает. Это оценочное рассмотрение показывает неизбежную многозначность приписывания «каталитически-интермедиатной» значимости той или иной атомной структуре F₁, расшифрованной рентгенографическим анализом кристаллов белка, выращенных в присутствии различных лигандов. Это замечание также относится и к результатам криоэлектронной микроскопии – метода, лавинообразно распространяющегося для визуализации биологических объектов на молекулярном уровне. Интересно, что каталитические параметры F₀·F₁ (во всяком случае, для мембран *Paracoccus denitrificans*) гидролиза и синтеза АТРа, измеренные при концентрациях нуклеотидов, многократно превышающих величины K_m и близких к физиологическим, почти не отличаются от тех, что определены для обычно измеряемых (~1 мМ АТРа и ~0,1 мМ АDР со-

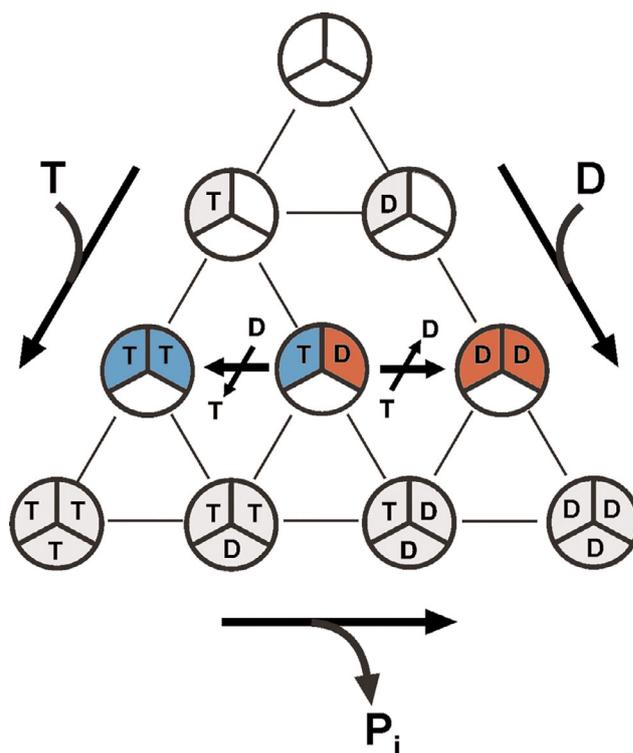


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая множественность возможных заполнений центров связывания двух лигандов: Т (АТРа) и D (АDР) тримером α-β-пар F₁. Возможно существование десяти комплексов разного состава: одного «пустого» комплекса и девяти комплексов разной качественной и количественной степени заполненности. Следует иметь в виду, что «пустой» и все АDР-содержащие комплексы могут связывать по крайней мере 1–3 молекулы P_i, так что число возможных вариантов существенно возрастает. Синим и красным цветами отмечены, соответственно, варианты «свободных регенерируемых форм» фермента при катализе синтеза или гидролиза АТРа посредством механизма, представленного на рис. 2. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ответственно). Другими словами, заполнение нуклеотидами многих или всех центров их связывания, не участвующих в катализе, не приводит к ингибированию высокими концентрациями субстратов/продуктов (при условии достаточной концентрации Mg²⁺). С другой стороны, для протекания стационарного гидролиза АТРа F₀·F₁ мембраны *Paracoccus denitrificans* необходимо, чтобы в среде присутствовало некоторое количество АDР (~10⁻⁵ М) – увеличение активности АТРа-регенерирующей системы (фосфоенолпируват + пируваткиназа) сверх «необходимого» приводит к торможению реакции [6]. Это наглядно показывает сложность кинетики АТРазной реакции и необходимость крайней осторожности при интерпретации результатов. Относительное сродство центров связывания

нуклеотидов, заполнение которых необходимо для формирования исходной формы активного «свободного» фермента, по-видимому, является видоспецифичным.

ЗАВИСИМОСТЬ ГИДРОЛИЗА АТР от Mg^{2+}

подавляющее большинство известных АТРаз использует в качестве субстрата реакции комплекс «нуклеотид — ион двухвалентного металла». Это справедливо и для F_1 -АТРаз из разных источников. Однако Mg^{2+} выполняет дополнительную, пока малопонятную роль в гидролизе. Известно, что АТР связывает катион Mg с хорошо известными количественными параметрами, и АТРазная активность F_1 снижается при большем увеличении концентрации АТР, чем это необходимо для образования комплекса $АТР^{4-} \cdot Mg^{2+}$, и это снижение количественно соответствует уменьшению концентрации свободного катиона [4, 7]. Интересно, что кинетически инертные комплексы АТР с катионами лантанидов не гидролизуются F_1 -АТРазой при отсутствии Mg^{2+} , и ее АТРазная активность, хотя и небольшая (~10% от максимальной активности, наблюдаемой в оптимальных условиях), появляется при добавлении Mg^{2+} [7]. Существование специфического центра связывания Mg^{2+} с зависящим от рН средством $\sim 10^{-5}$ М выявляется также в АDP-зависимой трансформации F_1 в неактивную форму [8–10]. Участие связывания Mg специфическим центром F_1 в механизме катализа, а возможно, и в механизме АТР-зависимой транслокации протонов, представляется важной, сегодня забытой проблемой энзимологии фермента.

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР F_1 -АТРАЗЫ

Растворимый F_1 или разные препараты СМЧ в зависимости от способа препаративного получения содержат или не содержат небольшой водорастворимый белок (IF_1), достаточно прочно связанный с F_1 и который фактически должен рассматриваться в качестве субъединицы комплекса $F_0 \cdot F_1$. Наличие этого белка в IF_1 -содержащих препаратах затрудняет, а зачастую и искажает измеряемые каталитические характеристики гидролиза АТР. Белок IF_1 получен в гомогенном состоянии, а доступность СМЧ, освобожденных от него, позволила достаточно подробно изучить параметры взаимодействия $F_0 \cdot F_1$ и IF_1 [11–13]. IF_1 медленно по сравнению с каталитическими оборотами F_1 ингибирует гидро-

лиз, и это ингибирование зависит от АТР, т.е. от состояния одного (или нескольких) интермедиатов катализа. Скорость торможения АТРазной активности ингибитором сильно зависит от рН и обусловлена протонированием гистидинового остатка в составе IF_1 [11, 12], ответственного за скорость его конформационной трансформации в активную (ингибирующую) форму. Нужно подчеркнуть, что IF_1 не ингибирует АТР-синтезную активность $F_0 \cdot F_1$ [13]. Физиологическое значение IF_1 -зависимого ингибирования АТРазной активности неизвестно. Одна из интересных, на мой взгляд, возможностей заслуживает обсуждения.

Высвобождение так называемого «стехиометрического» протона (см. уравнение (1)) при наличии АТР и любой АТР-гидролазной активности должно приводить к закислению среды. Физиологическая концентрация АТР в матриксе митохондрий составляет 5–10 мМ. Гидролиз АТР (закисление матрикса) и его синтез (защелачивание) можно рассматривать как динамическую контролируемую $F_0 \cdot F_1$ рН-буферную систему матрикса митохондрий. Сильная рН-зависимость влияния IF_1 в физиологической области рН и сама рН-зависимость АТР-гидролазной активности $F_0 \cdot F_1$ (см. ниже) позволяют думать о комбинации АТР/АDP, IF_1 и $F_0 \cdot F_1$ в качестве высокочувствительного рН-стата матрикса митохондрий.

АDP(Mg^{2+})-БЛОКИРОВАННАЯ ФОРМА $F_0 \cdot F_1$

При обсуждении кинетики и последующего построения моделей механизмов любой ферментативной реакции в энзимологии принято пользоваться стационарным приближением оценок начальных скоростей процесса. «Начальные скорости» гидролиза $F_0 \cdot F_1$, освобожденного от IF_1 , зависят от «истории» мембраносвязанных препаратов фермента. Убыль субстрата реакции (появление продукта) происходит либо линейно во времени, либо наблюдается лаг-фаза, либо «вспышка» активности, сменяющаяся постоянной скоростью реакции. Природа этого явления, в литературе обозначаемого как «АDP(Mg^{2+})-ингибирование», обусловлена специфическим связыванием АDP (обязательно в присутствии Mg^{2+}) в активном центре F_1 , локализованном на одной из пар α - β -субъединиц тримера F_1 . Преинкубация растворимого F_1 или $F_0 \cdot F_1$ в составе мембран в присутствии очень низких, почти равных концентрации F_1 количеств АDP или АТР в присутствии Mg^{2+} приводит к полному исчезновению АТР-

гидролазной активности [8, 14]. Полная, но медленная (десятки минут) активация фермента достигается добавлением P_i [15], удалением Mg²⁺ (ЭДТА) [9], обработкой фосфоенолпируватом в присутствии пируваткиназы [16], анионом сульфата [17] и, наконец, инициированием гидролиза субстратных количеств АТФ [18]. Энергизация мембран приводит к быстрой активации АТРаза ADP(Mg²⁺)-ингибированного фермента [19]. Отсутствие АТРазной активности F₁ у многих прокариот, по-видимому, обусловлено, по-крайней мере частично, естественной «преинкубацией» с ADP. Интересно, что препараты, преинкубированные с ADP в количестве (концентрации), большем, чем это необходимо для полного блокирования АТРаза, активируются *быстрее*, чем «стехиометрически» ингибированные [20]. Многие проявления этого ингибирования (активация АТРазной активности рядом анионов, специфическое ингибирование азид-анионом [17], уже упоминавшаяся стимуляция активности 2,4-динитрофенолом [5], различие в кинетике гидролиза АТФ и других пуриновых нуклеотидов [17], влияние Mg²⁺ [21], специфическая активация АТРаза детергентом LDAO и отсутствие или очень низкая активность АТРаза в мембранах прокариот) достаточно хорошо объясняются кинетическими схемами, опубликованными в серии наших работ. Потенциально важную роль в регулировании АТРазной активности, по-видимому, играет также ε-субъединица фермента, хотя данные о ее влиянии часто противоречивы. Анализ этого явления (в частности, его отсутствие в реакции синтеза АТФ препаратами сопряженных СМЧ) привел нас к гипотезе, сегодня принимаемой большинством энзимологов: *механизмы реакций синтеза и гидролиза АТФ F₀·F₁-АТРазами различны, и эти молекулярные машины не подчиняются принципу микрообратимости (детального равновесия)*. В самом общем виде эта гипотеза была сформулирована много лет назад: существует контролируемое рядом параметров равновесие между двумя формами F₀·F₁, каждая из которых катализирует либо гидролиз (F₁^H), либо синтез (F₁^S) [21, 22]:



Такая модель объясняла *одностороннее* действие нескольких соединений, специфических эффекторов АТРазной активности: белкового ингибитора IF₁, антибиотика ауровертина, азиды, P_i и др. К сожалению, напрямую доказать или опровергнуть это положение оказалось чрезвычайно трудным ввиду многочисленных возможностей интерпретации результатов, по-

лучаемых на заведомо неидеальных (см. рис. 1) препаратах СМЧ.

СМЕНА ОБЪЕКТА: *Paracoccus denitrificans*

В 1970 г. П. Джон и У. Гамильтон сообщили об отчетливо регистрируемом в препаратах инвертированных плазматических мембран почвенной бактерии *Paracoccus denitrificans* (Pd-СБЧ) явлении дыхательного контроля, качественно и количественно аналогичного сопряженным митохондриям. На рис. 4 представлена синхронная запись дыхания и мембранного потенциала цитоплазматических мембран *P. denitrificans* (рис. 4 воспроизведен из нашей публикации [23]). Поз-

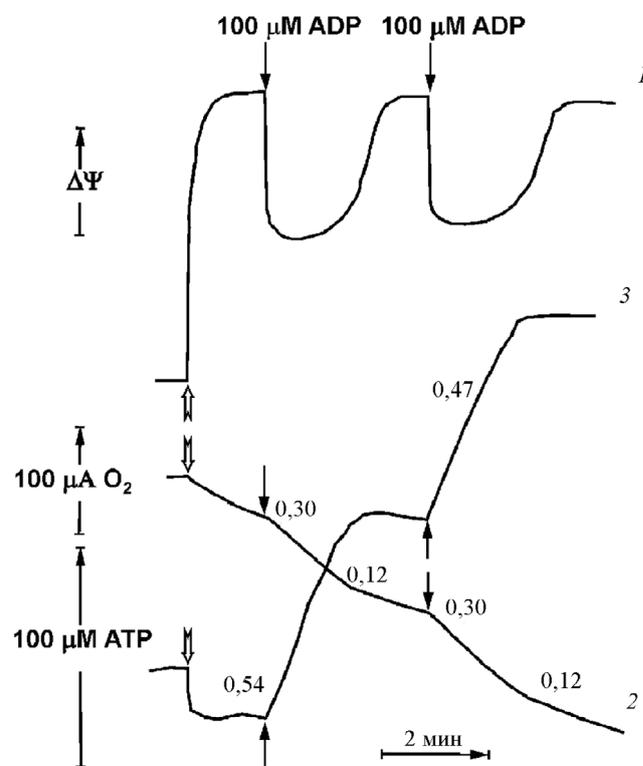


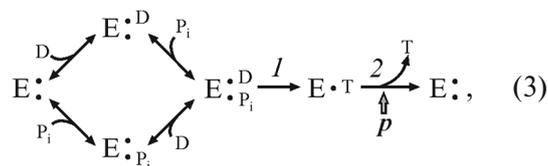
Рис. 4. Синхронная регистрация изменений электрического $\Delta\psi$ компонента p (кривая 1, усл. ед), поглощения кислорода (кривая 2) и синтеза АТФ (кривая 3) препаратом сопряженных Pd-СБЧ, суспендированных в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ Hepes (рН 7,0), 0,1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ К-Р_i, 5 мМ семикарбазид, 5 мМ этанол, 450 ед алкогольдегидрогеназы и 60 мкМ NADH (30 °С). Электрический потенциал (1) регистрировали по электрохромному сдвигу поглощения оксонола VI; дыхание (2) измеряли амперометрически кислород-чувствительным электродом; синтез АТФ (3) оценивали по изменению рН при синтезе АТФ с использованием стеклянного рН-электрода. Реакции начинали добавлением Pd-СБЧ (указано незаштрихованными стрелками). Рисунок взят из нашей публикации [23], воспроизведен с любезного разрешения издательства Elsevier

же оксфордская группа сообщила об удивительном явлении: сопряженные Pd-СБЧ катализировали окислительное фосфорилирование, но не обладали АТРазной активностью! Ввиду нашего интереса к описанному выше поведению митохондриального $F_0 \cdot F_1$ мы, следуя «принципу Крога» (см. эпиграф), обратились к изучению фермента в сопряженных мембранах этого микроорганизма. Мы убеждены, что несмотря на хорошо документированные различия в структуре и некоторых каталитических свойствах $F_0 \cdot F_1$ у разных организмов, главные принципы функционирования этого энергопреобразующего комплекса одинаковы у всех АТРаз F_1 -типа. Мы начали с проверки отсутствия АТР-гидролазной активности Pd- $F_0 \cdot F_1$, подозревая, что это удивительное явление обусловлено ADP(Mg^{2+})-индуцированным блокированием активности. Действительно, оказалось, что активированный мембранным потенциалом (энергизацией) Pd- $F_0 \cdot F_1$ катализирует как синтез, так и гидролиз АТР с соизмеримыми скоростями [24, 25]. Для регистрации обеих активностей потребовалось создать специальные условия: энергизовать мембраны сопряженным окислением либо сукцината, либо NADH и начать реакцию одновременным добавлением АТР и ингибитора дыхания. Начавшаяся АТРазная активность продолжается до тех пор, пока p поддерживается транслокацией протонов $F_0 \cdot F_1$ -комплексом. Такой гидролиз стимулируется разобщителями и, таким образом, происходит в самоподдерживаемом режиме: АТРаза активна до тех пор, пока сопряженный гидролиз АТР поддерживает энергизацию мембран. Другими словами, по крайней мере часть энергии, высвобождаемой при каталитической реакции, расходуется на поддержание фермента в метастабильном активном состоянии. Очевидно, что такая кинетика не может быть описана в стандартных терминах, и каталитический цикл должен рассматриваться как работа *машины*. Такое замечательное устройство физиологически оправдано: фермент должен «знать», что АТР, образованный не дыханием, а другими источниками (путь Энтнера–Дудорова анаэробного распада глюкозы у *P. denitrificans*), расходуется для поддержания жизненно необходимого потенциала плазматической мембраны, а не бесполезно превращается в тепло. АТРазная активность быстро исчезает, если мембранный потенциал падает ниже допустимого уровня при увеличении концентрации разобщителя. Как уже обсуждалось при описании дыхательного контроля и показано на рис. 4, в заторможенном состоянии p «уравновешивается» фосфорильным потенциалом. Однако прямое измерение показало, что соотноше-

ние АТР/АДР в этом состоянии *не зависит* ни от концентрации P_i (полноправного компонента фосфорильного потенциала), ни от количества предварительно образованного АТР! Такой результат показывает, что контролируемое дыхание определяется не термодинамическими, а кинетическими параметрами [23].

КИНЕТИКА p -ЗАВИСИМОГО СИНТЕЗА АТР

Синтез АТР из АДР и P_i – классическая би- или трисубстратная реакция (если генерацию p рассматривать как ферментативную реакцию), в которой субстратом служит векторно переносимый протон. Существование легко регистрируемого синтеза АТР мембранами *P. denitrificans* позволило сформулировать, хотя и очень упрощенно, кинетическую схему процесса:



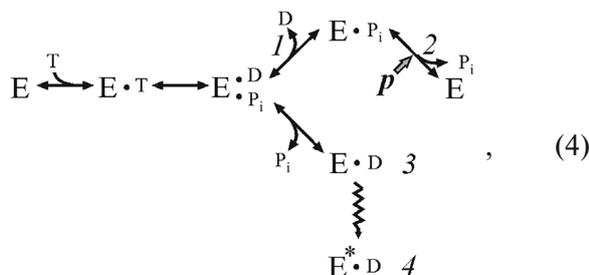
где D и T – АДР и АТР соответственно.

Анализ начальных скоростей синтеза показал, что связывание АДР и P_i происходит неупорядоченно, и стадии 1 и 2 в последовательности (3) разделены необратимыми превращениями (механизм пинг-понг): снижение величины p пропорционально уменьшает стационарную концентрацию интермедиата, превращающего связанные субстраты в продукт реакции [26]. Отметим, что точно такое же кинетическое поведение ожидается, если неупорядоченному связыванию субстратов предшествует энергозависимая трансформация фермента в форму, способную связывать (неупорядоченно) субстраты.

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА АТР: ВЛИЯНИЕ P_i

Хорошо известно, что P_i – естественный субстрат окислительного фосфорилирования – не ингибирует гидролиз АТР растворимым F_1 или мембраносвязанным $F_0 \cdot F_1$ при концентрациях, многократно превышающих величины K_m в реакции синтеза АТР. Это явление – сильное, неоднократно нами подчеркиваемое указание на различия путей энергозависимых синтеза и гидролиза АТР. Располагая заведомо сопряженными препаратами Pd- $F_0 \cdot F_1$, мы обратились к изучению влияния продукта реакции (P_i) на АТР-

гидролазную реакцию. Оказалось, что P_i не только не ингибирует АТРаза, но и *необходим* для *упорядоченного* *p*-зависимого высвобождения продуктов гидролиза, и описанное ранее ADP(Mg²⁺)-зависимое блокирование АТРаза гидролазной активности непосредственно связано с этим необычным явлением. Ниже приведена суммарная кинетическая схема энерготрансформирующего сопряженного гидролиза [27]:



где E^{*}·D – ADP(Mg²⁺), неактивная форма.

Высвобождение продуктов реакции происходит *упорядоченно*: *p* препятствует диссоциации P_i, и ADP должен высвобождаться первым. При отсутствии *p* P_i имеет низкое сродство к активному центру, и его диссоциация приводит к образованию интермедиата 3, быстро трансформирующемуся в ADP(Mg²⁺)-неактивную форму F₁ (4). При сравнении кинетических схем (3) и (4) стоит подчеркнуть, что в процессе синтеза АТРа субстраты фермента связываются неупорядоченно, тогда как при гидролизе АТРа путем прямого обращения последовательности синтеза продукты реакции должны высвобождаться упорядоченно и включать стадию *p*-зависимого прочного связывания P_i.

ДРУГИЕ ЭФФЕКТОРЫ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АКТИВНОСТЕЙ F₀·F₁

Низкие концентрации антибиотика вентурицидина специфически блокируют F₀·F₁, препятствуя транслокации протонов через F₀, действуя аналогично классическому ингибитору окислительного фосфорилирования – олигомицину (олигомицин практически не ингибирует F₀·F₁ прокариот). Чувствительности реакций синтеза и гидролиза АТРа препаратами Pd-F₀·F₁, обработанными в идентичных условиях вентурицидином, существенно различаются: полумаксимальное торможение синтеза и гидролиза происходит при концентрациях ~0,3 и 1,0 нмоль на 1 мг белка соответственно [28]. Ингибирование неконкурентно с субстратами реакций. Другим односторонним эффектором оказывается значение pH: закисление среды от 8,0 до 7,0

сильно и неконкурентно с АТРа тормозит АТРаза, практически не влияя на синтез АТРа. Важно отметить, что снижение активности гидролиза АТРа при снижении pH не сопровождается пропорциональным возрастанием активности синтеза, как следовало бы ожидать вследствие pH-зависимого сдвига равновесия (см. схему (2)).

ГИПОТЕЗА И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакции синтеза и гидролиза АТРа F₀·F₁-АТРазами, по моему мнению, – одни из чрезвычайно сложных для изучения их кинетики, главным образом потому, что «субстрат» и «продукт» обеих реакций – векторно переносимый протон. Попытки разобраться в деталях работы F₀·F₁ привели нас к твердому убеждению о различии механизмов синтеза и гидролиза АТРа. Нужно подчеркнуть, что все, что обсуждалось до сих пор – упрощенная картина. Так, например, некоторые F₁-АТРаза в дополнение к показанным схемам с тремя активными центрами содержат так называемые прочносвязанные, не обмениваемые в ходе катализа нуклеотиды; ε-субъединица фермента связывает АТРа (ADP), и изменение ее конформации влияет на АТРа-гидролазную активность; Pd-F₀·F₁ содержит относительно недавно обнаруженную ζ-субъединицу, возможно, выполняющую функцию, аналогичную митохондриальному IF₁.

Анализируя наши последние результаты и опираясь на опыт современной энзимологии, мы сочли целесообразным рассмотреть «простой» вариант объяснения этих различий: сопрягающие энергопреобразующие мембраны содержат две *неравновесные* формы F₀·F₁: одну форму, кинетические свойства которой наилучшим образом приспособлены для эффективно регулируемого *p*-зависимого синтеза АТРа, и другую форму, аналогичным образом приспособленную для АТРа-зависимой генерации *p*. Другими словами, формулируемая таким образом гипотеза состоит в ликвидации двухсторонней стрелки в схеме (2). Здесь следует дать несколько пояснений, касающихся самих понятий *равновесие* и *изоформы*. Нет оснований полагать, что существуют изоферменты (ферменты, кодируемые разными генами) F₀·F₁, хотя нельзя исключить и такую возможность для отдельных субъединиц комплекса. Под изоформами следует понимать возможные варианты ковалентной посттрансляционной модификации, набора специфических аннулярных фосфолипидов, комплексы F₀·F₁, содержащие или не содержащие дополнительные субъединицы. Мне кажется

ся особенно привлекательной возможностью существования комплексов с разноразмерными наборами *c*-субъединиц в протонопроводящем кольце F_0 , что должно привести к изменению энергетики всего процесса.

Теперь о равновесии или его отсутствии. Биохимики научились регистрировать внутримолекулярные процессы, происходящие за времена порядка микросекунд (и быстрее). С другой стороны, перестройки (возникновение и исчезновение) четвертичных структур белков-ферментов могут происходить во временном промежутке порядка минут и даже часов. Здесь я подразумеваю под изоформами структуры, время жизни которых многократно превышает время, необходимое для акта катализа.

Трудно удержаться от спекуляций применительно ко все более популярным «биомедицинским» проектам (финансирование!). В последнее время появилось несколько проектов по изучению новых $F_0 \cdot F_1$ (например, микобактерий (туберкулез) или трипаносом), направленных на поиск их специфических ингибиторов. Разные чувствительности синтетазной и гидролазной активностей $Pd \cdot F_0 \cdot F_1$ дают пищу для размышлений в этом направлении.

Подчеркну, что предложенная гипотеза ни в коем случае не может считаться доказанной, а

эксперименты для ее проверки — всего лишь одно из направлений работы нашей группы.

Финансирование. Все цитированные работы были выполнены при систематической финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты «Энзимология биоэнергетических систем» с момента основания фонда, включая текущий грант № 17-04-00706/17).

Благодарности. Автор благодарит своих коллег (все они являются выпускниками кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова), в разные годы участвовавших в наших общих работах по изучению $F_0 \cdot F_1$ -АТФазы. Я особенно признателен В.Г. Гривенниковой за помощь в редактировании и подготовке рукописи, без которых эта публикация была бы невозможна.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов. Митохондрии сердец крупного рогатого скота получали из материала коммерческих мясокомбинатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградов А.Д. (1984) Каталитические свойства АТФ-синтетазы митохондрий, *Биохимия*, **49**, 1220–1238.
2. Виноградов А.Д. (1999) Митохондриальная АТФ-синтезирующая машина: пятнадцать лет спустя, *Биохимия*, **64**, 1443–1456.
3. Vinogradov, A.D. (2000) Steady-state and pre-steady-state kinetics of the mitochondrial $F_0 \cdot F_1$ -ATPase: is ATP synthase a reversible molecular machine? *J. Exp. Biol.*, **203**, 41–49.
4. Акименко В.К., Минков И.Б., Бакеева Л.Е., Виноградов А.Д. (1972) Выделение и свойства растворимой АТФазы митохондрий сердца быка, *Биохимия*, **37**, 348–358.
5. Акименко В.К., Минков И.Б., Виноградов А.Д. (1971) О действии разобщителей на растворимую АТФазу митохондрий, *Биохимия*, **36**, 655–658.
6. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2006) Requirement of medium ADP for the steady-state hydrolysis of ATP by the proton-translocating *Paracoccus denitrificans* $F_0 \cdot F_1$ -ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 304–310, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.03.001.
7. Сыроешкин А.В., Галкин М.А., Седлов А.В., Виноградов А.Д. (1999) Кинетический механизм реакции гидролиза АТФ митохондриальной $F_0 \cdot F_1$ -АТФазой: участие ионов Mg^{2+} в гидролизе комплекса Mg -АТФ, *Биохимия*, **64**, 1337–1347.
8. Minkov, I.B., Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1979) Mg^{2+} -induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor F_1 , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1300–1306, doi: 10.1016/0006-291x(79)92150-8.
9. Bulygin, V.V., and Vinogradov, A.D. (1991) Interaction of Mg^{2+} with $F_0 \cdot F_1$ mitochondrial ATPase as related to its slow active/inactive transition, *Biochem. J.*, **276**, 149–156, doi: 10.1042/bj2760149.
10. Bulygin, V.V., Syroeshkin, A.V., and Vinogradov, A.D. (1993) Nucleotide/ H^+ -dependent change in Mg^{2+} affinity at the ATPase inhibitory site of the mitochondrial $F_1 \cdot F_0$ ATP synthase, *FEBS Lett.*, **328**, 193–196, doi: 10.1016/0014-5793(93)80991-3.
11. Panchenko, M.V., and Vinogradov, A.D. (1985) Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein, *FEBS Lett.*, **184**, 226–230, doi: 10.1016/0014-5793(85)80611-6.
12. Панченко М.В., Виноградов А.Д. (1989) Кинетика взаимодействия АТФазы субмитохондриальных фрагментов и природного белка-ингибитора, *Биохимия*, **54**, 569–579.
13. Васильева Е.А., Панченко М.В., Виноградов А.Д. (1989) Взаимодействие АТФазы субмитохондриальных фрагментов и природного белка-ингибитора в условиях генерации $\Delta\mu_H^+$ на мембране, *Биохимия*, **54**, 1490–1498.
14. Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1979) An inhibitory high affinity binding site for ADP in the oligomycin-sensitive ATPase of beef heart submitochondrial particles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 434–439, doi: 10.1016/0006-291x(79)90884-2.
15. Yalamova, M.V., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1982) Mutually dependent influence of ADP and P_i on the

- activity of mitochondrial adenosine triphosphatase, *Biochem. Int.*, **4**, 337–344.
16. Vasilyeva, E.A., Fitin, A.F., Minkov, I.B., and Vinogradov, A.D. (1980) Kinetics of interaction of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate with ATPase of bovine heart submitochondrial particles, *Biochem. J.*, **188**, 807–815, doi: 10.1042/bj1880807.
 17. Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F., and Vinogradov, A.D. (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite, *Biochem. J.*, **202**, 15–23, doi: 10.1042/bj2020015.
 18. Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F., and Vinogradov, A.D. (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics, *Biochem. J.*, **202**, 9–14, doi: 10.1042/bj2020009.
 19. Galkin, M.A., and Vinogradov, A.D. (1999) Energy-dependent transformation of the catalytic activities of the mitochondrial F_o·F₁-ATP synthase, *FEBS Lett.*, **448**, 123–126, doi: 10.1016/s0014-5793(99)00347-6.
 20. Булыгин В.В., Виноградов А.Д. (1989) Кинетические проявления взаимодействия трех нуклеотидсвязывающих центров митохондриальной АТФ-синтетазы, *Биохимия*, **54**, 1359–1367.
 21. Minkov, I.B., Vasilyeva, E.A., Fitin, A.F., and Vinogradov, A.D. (1980) Differential effects of ADP on ATPase and oxidative phosphorylation in submitochondrial particles, *Biochem. Int.*, **1**, 478–485.
 22. Syroeshkin, A.V., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1995) ATP synthesis catalyzed by the mitochondrial F₁-F_o ATP synthase is not a reversal of its ATPase activity, *FEBS Lett.*, **366**, 29–32, doi: 10.1016/0014-5793(95)00487-t.
 23. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2014) ATPase/synthase activity of *Paracoccus denitrificans* F_o·F₁ as related to the respiratory control phenomenon, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1322–1329, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.04.002.
 24. Жарова Т.В., Виноградов А.Д. (2003) Протон-транслоцирующая АТФ-синтетаза *Paracoccus denitrificans*: АТФ-гидролазная активность, *Биохимия*, **68**, 1370–1380.
 25. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2004) Energy-dependent transformation of F_o·F₁-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *J. Biol. Chem.*, **279**, 12319–12324, doi: 10.1074/jbc.M311397200.
 26. Кегярикова К.А., Жарова Т.В., Виноградов А.Д. (2010) Протон-транслоцирующая АТПаза *Paracoccus denitrificans*: кинетика окислительного фосфорилирования, *Биохимия*, **75**, 1424–1434.
 27. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2006) Energy-linked binding of P_i is required for continuous steady-state proton-translocating ATP hydrolysis catalyzed by F_o·F₁ ATP synthase, *Biochemistry*, **45**, 14552–14558, doi: 10.1021/bi061520v.
 28. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2017) Functional heterogeneity of F_o·F₁H⁺-ATPase/synthase in coupled *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 939–944, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.006.

NEW LOOK AT THE PROBLEM OF F_o·F₁-ATPase REVERSIBILITY

Review

A. D. Vinogradov*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: adv@biochem.bio.msu.su

Received June 19, 2019

Revised July 8, 2019

Accepted July 8, 2019

F_o·F₁-ATPases of mitochondria, chloroplasts and bacteria transform an electrochemical gradient of protons across energy-conserving membrane to free energy of ATP phosphoryl potential. F_o·F₁-ATPases are considered, almost conventionally, as the *reversible* molecular machines synthesizing or hydrolyzing ATP (depending on particular physiological conditions), taking as given the microreversibility principle of enzymatic catalysis. In his previous works the author adhered to the position that the mechanisms of the F_o·F₁-catalyzed ATP synthesis and hydrolysis differ (Vinogradov, A. D. (2000) *J. Exp. Biol.*, **203**, 41–49). In this essay a new model is proposed which postulates the presence of two *non-equilibrating* isoforms of F_o·F₁ unidirectionally catalyzing either synthesis or hydrolysis of ATP in the coupling membranes.

Keywords: F_o·F₁-ATPase, reversibility of enzymatic catalysis