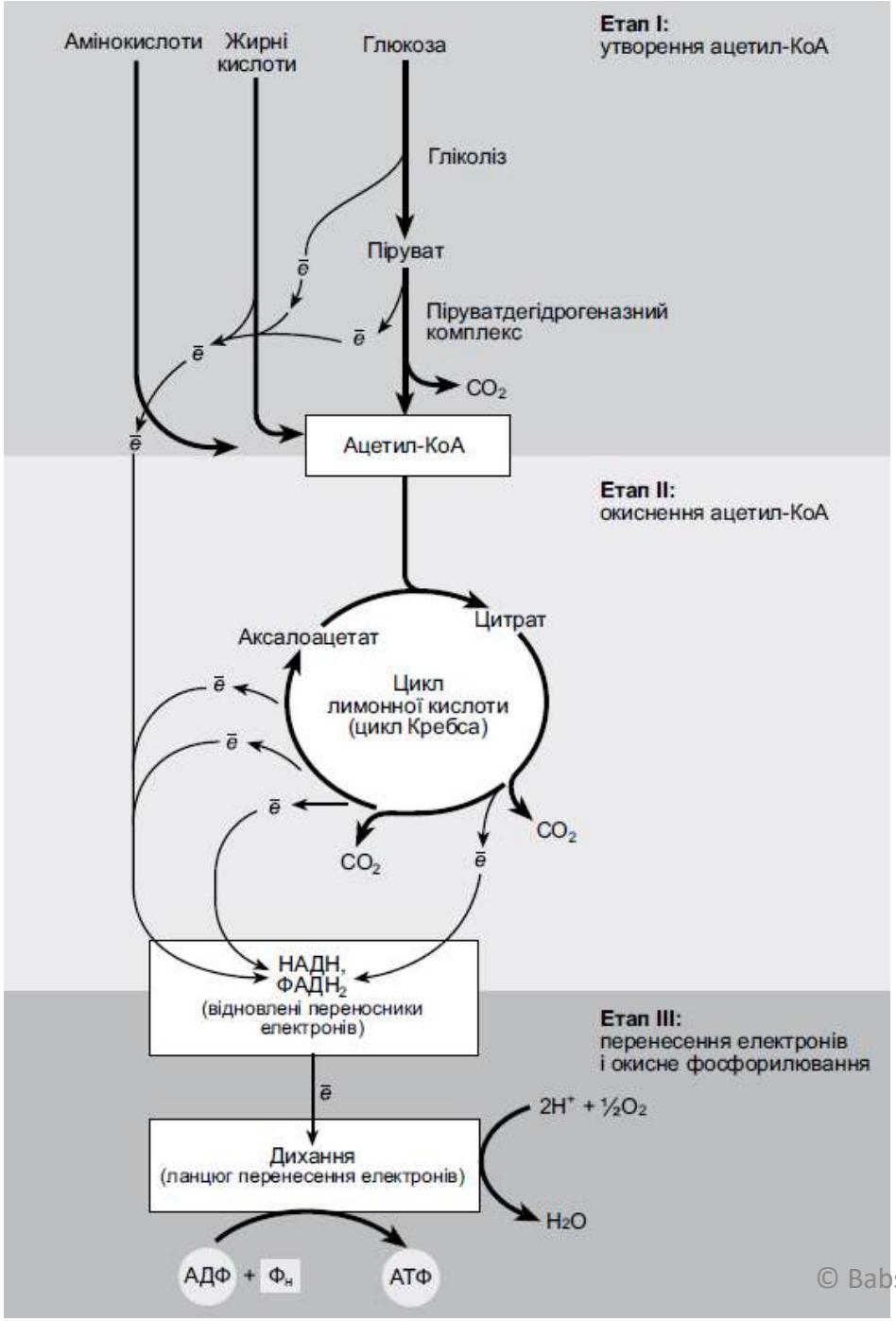
Тема. ***Біоенергетика: трансформація енергії***

План

1. Піруватдегідрогеназний комплекс
2. Цикл Кребса
3. Дихальний ланцюг мітохондрій
4. Теорії спряження дихання та окисного фосфорилювання
5. АТФаза
6. Транспортні процеси пов’язані із синтезом макроергів

© Babsky A.



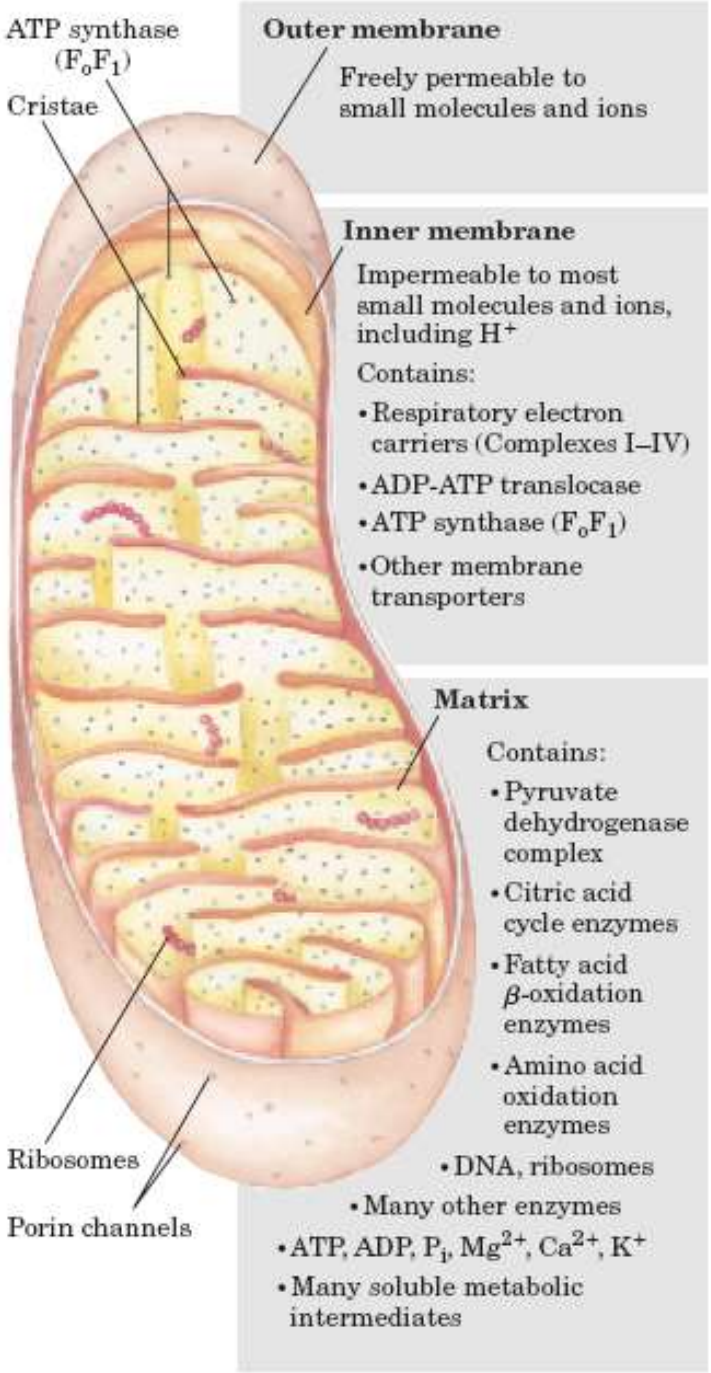
Катаболізм білків, жирів та вуглеводів проходить у три стадії клітинного дихання

Ганс Кребс , 1900–1981

Альберт Сент-Дьйорді, 1893-1986

- **Стадія 1**: окислення жирних кислот, глюкози і деяких амінокислот призводить до утворення ацетил-КоА.
- **Стадія 2**: окислення ацетильних груп у циклі лимонної кислоти включає чотири етапи, у яких виділяються електрони.
- **Стадія 3**: електрони, переносяться за допомогою НАДН і $ФАДН_2$ і „вливаються” у дихальний ланцюг, утворений переносниками електронів, у якому O_2 повністю відновлюється до H_2O. Цей потік електронів супроводжується продукцією АТФ.

© Babsky A



Біохімічна анатомія мітохондрії

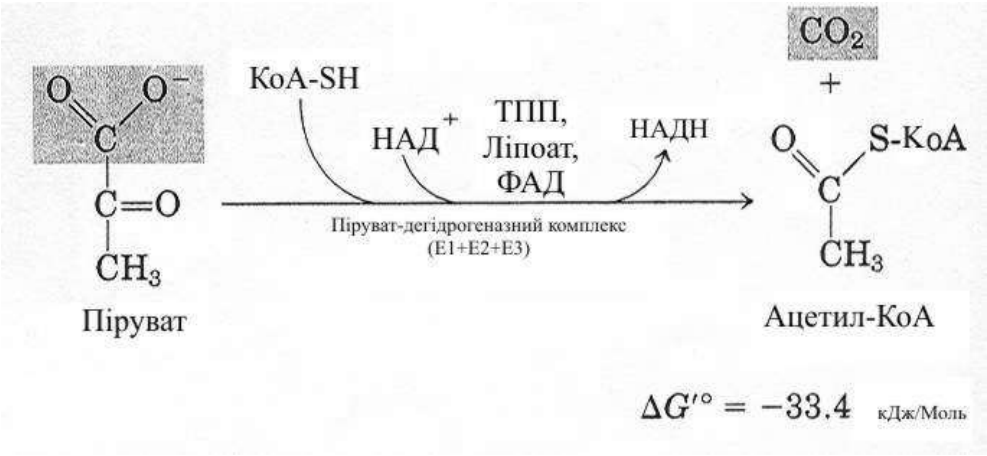
- Кристи збільшують площу поверхні внутрішньої мембрани, яка містить у печінці понад 10000 (печінка) чи 30000 (серце) дихальних ланцюгів і молекул АТР-синтази.

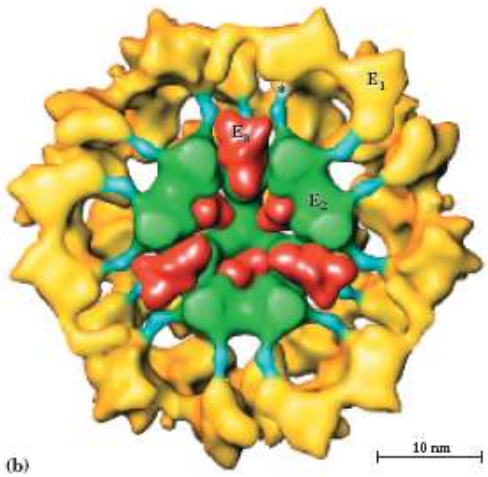
- Мітохондріальний запас коензимів та проміжних продуктів функціонально відокремлений від відповідного цитозольного пулу.

- Мітохондрії безхребетних, рослин і мікробних еукаріотів за своєю будовою подібні до наведеної на рисунку, проте варіюють за розмірами, формою та ступенем складчастості внутрішньої мембрани.

© Babsky A.

Загальний вигляд реакції, що каталізується піруват-дегідрогеназним комплексом

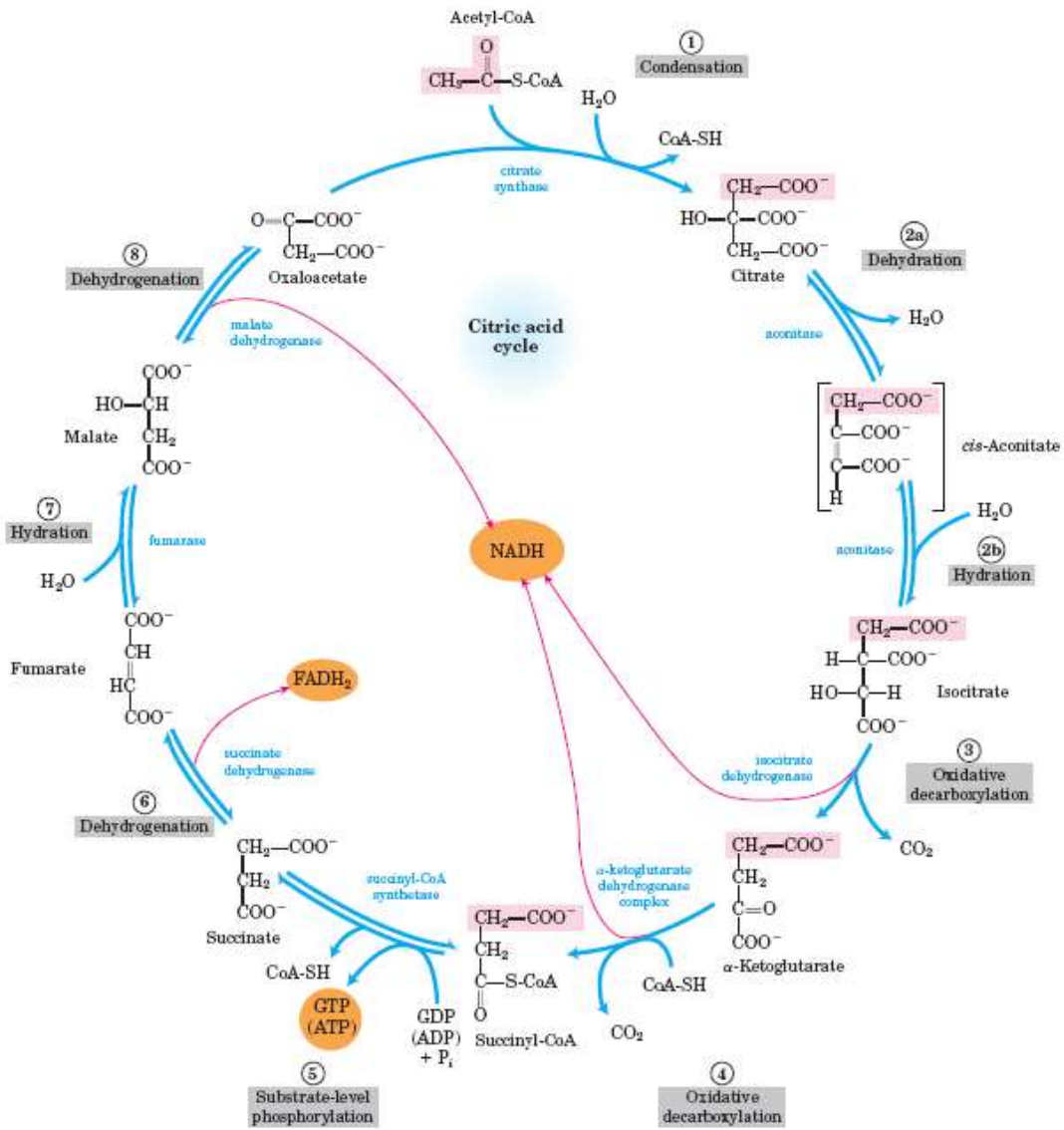




У реакції беруть участь п’ять коферментів і три ферменти.

© Babsky A.

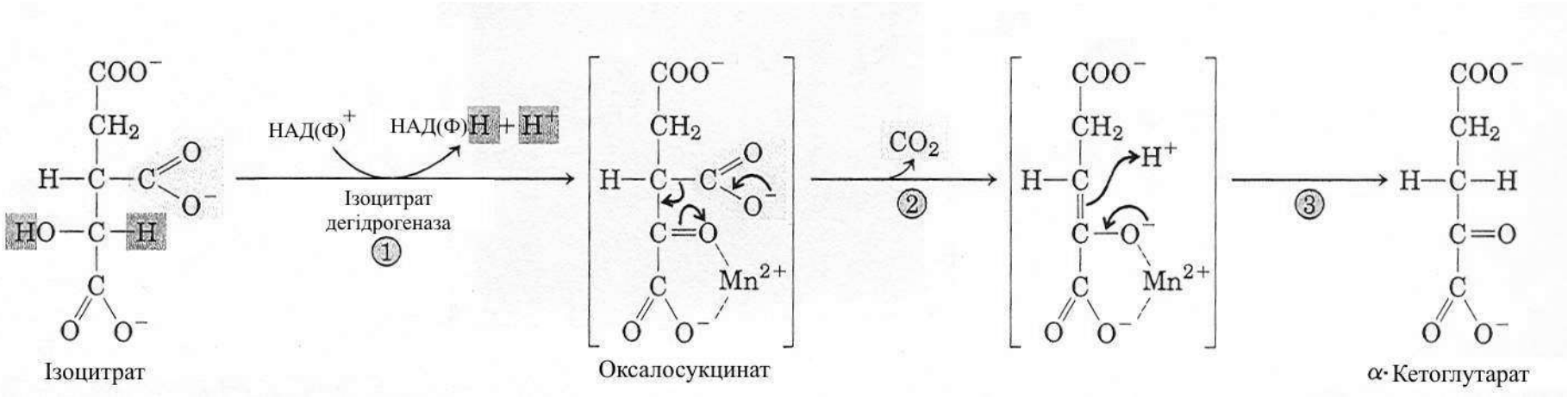
Реакції циклу лимонної кислоти



- Атоми карбогену в ацетил-КоА походять з ацетату за першого оберту циклу
- Червоними стрілками показано місця запасання енергії через перенос електронів на ФАД$^+$ чи НАД$^+$
- Етапи (1), (3) і (4) є незворотними у клітині, всі інші - зворотними
- Продуктом етапу (5) може бути як АТФ, так і ГТФ, залежно від того, який ізофермент каталізує реакцію

© Babsky A.

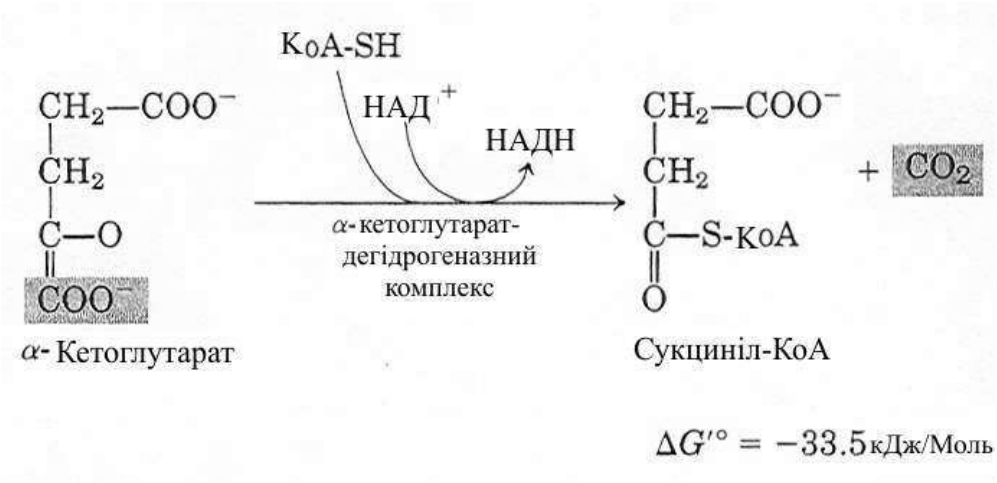
Ізоцитратдегідрогеназа



- Ізоцитрат втрачає один атом карбону в процесі окисного декарбоксилювання, що відбувається у три етапи:
- **Етап 1:** Ізоцитрат зв'язується з ферментом і окислюється перенесенням гідрогенів до $НАД^+$ чи $НАДФ^+$.
- **Етап 2:** Утворена карбонільна група відчеплюється**.** Взаємодія карбонільного оксигену зі зв'язаним іоном Mn^{2+} викликає збільшення електронегативності карбонільної групи, що сприяє процесу декарбоксилювання.
- **Етап 3:** Перегрупування енольного інтермедіата з утворенням α-кетоглутарату.

© Babsky A.

Окислення α-кетоглутарату до сукциніл-КоА і CO_2

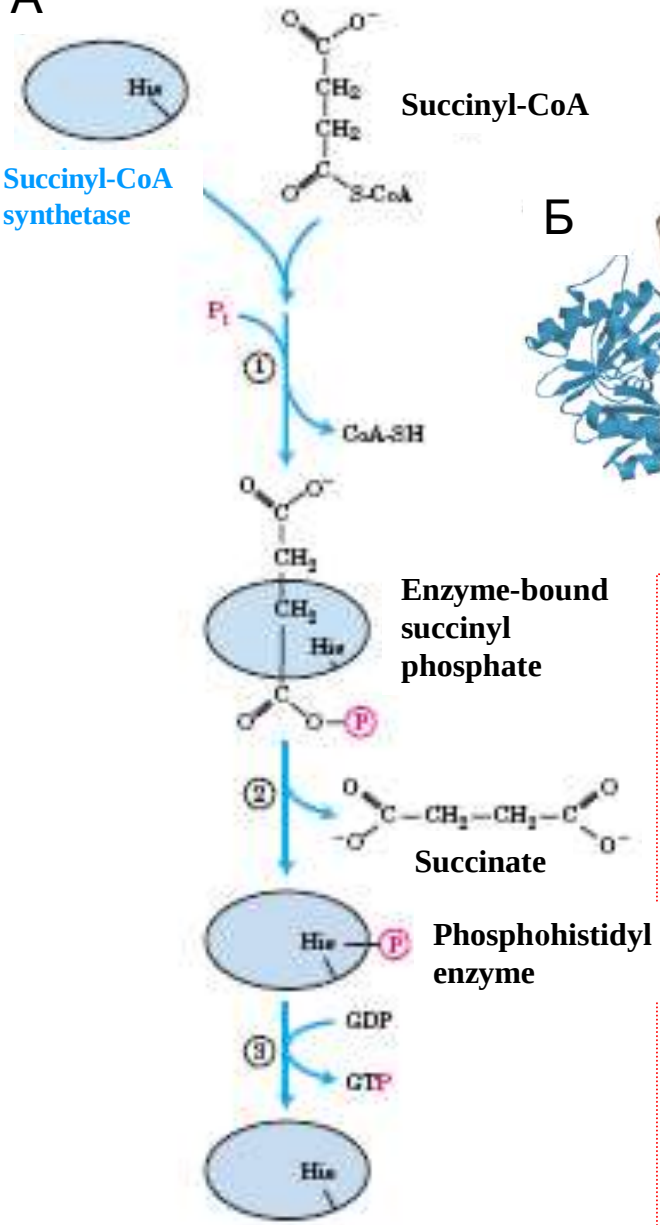


- α-кетоглутарат перетворюється до сукциніл-КоА і CO_2 за дії α-кетоглутарат-дегідрогеназного комплексу
- $НАД^+$ виконує роль акцептора електронів, а КоА – переносника сукцинільної групи.
- Енергія окислення α-кетоглутарату зберігається у формі тіоефірного зв’язку сукциніл-КоА.

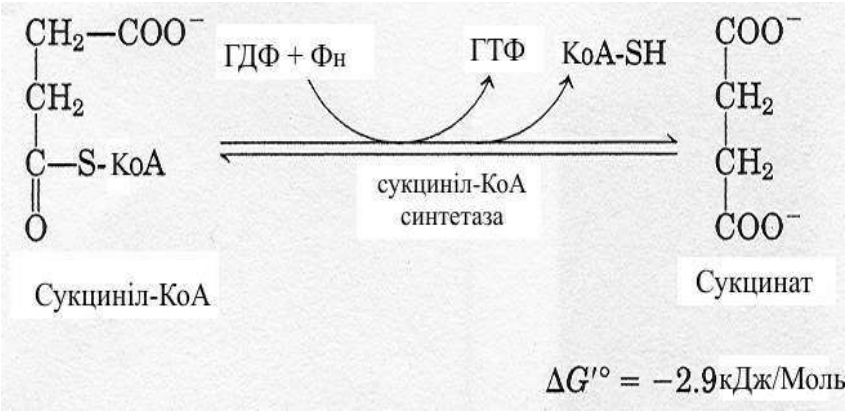
© Babsky A.

Сукциніл-КоА-синтетазна реакція

А



Б

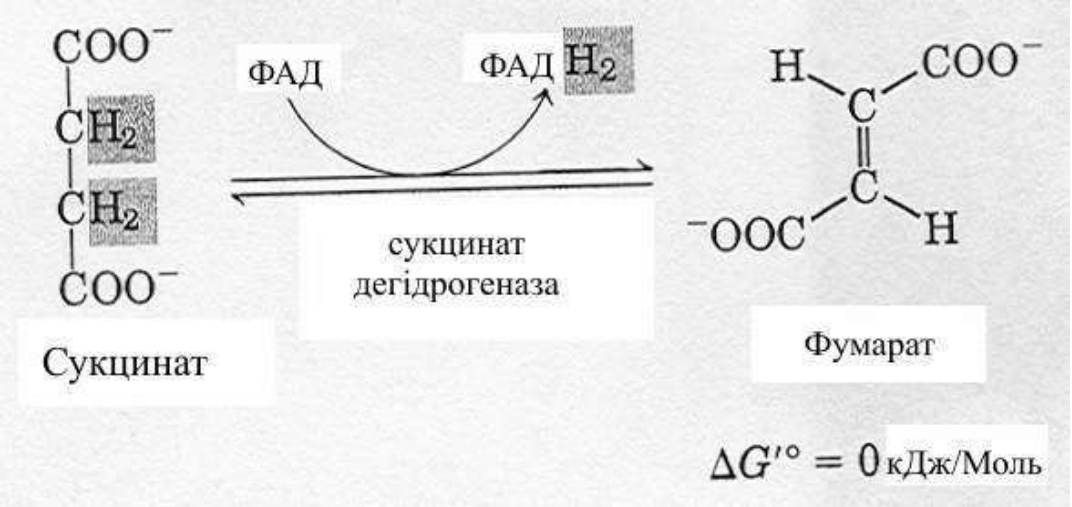


А. ***Етап 1:*** пірофосфатна група заміщає КоА, зв'язаний з молекулою сукциніл-КоА, утворюючи високо енергетичний ацил-фосфат. ***Етап 2:*** сукциніл-фосфат віддає свою фосфатну групу на залишок гістидину у молекулі ферменту, утворюючи високо енергетичний фосфогістидиловий фермент. ***Етап 3:*** фосфатна група переноситься з гістидинового залишку на молекулу кінцевого фосфату, яким є ГДФ (чи АДФ), утворюючи таким чином ГТФ (чи АТФ).

(б) Сукциніл-КоА-синтетаза з *E.coli*. Активний центр включає α (синя) і β (коричнева) субодиниці. Кофермент А у формі червоної паличко-подібної структури.

© Babsky A.

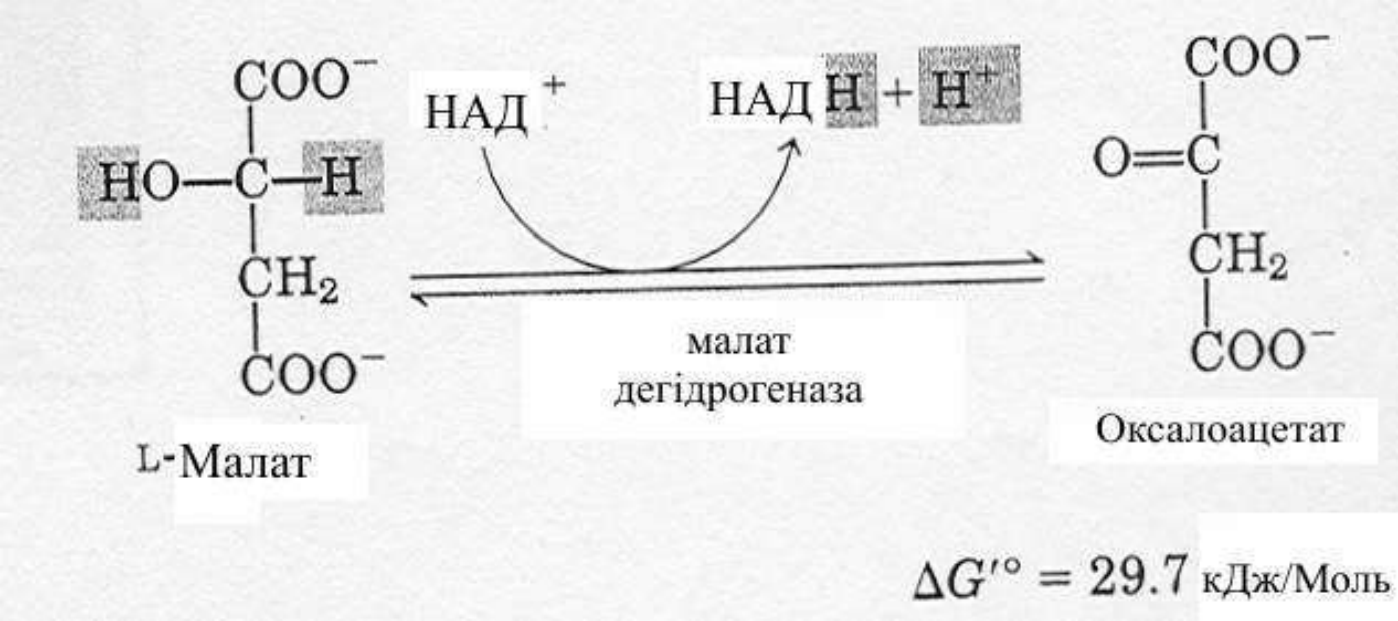
Окислення сукцинату до фумарату



- **Сукцинат** окислюється до **фумарату** флавопротеїновою **сукцинатдегідрогеназою** (СДГ)
- В еукаріотів СДГ щільно зв’язана з внутрішньою мітохондріальною мембраною, у прокаріотів – з плазматичною мембраною
- СДГ містить три різні ферум-сульфурні кластери і одну молекулу ковалентно зв’язаного ФАД
- Електрони, утворені у процесі окислення сукцинату, перед тим як потрапити у дихальний ланцюг, проходять через ФАД- і ферум-сульфурні центри
- Потік електронів від сукцинату через ці переносники до кінцевого акцептора електронів (O_2)є спряженим з синтезом 1,5 молекули АТФ на пару електронів
- **Малонат**, як структурний аналог сукцинату, є конкурентним інгібітором СДГ

© Babsky A.

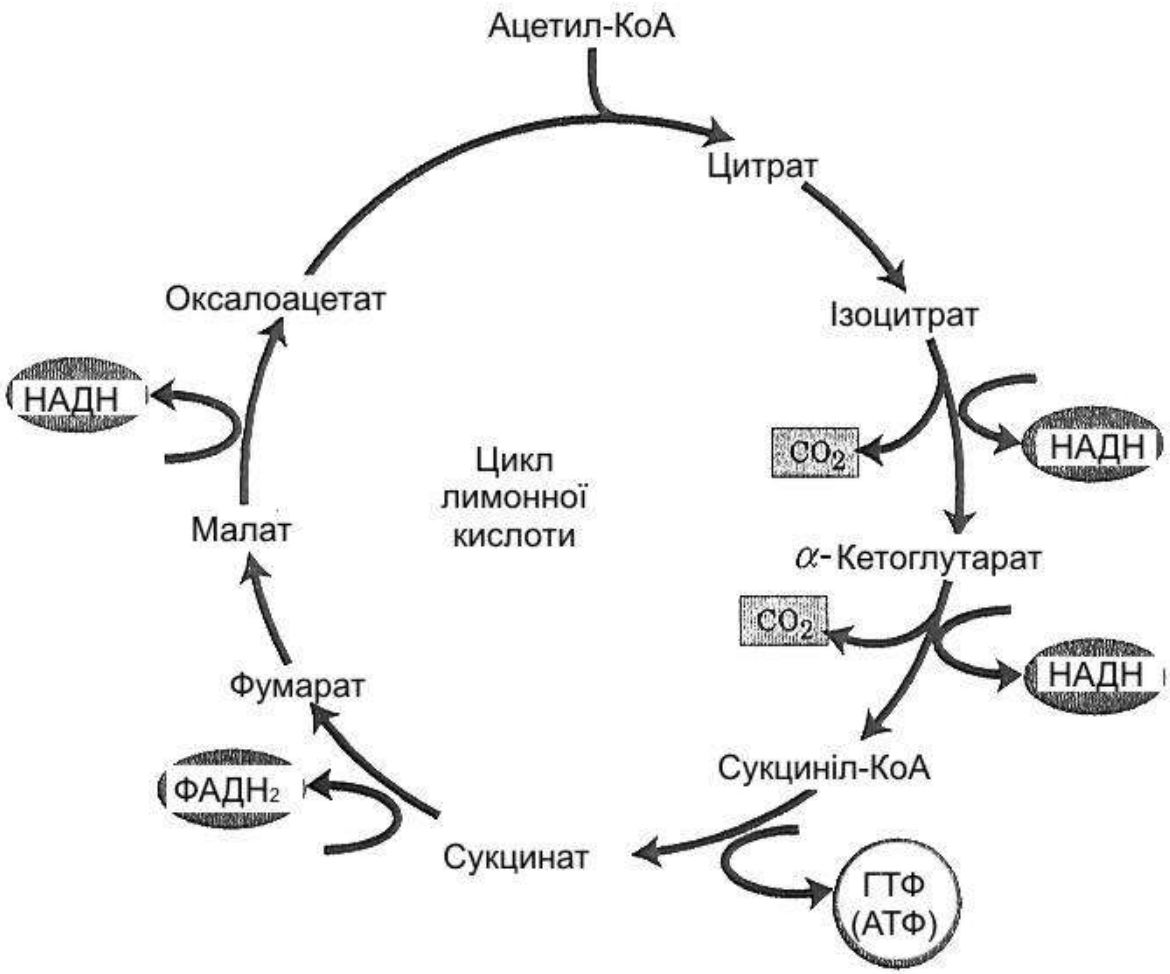
Окислення малату до оксалоацетату



- **НАД-залежна-L-малат-дегідрогеназа** каталізує окислення малату до оксалоацетату.
- Рівновага цієї реакції за стандартних термодинамічних умов лежить далеко зліва, проте в інтактних клітинах оксалоацетат постійно видаляється високо-екзергонічною цитрат-синтазною реакцією.
- Це дозволяє підтримувати концентрацію оксалоацетату у клітині вкрай низькою ($<10^{-6}$ M), сприяючи малат-дегідрогеназній реакції в сторону утворення оксалоацетату.

© Babsky A.

Продукти одного обороту циклу лимонної кислоти



- За кожного обертання циклу вивільняються три молекули НАДН, одна $ФАДН_2$, одна ГТФ (чи АТФ) і дві молекули CO_2 у реакції окисного декарбоксилювання.
- На цьому рисунку всі реакції циклу показані як такі, що йдуть лише в одному напрямку, проте деякі реакцій є зворотніми.

© Babsky A.

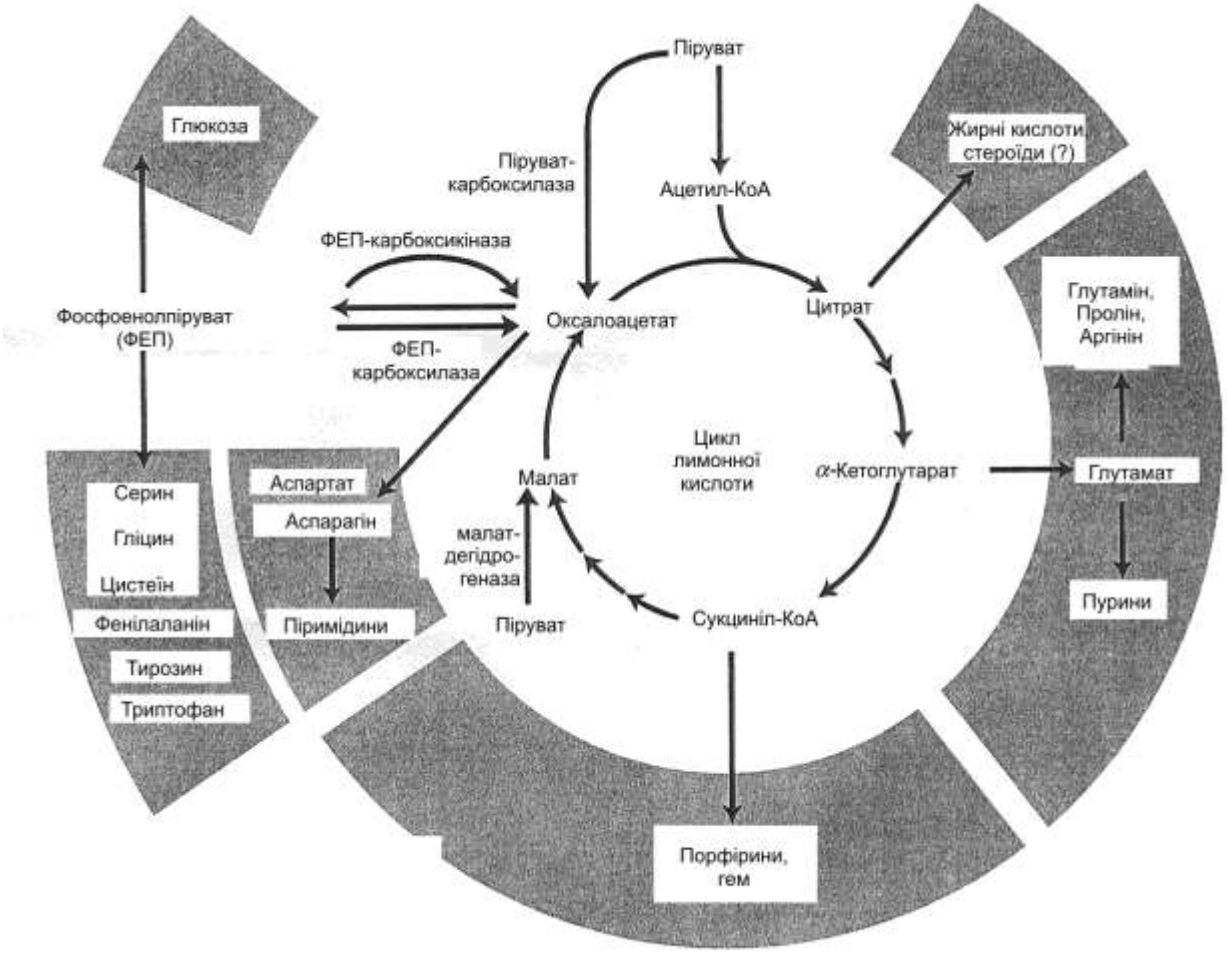
Стехіометрія відновлення коферментів і утворення АТФ за аеробного окислення глюкози через гліколіз, реакції піруват-дегідрогеназного комплексу, цикл лимонної кислоти та окисне фосфорилювання

Реакція	*Кількість АТФ чи безпосередньо утворених відновлених коферментів*	*Гранично можлива кількість утворення АТФ**
Глюкоза → глюкозо-6-фосфат	- 1 АТФ	- 1
Фруктозо-6-фосфат → фруктозо 1,6 дифосфат	- 1 АТФ	-1
2 (Гліцеральдегід-3-фосфат) → 2 (1,3-дифосфогліцерат)	2 НАДН	3-5
2 (1,3-Дифосфогліцерат) → 2 (3-фосфогліцерат)	2 АТФ	2
2 (Фосфоенолпіруват) → 2 (піруват)	2 АТФ	2
2 (Піруват) → 2 (ацетил-КоА)	2 НАДН	5
2 (Ізоцитрат) → 2 (α-кетоглутарат)	2 НАДН	5
2 (α-Кетоглутарат) → 2 (сукциніл-КоА)	2 НАДН	5
2 (Сукциніл-КоА) → 2 (Сукцинат)	2 АТФ (чи 2 ГТФ)	2
2 (Сукцинат) → 2 (Фумарат)	2 $ФАДН_2$	3
2 (Малат) → 2 (Оксалоацетат)	2 НАДН	5
Всього		30-32

* Розраховано як 2,5 АТФ на НАДН чи 1,5 АТФ на $ФАДН_2$. Негативне значення означає споживання.

© Babsky A.

Роль циклу лимонної кислоти в анаболізмі



- Інтермедіати циклу лимонної кислоти використовуються як попередники для багатьох біосинтетичних шляхів.
- Товстими лініями показано чотири анаплеротичні реакції, які поповнюють запаси використаних інтермедіатів циклу.

© Babsky A.

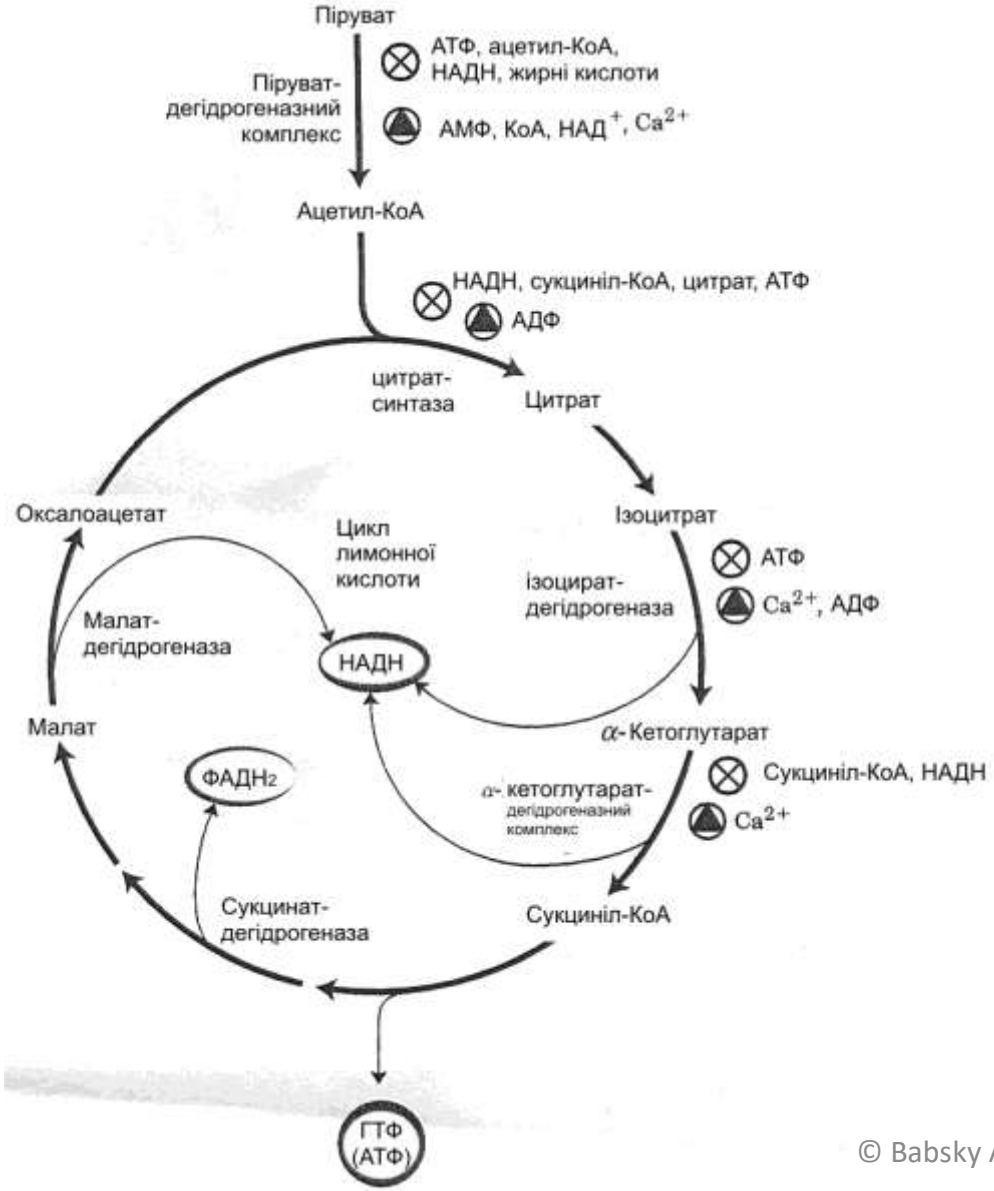
Анаплеротичні реакції циклу лимонної кислоти

Анаплеротичні реакції

Реакції			*Тканина (и) / організм (и)*
Піруват + HCO_3^- + АТФ	$\overset{\text{піруват-карбоксилаза}}{\rightleftharpoons}$	Оксалоацетат + АДФ + $Ф_н$	Печінка, нирки
Фосфоенолпіруват + CO_2 + ГДФ	$\overset{\text{фосфоенолпіруват-карбоксикіназа}}{\rightleftharpoons}$	Оксалоацетат + ГТФ	Серце, скелетні м’язи
Фосфоенолпіруват + HCO_3^-	$\overset{\text{фосфоенолпіруват-карбоксилаза}}{\rightleftharpoons}$	Оксалоацетат + $Ф_н$	Вищі рослини, бактерії, дріжджі
Піруват + HCO_3^- + НАД(Ф)Н	$\overset{\text{малат-дегідрогеназа}}{\rightleftharpoons}$	Малат + НАД(Ф)$^+$	Широко розповсюджена у еукаріот і прокаріотів

© Babsky A.

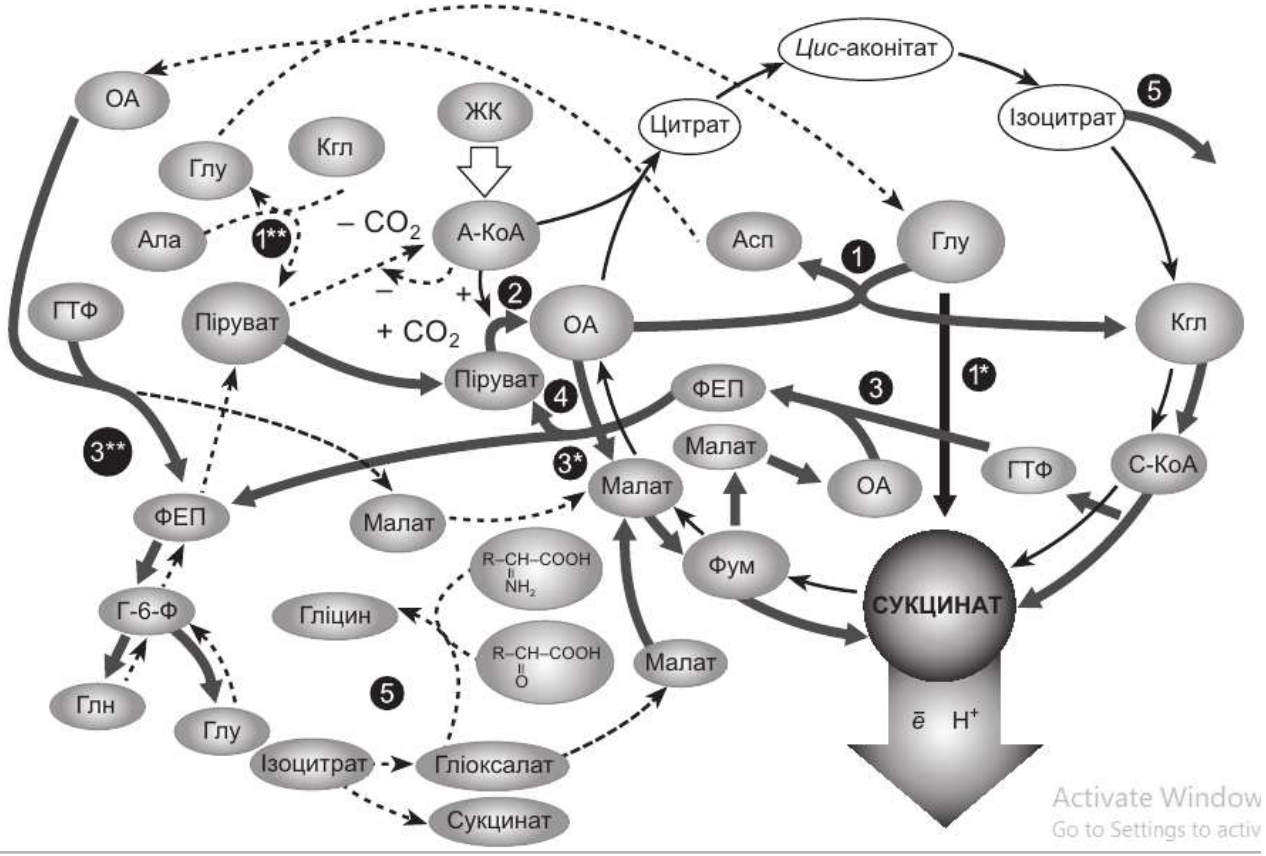
Регуляція метаболічного потоку з ПДГ-комплексу через цикл лимонної кислоти (ЦЛК)



- ПДГ-комплекс алостерично гальмується, коли АТФ/АДФ, НАДН/НАД$^+$ і Ацетил-КоА/КоА є високими. Коли ці співвідношення зменшуються, запускається алостерична активація окислення пірувату.
- Потік через ЦЛК може бути обмежений рівнем субстратів цитрат-синтази – оксалоацетату і ацетил-КоА чи НАД$^+$, який вичерпується через перетворення в НАДН у трьох пунктах НАД-залежного окислення
- Гальмування за принципом зворотнього зв’язку спричиняється через сукциніл-КоА, цитрат і АТФ, які сповільнюють цикл на ранніх стадіях
- У м’язовій тканині сигнали Ca^{2+} викликають скорочення і стимулюють відновлення запасів АТФ. Ca^{2+}-залежні дегідрогенази: піруват-, ізоцитрат- і α-кетоглутарат-...

© Babsky A.

Повний (повільний) і короткий (швидкий) шляхи окиснення субстратів у клітині (проф. Кондрашова М.М.)

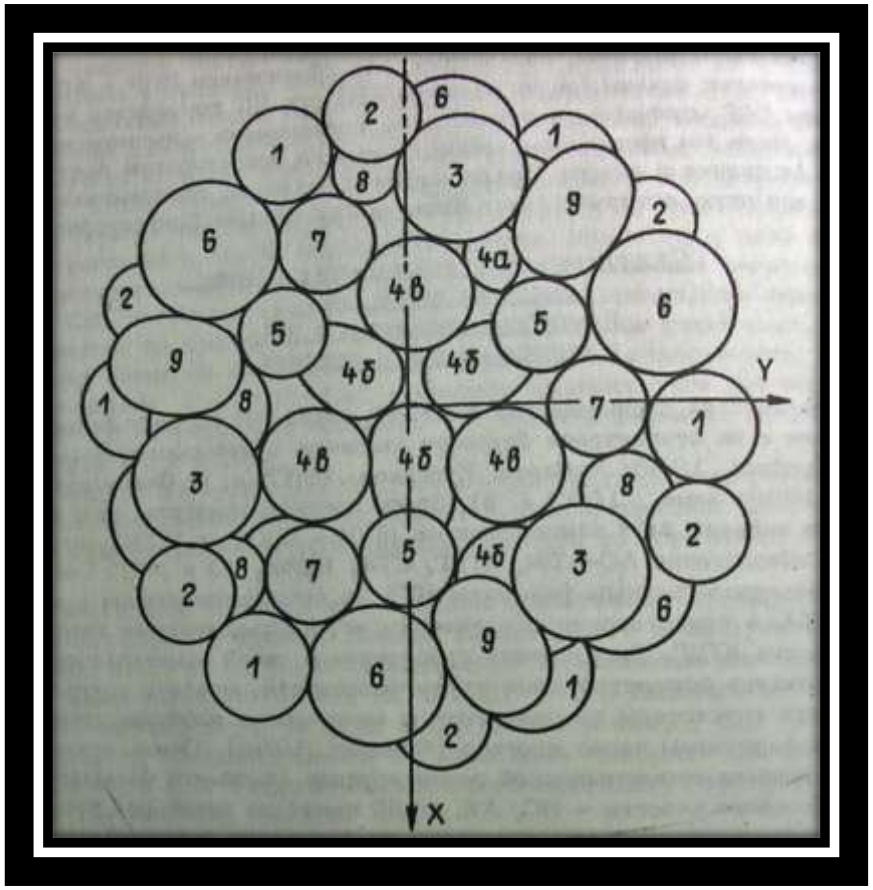


- У тканині може відбуватись коротший і швидший цикл, ніж повний цикл Кребса.
- За П'єром Ферма, «при-
- рода завжди обирає найкоротший шлях»
- М. Кондрашова віддає перевагу надходженню сукцинату через сукциніл-КоА із α-кетоглутарату, який утворюється через пе-
- реамінування глутаміну й оксалоацетату, що здійснюється аспартатамінотрансферазою

- Зростання клітинної активності в мітохондріях вмикає швидкий механізм утворення сукцинату через спряження аспартатамінотрансферазної і α-кетоглутаратдегідрогеназної реакцій. Цей шлях замикається в цикл за участю цитозольних трансаміназ, які підтримують надходження глутаміну, пірувату й малату в мітохондрії, і, т.ч. оминається початкова повільна ділянка циклу Кребса.

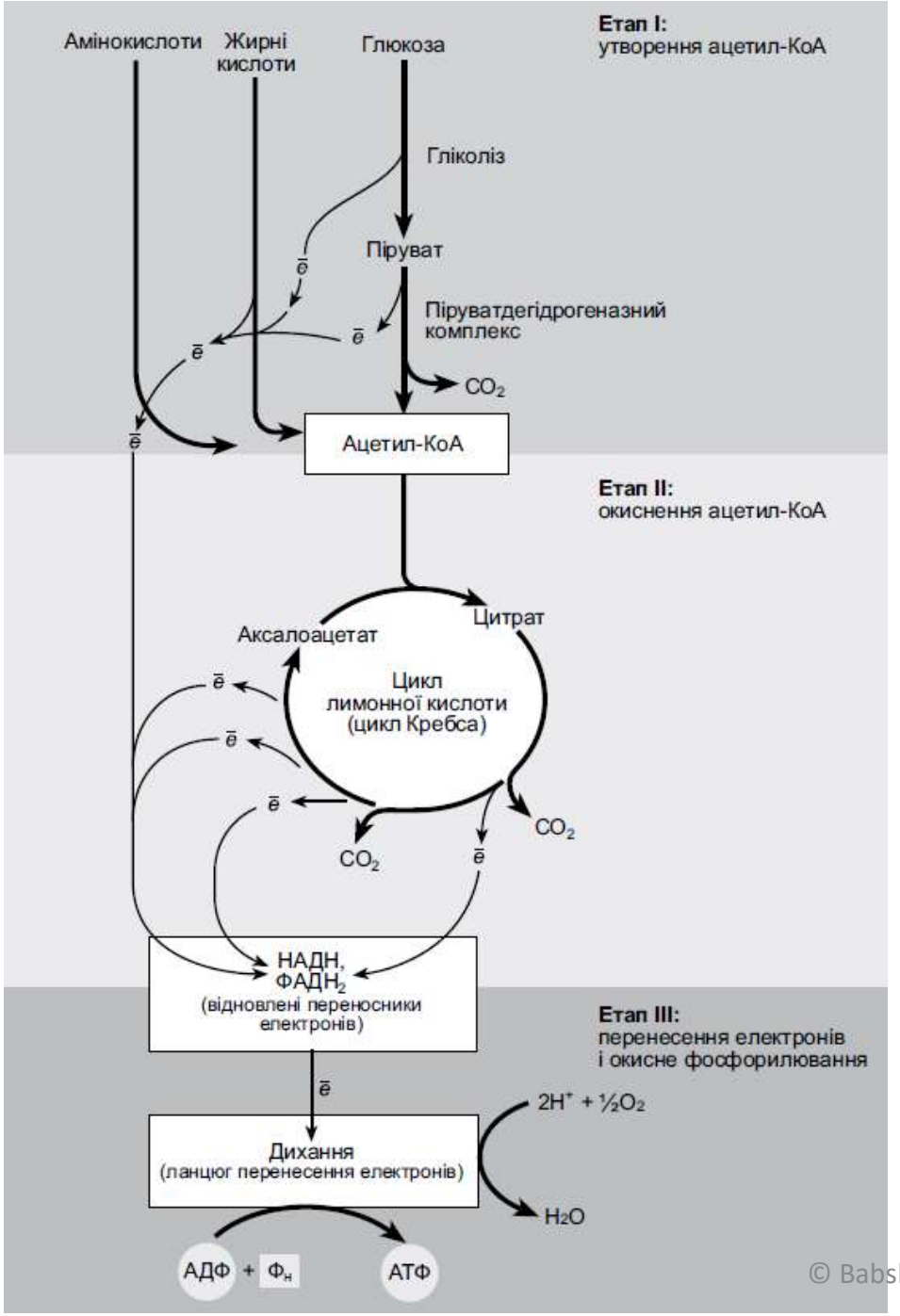
© Babsky A.

Реконструкція структурної організації ферментів окислення у мітохондріях



- 1 – цитратсинтаза, 2 – аконітаза, 3 – ізоцитратдегідрогеназа, 4а – кетоглутаратдегідрогеназа, 4б – транссукцинілаза, 4в – сукцинаттіокіназа, 6 – фумараза, 7 – млатдегідрогеназа, 8 – аспартатамінотрансфераза, 9 – нуклеозиддифосфокіназа. (За: *Любарев, Курганов, 1987*)

© Babsky A.



Катаболізм білків, жирів та вуглеводів проходить у три стадії клітинного дихання

- **Стадія 1**: окислення жирних кислот, глюкози і деяких амінокислот призводить до утворення ацетил-КоА.
- **Стадія 2**: окислення ацетильних у циклі лимонної кислоти включає чотири етапи, у яких виділяються електрони.
- **Стадія 3**: електрони, переносяться за допомогою НАДН і $ФАДН_2$ і „вливаються” у дихальний ланцюг, утворений переносниками електронів, у якому O_2 повністю відновлюється до H_2O. Цей потік електронів супроводжується продукцією АТФ.

© Babsky A.

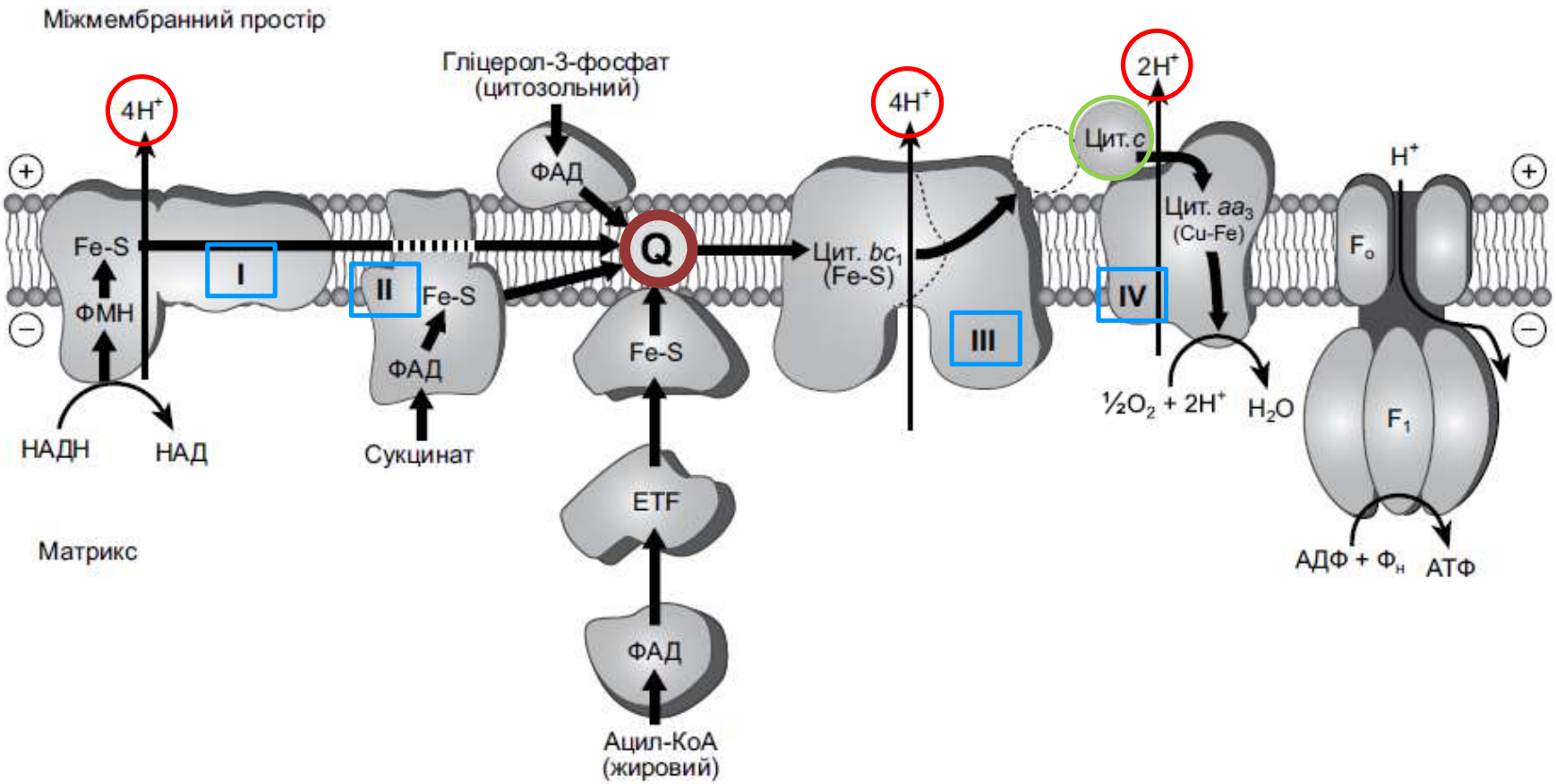
Білкові компоненти мітохондріального електрон-транспортного ланцюга

Enzyme complex/protein	*Mass (kDa)*	*Number of subunits*[*]	*Prosthetic group(s)*
I NADH dehydrogenase	850	43 (14)	FMN, Fe-S
II Succinate dehydrogenase	140	4	FAD, Fe-S
III Ubiquinone cytochrome *c* oxidoreductase	250	11	Hemes, Fe-S
Cytochrome *c*[†]	13	1	Heme
IV Cytochrome oxidase	160	13 (3–4)	Hemes; Cu_A, Cu_B

[*]Numbers of subunits in the bacterial equivalents in parentheses.
[†]Cytochrome *c* is not part of an enzyme complex; it moves between Complexes III and IV as a freely soluble protein.

© Babsky A.

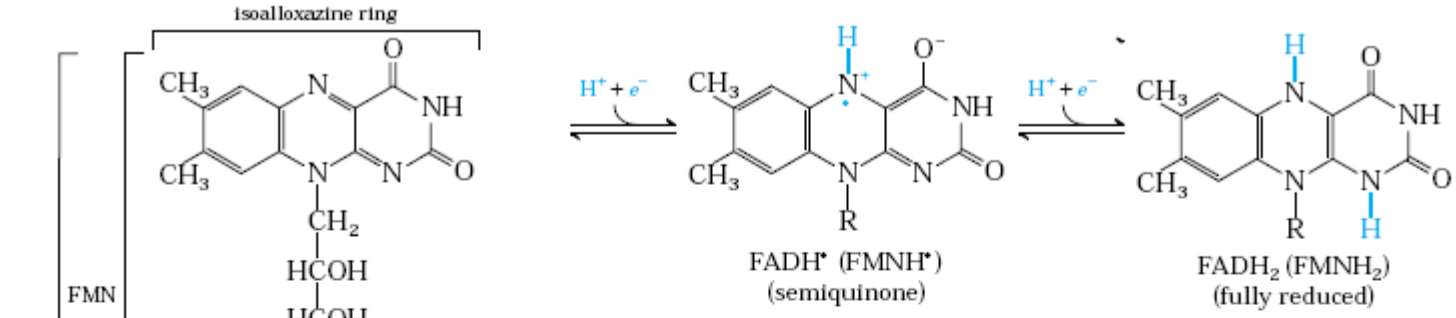
Загальна схема потоку електронів і протонів через чотири комплекси дихального ланцюга



Електрони переносяться на Q через комплекси I і II. QH_2 - мобільний переносник e^- та H^+. Він доставляє електрони до комплексу III, який передає їх на цитохром c. Комплекс IV переносить e^- від відновленого цитохрому *c* на O_2. Електронний потік через комплекси I, III і IV супроводжується потоком протонів з матриксу у міжмембранний простір.

© Babsky A.

Структура флавін-аденін-динуклеотида (FAD) та флавін-мононуклеотида (FMN) в окисненому та відновленому станах



Flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN)

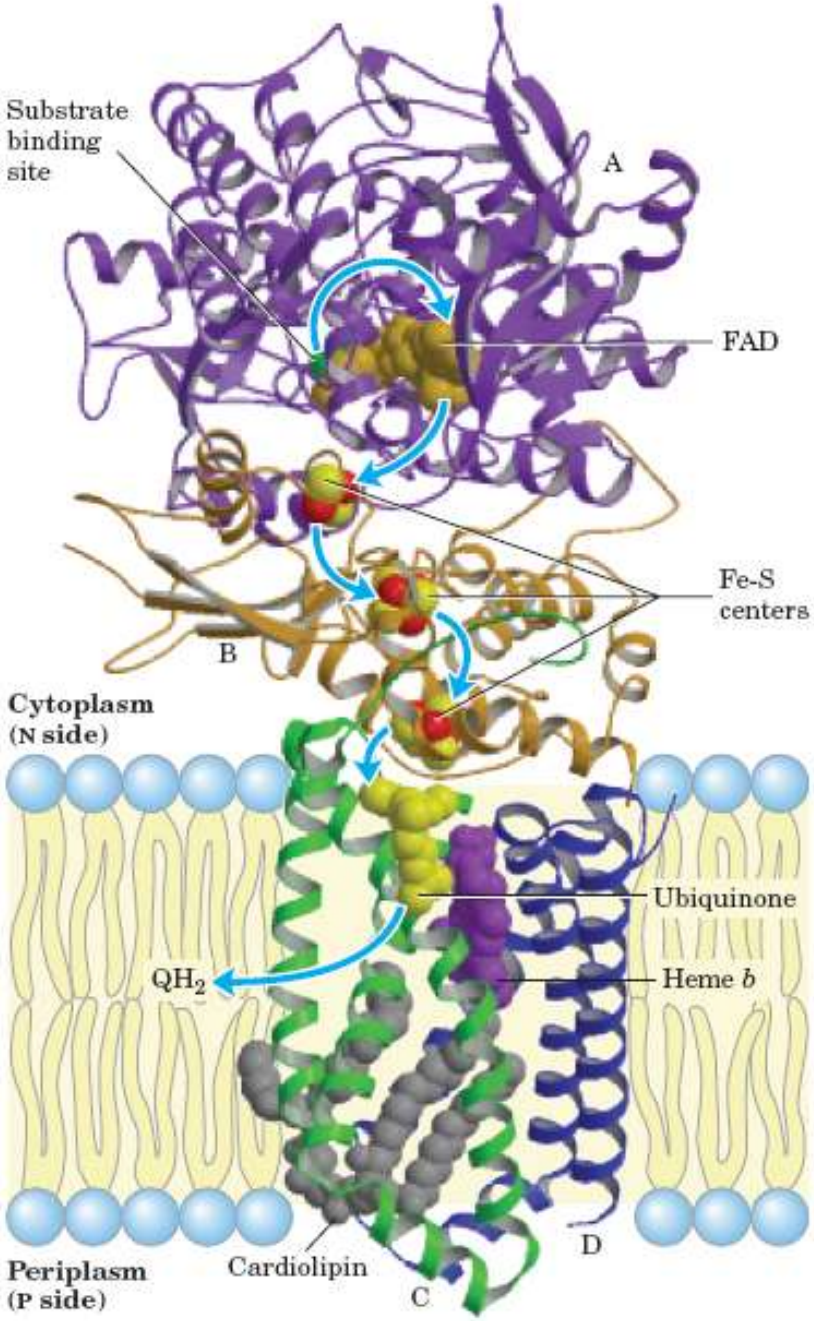
- *Коли окиснений флавіновий нуклеотид одночасно акцептує два атома водню (два електрона і два протона), обидва атома виявляються у системі флавінового кільця і нуклеотид переходить у повністю відновлений стан.*
- *Коли на FAD або FMN переноситься лише один атом водню, утворюється семіхінон - стабільний вільний радикал.*

Сумарне рівняння реакцій у комплексі I:

$$\textbf{НАДН} + 5H^+_N + Q \rightarrow \textbf{НАД}^+ + QH_2 + 4H^+_P$$

© Babsky A.

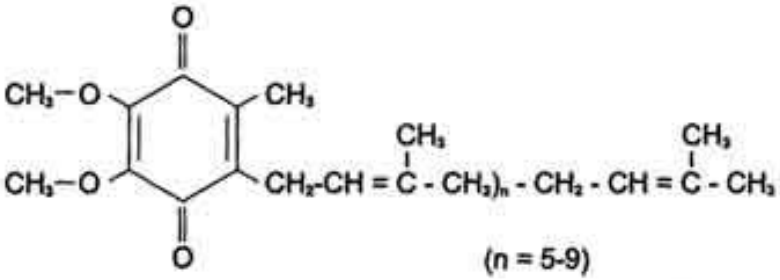
Структура комплексу II (сукцинатдегідрогеназа)

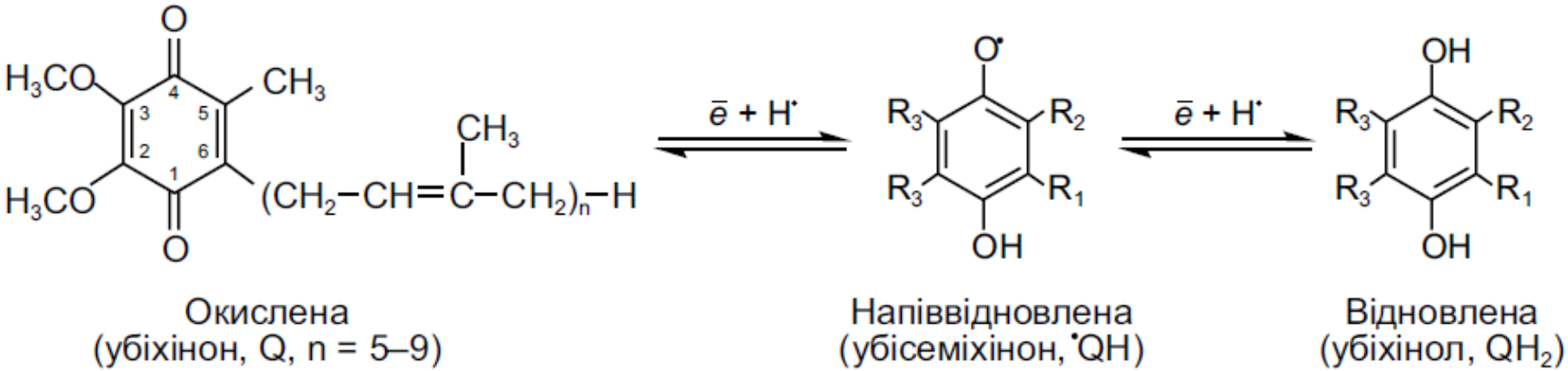


Дві трансмембранні C (зелена) і D (синя) і дві цитоплазматичні B (помаранчева) і A (фіолетова). Транспорт електронів показано голубими стрілками. Гем b не бере участі у транспорті електронів, але запобігає утворенню активних форм кисню (ROS).

© Babsky A.

Убіхінон (Q, чи коензим Q)

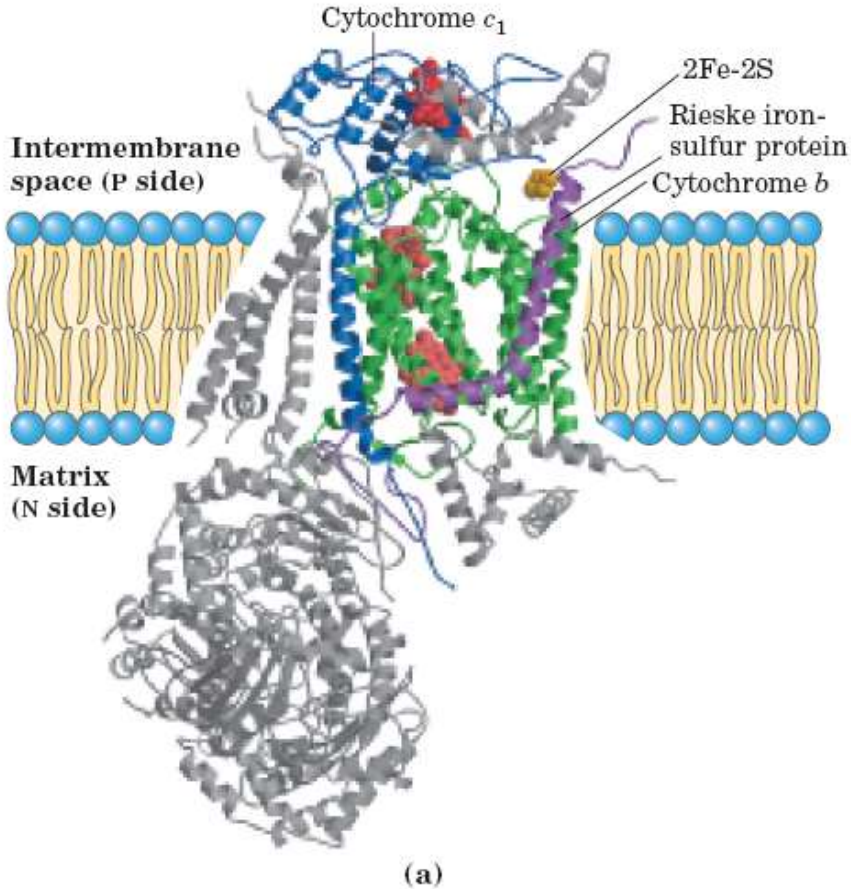


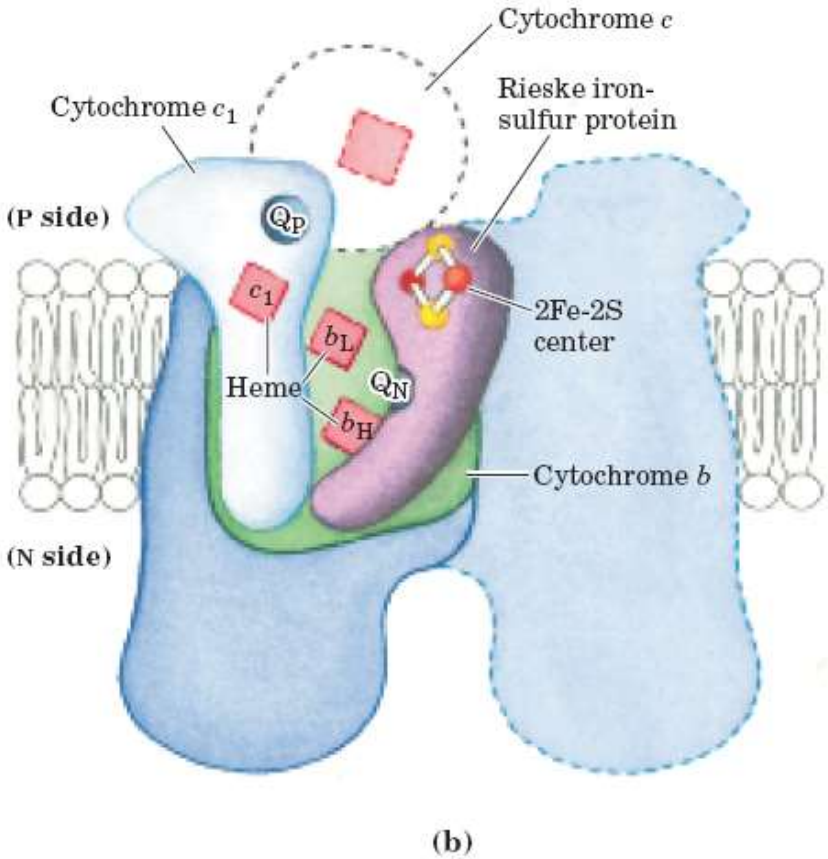


Повне відновлення убіхінону потребує двох електронів і двох протонів, і проходить упродовж двох етапів з утворенням напівхінонового проміжного радикала.

© Babsky A.

Комплекс цитохром bc_1 (комплекс III)



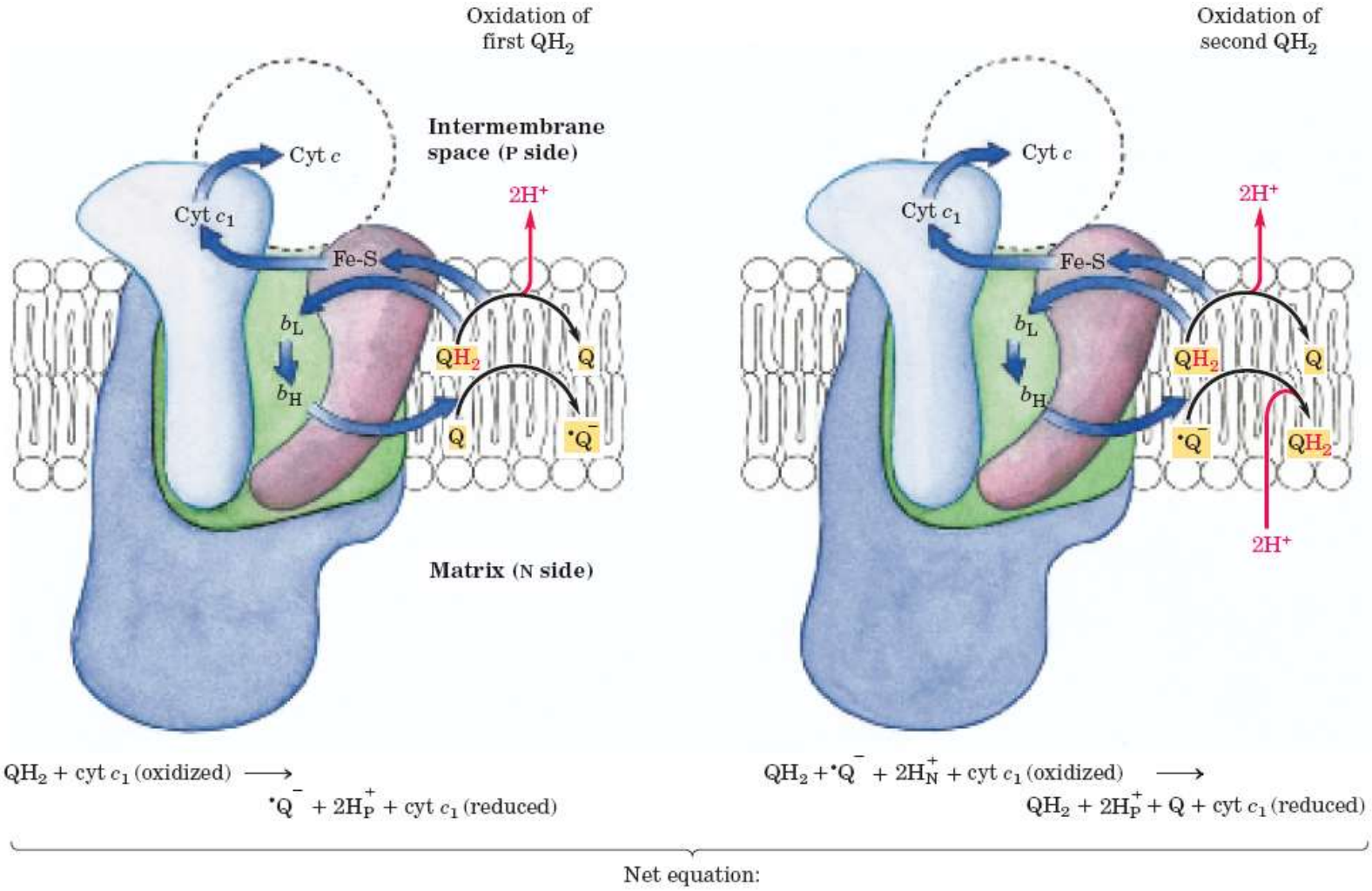


(a) Структура мономера: цитохром *b* (зелений), що містить два геми (b_H і b_L, світло-червоні); залізо-сірковий протеїн Ріске (фіолетовий) з 2Fe-2S - центрами (жовті); і цитохром c_1 (синій) з одним гемом (червоний).

(b) Димерна функціональна одиниця. Цитохром c_1 і залізо-сірковий протеїн Ріске виступають з Р-поверхні і у міжмембранному просторі можуть взаємодіяти з цитохромом *c* (який не входить до функціонального комплексу). Комплекс має два окремі центри зв'язування для убіхінона - Q_N і Q_P.

© Babsky A.

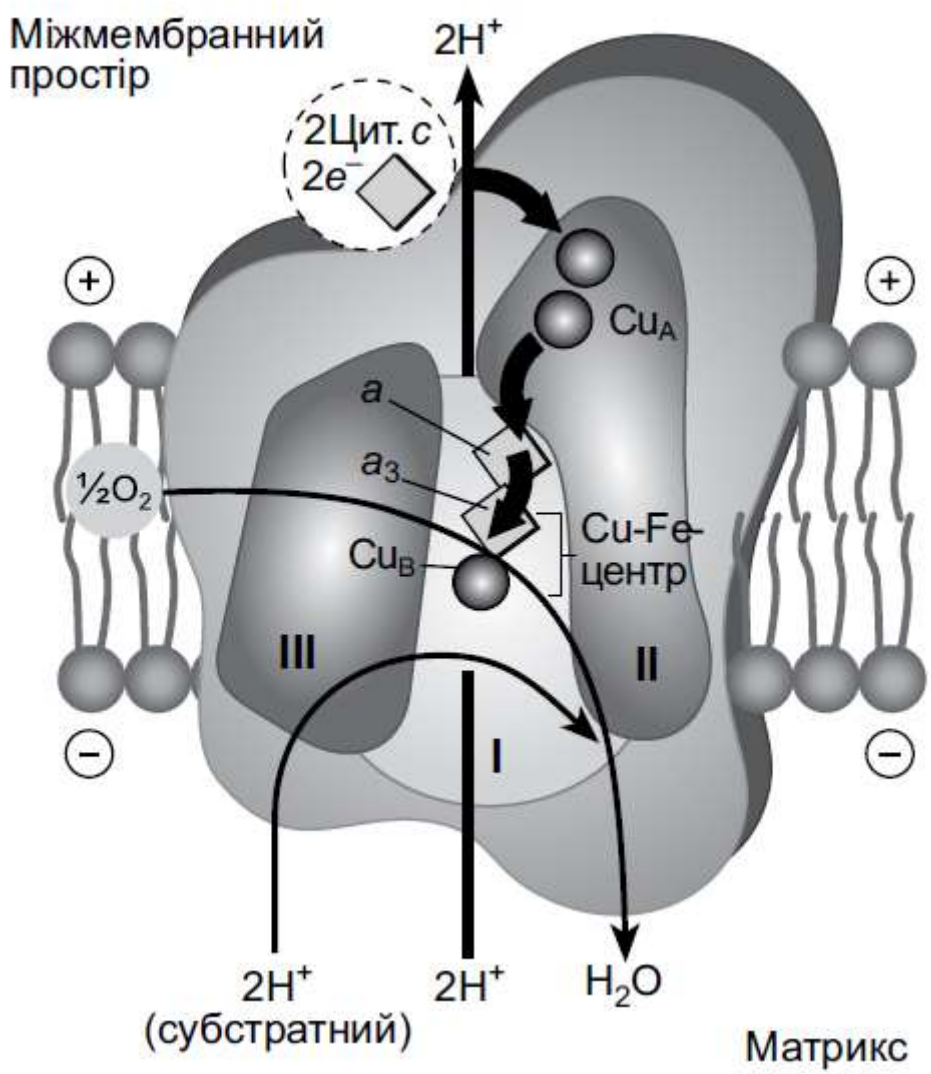
Q-цикл (комплекс III)



QH_2 + 2 цит c_1 (окислений) + $2H^+_N$ → Q + 2 цит c_1 (відновлений) + $4H^+_P$

© Babsky A.

Шлях електронів через комплекс IV



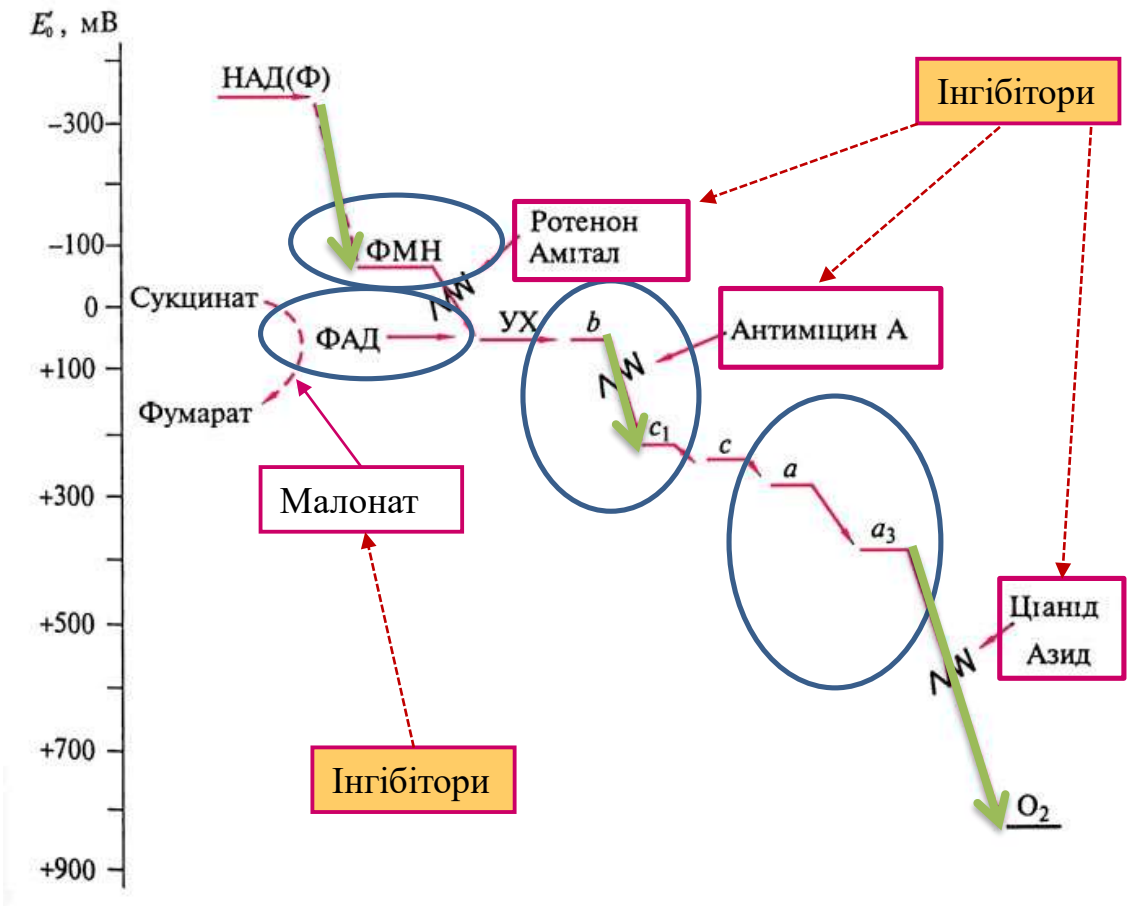
- Цитохром *c* передає електрон на двоядерний центр Cu_A. Далі електрони рухаються через гем *a* на Fe-Cu - центр.

- Кисень зв'язується з гемом a_3 і відновлюється до пероксипохідного (O_2^{2-}). Унаслідок приєднання ще двох електронів від цитохрому с O_2^{2-} перетворюється на дві молекули води.

- При цьому поглинається чотири „субстратних" протони з матрикса. Одночасно ще чотири протони закачуються з матрикса.

© Babsky A.

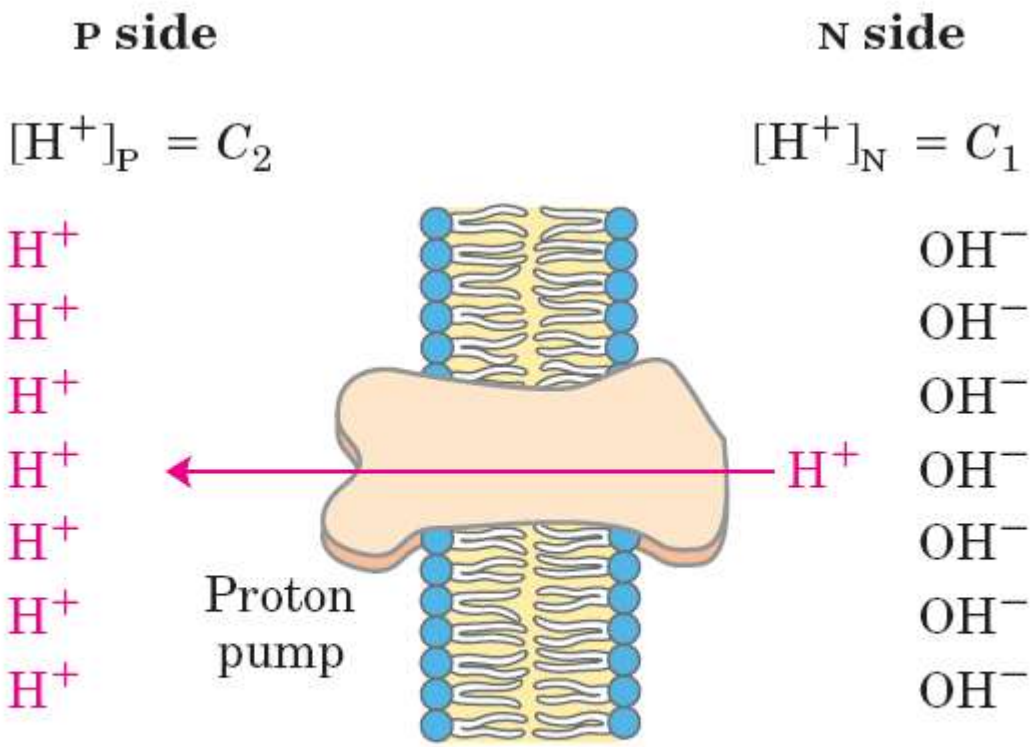
Схема електрон-транспортного ланцюга



$$НАДН + 11H^+_n + ½O_2 \rightarrow НАД+ + 10H^+_p + H_2O$$

© Babsky A.

Протонорушійна сила

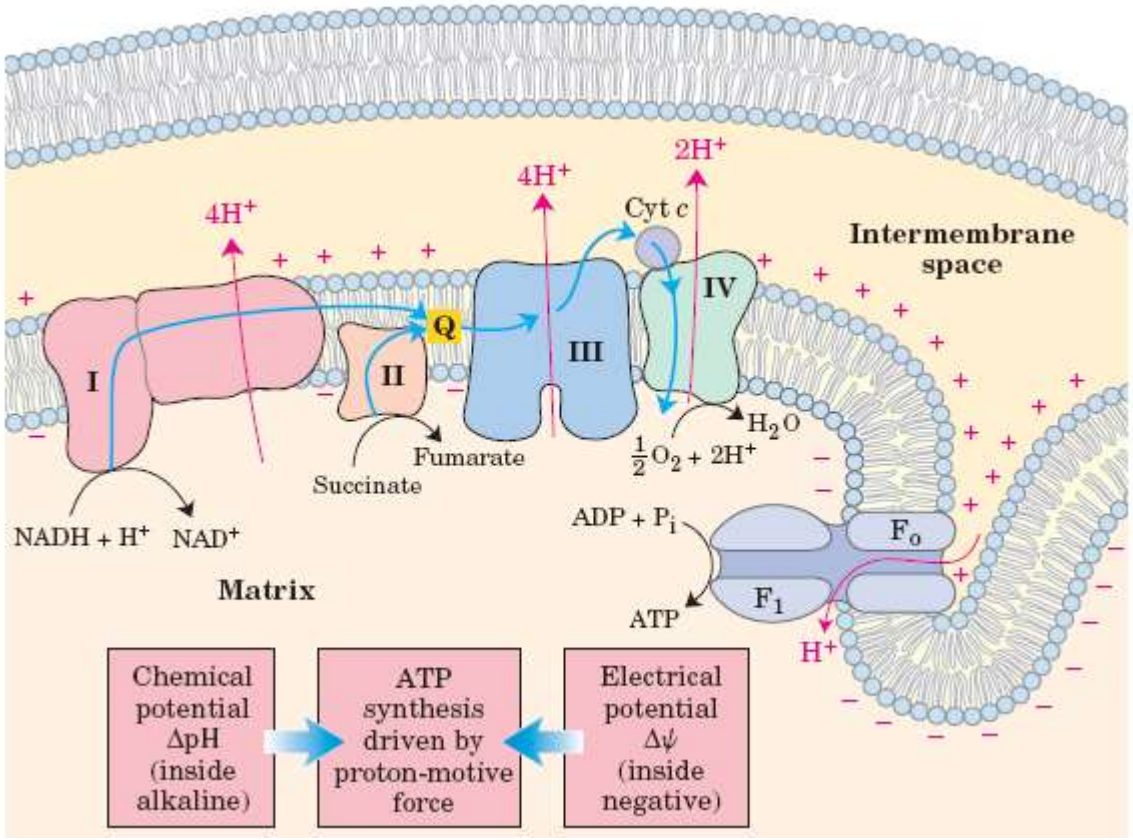


$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\ \Delta\psi$$
$$= 2.3RT\ \Delta\text{pH} + \mathcal{F}\ \Delta\psi$$

Внутрішня мітохондріальна мембрана розділяє два компартменти з різною $[H^+]$, наслідком чого є різниці у хімічній концентрації (ΔpH) і розподілі зарядів ($\Delta\psi$) по обидві сторони мембрани. У результаті виникає протонорушійна сила (ΔG), яку можна обчислити.

© Babsky A.

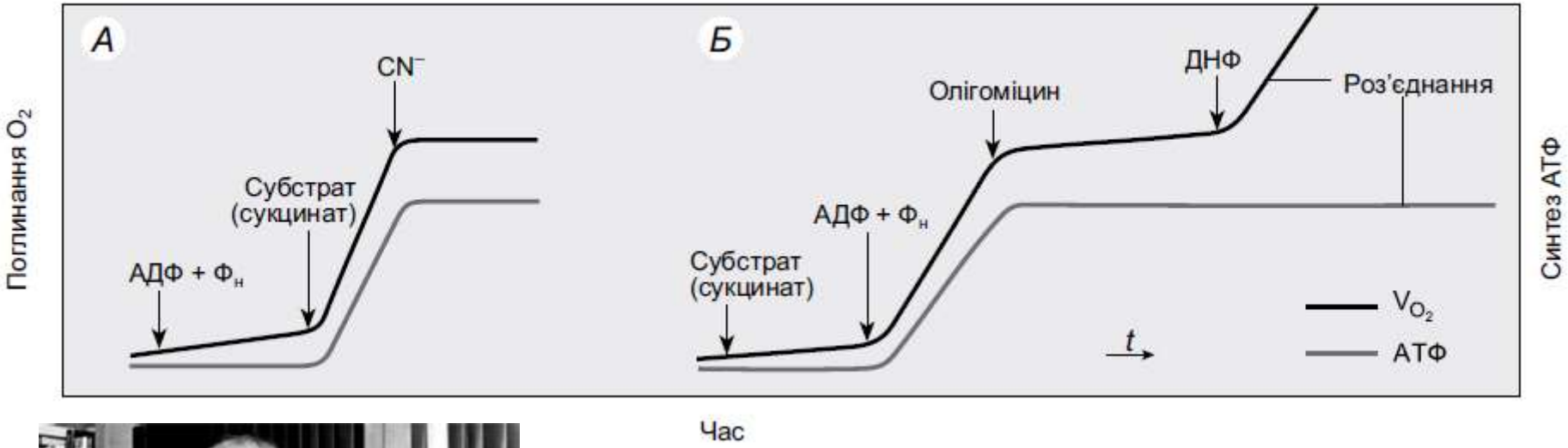
Хеміосмотична модель

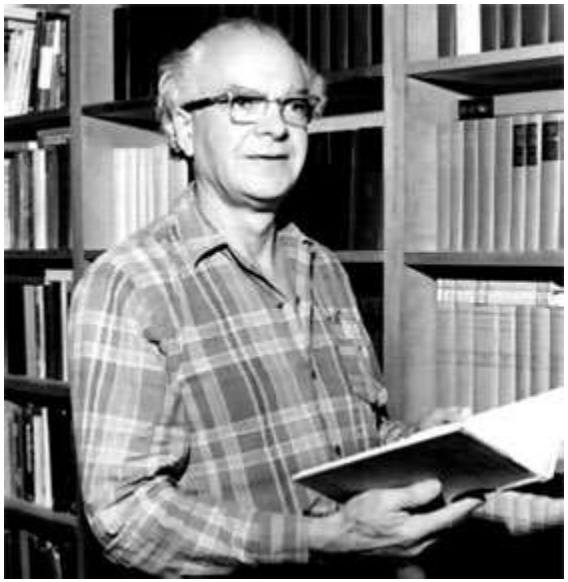


- Потік e^- через дихальний ланцюг супроводжується виведенням протонів через мембрану у міжмембранний простір, внаслідок чого виникають хімічний (ΔpH) та електричний (Δψ) градієнти.
- Внутрішня мітохондріальна мембрана непроникна для протонів, вони можуть надходити назад у матрикс лише через протоноспецифічні канали (F_0).
- Протонорушійна сила, що спрямовує протони назад у матрикс, є джерелом енергії для синтезу АТР, цю реакцію каталізує комплекс F_1, з'єднаний з F_o.

© Babsky A.

Спряження дихання ізольованих мітохондрій і синтезу АТФ. Досліди П. Мітчела





© Babsky A.

Хімічна гіпотеза спряження дихання та окисного фосфорилювання

- Була висловлена у 1953 р. Е. Слейтером
- Спряжуючим фактором є хімічний посередник (інтермедіат), який утворюється за транспорту електронів і запасає енергію в макроергічному зв'язку, яка надалі використовується для синтезу АТФ:

❖ $A_{red} + I + B_{ox} = B_{red} + Aox{\sim}I$;

❖ $A_{ox}{\sim}I + АДФ + Ф_н = A_{ox} + I + АТФ + H_2O$,

де А і В – редокс-компоненти дихального ланцюга , $A_{ox}{\sim}I$ – хімічний інтермедіат

- На роль посередника І гіпотетично пропонували одну із субодиниць АТФази
- Передбачалась наявність трьох спряжених центрів у дихальному ланцюгу
- Інтермедіатів типу A_{ox} чи B_{red} не було знайдено

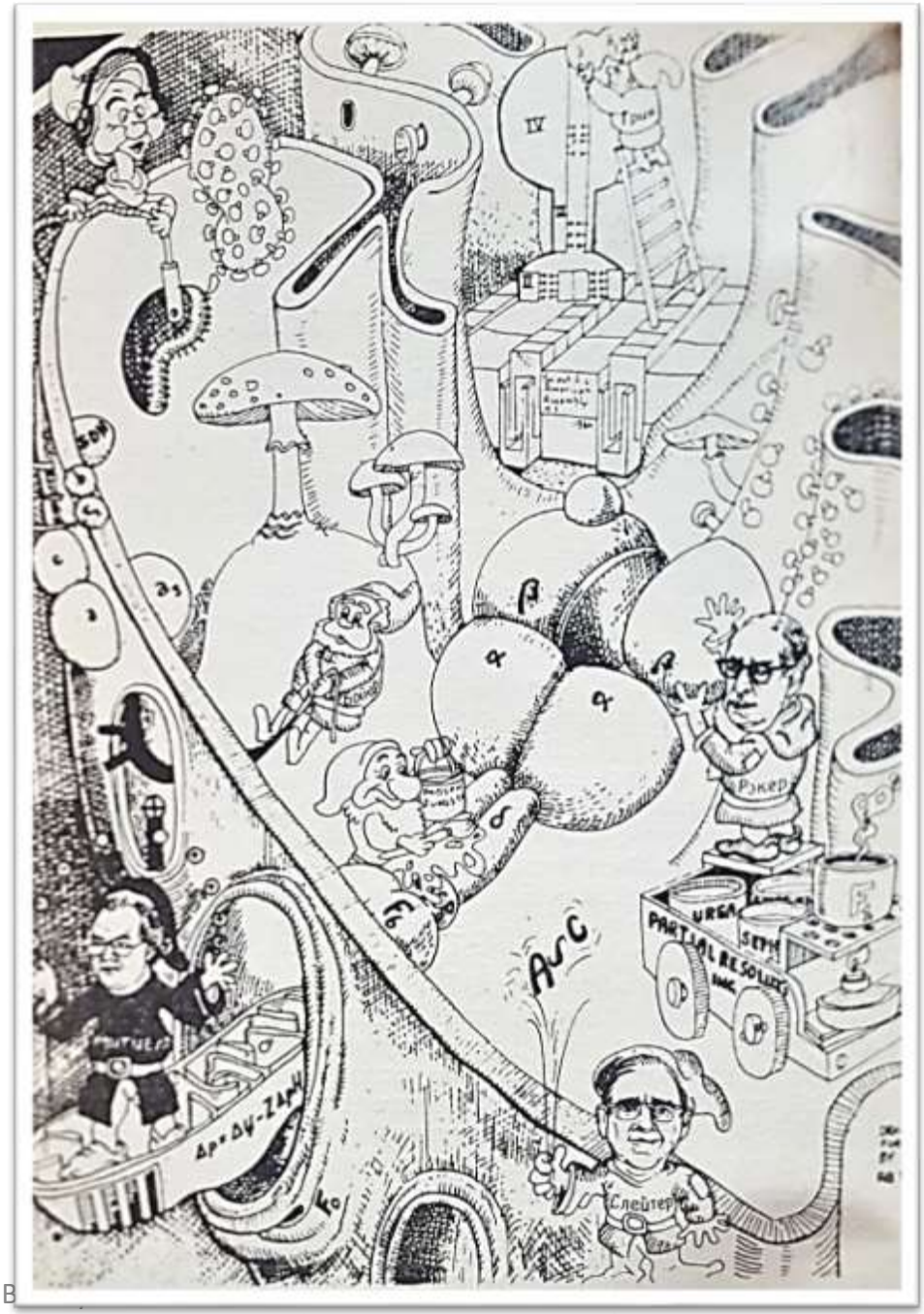
© Babsky A.

Конформаційна (механохімічна) гіпотеза

- Була висловлена у 1964 р. П. Боєром і підтримана у 1968 р. Д. Гріном.
- Енергетично-збагачений стан (~) не є хімічною сполукою, а лише конформація певної білкової чи ліпопротеїнової ділянки молекули, яка спряжена з електронним транспортом.
- Вільна енергія, яка вивільняється за переходу мембрани з енергізованого в неенергізований стан, використовується для синтезу АТФ.
- Нез'ясовано як локальне перенесення електронів позначається на енергізації великої ділянки мембрани та яким є фізичний механізм використання енергізованого стану для синтезу молекул АТФ.
- Час конформаційних змін не збігається із часовими параметрами процесів окисного фосфорилювання.

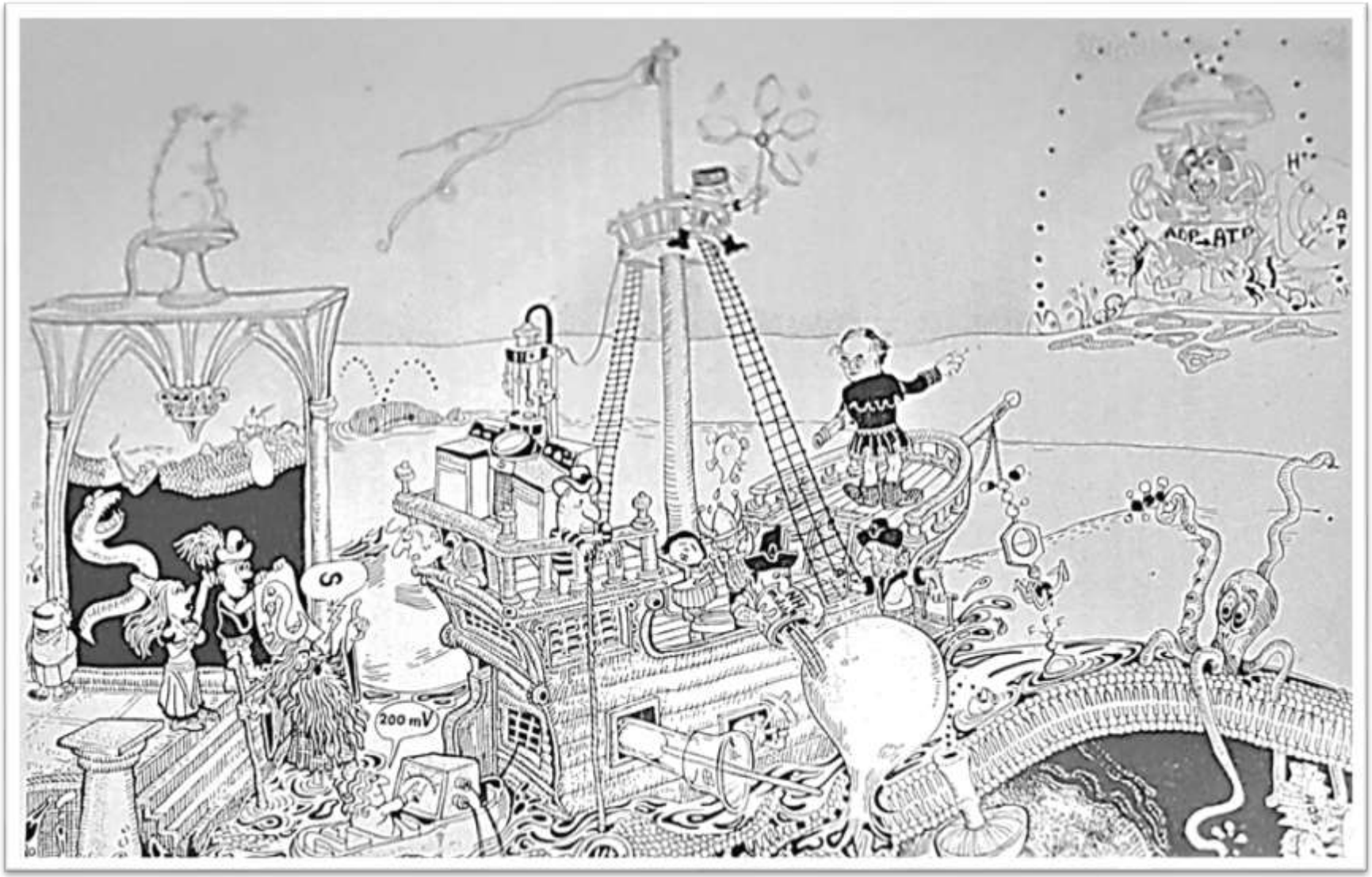
© Babsky A.

Теорії спряження клітинного дихання та окисного фосфорилювання: Нобелівські перегони



© В

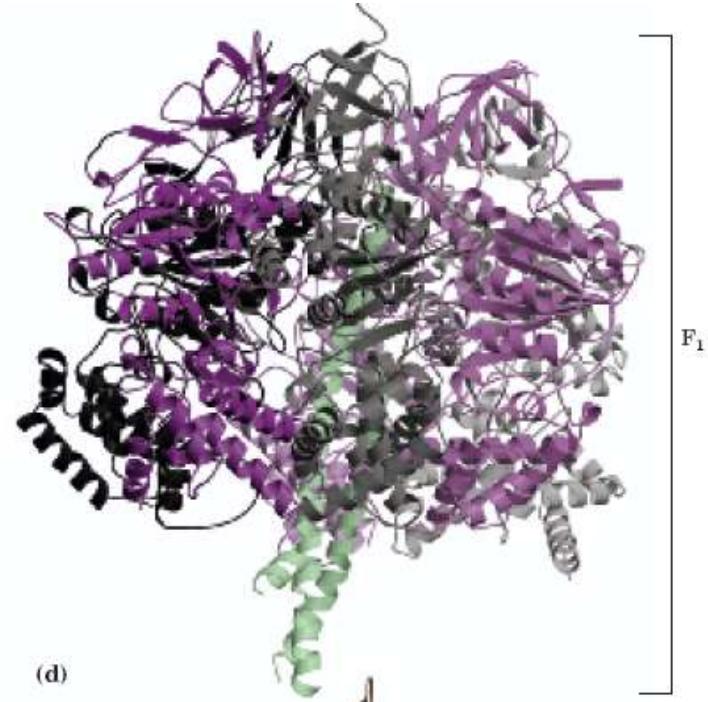
Хеміосмотична теорія спряження клітинного дихання та окисного фосфорилювання на шляху до визнання

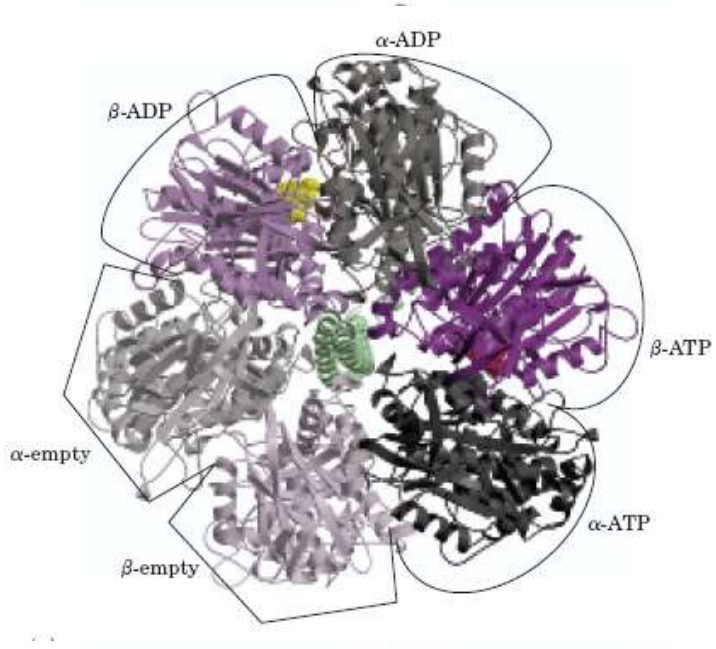


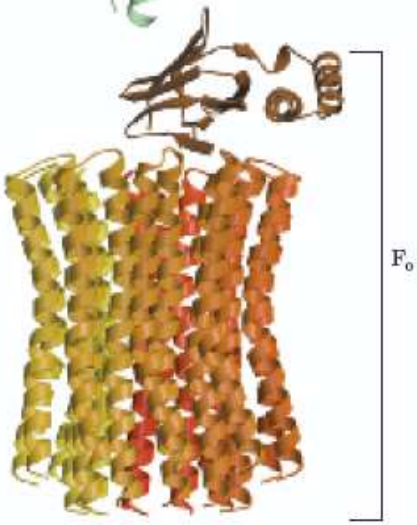
© Babsky A.

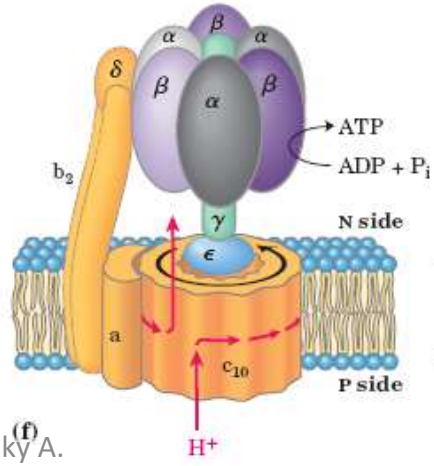
Структура АТФази

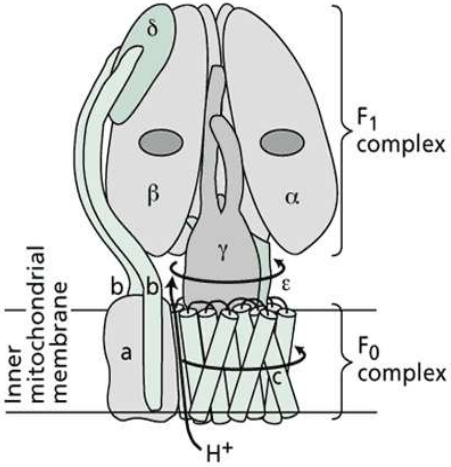
Е. Рекер
1913 - 1991





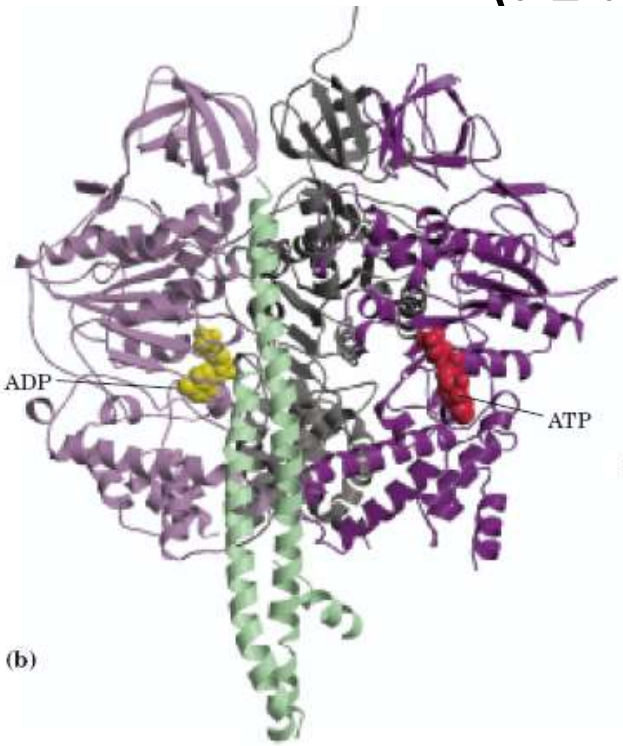


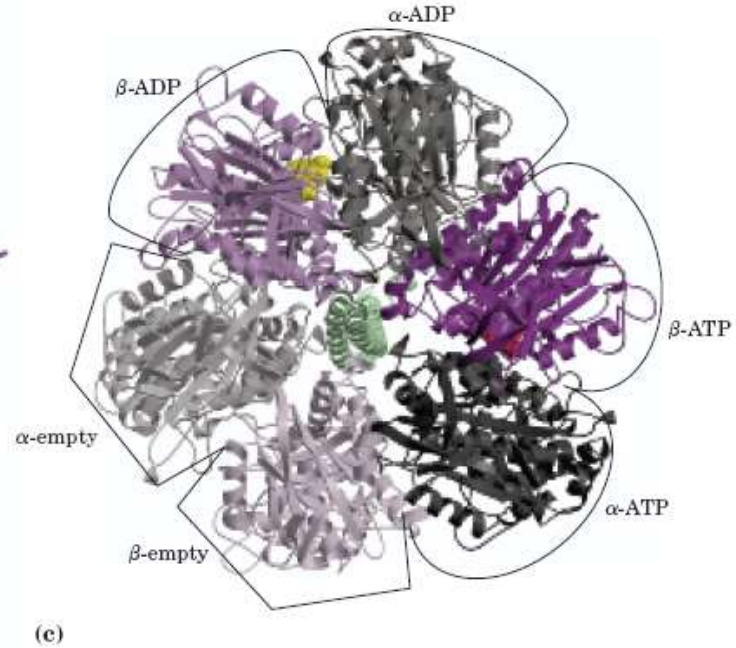


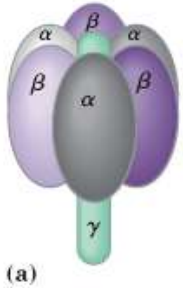


© Babsky A.

Мітохондріальний комплекс АТФ синтетази (F1 комплекс)







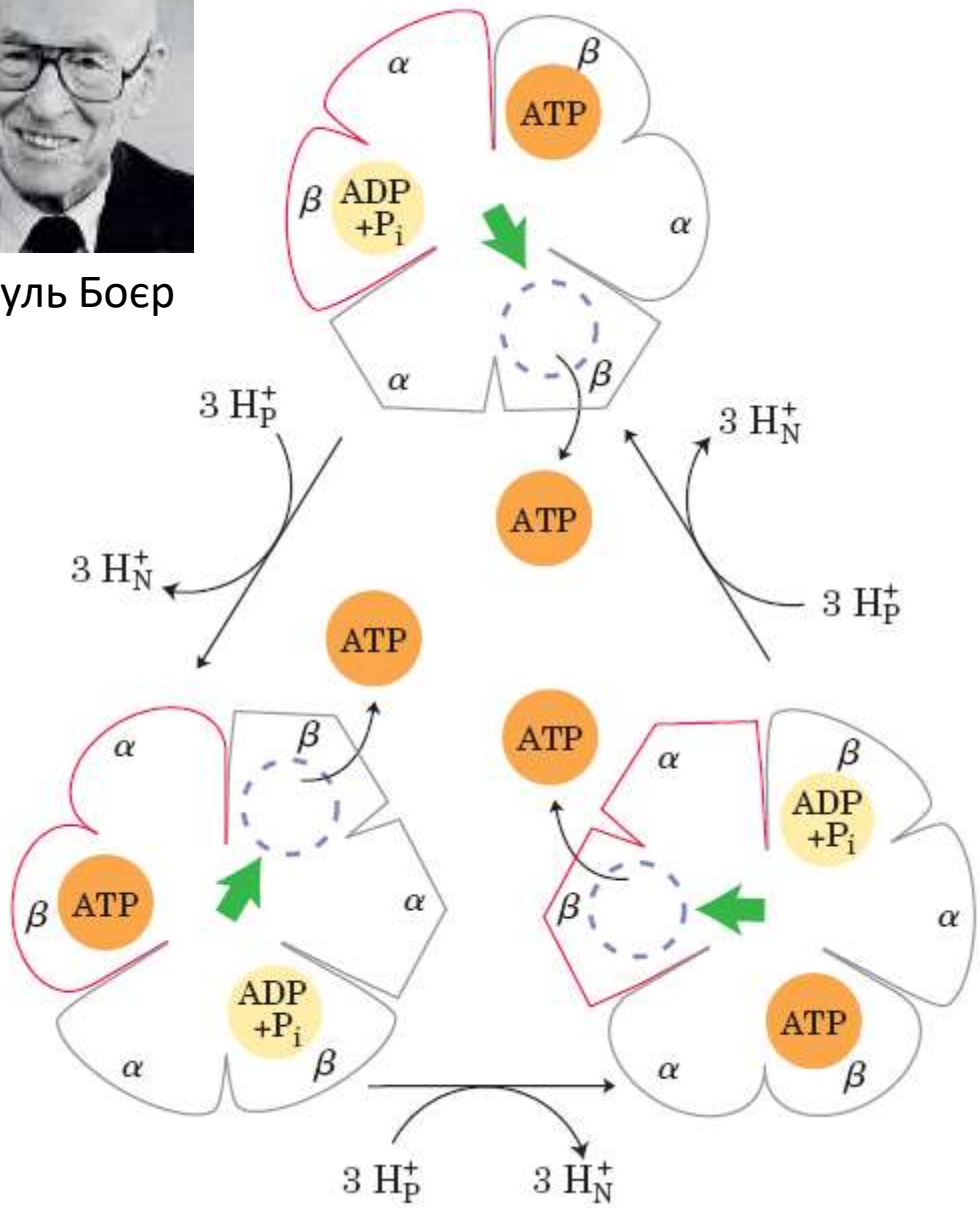
Джон Вокер

(a) Три α-та три *β*-субодиниці упорядковані навколо центрального стержня - γ субодиниці.
(b) Кристалічна структура F_1 мітохондрій бика (PDB ID 1BMF), вигляд збоку.
(c) Вигляд F_1 зверху (з N- сторони мембрани).

© Babsky A.

Пауль Боєр

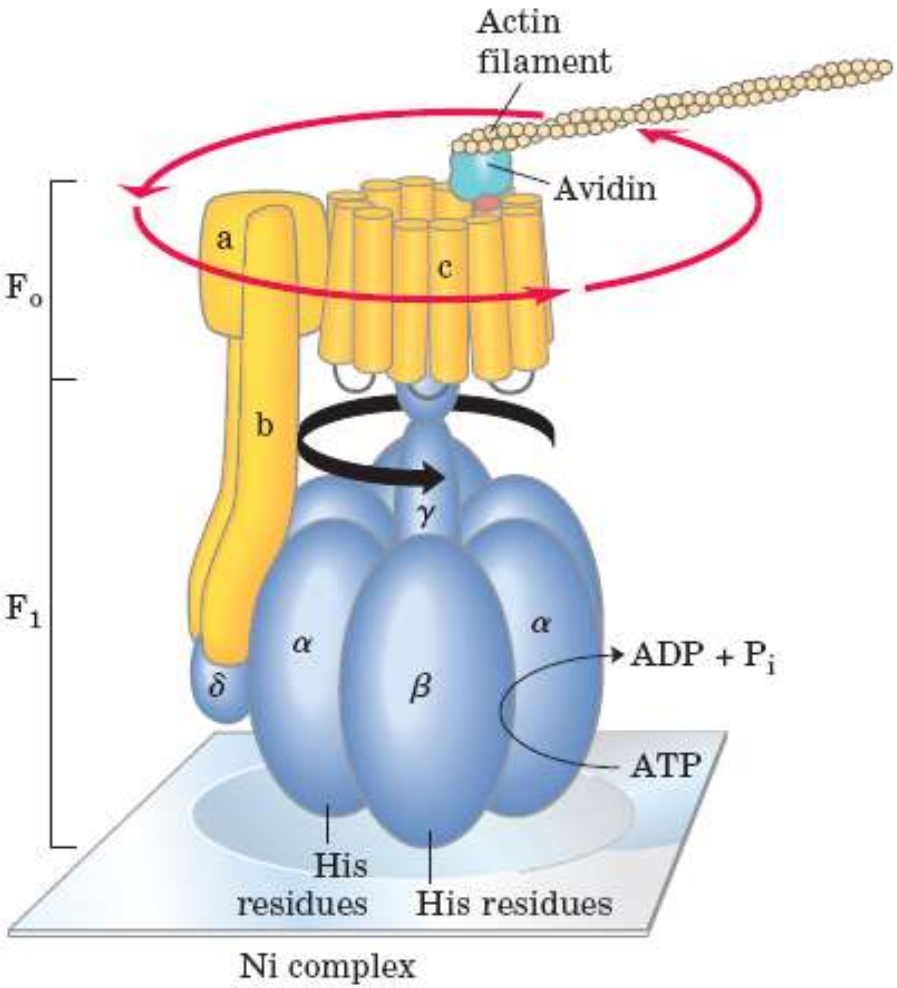
Модель функціонування АТФ-синтази



© Babsky A.

- *β*-ATP-конформації (міцно зв'язана ATP), *β*-ADP-конформації (зв'язування слабке), а третій – у *β*-порожній конформації (зв'язування дуже слабке).
- Протонорушійна сила спричиняє обертання центрального стержня - γ-субодиниці. Це викликає кооперативну зміну конформації нуклеотид-зв'язувальних центрів.
- Коли γ-субодиниця робить один повний оберт, кожна з β-субодиниць по черзі набуває трьох різних конформацій, і під час кожного оберту синтезуються та від'єднуються від поверхні ензиму три молекули ATP.

Підтвердження обертання комплекса F_0 та γ - субодиниці

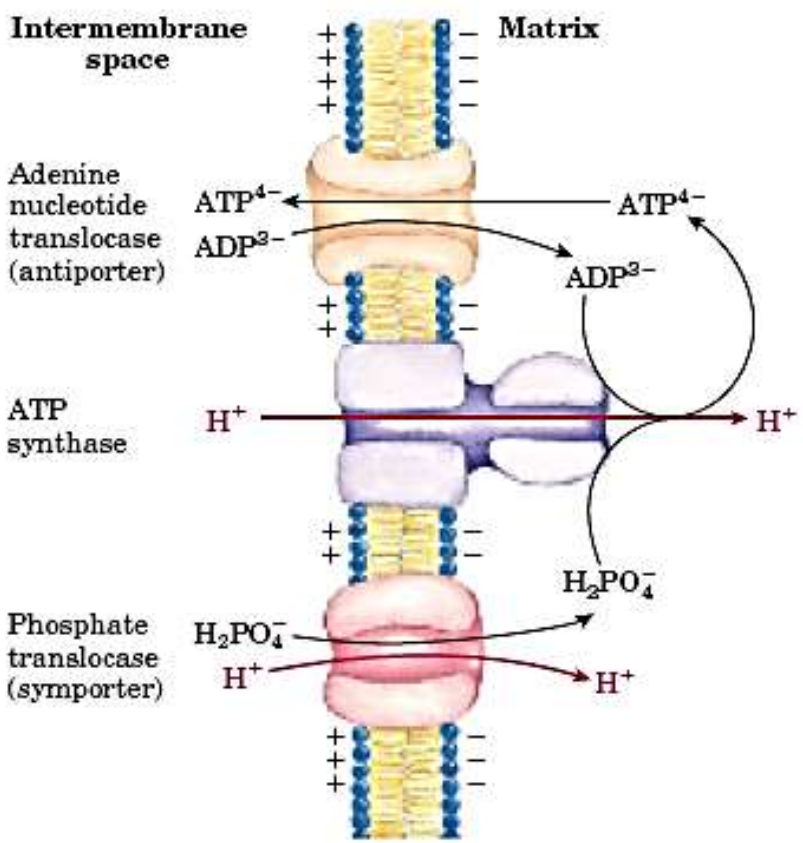


- F_1, що містить низку залишків His, щільно прилипає до предметного скельця
- До с-субодиниці F_0 ковалентно приєднанр біотин
- Протеїн авідин ковалентно приєднано до актинового філамента з флюоресцентною міткою
- Якщо у середовище додати АТФ то можна побачити, як мічений філамент починає обертатися в одному напрямку, що свідчить про обертання F_0-циліндра
- Під час обертання філамент здійснює дискретні стрибки приблизно через кожні одинадцять кадрів. Очевидно, що циліндр і стержень обертаються разом.

Masasuke Yoshida and Kazuhiko Kinosita, Jr.

© Babsky A.

Транслокази аденінових нуклеотидів та фосфату

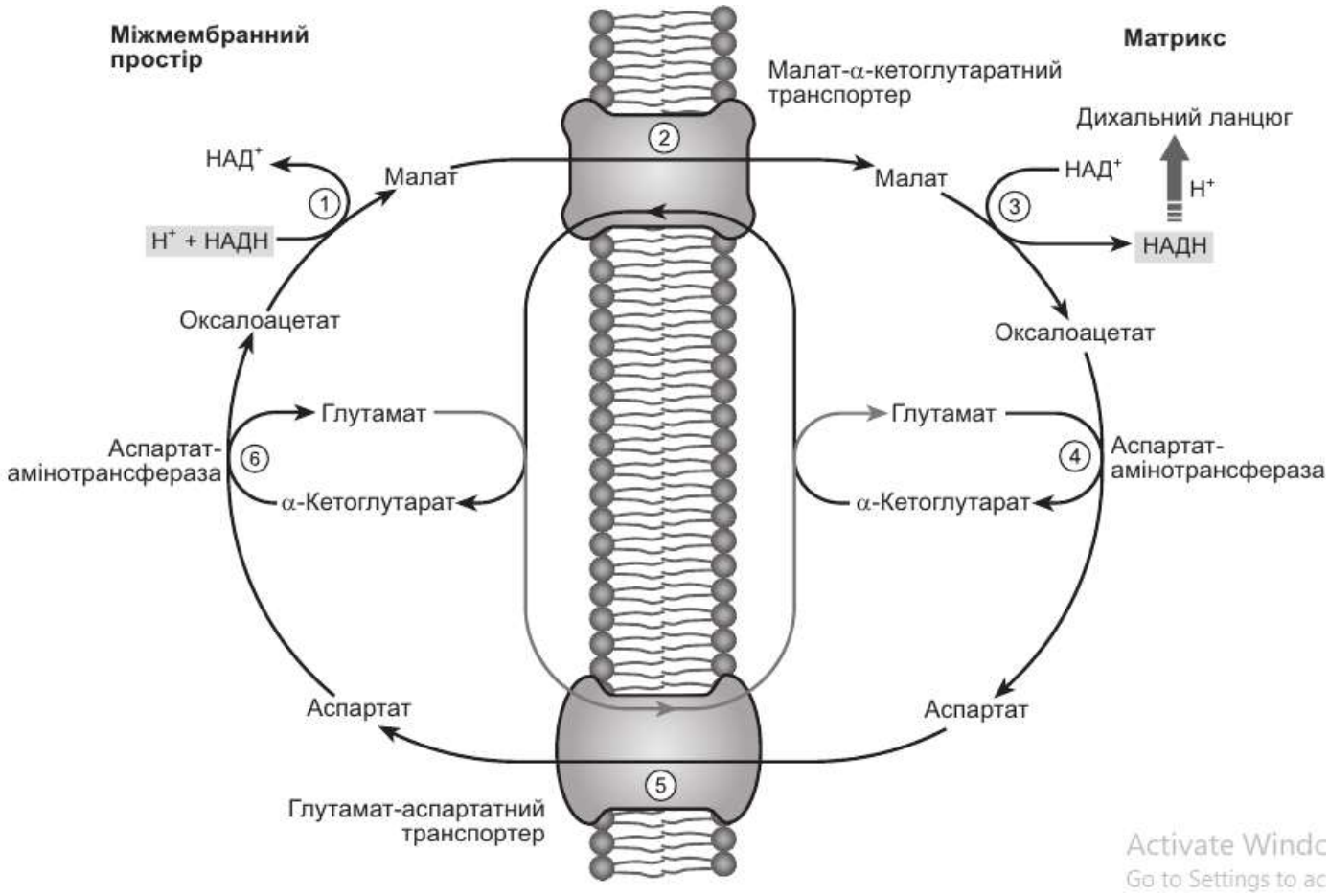


- Транслокази внутрішньої мембрани мітохондрій переносять ADP та P_i у матрикс, а ATP – у цитозоль.
- Транслоказа аденінових нуклеотидів є антипортером. Унаслідок заміни ATP^{4-} на ADP^{3-} один негативний заряд виводиться з матриксу, цьому сприяє різниця зарядів на мембрані.

- Симпорт $H_2PO_4^-$ та H^+ не супроводжується сумарним витоком заряду.
- Енергія протонорушійної сили використовується як для синтезу ATP і транспортування субстратів реакції (ADP та P_i) у мітохондріальний матрикс, а продуктів (ATP) – у цитозоль.

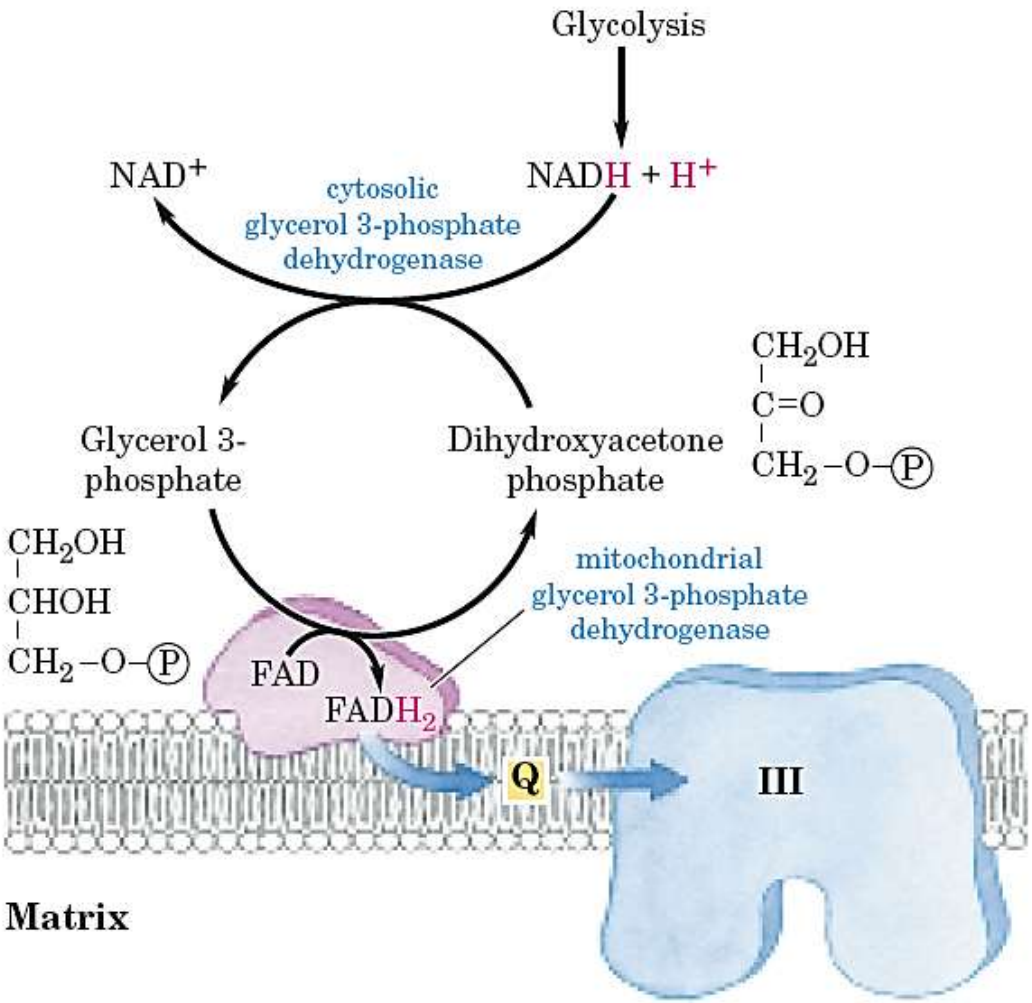
© Babsky A.

Малат-аспартатна човникова система транспортування відновлювальних еквівалентів (ВЕ) від цитозольного NADH у мітохондріальний матрикс (печінка, нирки, серце).



① У цитозолі два ВЕ переносяться від NADH на оксалоацетат з утворенням малату. ② Малат проникає через мембрану за допомогою малат-α-кетоглутаратного транспортера. ③ У матриксі малат передає два ВЕ еквіваленти на NAD^+, утворений NADH окиснюється у дихальному ланцюзі. ④ Оксалоацетат трансамінується до аспартату, який ⑤ виводиться у цитозоль через глутамат-аспартатний транспортер. ⑥ Оксалоацетат знову утворюється у цитозолі і цикл завершується.

Гліцерол-3-фосфатна човникова система перенесення відновлювальних еквівалентів (ВЕ) з цитозолю у мітохондріальний матрикс (скелетні м’язи, мозок)



- Дигідроксиацетонфосфат у цитозолі приєднує два відновлювальні еквіваленти від NADH у реакції, яку каталізує цитозольна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа.
- Мітохондріальна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа переносить два відновлювальні еквіваленти на убіхінон.
- Цей човниковий механізм не потребує участі мембранних транспортних систем.

© Babsky A.

Додаткова література до теми «*Біоенергетика: трансформація енергії*

- Скулачев В.П. Биоэнергетика: Мембранные преобразователи энергии. - М.: Высш. шк., 1989. – 271 с.
- Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: Новые взгляды. - М.: Мир, 1979. – 216 с.
- Nelson DL; Cox MM (2005). Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed.).
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191 (4784): 144–148.
- Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita M, Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. Nature, 386, 299 - 302.

© Babsky A.