



УДК 577.153.3.03

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАСТВОРИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТР-АЗЫ С АДЕНИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ *

Козлов И. А., Проханов О. А., Ягужинский Л. С.

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Изучали закономерности взаимодействия растворимой митохондриальной АТР-азы с ПХАУК в присутствии ADP, Mg-ADP и Mg-АТР. Показано, что в присутствии Mg-ADP увеличивается скорость инактивация АТР-азы ПХАУК. Полученные результаты подтверждают предположение о наличии в активном центре АТР-азы двух различных гидрофобных областей, ответственных за взаимодействие с адениновым кольцом ADP и АТР и одной полярной области, обуславливающей конкуренцию между нуклеотидами. Присоединение ADP в некаталитическом центре АТР-азы приводит к изменению конформации фермента, которое в присутствии ПХАУК обнаруживается с помощью метода КД.

Изучение структуры и механизма действия растворимой митохондриальной АТР-азы (сопрягающий фактор F_1 , по терминологии Рэкера [1]) может ответить на ряд вопросов, связанных с функционированием этого фермента в системе окислительного фосфорилирования. Наличие у АТР-азы сложной и лабильной четвертичной структуры является фактором, затрудняющим исследование каталитических свойств фермента. Сравнительно мало изучена до настоящего времени структура активного центра АТР-азы. Лишь в опубликованной недавно работе Сеньора [2] обсуждается возможность локализации тирозина в активном центре. Интерпретация результатов по действию ингибиторов на АТР-азу затруднена отсутствием достоверных данных о числе центров связывания нуклеотидов в расчете на одну молекулу фермента. Кэттерелл и Педерсон [3] обнаружили у АТР-азы один центр связывания ADP. Хилборн и Хаммес [4] идентифицировали два центра связывания адениновых нуклеотидов. Один из центров совпадает, по мнению авторов, с каталитическим центром АТР-азной реакции, причем эффективность связывания в нем ADP и АТР мало зависит от присутствия Mg^{2+} . С другой стороны, в ряде лабораторий было показано, что Mg^{2+} участвует в процессе сорбции АТР-ферментом [5, 6]. Проведенный в нашей лаборатории ранее [7] кинетический анализ системы Mg^{2+} — АТР-фермент по методу Лондона — Стока [8] подтвердил участие Mg^{2+} в связывании АТР. Кроме того, было показано, что при конкурентном ингибировании АТР-азной реакции ADP связывается в виде магниево-й соли [7].

Данная работа посвящена изучению закономерностей взаимодействия F_1 с алкилирующим агентом — ПХАУК, эффективным ингибитором сис-

* Принятые сокращения: ПХАУК — *n*-N, N'-ди(хлорэтил)аминофенилуксусная кислота; АТР-аза — аденозинтрифосфатаза (сопрягающий фактор F_1).

темы окислительного фосфорилирования [9]. Исследовано влияние адениновых нуклеотидов на скорость инактивации АТР-азы ПХАУК. Полученные нами результаты позволяют предположить существование в активном центре F_1 двух различных гидрофобных областей, ответственных за взаимодействие с адениновым кольцом АDP и АТР, и одной полярной области, обуславливающей конкуренцию между нуклеотидами. Высказанное предположение подтверждается данными о снятии фенолами конкурентного ингибирования АТР-азной реакции Mg-ADP [10] и о различной специфичности фермента к типу гетероциклического основания при сорбции нуклеозид-5'-дифосфатов и нуклеозид-5'-трифосфатов [1].

Среди химических агентов, модифицирующих растворимую митохондриальную АТР-азу, наиболее эффективными оказались I_2 и тетранитрометан [2, 11]. Оба реагента взаимодействуют с тирозином; I_2 модифицирует также SH-группы белка. Как тетранитрометан, так и I_2 модифицируют сравнительно большое число аминокислотных остатков в молекуле F_1 . Используемый в данной работе для модификации фермента бифункциональный алкилирующий агент ПХАУК взаимодействует, по-видимому, с весьма ограниченным числом аминокислотных остатков АТР-азы. Так, аминокислотный анализ исходного фермента совпадает в пределах чувствительности метода [12, 13] с аминокислотным анализом F_1 , обработанного 5 мМ ПХАУК в течение 2 ч при 20°. Однако ингибирование ПХАУК АТР-азы можно объяснить лишь модификацией фермента алкилирующим агентом, поскольку проведенная нами длительная инкубация F_1 с неалкилирующим структурным аналогом ПХАУК, фенилуксусной кислотой, не привела к заметному изменению АТР-азной активности. К сожалению, имеющиеся к настоящему моменту данные не позволяют идентифицировать природу нуклеофильных групп в активном центре F_1 , взаимодействующих с ПХАУК.

На рис. 1 изображено падение во времени АТР-азной активности F_1 в результате реакции с ПХАУК. Из рис. 1 (кривые 1, 2 и 3) видно, что скорость инактивации фермента увеличивается в присутствии Mg^{2+} и особенно Mg-ADP. ADP в отличие от Mg-ADP не вызывает ускорения реакции инактивации АТР-азы (кривая 4) ПХАУК. Присутствие помимо Mg^{2+} в среде инкубации субстрата АТР-азной реакции Mg-АТР приводит к усложнению зависимости активности фермента от времени инкубации. Первоначальный защитный эффект Mg-АТР ослабевает по мере гидролиза этого соединения и накопления в среде Mg-ADP (кривая 5). Столь различное влияние Mg-ADP и Mg-АТР на скорость инактивации F_1 ПХАУК может объясняться различной электроотрицательностью активного центра в комплексах Mg-ADP- F_1 и Mg-АТР- F_1 . Электростатические взаимодействия играют важную роль в процессе сорбции ПХАУК на ферменте: как следует из полученных нами данных, инкубация с метиловым эфиром ПХАУК не приводит к заметному падению АТР-азной активности. Следует заметить, что ПХАУК присутствует в реакционной среде в виде аниона даже при избытке Mg^{2+} : константа диссоциации комплекса Mg^{2+} -ПХАУК, определенная нами с помощью Mg^{2+} — чувствительного электрода, составляет $6 \cdot 10^{-8}$ М. Кроме того, различная доступность комплексов Mg-ADP- F_1 и Mg-АТР- F_1 действию ПХАУК может объясняться различной локализацией Mg-ADP и Mg-АТР в активном центре фермента.

Эксперименты показали, что модифицированная АТР-аза утрачивает способность связывать в активном центре Mg-ADP. Так, $K_{i(набл)}$ для Mg-ADP увеличивается по крайней мере в 15 раз в результате предынкубации F_1 с 2 мМ ПХАУК и $MgSO_4$ в течение 10 мин. Кривая 6 на рис. 1 изображает зависимость АТР-азной активности фермента от времени его предынкубации с ПХАУК и $MgSO_4$ (2 мМ) для случая, когда АТР-азная активность исходного и модифицированного ПХАУК F_1 измерялась в пробе, содержащей 1 мМ Mg-ADP и 2 мМ Mg-АТР. Кажущееся уменьшение скорости инактивации АТР-азы при измерении АТР-азной активности в при-

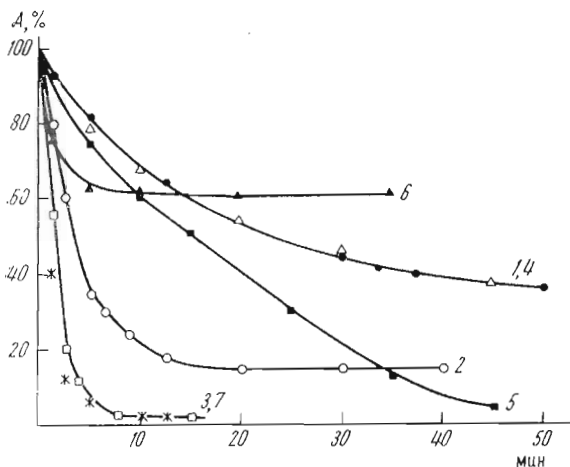


Рис. 1. Инактивация АТФ-азы в присутствии ПХАУК. Модификацию F_1 ПХАУК проводили в растворе, содержащем F_1 0,5 мг/мл, 2 мМ ПХАУК, 10 мМ трис-НСI буфер (рН 8,0) (кривая 1, Δ). В других опытах реакционная смесь содержала также 2 мМ $MgSO_4$ (2), 2 мМ $Mg-ADP$ (3, *); 2 мМ ADP (4, \bullet); 2 мМ $MgSO_4$ и 1 мМ $Mg-ATP$ (5); 2 мМ $MgSO_4$ (6); 2 мМ $MgSO_4$ и 2 мМ фенолуксусной кислоты (7, \square). Для кривых 1—5 и 7 скорость АТФ-азной реакции измеряли в стандартных условиях, описанных в экспериментальной части. В случае кривой 6 среда для измерения АТФ-азной активности содержала 2 мМ $Mg-ATP$ и 1 мМ $Mg-ADP$.

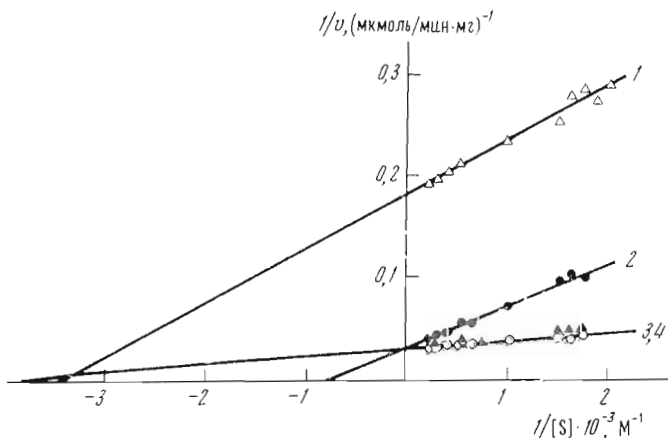


Рис. 2. Зависимость обратной скорости АТФ-азной реакции от обратной концентрации субстрата: 1 — для F_1 , обработанного 2 мМ ПХАУК в присутствии 2 мМ $MgSO_4$ в течение 20 мин; 2—4 — для стандартного препарата F_1 . Реакционная смесь для определения скорости АТФ-азной реакции содержала 0,4—4 мкг/мл F_1 , 0,5—5 мМ $Mg-ATP$, 3 мМ трис-НСI буфер (рН 8,3) (кривая 1, Δ , \circ), а также 1 мМ $Mg-ADP$ (2) и 1 мМ $Mg-ADP$, 2 мМ фенолуксусной кислоты (3)

существом $Mg-ADP$ объясняется тем, что алкилирование F_1 приводит к уменьшению способности фермента связывать $Mg-ADP$, конкурентный ингибитор АТФ-азной реакции. Обнаруженный эффект понижения сродства фермента к $Mg-ADP$ в результате прединкубации с ПХАУК в присутствии Mg^{2+} становится понятным, если предположить, что ПХАУК конкурирует с $Mg-ADP$ за связывание с ферментом, т. е. модификация F_1 осуществляется в области связывания $Mg-ADP$. Действительно, неалкилирующий

структурный аналог ПХАУК, фенилуксусная кислота, как и многие полярные ароматические соединения [10], снимает эффект ингибирования АТР-азной реакции Mg-ADP (рис. 2).

Увеличение скорости инактивации АТР-азы ПХАУК в присутствии Mg-ADP (рис. 1, кривая 3) объясняется, по-видимому, тем, что нуклеотид, блокируя в активном центре фермента область наибольшего сродства к ПХАУК, увеличивает вероятность взаимодействия алкилирующего агента с группами, входящими в состав АТР-связывающего центра и играющими более важную роль в осуществлении катализа АТР-азной реакции. Аналогичную природу имеет, по-видимому, механизм увеличения скорости инактивации АТР-азы ПХАУК в присутствии фенилуксусной кислоты (рис. 1, кривые 3, 7). Общий механизм увеличения скорости инактивации F_1 для фенилуксусной кислоты и Mg-ADP объясняется способностью этих соединений конкурировать за одно место связывания в активном центре фермента (рис. 2, кривые 2, 4). Присутствие Mg-ADP (или фенилуксусной кислоты) не только оказывает влияние на скорость падения АТР-азной активности, но и приводит к иному конечному результату: инкубация F_1 с ПХАУК и Mg-ADP (или фенилуксусной кислотой) полностью инактивирует АТР-азу, в то время как при инкубации F_1 с ПХАУК в присутствии одного Mg^{2+} образуется модифицированный фермент, обладающий 15%-ной исходной активностью (рис. 1, кривая 2). Очевидно, алкилирование Mg-ADP-связывающего центра в отсутствие Mg-ADP (в отличие от простой сорбции Mg-ADP и фенилуксусной кислоты) препятствует инактивации фермента. На рис. 2 изображена зависимость скорости АТР-азной реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка для исходного F_1 (кривая 4) и F_1 , обработанного ПХАУК (2 мМ) в присутствии $MgSO_4$ (2 мМ) в течение 20 мин (кривая 1). Из рис. 2 видно, что модифицированный фермент не отличается от исходного по величине K_m (набл.) и имеет в 6 раз меньшую величину V_{max} .

Наблюдаемый эффект уменьшения V_{max} АТР-азной реакции при алкилировании Mg-ADP-связывающего центра F_1 наряду с сохранением 15%-ной исходной активности у модифицированного фермента может иметь два объяснения: во-первых, алкилирование Mg-ADP-связывающей области активного центра вызывает небольшие изменения стерического соответствия в активном центре, которые приводят к падению V_{max} без изменения K_m (набл.); во-вторых, сохранение 15%-ной АТР-азной активности свидетельствует о том, что реакция алкилирования в Mg-ADP-связывающей области протекает приблизительно в 6 раз медленнее, чем индуцируемая простой сорбцией ПХАУК реакция алкилирования Mg-АТР-связывающей области, приводящая к полной инактивации фермента: 85% АТР-азы инактивируется полностью, а 15% сохраняет исходную активность (рис. 1, кривая 2), но утрачивает способность связывать Mg-ADP.

К сожалению, на основании полученных нами результатов мы не можем выбрать, какое из двух возможных объяснений обнаруженного эффекта взаимодействия F_1 с ПХАУК является более верным. Следует отметить, что независимо от того, который из двух предложенных механизмов окажется верным, требует дополнительного объяснения, каким образом алкилирование Mg-ADP-связывающего центра предохраняет фермент от дальнейшей инактивации.

Полученные нами результаты о взаимодействии F_1 , а также комплексов Mg-ADP- F_1 и Mg-АТР- F_1 с ПХАУК и фенилуксусной кислотой можно суммировать следующим образом: 1) комплексы Mg-ADP- F_1 и Mg-АТР- F_1 имеют различную доступность инактивирующему действию ПХАУК; 2) взаимодействие фермента с ПХАУК или фенилуксусной кислотой приводит к понижению Mg-ADP-связывающей способности без изменения сродства к Mg-АТР. Несмотря на отсутствие полной ясности в механизме модификации ПХАУК, вся сумма полученных нами данных свидетельствует в пользу предположения о наличии в активном центре F_1 двух различных

гидрофобных областей, ответственных за взаимодействия с адениновыми кольцами ADP и АТР. Подобное предположение хорошо согласуется с данными работ [1, 10].

Выше было показано, что кинетика инактивации АТР-азы ПХАУК в присутствии Mg-ADP и ADP различна (рис. 1, кривые 3, 4). Полученные нами ранее [7] результаты свидетельствовали о том, что только Mg-ADP является конкурентным ингибитором и, следовательно, связывается в активном центре фермента. Как уже отмечалось, Хамес и Хилбори [4] обнаружили у АТР-азы два центра связывания ADP, только один из которых совпадал с каталитическим центром АТР-азной реакции. В литературе отсутствуют данные о том, как меняются свойства АТР-азы в результате присоединения ADP во втором некаталитическом центре связывания нуклеотидов. Показано лишь, что взаимодействие F_1 с некаталитическим центром связывания нуклеотидов характеризуется высоким сродством и специфичностью [14]. Представляло интерес выяснить, меняется ли при сорбции ADP конформация F_1 . В качестве прямого метода исследования конформационных состояний фермента мы использовали метод КД. На рис. 3 (кривая 1) изображен характерный спектр КД F_1 . В спектре наблюдается большой отрицательный эффект Котона в

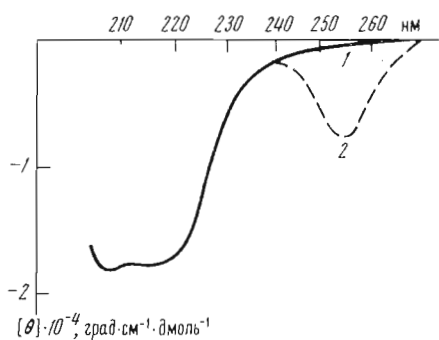


Рис. 3. Спектры КД F_1 (1) и F_1 , обработанного 0,5 мМ ПХАУК в присутствии 0,6 мМ ADP (2)

полосе поглощения регулярной структуры пептидного хромофора*. Оценка степени α -спиральности F_1 , произведенная по методу Гринфилд и Фасман [16], дала величину, равную 50%. Лучшее соответствие экспериментальных кривых с модельными наблюдается, если предположить наличие в F_1 10% β -структуры и 40% клубкообразной конформации. Mg^{2+} , Mg-ADP, ADP, Mg-ATP и АТР не вносят никаких изменений в спектр КД F_1 в пределах чувствительности метода измерений. Это указывает на отсутствие значительных изменений во вторичной структуре F_1 в результате взаимодействия с компонентами АТР-азной реакции. Для идентификации более тонких конформационных изменений фермента при образовании комплекса с ADP мы применили ПХАУК как индикатор конформационных состояний АТР-азы. ПХАУК имеет полосу поглощения в УФ-свете при 250—260 нм и обладает плоскостью симметрии. На рис. 3 штриховой линией изображен индуцированный эффект Котона в области 255 нм, возникающий при инкубации F_1 в присутствии ADP, EDTA и ПХАУК. Возникновение этого эффекта Котона является, по нашему мнению, результатом индуцированной асимметрии ПХАУК при взаимодействии с АТР-азой. Фенилуксусная кислота не вызывает в аналогичных условиях изменений в спектре КД F_1 , и, следовательно, эффект ПХАУК связан с алкилированием фермента. Эффект Котона при 255 нм не наблюдается, если в реакционной смеси заменить EDTA на Mg^{2+} или исключить из реакционной смеси ADP. Полученные результаты свидетельствуют об изменении конформации F_1 в результате образования комплекса с ADP в отсутствие Mg^{2+} . С другой стороны, присутствие одного ADP не изменяет скорости инактивации АТР-азы под действием ПХАУК (рис. 1, кривая 1, 4), и, следовательно, конформационные изме-

* Эффект Котона при 280 нм, обусловленный ароматическими аминокислотами, был незначителен в пределах данной чувствительности прибора. Этот результат согласуется с данными о сравнительно низком содержании ароматических аминокислот в F_1 , приведенными в работе [15].

нения в ферменте в результате взаимодействия с ADP не затрагивают активный центр. Этот результат находится в хорошем соответствии с данными Хамеса и Хилборна [4], которые показали, что специфичное связывание ADP в области, не совпадающей с активным центром F_1 , не вызывает изменения АТР-азной активности фермента.

Полученные результаты (изменение доступности F_1 действию алкилирующего агента в присутствии ADP) интересно сопоставить с известными данными [17] о различном уровне включения в молекулу сопрягающего фактора хлоропластов ^{14}C -N-этилмалеимида в условиях энергизации и деэнергизации хлоропластов. Не исключено, что в нашем случае имеют место близкие по характеру конформационные изменения фермента.

Экспериментальная часть

Растворимую митохондриальную АТР-азу выделяли по методу Хорстмана и Рэкера [18]. АТР-азную активность определяли по скорости изменения рН реакционной среды в результате гидролиза АТР [19]. Стандартная реакционная смесь для измерения АТР-азной активности содержала 3 мМ трис-НСl буфер (рН 8,3); 3—30 мкг фермента, 2,5 мМ АТР и 5 мМ $MgSO_4$ в общем объеме 8 мл. Скорость АТР-азной реакции линейно зависела от концентрации фермента в пробе. рН реакционной среды за измеряемое время реакции изменялся не более чем на 0,1; степень превращения не превышала 5%. Количество грамм-эквивалентов H^+ , выделившееся в результате полного гидролиза АТР, соответствовало рассчитанному. Стандартная ошибка при определении АТР-азной активности составляла 3—7%. Удельная активность препарата АТР-азы составляла 30 мкмоль Mg -АТР/мг белка в 1 мин (25°). При изучении зависимости скорости реакции от концентрации субстрата отношение $[Mg\text{-}ATP]/[Mg^{2+}]_{св} = 1$ в реакционной среде поддерживали постоянным. Кривые в координатах Лайнуивера — Берка (рис. 2) построены по методу наименьших квадратов с использованием стандартной программы счетной машины «Seiko» (Япония). Все кинетические измерения проводили при 25° .

Опыты по изучению скорости инактивации фермента при его инкубации с ПХАУК проводили в реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-НСl буфер (рН 8,0), АТР-азу 0,5 мг/мл, а также различные добавки в виде $MgSO_4$, ADP, АТР, фенилуксусной кислоты и ПХАУК в концентрациях, указанных в подписи к рис. 1. Реакцию проводили при 20° . Время реакции отсчитывали с момента добавления к реакционной смеси ПХАУК. Для определения АТР-азной активности в зависимости от времени инкубации фермента с ПХАУК отбирали небольшие аликвоты реакционной смеси и немедленно добавляли их в кювету с заранее приготовленной стандартной реакционной смесью для измерения АТР-азной активности. Спектры КД снимали на приборе фирмы «Jouan» с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 0,1 см. Опытные растворы содержали 10 мМ трис-НСl буфер (рН 8,0), фермент 0,2 мг/мл, а также в отдельных экспериментах 5 мМ $MgSO_4$, 0,6 мМ ADP, 0,5 мМ АТР, 0,5 мМ ПХАУК и 2 мМ EDTA. Спектры КД, приведенные на рис. 3, получены вычитанием из экспериментального спектра фонового спектра раствора, содержащего все компоненты, за исключением АТР-азы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рэкер Е. (1967) Биоэнергетические механизмы, стр. 144—196, «Мир», М.
2. Senior A. E. (1973) *Biochemistry*, 12, 3622—3627.
3. Catterall W. A., Pedersen P. L. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7969—7976.
4. Hilborn D. A., Hammes G. G. (1973) *Biochemistry*, 12, 983—990.
5. Selwyn M. J. (1967) *Biochem. J.*, 105, 279—288.
6. Акпменко В. К., Минков И. Б., Випоградов А. Д. (1972) *Биохимия*, 37, 348—352.
7. Козлов И. А., Кононенко В. А. (1975) *Биоорганическая химия*, печатается в этом номере, стр. 489—493.

8. London W. P., Stock T. L. (1969) *Biochemistry*, 8, 1767—1779.
9. Кобляков В. А., Ягузинский Л. С., Ратникова Л. А., Хосни Ф. М. (1971) в сб.: Митохондрии, стр. 190—202, «Наука», М.
10. Акименко В. К., Митков И. Б., Виноградов А. Д. (1971) *Биохимия*, 36, 502—506.
11. Penefsky M. S. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 5789—5795.
12. Moore S., Stein W. H. (1963) *Methods Enzymol.*, 6, 819—830.
13. Hirs C. H. W. (1956) *J. Biol. Chem.*, 219, 611—619.
14. Tondre C., Hammes G. G. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 314, 245—249.
15. Knowles A., Penefsky M. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6617—6624.
16. Greenfield N., Fasman G. (1969) *Biochemistry*, 8, 4108—4116.
17. McCarty R. E., Fagan Z. (1973) *Biochemistry*, 12, 1503—1507.
18. Racker E., Horstman L. L. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2547—2554.
19. Nishimura M., Yto T., Chance (1962) *Biochim. et biophys. acta*, 59, 177—182.

Поступила в редакцию *
2.VIII.1974

THE INTERACTION OF SOLUBLE MITOCHONDRIAL ATPase WITH ADENINE NUCLEOTIDES

KOZLOV I. A., PROKHANOV O. A., YAGUZHINSKY L. S.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

The interaction of soluble mitochondrial ATPase with p-N; N'-di (chloroethyl)aminophenylacetic acid (I) in the presence of ADP, Mg-ADP, and Mg-ATP has been studied. It was shown that in the presence of Mg-ADP the rate of inactivation of ATPase by (I) increases. The results obtained lend support to the suggestion that two different hydrophobic regions and one polar region are present in the active site of ATPase. The hydrophobic regions participate in the interaction with the adenine ring of ADP and ATP, while the polar region determines the competition between the nucleotides. Binding of ADP at the non-catalytic site of ATPase leads to a change in the conformation of the enzyme, which was registered in the presence of (I) by CD method.

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия»; дата поступления — 13.V, 1974.