



УДК 577.152.361*34'13:577.352.332

Н⁺-АТФ-АЗА МИТОХОНДРИЙ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ СУБЪЕДИНИЦ СУБКОМПЛЕКСА F₀, КОНТАКТИРУЮЩИХ С ЛИПИДАМИ МЕМБРАНЫ

© 2002 г. Л. Г. Зайцева*, Т. В. Овчинникова*, Е. Л. Водовозова*, Юл. Г. Молотковский*, Н. Б. Поляков**, М. И. Титов*, С. Е. Есипов*, В. А. Гринкевич***

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоорганической химии, 119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 10.09.2001 г. Принята к печати 04.12.2001 г.

Для идентификации субъединиц мембранного сектора F₀ митохондриальной Н⁺-АТФ-азы сердца быка, контактирующих с липидами внутренней мембраны митохондрий, сконструированы протеолипосомы, содержащие активную Н⁺-АТФ-азу митохондрий и фотоактивируемые липиды: 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбониламино)-[12-¹⁴C]додеканоил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, 1-ацил-2-[11-([¹²⁵I]диазоидциклопентадиен-2-карбонилокси)ундеканоил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин или 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбониламино)додеканоил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, где ацил – смесь остатков пальмитиновой (70%) и стеариновой (30%) кислот. Анализ кросс-сшитых продуктов, полученных после облучения таких протеолипосом УФ-светом, показал, что с липидами мембраны контактируют субъединицы *c* и *a* мембранного сектора F₀. Идентификацию кросс-сшитых продуктов осуществляли методами SDS-ПААГ-электрофореза и MALDI-масс-спектрометрии.

Ключевые слова: Н⁺-АТФ-аза митохондрий; субъединицы мембранного сектора F₀; липиды фотоактивируемые; MALDI-масс-спектрометрия мембранных белков.

ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальная Н⁺-АТФ-аза (АТФ-синтетаза, F₁F₀-АТФ-аза или F₁F₀-комплекс, КФ 3.6.1.34) осуществляет сопряженный с переносом протонов синтез/гидролиз АТФ. Структурно и функционально этот мембраносвязанный комплекс может быть разделен на два субкомплекса: периферический (F₁ или F₁-АТФ-аза), несущий центры синтеза и гидролиза АТФ, и мембранный (F₀ или

мембранный сектор F₀), осуществляющий транс-мембранный перенос протонов. Каждый из этих субкомплексов имеет сложный полипептидный состав [1]. Наиболее изучена F₁-АТФ-аза митохондрий. С помощью рентгеноструктурного анализа была определена ее трехмерная структура [2]. Строение мембранного сектора F₀ исследовано в меньшей степени. В настоящее время считается, что F₀-субкомплекс митохондрий сердца быка может состоять, по крайней мере, из 10 субъединиц (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, OSCP, F₆ и A6L), стехиометрия и топография которых полностью не ясна.

В данной работе для идентификации субъединиц мембранного сектора F₀, контактирующих с липидами внутренней мембраны митохондрий, нами были использованы различные липофильные фотоактивируемые метки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы в качестве фотоактивируемого гидрофобного зонда был использован 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбонил-амино)-[12-¹⁴C]додеканоил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин ([¹⁴C]DCADP), содержащий в качестве ацильной группы остатки пальмитиновой (70%)

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; [¹⁴C]DCADP и [¹²⁵I]IDCOUP – 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбониламино)-[12-¹⁴C]додеканоил]- и 1-ацил-2-[11-([¹²⁵I]диазоидциклопентадиен-2-карбонилокси)ундеканоил]-производные *sn*-глицеро-3-фосфохолина, где ацил – смесь остатков пальмитиновой (70%) или стеариновой (30%) кислот; DHB – 2,5-дигидроксibenзойная кислота; MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) – матрично-активируемая лазерная десорбция-ионизация; OSCP – субъединица Н⁺-АТФ-азы митохондрий, придающая ферменту чувствительность к антибиотику олигомицину; PMSF – фенолметансульфонилфторид; PVDF-мембрана – поливинилидендифторидная мембрана; TEMED – *N,N,N,N*-тетраметилэтилендиамин; THAP – 2,4,6-тригидроксиацетофенон; [¹²⁵I]TID – 3-(трифторметил)-3-(*m*-[¹²⁵I]иодфенил)диазирин; трицин – *N*-[трис(гидроксиметил)метил]глицин.

Автор для переписки (тел.: (095) 939-12-68; эл. почта: grin@soil.msu.ru).

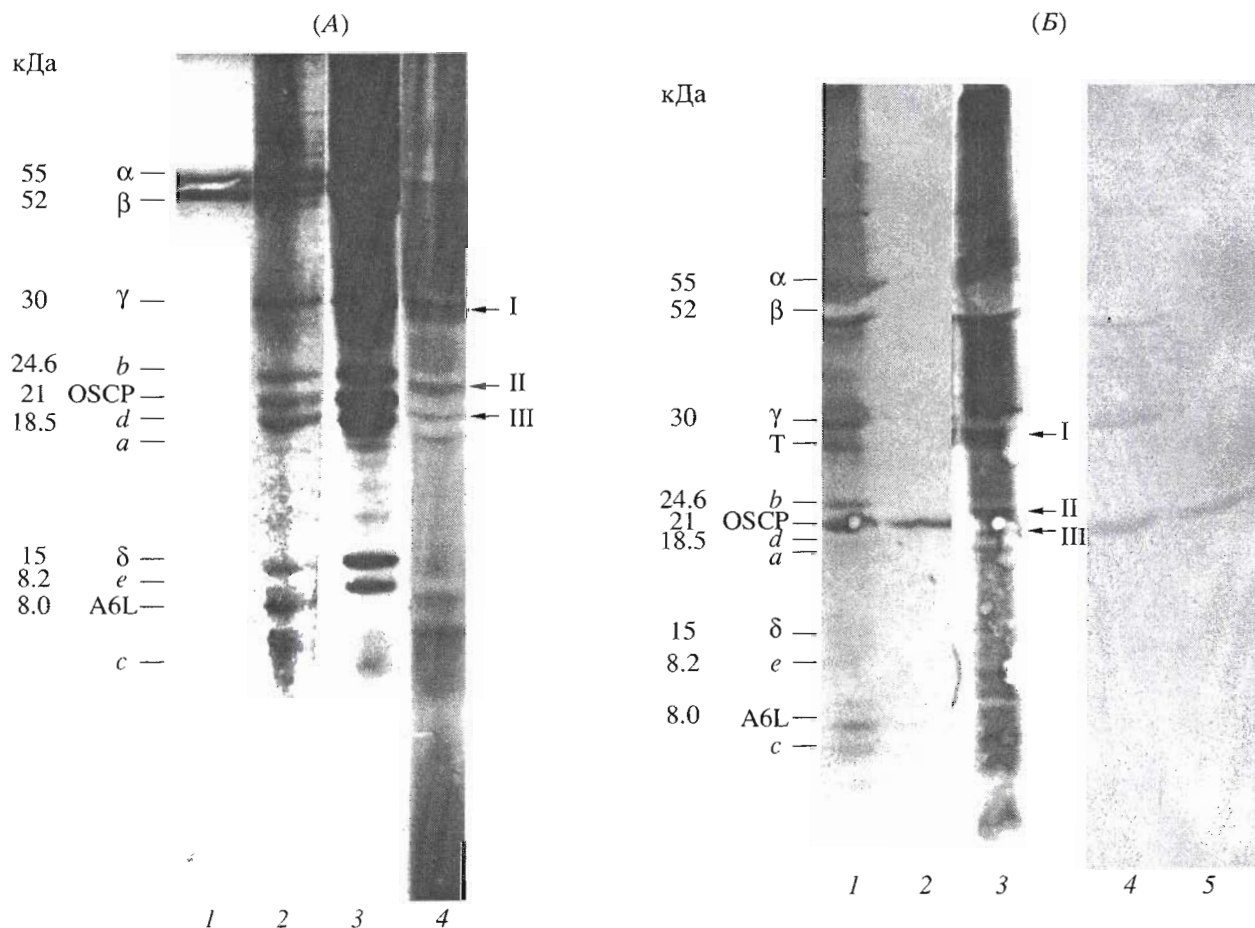


Рис. 1. Электрофорез в 15% SDS-ПААГ белкового продукта (см. “Эксперимент. часть”), полученного после делипидизации предварительно облученных УФ-светом протеолипосом, содержащих H^+ -АТФ-азу митохондрий сердца быка и [^{14}C]DCADP: ПААГ (А) с последующим переносом на PVDF-мембрану (Б1–Б3) или нитроцеллюлозу (Б4, Б5). α -, β -Субъединицы F_1 -АТФ-азы (А1), компоненты белкового продукта (А2) и (Б1), а также OSCP (Б2) – окрашены кумаси R-250. Окраска белковых компонент серебром – дорожка А3. Дорожки А4 и Б3 – соответствующие автордиограммы дорожек А2 и Б1. Иммунологическое тестирование компонентов белкового продукта поликлональными антителами: анти-OSCP – дорожка Б5, смесью (анти- γ + анти-OSCP) – дорожка Б4. Т – ADP/АТФ-транслокатор. I–III – полосы, предположительно соответствующие модифицированным субъединицам γ , OSCP и d, соответственно.

или стеариновой (30%) кислот. Зонд был синтезирован нами согласно разработанным ранее методикам [3, 4]. Известно, что при облучении фотореактивных липидов такого типа УФ-светом их диазоциклопентадиеновая группа генерирует карбен, отличающийся значительно большей активностью, чем ароматические нитрены (которые образуются при фотоактивации обычно применяемых фенилазидных меток) и, вследствие этого, способный внедряться с заметным выходом в неактивируемые связи C–H [5]. Высокая реакционная способность генерированного карбена определяет его малую избирательность по отношению к соседним молекулам, что повышает результативность анализа ближайших соседей липидных зондов такого типа.

Выделенный из митохондрий сердца быка F_1F_0 -комплекс встраивали в липосомы, содержа-

щие наряду с другими липидами [^{14}C]DCADP, а затем полученные протеолипосомы облучали светом ртутной лампы ($\lambda \geq 330$ нм) для активации кросс-сшивания липидного зонда с субъединицами мембранного сектора F_0 (см. “Эксперимент. часть”). Поскольку прямой автордиографический анализ кросс-сшитых липид-белковых продуктов в таких протеолипосомах был невозможен из-за присутствия больших количеств радиоактивных примесей (зонда и кросс-сшитых липид-липидных продуктов), протеолипосомы перед SDS-электрофорезом делипидизировали. Полосы SDS-ПААГ-электрофореграмм, содержащие белковые компоненты, анализировали на наличие радиационной активности либо на сцинтилляционном счетчике Mark II (Chicago Nuclear, США) (соответствующие гистограммы не приводятся), либо с помощью автордиографии (рис. 1). Результаты

гистограмм и соответствующих автордиограмм не противоречили друг другу.

На рис. 1 (А, 4; Б, 3) приведены типичные автордиограммы, полученные после облучения УФ-светом протеолипосом, содержащих [¹⁴C]DCADP, их делипидизации и последующего разделения белкового продукта SDS-ПААГ-электрофорезом. Так как ковалентное присоединение [¹⁴C]DCADP к любой из субъединиц мембранного сектора F₀ должно увеличивать массу модифицированной субъединицы примерно на 800 Да, то из рисунка следовало, что с липидами вероятно контактируют трансмембранные *a*- и *c*-субъединицы, а также, возможно, А6L. Кроме того, согласно этой логике, модификации могут подвергаться также субъединицы γ , OSCP и *d* (полосы I–III соответственно). Однако последнее предположение находится в противоречии с наиболее популярными моделями строения Н⁺-АТФ-азы [6, 7], согласно которым субъединицы γ , *d* и OSCP непосредственных контактов с липидами не имеют.

Расхождение полученных нами результатов и литературных данных можно объяснить, если предположить, что ковалентное присоединение [¹⁴C]DCADP непредсказуемо влияло на изменение электрофоретической подвижности меченой субъединицы, так как изменялась не только ее молекулярная масса (всегда увеличивалась), но и степень гидрофобности, которая при мечении могла увеличиваться, оставаться постоянной или даже уменьшаться. Для проверки этого предположения в качестве липофильной метки был использован фотоактивируемый реагент 3-(трифторметил)-3-(*m*-[¹²⁵I]иодфенил)диазириин ([¹²⁵I]TID), имеющий меньшую молекулярную массу и, согласно литературным данным [8], практически не изменяющий электрофоретическую подвижность субъединицы при ее модификации.

Из рис. 2 видно, что основное включение метки приходилось на субъединицу *a* и низкомолекулярные полипептиды – *c* и, вероятно, А6L. В значительно меньшей степени метилась субъединица *b*. Таким образом, кажущаяся модификация *d*-субъединицы и OSCP липидом [¹⁴C]DCADP, наблюдаемая нами (рис. 1, А), вероятнее всего, может объясняться изменением электрофоретической подвижности модифицированных этим реагентом *a*- или *b*-субъединиц. Кроме того, так как при получении соответствующих протеолипосом использовались относительно большие количества [¹⁴C]DCADP, не исключена множественная модификация этих субъединиц, увеличивающая гетерогенность образовавшихся кросс-сшитых (фосфолипиды–белок) продуктов.

В связи с вышеизложенным по ранее предложенным методикам [3, 4] нами был синтезирован другой фотоактивируемый гидрофобный зонд 1-ацил-2-[11-(¹²⁵I)диазоидциклопентадиен-2-кар-

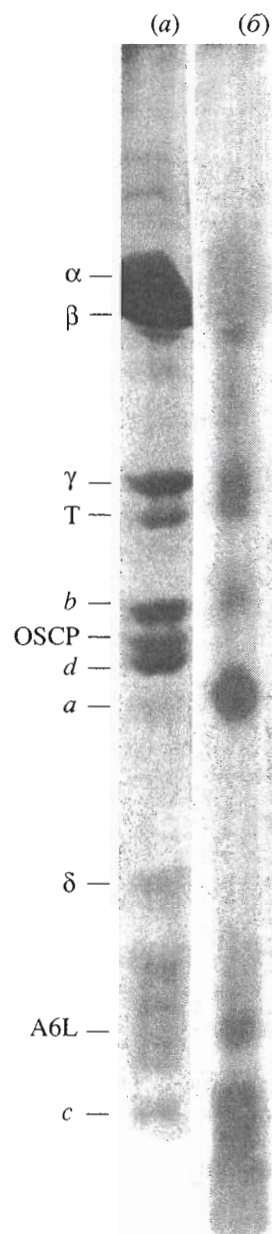


Рис. 2. Электрофорез в 15% SDS-ПААГ Н⁺-АТФ-азы митохондрий сердца быка, модифицированной [¹²⁵I]TID. Окраска кумасси R-250 (а), автордиография (б). Т – ADP/АТФ-транслокатор.

бонилокси)ундеканоил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин ([¹²⁵I]IDCOUP). Этот липид обладал значительно большей удельной радиоактивностью, чем [¹⁴C]DCADP (см. “Эксперимент. часть”) и, следовательно, его содержание в протеолипосомах можно было понизить примерно на 2–3 порядка, уверенно идентифицируя при этом на автордиограммах полосы радиоактивных кросс-сшитых липид-белковых продуктов, образующихся при модификации митохондриальной Н⁺-АТФ-азы. Это позволяло в значительной степени

уменьшить вероятность множественной модификации субъединиц фермента и, следовательно, уменьшить степень гетерогенности образующихся при такой модификации кросс-сшитых продуктов.

Были получены протеолипосомы, содержащие F_1F_0 -комплекс и $[^{125}\text{I}]\text{IDCOUP}$ и облучены УФ-светом (см. "Эксперимент. часть"). Результаты этого эксперимента оказались сходными с данными по модификации с помощью $[^{14}\text{C}]\text{DCADP}$, за исключением того, что включение метки в белок, соответствующий полосе I (рис. 1), было значительно меньше (автордиограмма не приводится). Следует отметить, что степень этого включения и в случае протеолипосом с $[^{14}\text{C}]\text{DCADP}$ также не была постоянна и варьировала для разных препаратов выделяемого F_1F_0 -комплекса.

Нами были проведены также эксперименты по идентификации модифицированных $[^{14}\text{C}]\text{DCADP}$ субъединиц с помощью поликлональных антител. Были получены поликлональные антитела против OSCP и α -, β -, γ -субъединиц H^+ -АТФ-азы митохондрий сердца быка, но, к сожалению, нам не удалось получить поликлональные антитела против остальных субъединиц мембранного сектора F_0 . Однако результаты иммуноблотинга (анти-OSCP и смесь (анти-OSCP + анти- γ), рис. 1, дорожки B5, B4, соответственно) ясно показали, что фотоактивируемые липиды не могли модифицировать OSCP и γ -субъединицу. Позже было установлено, что полоса I соответствует модифицированному АТФ/АДП-транслокатору, который в небольших количествах часто присутствовал в выделяемых нами препаратах F_1F_0 -комплекса.

На данном этапе нами не были идентифицированы с помощью SDS-электрофореза в ПААГ также те субъединицы, которые при делипидизации протеолипосом смесью хлороформ-метанол экстрагировались вместе с липидами в органическую фазу.

Неоднозначность полученных результатов при анализе модифицированных субъединиц сектора F_0 , меченных $[^{14}\text{C}]\text{DCADP}$ либо $[^{125}\text{I}]\text{IDCOUP}$, электрофоретическим методом заставила нас использовать для решения данной задачи метод масс-спектрометрии MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). Этот метод не требовал предварительного разделения F_1F_0 -комплекса на отдельные субъединицы, и, на первый взгляд, как будто позволяя идентифицировать молекулярные ионы кросс-сшитых фосфолипид-белковых продуктов практически для всех субъединиц H^+ -АТФ-азы митохондрий. Однако метод MALDI в свою очередь накладывает определенные требования к подготовке анализируемого образца: исследуемое вещество необходимо очищать от солей и детергентов, мешающих процессу кристаллизации образца в присутствии матрицы.

Так как метод MALDI-масс-спектрометрии до сих пор не использовался для анализа состава полисубъединичных мембранных белковых комплексов и липид-белковых кросс-сшитых продуктов, то вначале нами были разработаны условия подготовки образцов H^+ -АТФ-азы митохондрий и снятия масс-спектров, позволяющие идентифицировать максимальное число субъединиц этого фермента. Было показано, что наиболее подходящей матрицей для этой цели является 2,5-дигидроксibenзойная кислота (ДНВ) и растворение F_1F_0 -комплекса в 75% муравьиной кислоте.

В качестве фотоактивируемого липидного зонда был использован нерадиоактивный фосфолипид – 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбониламино)додеканоил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DCADP), где ацил – 70% пальмитоила (зонд Z1) и 30% стеароила (зонд Z2). Таким образом, DCADP, по сути, является смесью двух зондов Z1 и Z2 в соотношении 7 : 3.

Чистота и строение DCADP, наряду с обычными методами, были подтверждены также методом MALDI-масс-спектрометрии (рис. 3). В масс-спектре DCADP присутствовали пики с m/z 812.5 (Z1) и m/z 841 (Z2), подтверждающие наличие в анализируемом препарате фотоактивируемых фосфолипидов. Условия съемки данного масс-спектра позволили предположить возможность образования активных форм фотоактивируемого зонда. Образование активных карбенов подтверждается наличием в спектре пика с m/z 784.5 (Z1-28). Дополнительным подтверждением фактов отрыва диазогруппы от зондов в процессе съемки спектра служит присутствие в спектре пиков с m/z 937.2 и m/z 964.7, соответствующих продуктам взаимодействия радикалов (Z1-28) и (Z2-28) с веществом матрицы – 2,4,6-тригидроксиацетофеноном (M 168). Пики с m/z 802 и m/z 832 соответствуют молекулярным ионам Z1 и Z2 соответственно, у которых диазогруппа замещена на гидроксильную, то есть продуктам взаимодействия этих зондов с водой. Пик с m/z 859 идентифицирован как соответствующий кластерному иону $[\text{Z2} + \text{NH}_4]^+$.

Затем были подобраны условия получения MALDI-масс-спектров F_1F_0 -комплекса до встраивания его в протеолипосомы (стандарты 1 и 2). На рис. 4 приведены MALDI-масс-спектры F_1F_0 -комплекса, выделенного по методу Серрано [9] (стандарт 1), и того же комплекса, подвергнутого дополнительной очистке с помощью трехкратного повторения последней стадии высаливания сульфатом аммония (стандарт 2). Как видно из рисунка, во втором случае был получен значительно более чистый F_1F_0 -комплекс. Однако и он сохранял небольшое количество примеси АТФ/АДП-транслокатора. В качестве стандарта в дальнейшем использовали как стандарт 1, так и

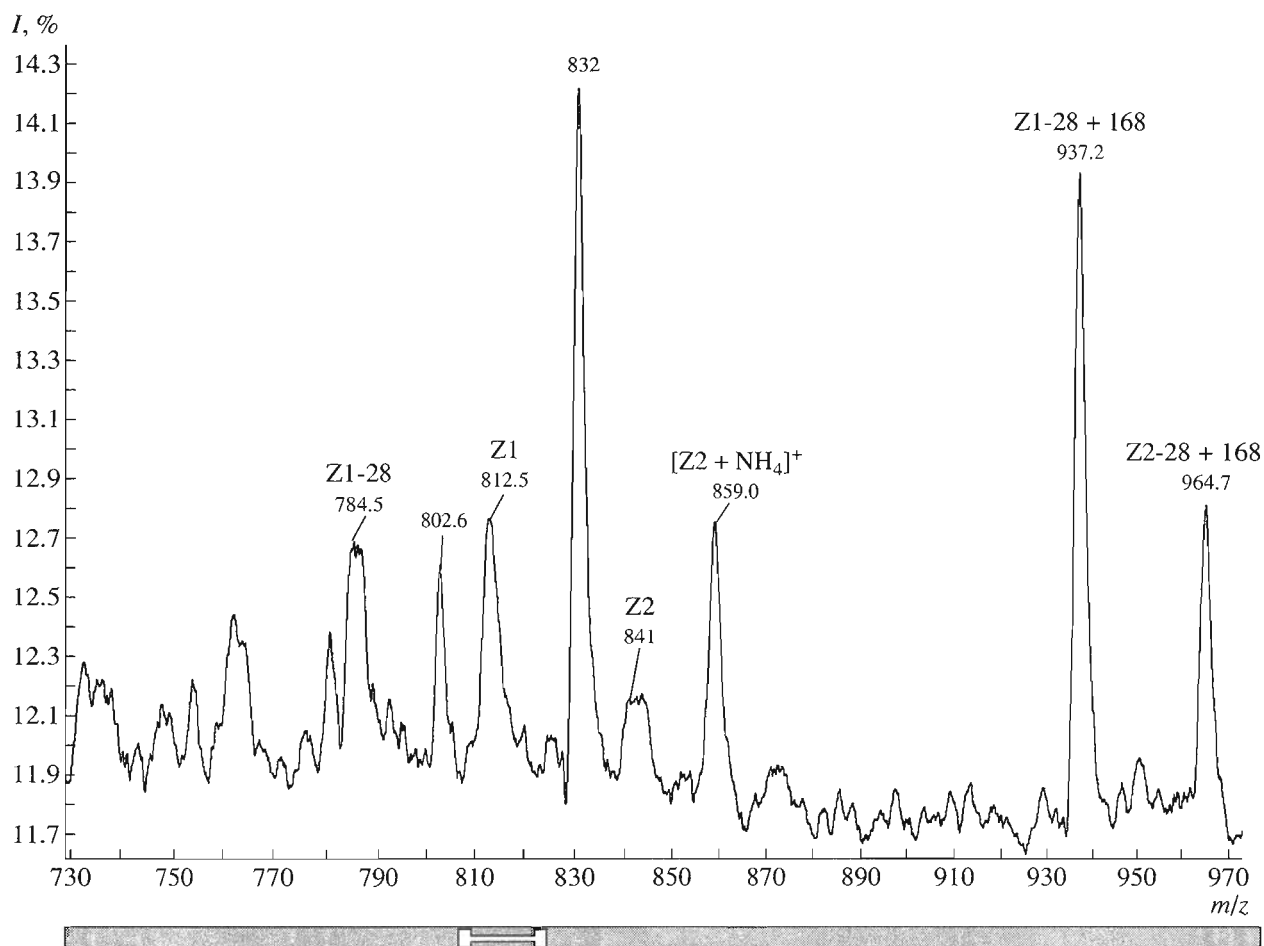


Рис. 3. MALDI-масс-спектр DCADP в метаноле. Ацильная группа представлена на 70% пальмитилом (Z1) и 30% стеарилолом (Z2). Мощность лазера 61%, число лазерных ударов 97.

стандарт 2. Следует отметить, что оба комплекса образовывали протеолипосомы с одинаковым белковым составом (соответствующие масс-спектры не приводятся). Это означает, что белковые примеси, за исключением АТФ/АДП-транслокатора, в протеолипосомы практически не встраивались, поэтому для получения протеолипосом часто использовался F₁F₀-комплекс, полученный по методу Серрано, без дополнительной очистки.

В MALDI-масс-спектрах стандартов (рис. 4) присутствовали пики молекулярных ионов, соответствующие практически всем субъединицам, входящим в состав F₁F₀-комплекса (рис. 4А, Б; таблица). Кроме того, некоторые субъединицы в условиях получения данного масс-спектра образуют двузарядные (α - и β -субъединицы) и трехзарядные (β -субъединица) ионы. Как видно из спектра на рис. 4Б, разрешающая способность прибора не позволяет зафиксировать субъединицу *a*. Молекулярная масса этой субъединицы, с учетом N-формилирования α -аминогруппы, составляет 24815 Да [10]. Пик, соответствующий этой субъединице, попадает в область между пиком, соот-

ветствующим субъединице *b* (*M* 24668 Да [10, 14, 16]) и пиком с *m/z* 25782, который соответствует двузарядному иону [β]²⁺ (на масс-спектре стандарта 2 (рис. 4Б, положение молекулярного иона [*a*]⁺ указано стрелкой). В случае менее очищенного F₁F₀-комплекса (рис. 4А) пики, соотношенные молекулярным ионам субъединиц *a* и *b*, не разрешаются совсем, давая усредненный пик с *m/z* 24765. Пики с *m/z* 12380 и 12382 (таблица, А, Б) были идентифицированы как смесь двузарядных ионов субъединицы *a* и субъединицы *b*. Пики с *m/z* 17253 и 17210 соответствуют, по нашему мнению, трехзарядному иону β -субъединицы. Разница значений *m/z* обоих пиков и их отличие от расчетного для [β]³⁺ значения *m/z*, равного 17188, может объясняться не только относительной ошибкой измерения в 0.5%, но и тем, что заряд +3 может придаваться β -субъединице как за счет сорбции трех протонов, так и ионов Na⁺, K⁺, NH₄⁺ или H₃O⁺. То же касается и других значений *m/z* в таблице.

Субъединица *c* (*m/z* 7649 и 7636, рис. 4А, Б; таблица) имеет массу на 41 и 28 единиц большую,

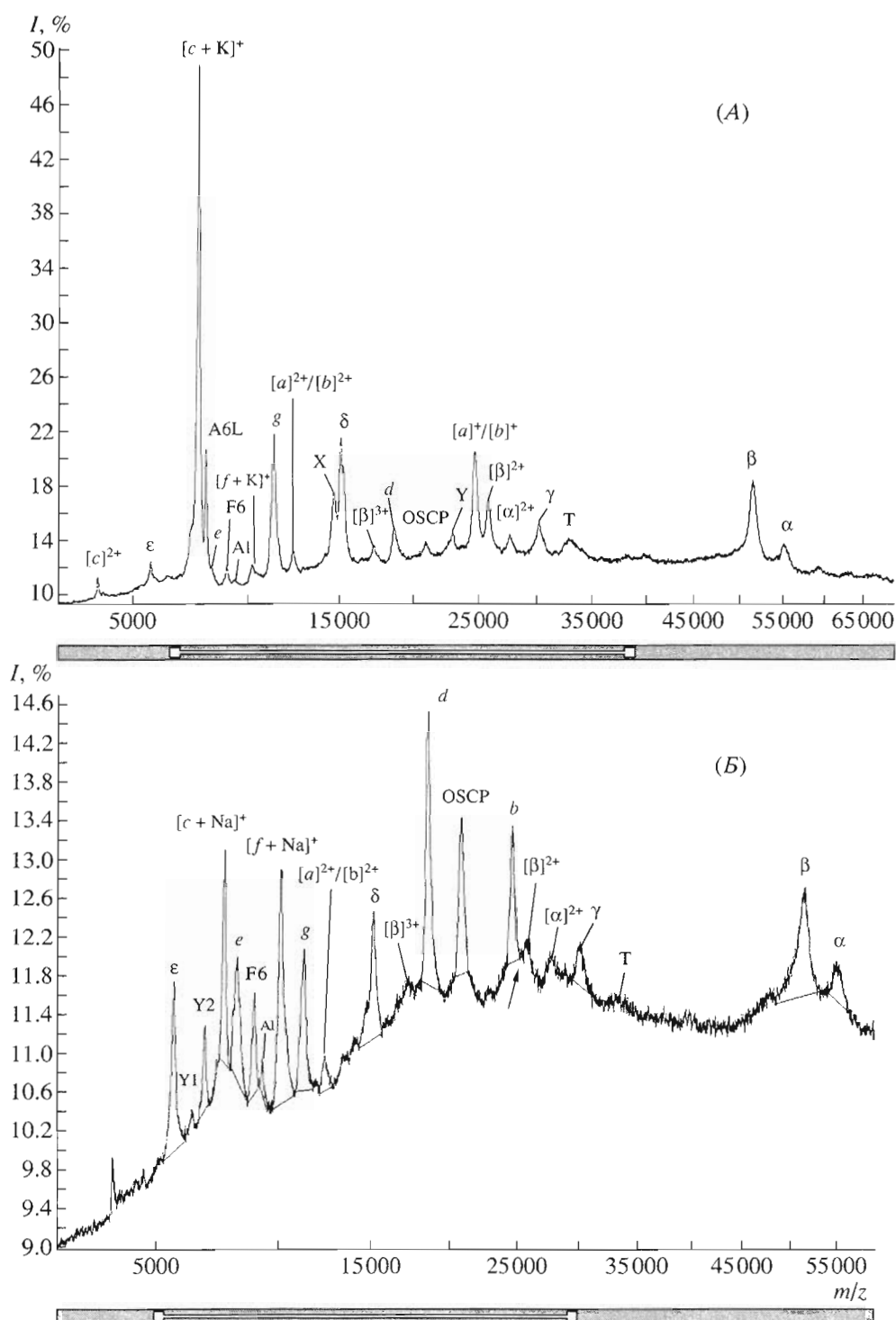


Рис. 4. MALDI-масс-спектры стандартов: F_1F_0 -комплекс, полученный по методу [6] (А, стандарт 1), тот же комплекс, дополнительно подвергнутый трехкратному переосаждению сульфатом аммония (Б, стандарт 2). Стандарты растворены в 75% HCOOH . Мощность лазера 75% (А) и 60% (Б), число лазерных ударов 145 (А) и 60 (Б). Местоположение пика молекулярного иона $[a]^+$ в масс-спектре стандарта 2 указано стрелкой.

чем это следует из данных по ее аминокислотной последовательности. Ранее было высказано предположение [17], что субъединица *c* подвергается посттрансляционной модификации, ацетилирова-

нию [17] или триметилированию [18] одного из остатков Lys, так как, согласно данным масс-спектрометрии ESI (electrospray ionization), эта субъединица имела массу на 42 единицы большую,

Идентификация пиков в масс-спектрах стандартов (рис. 4А, Б) А – стандарт 1, Б – стандарт 2

А

Обозначение пика	<i>m/z</i>	<i>M_r</i>	Источник	Обозначение пика	<i>m/z</i>	<i>M_r</i>	Источник	Обозначение пика	<i>m/z</i>	<i>M_r</i>	Источник
[c] ²⁺	3834	–	–	g	11344	11328	[10]	[a] ⁺ /[b] ⁺	24765		
ε	5662	5651	[11]	[a] ²⁺ /[b] ²⁺	12360			[β] ²⁺	25851		
[c + K] ⁺	7649	7608	[10]	X	14701			[α] ²⁺	27685		
A6L	7975	7964	[10]	δ	15129	15065	[11]	γ	30194	30141	[11]
e	8233	8189	[10]	[β] ³⁺	17253			T	33155	32836	Swiss-Prot
F6	8972	8958	[12]	d	18626	18603	[14]	β	51622	51595	[11]
Al	9328	9582	[13]	OSCP	20947	20967	[15]	α	55203	55161	[11]
[f + K] ⁺	10267	10209	[10]	Y	22895						

Б

Обозначение пика	<i>m/z</i>	<i>M_r</i>	Источник	Обозначение пика	<i>m/z</i>	<i>M_r</i>	Источник	Обозначение пика	<i>m/z</i>	<i>M_r</i>	Источник
[c] ²⁺	3834			Al	9311	9582	[13]	OSCP	20947	20967	[15]
ε	5662	5651	[11]	[f + Na] ⁺	10236	10209	[10]	b	24667	24668	[16]
Y1	6327			g	11344	11328	[10]	a	24887	24815	[10]
Y2	6819			[a] ²⁺ /[b] ²⁺	12382			[β] ²⁺	25834		
[c + Na] ⁺	7636	7608	[10]	δ	15092	15065	[11]	[α] ²⁺	27747		
e	8187	8189	[10]	[β] ³⁺	17210			γ	30126	30141	[11]
F6	8957	8958	[12]	d	18594	18603	[14]	β	51622	51595	[11]
								α	55203	55161	[11]

чем расчетная. Однако попытки локализовать остаток Lys, у которого модифицирована ε-аминогруппа, не дали однозначных результатов. В одном случае он был определен предположительно как Lys43 [19], в другом предполагалось, что таким модифицированным остатком может быть Lys7 или даже N-концевой остаток Asp [20].

Мы полагаем, что увеличенная молекулярная масса c-субъединицы обусловлена не посттрансляционной модификацией, а тем, что эта субъединица может присутствовать в масс-спектрах как в виде молекулярного иона [c]⁺, так и в виде кластерных ионов с катионами калия или натрия ([c + K]⁺ или [c + Na]⁺). На возможность образования подобных кластерных ионов указывает и Д. Гриффитс (персональное сообщение).

Также следует отметить, что в зависимости от условий снятия масс-спектров (мощность лазера, количество выстрелов) и от качества используемого F₁F₀-комплекса можно было идентифицировать либо субъединицы c (кластерный ион [c + Na]⁺) и e (*m/z* 7636 и 8187; таблица, рис. 4Б), либо c (кластерный ион [c + K]⁺) и A6L (*m/z* 7649 и 7975; таблица, рис. 4А), но не c, A6L и e вместе.

При соотношении масс-спектров одного из стандартов и изолированного F₁-комплекса (рис. 5) был сделан вывод о том, что пик молекулярного иона X с *m/z* 14701, по всей видимости, соответствует продукту распада δ-субъединицы (пик с *m/z* 15064). Из работы [21] известно, что δ-субъединица может иметь так называемую “растрепанную” N-концевую последовательность, то есть у части молекул этой субъединицы могут быть отщеплены от одного до нескольких аминокислотных остатков с N-конца полипептидной цепи. Кроме того, рис. 5 подтверждает правильность соотношения пиков, соответствующих ионам [α]²⁺, [β]²⁺ и [β]³⁺ в MALDI-масс-спектрах стандартов.

В последующем все получаемые масс-спектры препаратов митохондриальной H⁺-АТФ-азы сравнивались со спектрами стандартов. Анализ полученных масс-спектров показал, что относительная ошибка определения масс субъединиц по соответствующему им массовому числу (*m/z*) для M 10–56 кДа была около 0.5%.

Затем F₁F₀-комплекс встраивали в липосомы. Протеолипосомы получали двух типов: тип I содержал встроенный F₁F₀-комплекс и смесь липидов, состоящую из димиристоилфосфатидилхо-

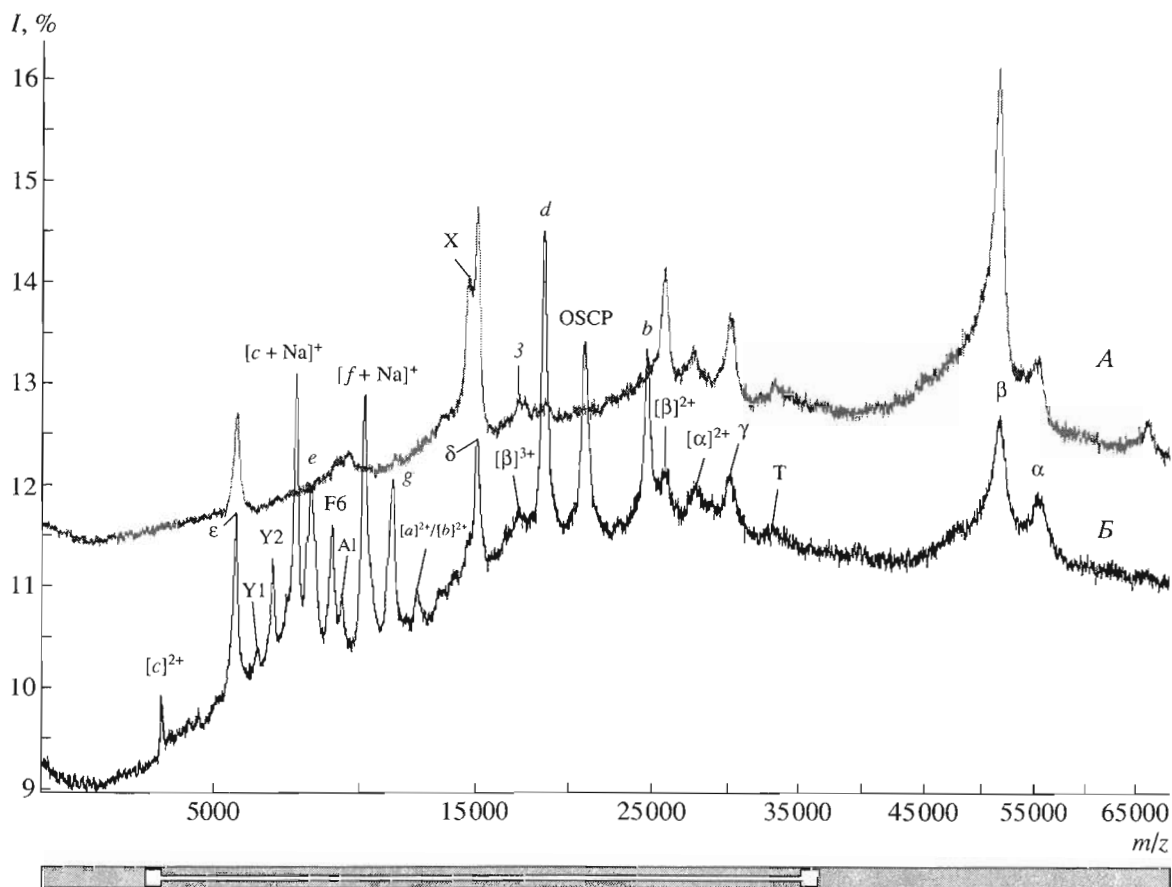


Рис. 5. MALDI-масс-спектрометрический анализ F_1 -АТФ-азы митохондрий сердца быка (А) и стандарта 2 (Б). Мощность лазера 60%, число лазерных ударов 160.

лина и 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (1 : 1); тип II имел тот же состав плюс DCADP. Содержание фотоактивируемого зонда не превышало 10% общего содержания липидов.

Качество полученных протеолипосом и их размер проверяли с помощью электронной микроскопии, кроме того, измеряли АТФ-азную активность встроенных в протеолипосомы H^+ -АТФ-аз (данные не приводятся).

После облучения протеолипосом типа I и II УФ-светом оба образца протеолипосом делипидизировали смесью хлороформ-метанол (1 : 2). Собирали отдельно белковый осадок, водную и хлороформ-метанольную фракции, лиофильно высушивали, а затем перерастворяли их в 75% $HCOOH$, обессоливали с помощью гель-хроматографии и анализировали, используя MALDI-масс-спектрометрию (см. "Эксперимент. часть").

В масс-спектре белкового осадка протеолипосом типа I (немодифицированная H^+ -АТФ-аза, рис. 6) были идентифицированы пики, соответствующие молекулярным ионам следующих субъединиц фермента: ϵ , f , g , δ , d , OSCP, γ , β и α . Не наблюдалось разделения пиков молекулярных ионов

субъединиц a и b , а пик c m/z около 12400 может соответствовать, по нашему мнению, двум неразрешенным пикам, соответствующим двузарядным ионам a - и b -субъединиц. Субъединицы c и f в масс-спектре присутствовали в виде кластерных ионов $[M + K]^+$. При сравнении масс-спектров стандарта и фракции белкового осадка после делипидизации отмечено отсутствие в последнем пика с m/z 8964, соответствующего молекулярному иону субъединицы F_6 и значительное уменьшение относительного содержания субъединицы c . Во встроенной в протеолипосомы H^+ -АТФ-азе (рис. 6Б) отсутствовала также и основная белковая примесь стандарта I – неидентифицированный белок Y.

Согласно MALDI-масс-спектрометрическому анализу, водная фракция содержала в основном фактор F_6 (соответствующий масс-спектр не приводится). В масс-спектре хлороформ-метанольной фракции (рис. 7) идентифицированы пики, соответствующие молекулярному (m/z 24825) и двузарядному (m/z 12416) ионам a -субъединицы, c -субъединица в данном масс-спектре образовывала кластерный ион $[c + K]^+$ (m/z 7650) и двузарядный ион $[c + 2K]^{2+}$ (m/z 3838). Таким образом,

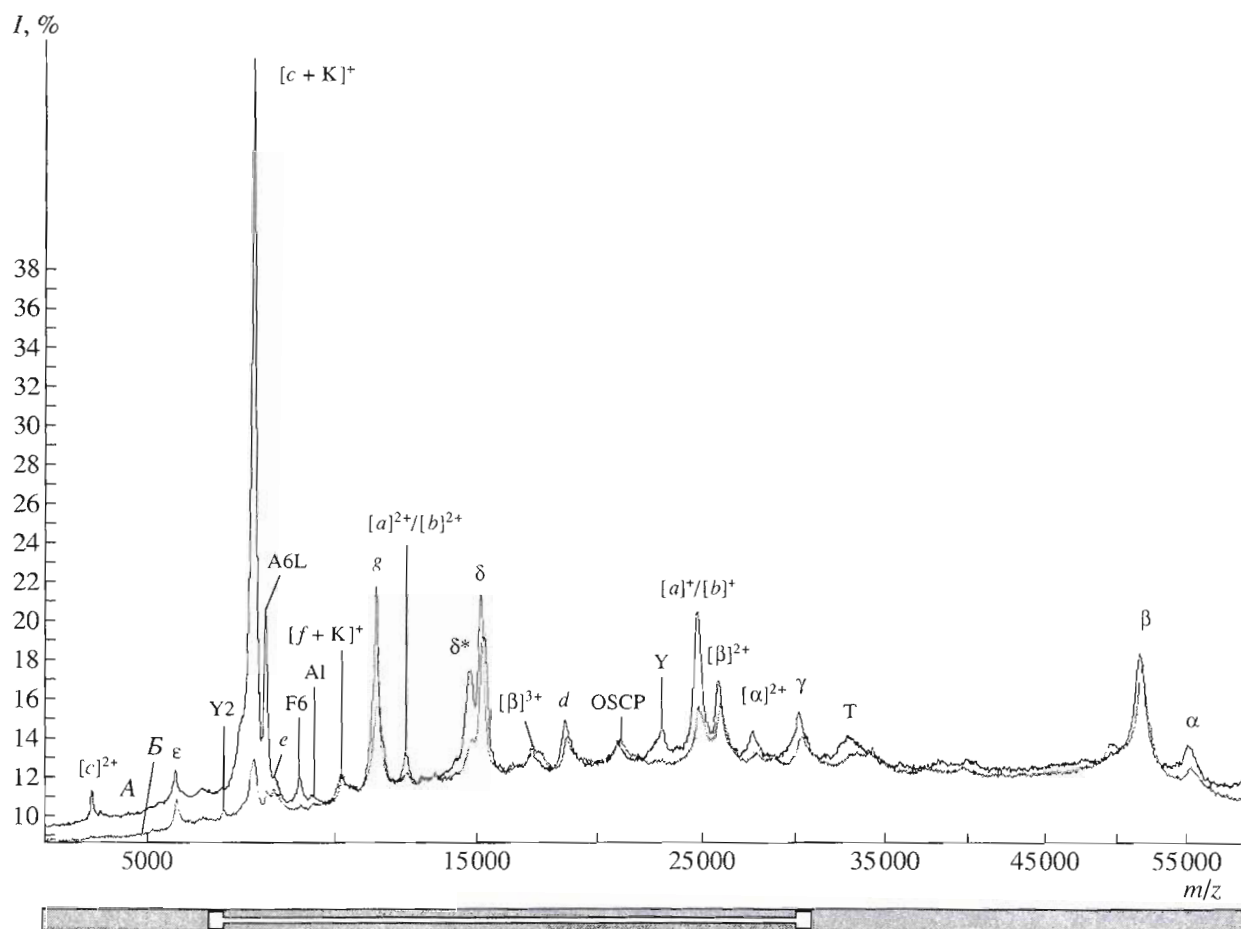


Рис. 6. MALDI-масс-спектрометрический анализ белкового осадка немодифицированной H⁺-АТФ-азы митохондрий сердца быка в составе протеолипосом типа I (Б) и стандарта I (А). Мощность лазера 75%, число лазерных ударов 160. δ* – субъединица δ с "растрепанной" N-концевой последовательностью.

MALDI-масс-спектрометрический анализ показал, что при делипидизации протеолипосом смесью хлороформ–метанол (1 : 2) по выбранной нами методике происходит не только разрушение протеолипосом, но и распределение отдельных субъединиц F₁F₀-комплекса между водной и органической фазами, а также белковым осадком. Вводной фазе остается практически только фактор F₆, в хлороформ–метанольную фазу вместе с фосфолипидами экстрагируется в значительной мере протеолипид и некоторое количество субъединицы *a*. Остальные субъединицы выпадают в осадок, концентрирующийся на границе раздела водной и органической фаз.

Для анализа модифицированного фермента был использован F₁F₀-комплекс, встроенный в липосомы типа II. В масс-спектре фракции белкового осадка модифицированного фермента (рис. 8Б) присутствует полный набор пиков, характерных для аналогичной фракции немодифицированной H⁺-АТФ-азы – это пики, соответствующие молекулярным ионам следующих субъединиц: ε, *f*, *g*, δ, *d*, OSCP, γ, β и α. β-Субъединица в данном масс-

спектре фиксируется также в виде двузарядного и трехзарядного ионов. Субъединица *c* в масс-спектре присутствует в виде кластерного иона состава [c + Na]⁺.

Наряду с пиками, описанными выше, в масс-спектре белкового осадка модифицированного фермента отмечено появление новых пиков, которые отсутствовали в контрольных экспериментах с немодифицированным ферментом (рис. 7Б). Так, появление пика с *m/z* 8297 можно объяснить присоединением одной молекулы липида Z1 или Z2 к *c*-субъединице (*m/z* 7608). Следует, однако, отметить, что наблюдаемое приращение массы при такой модификации составляет примерно 640 Да, а не 785 или 813, ожидаемое исходя из химических формул этих зондов. Мы предполагаем, что в растворе 75% HCOOH, который используется для приготовления образцов для MALDI-масс-спектрометрии, происходит гидролиз фосфоэфирной связи и липид теряет остаток фосфохолина (теряемая масса составляет 168 Да). Масса образующегося ковалентно связанного с протеолипидом диглицерида в случае Z1 составляет 616, а в случае

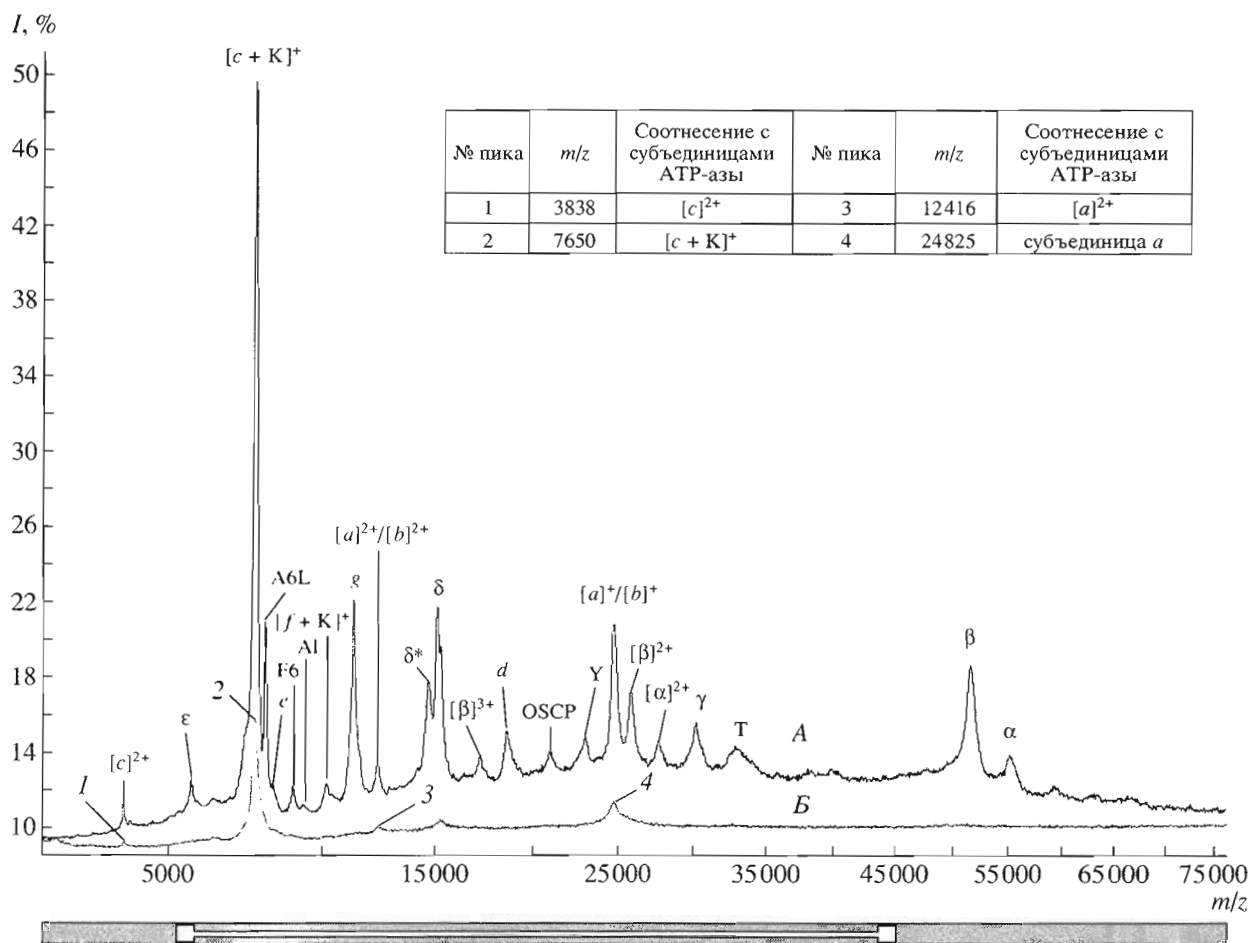


Рис. 7. MALDI-масс-спектрометрический анализ хлороформ-метанольной фракции немодифицированной H^+ -АТФ-азы митохондрий сердца быка в составе протеолипосом типа I (Б); хлороформ-метанольная фракция и стандарта I (А). Мощность лазера 80%, число лазерных ударов 139.

Z2 – 645 Да, что с учетом ошибки измерения хорошо согласуется с полученным результатом.

Наблюдаемая модификация *c*-субъединицы является доказательством непосредственного контакта этого олигомера в составе мембранного сектора F_0 с липидным бислоем. Появление ряда плохо разрешенных пиков (m/z 13348 для наиболее выраженного), а также отсутствие пика, который, по нашему мнению, может соответствовать двузарядному иону как субъединицы *a*, так и субъединицы *b* (рис. 8А) позволило сделать предположение о множественной модификации фотореактивным липидным зондом DCADP этих субъединиц H^+ -АТФ-азы и, следовательно, о их возможном непосредственном контакте с липидами мембраны.

Принимая во внимание то, что в масс-спектре хлороформ-метанольной фракции модифицированной H^+ -АТФ-азы (рис. 9А) не были идентифицированы пики, соответствующие молекулярному и двузарядному ионам *a*-субъединицы (*b*-субъединица не экстрагируется смесью хлороформ-мета-

нол), можно сделать вывод, что *a*-субъединица промодифицировалась практически полностью. Наличие пика 4 с m/z 13701 (рис. 9А) и пика 3 с m/z 13348 (рис. 8Б) подтверждает вывод о множественной модификации *a*-субъединицы.

Субъединица *c* в данном масс-спектре образует кластерный ион [*c* + *K*]⁺ (m/z 7650). Кроме того, в масс-спектре хлороформ-метанольной фракции модифицированного фермента (рис. 9А) появились пики, которые отсутствовали в MALDI-масс-спектрах стандартов (рис. 4) и этой же фракции немодифицированного фермента (рис. 9Б). Наличие пика с m/z 8302 можно объяснить присоединением одной, а пика с m/z 8959 – двух молекул фотореактивного зонда DCADP к субъединице *c* (рис. 9А, пики 2 и 3, о потере остатков фосфохолина см. выше). Пик 4, по нашему мнению, соответствует двузарядному иону модифицированной *a*-субъединицы. Учитывая результаты, приведенные на рис. 8 и 9, следует также отметить, что немодифицированными оставалось около 15% все-

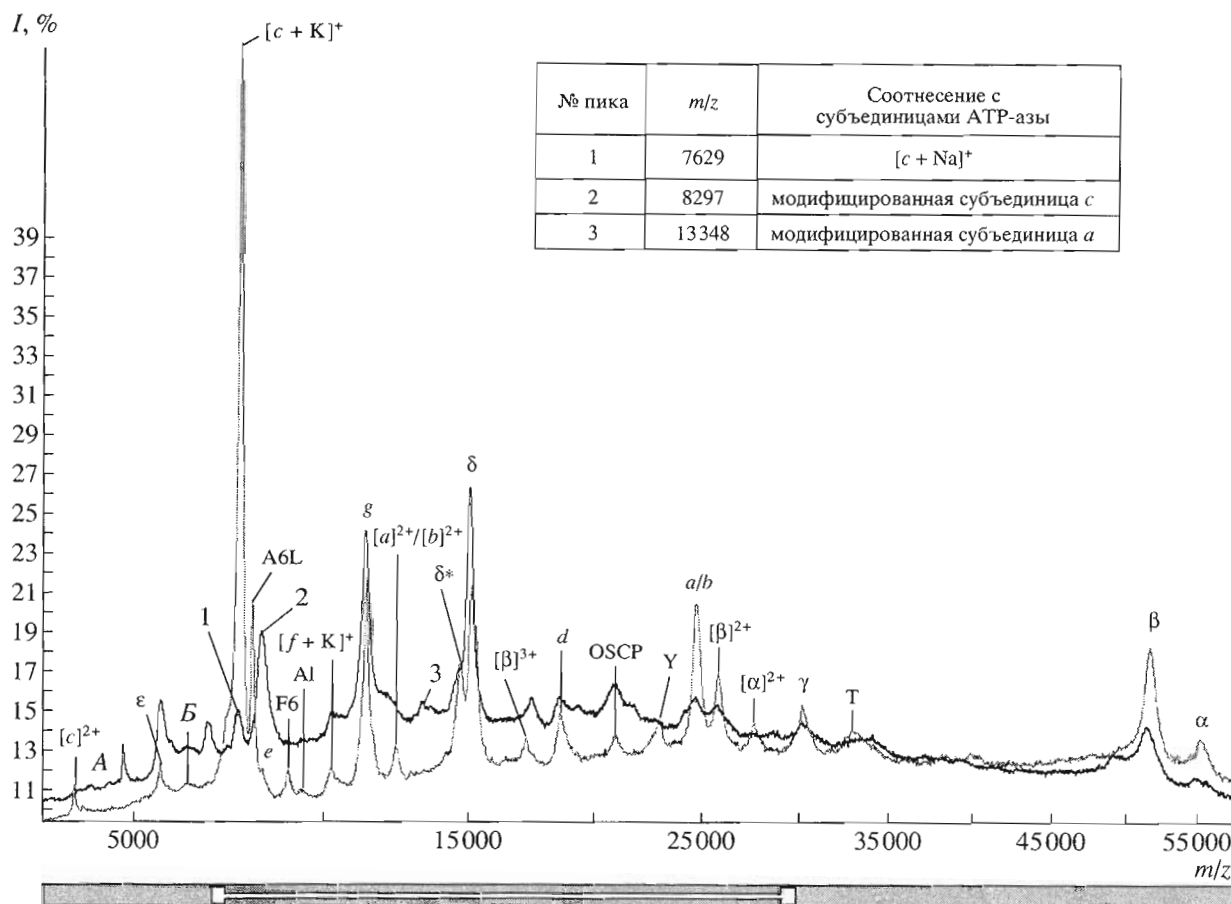


Рис. 8. MALDI-масс-спектрометрический анализ белкового осадка модифицированной H⁺-АТФ-азы митохондрий сердца быка в составе протеолипосом типа II (А) и стандарта 1 (Б). Мощность лазера 84%, число лазерных ударов 174.

го количества *c*-субъединиц, то есть около двух из двенадцати.

Полученные результаты также являются подтверждением непосредственного контакта *a*- и *c*-субъединиц в составе F₀ с мембранным бислоем.

Нами не были идентифицированы кросс-сшитые продукты, которые могли образоваться вследствие модификации DCADP таких субъединиц, как A6L и *b*. Однако это не дает пока нам основания однозначно утверждать, что эти субъединицы не имеют непосредственных контактов с липидами внешней мембраны митохондрий. Поскольку молекулярные массы субъединиц *a* и *b* близки (*M* 24815 и 24668 Да соответственно), возможно, мы просто не можем их различить в масс-спектре, из-за ограничений, связанных с разрешающей способностью масс-спектрометра. Отсутствие же модификации A6L можно объяснить недостаточной концентрацией продуктов кросс-сшивок. Поэтому мы пока не можем дать четкий ответ на вопрос – контактируют ли субъединицы *b* и A6L с липидами мембраны или нет. Работа в этом направлении продолжается.

Из значения *m/z* 13348 (рис. 8А) для пика двузарядного иона модифицированной субъединицы *a* следует, учитывая возможный гидролиз фосфоэфирной связи, что произошло присоединение не менее трех молекул фотоактивируемого зонда к одной молекуле *a*-субъединицы. Известно, что субъединица *a* присутствует в F₁F₀-комплексе в одной копии, причем основная часть ее молекулы погружена в липидный бислой, и как предполагается образует 6–7 трансмембранных α -спиральных тяжей [22]. Предполагается, что эта субъединица выполняет как бы роль статора для ротора, образованного 12 субъединицами *c* [7]. Из полученных результатов следует, что этот статор (субъединица *a*) является компактным образованием, экранирующим довольно незначительную часть ротора, состоящего из 12 *c*-субъединиц, от контактов с липидами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы ADP, акриламид, АТФ, глицин, димиристоилфосфатидилхолин, EDTA, лактатдегидрогеназа, *N*, *N*-метиленисакриламид,

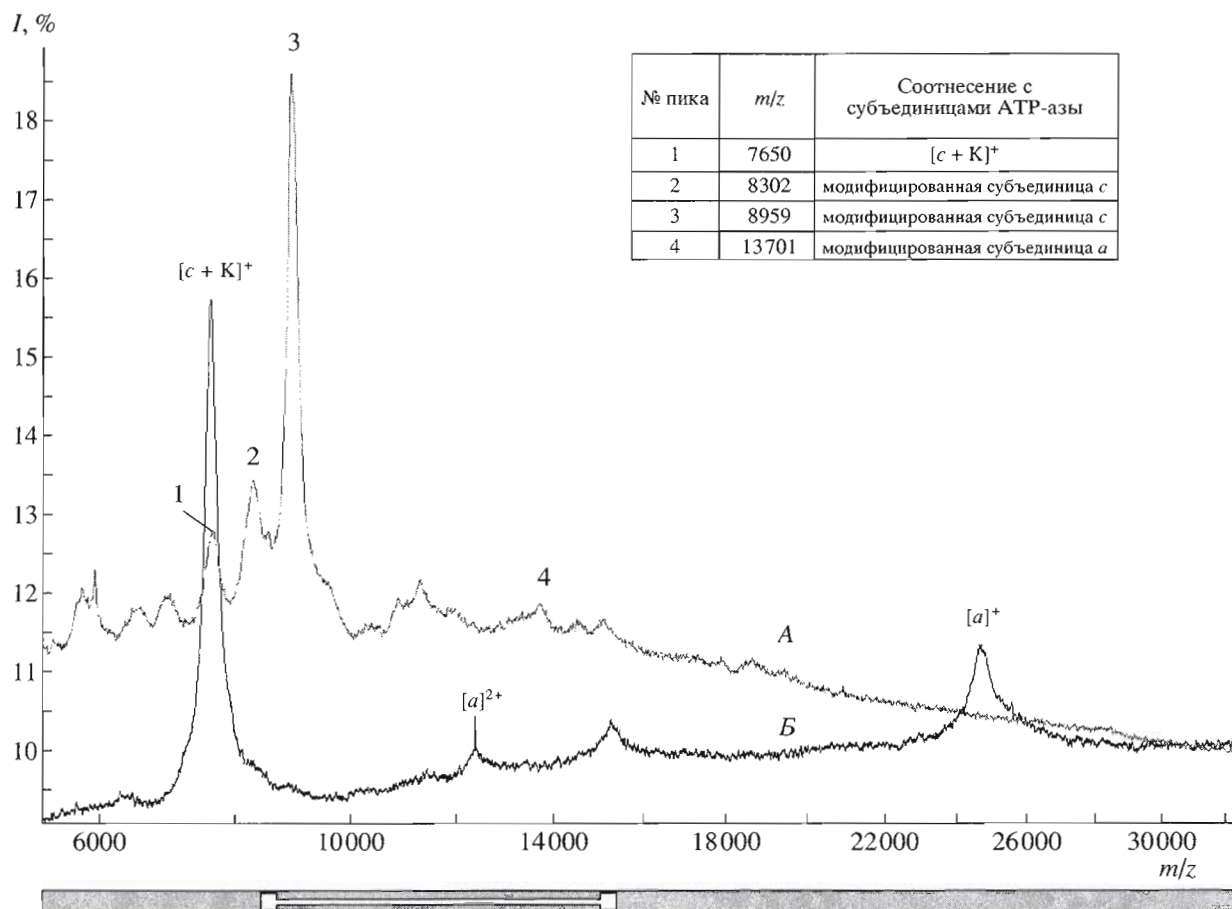


Рис. 9. Сравнительный MALDI-масс-спектрометрический анализ хлороформ-метанольной фракции немодифицированной (Б) и модифицированной (А) H^+ -АТФ-азы митохондрий сердца быка в составе протеолипосом типа I и II соответственно. Мощность лазера 84%, число лазерных ударов 153.

NADH, 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, пероксидаза хрена (конъюгированная с антителами против иммуноглобулинов кролика), персульфат аммония, пируваткиназа, PMSF, трис, трицин, фосфоенолпируват (Sigma, США); белковые стандарты, бромфеноловый синий, BSA (фракция V), кумасси R-250, β -меркаптоэтанол, метанол, муравьиная кислота, хлороформ (Merck, Германия); олигомицин, SDS, TEMED, холат натрия (Serva, Германия); [^{125}I]TID, Amplify™ (Amersham, США); дезоксихолат натрия, ТНАР (Fluka, Швейцария); DNB (Aldrich, Германия). Все остальные реагенты отечественного производства квалификации не ниже "х.ч."

Митохондрии из сердца быка выделяли как описано в работе Крейна и Грина [23]. Субмитохондриальные частицы получали по методу Сениора [24]. F_1F_0 -комплекс выделяли по методике Серрано и сотр. [9], F_1 -АТФ-азу – по методике Хорстмана и Ракера [25], OSCP – как в работе Белогрудова с соавт. [26].

АТФ-азную активность измеряли спектрофотометрически в сопряженной ферментативной системе по методу Пуллмана и др. [27].

Моноклональные антитела получали как в работе Белогрудова с соавт. [26].

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [28], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Фотоактивируемые гидрофобные зонды 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбониламино)-[12- ^{14}C]додеcanoил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (^{14}C DCADP), 1-ацил-2-[11-(^{125}I)иоддиазоциклопентадиен-2-карбонилокси]ундеcanoил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (^{125}I IDCOUP) и 1-ацил-2-[12-(диазоциклопентадиен-2-карбониламино)додеcanoил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DCADP) синтезировали по методикам работ [3, 4]. Удельная радиоактивность [^{14}C]DCADP и [^{125}I]IDCOUP 50 Ки/моль и 30 Ки/ммоль соответственно.

Липидные смеси для получения протеолипосом: (а) к 6 мг (50%) димиристоилфосфатидилолина добавляли 4.8 мг (40%) 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, а затем –

примерно 1.2 мг (10%) [¹⁴C]DCADP так, чтобы общая радиоактивность составляла около 50 мкКи; (б) к 12 мг смеси (1 : 1) димиристоилфосфатидилхолин-1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин добавляли примерно 20 нМ [¹²⁵I]IDCOUP (общая радиоактивность около 200–600 мкКи); (в) к 6 мг димиристоилфосфатидилхолина добавляли 6 мг 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина; (г) к 9 мг смеси (в) добавляли DCADP (примерно 10% общего количества липидов). Все липиды растворяли в смеси хлороформ-метанол (2 : 1).

Протеолипосомы получали согласно модифицированному методу Фридла и Шайрера [29]. Все операции вели при освещении красным светом. Смеси липидов (а)–(г), растворенные в хлороформ-метаноле (2 : 1), упаривали на ротарном испарителе при 43°C в течение 30 мин до образования липидной пленки и перерастворяли каждую в 400–450 мкл буфера (10 мМ трицин-NaOH (pH 8.0), 0.2 мМ EDTA, 0.8% дезоксихолат натрия, 1.6% холат натрия).

Смеси озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН 2Т дважды при частоте 22 кГц в течение 2 мин до просветления. К озвученной смеси липидов (а)–(г) добавляли F₁F₀-комплекс (соотношение белок-липид 1 : 4, по массе) и диализовали против 1.5–2 л буфера (10 мМ трицин-NaOH (pH 7.8), 2.5 мМ Na₂SO₄, 50 мкМ CaCl₂) в течение 12–18 ч при 18–22°C.

Протеолипосомы для SDS-ПААГ-электрофореза получали используя смеси (а) и (б), протеолипосомы типов I и II для MALDI-масс-спектрометрии – смеси (в) и (г) соответственно.

Для модификации H⁺-АТФ-азы фотоактивируемым липидом протеолипосомы, содержащие [¹⁴C]DCADP, [¹²⁵I]IDCOUP или DCADP, облучали 15 мин светом ртутной лампы с максимумом эмиссии 330 нм в кварцевой кювете при перемешивании мешалкой в атмосфере аргона. Затем образцы делипидизировали.

Модификацию H⁺-АТФ-азы [¹²⁵I]TID проводили как в работе [30].

Делипидизация протеолипосом. К суспензии облученных УФ-светом протеолипосом, содержащей примерно 100 мкг белка, добавляли трехкратный объем смеси хлороформ-метанол (1 : 2) и инкубировали образовавшуюся смесь при комнатной температуре в течение 2–3 ч при перемешивании. Затем перемешивание прекращали, а инкубацию продолжали до четкого образования трех фракций: водной, белкового осадка и хлороформ-метанольной.

Электрофоретический анализ. Протеолипосомы, содержащие [¹⁴C]DCADP или [¹²⁵I]IDCOUP, делипидизировали, соответствующие белковые продукты (белковый осадок + водная фракция) лиофильно высушивали, растворяли в буфере

для нанесения образца и анализировали при помощи SDS-ПААГ-электрофореза по методу Лэммли [31]. Белковые полосы на пластинках ПААГ визуализировали с помощью окрашивания кумасси R-250 или серебром по общепринятым методикам.

Измерение радиоактивности в SDS-ПААГ-электрофореграммах вели двумя методами: 1) полосы геля, содержащие белковые компоненты, разрезали на кусочки шириной примерно 2 мм, высушивали, помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью Ready Gel™ (Beckman, США) и измеряли радиационную активность на сцинтилляционном счетчике Mark II (Chicago Nuclear, США); 2) с помощью автордиографии. Для этого пластину ПААГ, после SDS-электрофореза в ней субъединиц H⁺-АТФ-азы, модифицированной [¹⁴C]DCADP, обрабатывали в течение 20 мин реагентом Amplify™ (Amersham, США) для уменьшения требуемого времени экспозиции. Далее пластину ПААГ высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой при –70°C в течение 5–7 сут. В случае модификации [¹²⁵I]IDCOUP Amplify™ не использовали, и высушенную пластину ПААГ экспонировали с рентгеновской пленкой при –70°C в течение 5–7 сут.

Автордиографию проводили также, используя следующую методику: субъединицы модифицированной H⁺-АТФ-азы с ПААГ переносили на PVDF-мембрану (Immobilon Transfer, Millipore, США) (перенос осуществляли на приборе Midget Multiblott (LKB, Швеция) по методу, описанному в работе [32]), а затем PVDF-мембрану экспонировали с рентгеновской пленкой при –70°C в течение 5–7 сут.

Иммунологическое тестирование. Белковые полосы с SDS-ПААГ-электрофореграмм с помощью электроблоттинга переносили на нитроцеллюлозные фильтры. Тестирование вели как в работе [26], используя анти-OSCP и эквивалентную смесь (анти-OSCP + анти-γ).

MALDI-масс-спектрометрический анализ. *Приготовление матриц:* 2.5 мг 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (ДНВ) или 2,4,6-тригидроксиацетифенона (ТНАР) растворяли в 1 мл 25% метанола в 0.1% трифторуксусной кислоте или в 100 мкл 50% этанола соответственно. Непосредственно перед нанесением на мишень 10 мкл раствора ТНАР смешивали с 10 мкл 0.1 М аммиачно-цитратного буфера, pH 5.5.

Приготовление образцов белков. Стандарты: F₁F₀-комплекс, выделенный по методу [9] (стандарт 1), и тот же комплекс, трижды пересажженный сульфатом аммония (стандарт 2), хранили в виде преципитата под сульфатом аммония при 4°C. Непосредственно перед приготовлением образцов стандартов преципитат тщательно перемешивали до однородной суспензии и отбирали

аликвоты, содержащие 150–200 мкг белка. Белок осаждали на центрифуге Biofuga B (Heraeus, Германия) 5 мин при 11000 об/мин. Осадок растворяли в 150–200 мкл 75% муравьиной кислоты и осуществляли обессоливание раствора с помощью гель-фильтрации на колонке (1 × 8 см) с сефадексом G-25 (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенным 75% муравьиной кислотой. Элюцию белка с колонки проводили тем же раствором кислоты со скоростью 15 мл/ч. Контроль за выходом белка осуществляли с помощью детектора HoloChrome (Gilson, Франция) при 280 нм. Далее обессоленный раствор белка концентрировали на Speed-Vac Concentrator (Savant, США) до концентрации приблизительно 1 мг/мл.

Белковый осадок, водная и хлороформ-метанольная фракции. После делипидизации протеолипосом хлороформ-метанольную фракцию отбирали осторожно шприцем. Остаток центрифугировали (центрифуга Biofuga B, Heraeus, Германия) 10 мин при 11000 об/мин и отбирали надосадочную водную фракцию. Осадок, водную и хлороформ-метанольную фракции высушивали досуха на Speed-Vac Concentrator (Savant, США). Затем каждую фракцию растворяли в 100–150 мкл 75% муравьиной кислоты, обессоливали и концентрировали как описано выше.

Нанесение на мишень образцов белка. 25 мкл раствора ДНВ наносили на мишень и немедленно в образовавшуюся каплю добавляли 0.25 мкл исследуемого обессоленного образца белка с концентрацией приблизительно 1 мг/мл. Мишень оставляли при комнатной температуре до полного испарения растворителей.

Липиды наносили на мишень, используя модифицированный двустадийный метод Мониаatte с соавт. [33].

MALDI-масс-спектрометрию проводили на масс-спектрометре VISION 2000 (Thermo BioAnalysis, США). Образец облучали УФ-лазером с длиной волны 337 нм и максимальной энергией 250 мкДж, в импульсном режиме, с частотой 3 нс. Положительно заряженные ионы детектировали в отраженном режиме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boyer P.D. // *Annu. Rev. Biochem.* 1997. V. 66. P. 717–749.
2. Abrahams J.P., Leslie A.G., Lutter R., Walker J.E. // *Nature.* 1994. V. 370. P. 621–628.
3. Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G. // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 1933–1936.
4. Vodovozova E.L., Tsibizova E.L., Molotkovsky J.G. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 2001. № 18. P. 2221–2228.
5. Hatanaka Y., Nakayama H., Kanaoka Y. // *Rev. Heteroatom Chem.* 1996. V. 14. P. 213–243.
6. Engelbrecht S., Junge W. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 485–491.
7. Groth G., Walker J.E. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 117–123.
8. Белогрудов Г.И., Ильина Е.Ф., Гринкевич В.А., Модянов И.Н. // *Биол. мембраны.* 1988. Т. 5. С. 677–687.
9. Serrano R., Kanner B.J., Raker E.J. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 2453–2461.
10. Collinson I.R., Runswick M.J., Buchanan S.K., Fearnley I.M., Skehel J.M., van Raaij M.J., Griffiths D.E., Walker J.E. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 7971–7978.
11. Walker J.E., Fearnley I.M., Gay N.J., Gibson B.W., Northrop F.D., Powell S.J., Runswick M.J., Saraste M., Tybulewicz V.L.J. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 184. P. 677–701.
12. Ernster L., Hundal T., Norling B., Sandri G., Wojtszak L., Grinkevich V.A., Modyanov N.N., Ovchinnikov Yu.A. // *Chemica Scripta.* 1986. V. 26B. P. 273–279.
13. Walker J.E., Gay N.J., Powell S.J., Kostina M., Dyer M.R. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 8613–8619.
14. Walker J.E., Runswick M.J., Poulter L. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 197. P. 89–100.
15. Ovchinnikov Yu.A., Modyanov N.N., Grinkevich V.A., Aldanova N.A., Trubetskaya O.E., Nazimov I.V., Hundal T., Ernster L. // *FEBS Lett.* 1984. V. 166. P. 19–22.
16. Collinson I.R., van Raaij M.J., Runswick M.J., Fearnley I.M., Skehel J.M., Orris G.L., Miroux B., Walker J.E. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 242. P. 408–421.
17. Ryan E.M., Buzy A., Griffiths D.E., Jennings K.R., Palmer D.N. // *Biochem. Soc. Trans.* 1996. V. 24. P. 289–290S.
18. Katz M.L., Gao C.L., Tompkins J.A., Bronson R.T., Chin D.T. // *Biochem. J.* 1995. V. 310. P. 887.
19. Buzy A., Ryan E.M., Jennings K.R., Palmer D.N., Griffiths D.E. // *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* 1996. V. 10. P. 790–796.
20. Griffiths D.E., Buzy A., Jennings K.R., Millar A.L., Ryan E.M. // *Eur. Mass. Spectrom.* 1997. V. 3. P. 81–88.
21. Walker J.E., Lutter R., Dupuis A., Runswick M.J. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 5369–5378.
22. Fearnley I.M., Walker J.E. // *EMBO J.* 1986. V. 5. P. 2003–2008.
23. Crane G., Green D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1956. V. 22. P. 1087–1094.
24. Senior A.E. // *J. Bioenergetics.* 1971. V. 2. P. 141–150.
25. Horstman G., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 1336–1344.
26. Белогрудов Г.И., Кан Е.Ф., Ильина Е.Ф., Муравьева Т.И., Гринкевич В.А. // *Биол. мембраны.* 1990. Т. 7. С. 213–221.
27. Pullman M.E., Penefsky H.S., Datta A., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1960. V. 235. P. 3322–3329.
28. Hess H.H., Lees M.B., Derr J.E. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 85. P. 295–300.
29. Friedl P., Schairer H.U. // *Meth. Enzymol.* 1986. V. 126. P. 579–588.

30. Белогрудов Г.И., Ильина Е.Ф., Гринкевич В.А., Модянов И.Н. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 677–687.
31. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
32. Зайцева Л.Г., Зайцев В.Г., Фенюк Б.А., Павлов П.Ф., Виленская Н.Д., Овчинникова Т.В., Плужников К.А., Гришин Е.В., Гринкевич В.А. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 563–570.
33. Moniatte M., Lesieur C., Vecsey-Semjen B., Buckley J.T., Pattus F., van der Goot F.G., van Dorsselaer A. // International J. Mass-Spectrometry and Ion Processes. 1997. V. 169/170. P. 179–199.

Mitochondrial H⁺-ATPase: Identification of Subunits of the F₀ Subcomplex that Contact Membrane Lipids

L. G. Zaitseva*, T. V. Ovchinnikova*, E. L. Vodovozova*, Yul. G. Molotkovsky*, N. B. Polyakov**, M. I. Titov*, S. E. Esipov*, and V. A. Grinkevich**#

#Phone: +7 (095) 939-1268; e-mail: grin@soil.msu.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

** Chair of Bioorganic Chemistry, Biological Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The subunits of the F₀ membrane sector of bovine heart mitochondrial H⁺-ATPase that contact the lipids of the mitochondrial inner membrane were identified with the use of specially synthesized proteoliposomes that contained active mitochondrial H⁺-ATPase and a photoreactive lipid, which was 1-acyl-2-[12-(diazocyclopentadiene-2-carboxylamino)-[12-¹⁴C]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-acyl-2-[11-([¹²⁵I]diaziodocyclopentadiene-2-carboxyloxy)undecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, or 1-acyl-2-[12-(diazocyclopentadiene-2-carboxylamino)dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, where acyl is a mixture of the residues of palmitic (70%) and stearic (30%) acids. An analysis of the cross-linked products obtained upon the UV-irradiation of these proteoliposomes indicated that subunits *c* and *a* of the F₀ membrane sector contact the lipids. The cross-linked products were identified by SDS-PAGE and MALDI mass spectrometry. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: mitochondrial H⁺-ATPase, subunits of the F₀ membrane sector, photoreactive lipids, MALDI mass spectrometry of membrane proteins