

С. Т. МЕТЕЛЬСКИЙ, И. А. КОЗЛОВ

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ РАСТВОРИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТФазы

(Представлено академиком А. С. Спириным 21 X 1974)

Гидролиз АТФ в митохондриях сопровождается переносом протонов через митохондриальную мембрану. В литературе обсуждается два механизма вызванной гидролизом АТФ транслокации протонов. В соответствии со схемой Митчелла (<sup>1</sup>), в переносе протонов через липидный барьер принимают участие АДФ, АТФ и  $\Phi_n$ . Перенос осуществляется за счет транслокации протонированных форм нуклеотидов и  $\Phi_n$ . При этом имеет место трансмембранный перенос тех самых протонов, которые принимают участие в катализе АТФазной реакции. Гипотеза Скулачева (<sup>2</sup>) предусматривает вращение белковых глобул АТФазного комплекса, приводящее к переносу протонированной группы белка через митохондриальную мембрану. Группа, осуществляющая транслокацию протона, может быть локализована на определенном расстоянии от активного центра АТФазы, а переносимые протоны могут не принимать участия в процессах, протекающих в активном центре фермента. Обе гипотетические схемы требуют экспериментальной проверки. Идентификация групп, осуществляющих транслокацию протонов через митохондриальную мембрану, равно как и идентификация групп, принимающих участие в катализе АТФазной реакции, является необходимым условием выяснения механизма функционирования АТФазного комплекса. Плодотворным подходом к решению поставленной задачи является сравнительное изучение зависимости кинетических параметров растворимой митохондриальной АТФазы и АТФазы в составе АТФазного комплекса митохондрий от рН.

Настоящая работа посвящена изучению зависимости  $K_M$  и  $K_{кат}$  растворимой митохондриальной АТФазы от рН. Исследуется также влияние рН на сродство фермента к Mg-АДФ, конкурентному ингибитору АТФазной реакции.

Зависимость скорости АТФазной реакции от рН изучалась рядом авторов как для растворимого фермента, так и для АТФазы, входящей в состав АТФазного комплекса митохондрий (<sup>3, 4</sup>). В большинстве работ, однако, отсутствуют данные о влиянии рН отдельно на скорость каталитической стадии реакции ( $K_{кат}$ ) и сродство фермента к АТФ ( $K_M$ ). Последнее обстоятельство ограничивает использование этих литературных данных. Интерпретация полученных некоторыми авторами результатов затруднена также тем, что в литературе отсутствует единое мнение о роли  $Mg^{2+}$  в АТФазной реакции. Хамес и Хилборп (<sup>5</sup>) считают истинным субстратом реакции АТФ. По мнению других исследователей (<sup>6</sup>), АТФ сорбируется ферментом в виде магниевой соли. Проведенный в нашей лаборатории кинетический анализ системы металл — субстрат — фермент (<sup>6</sup>) по методу Лондона — Стека подтвердил последнюю точку зрения. Характер зависимости скорости АТФазной реакции от рН может искажаться благодаря ингибирующему эффекту белкового ингибитора, присутствующего в большинстве препаратов растворимой АТФазы митохондрий. Ингибирующий эффект белкового ингибитора, по данным Минкова и сотр. (<sup>7</sup>), развивается во времени в присутствии АТФ и возрастает с понижением

pH. Применяемые в настоящей работе методы измерения скорости АТФазной реакции в их конкретном аппаратном оформлении позволяют исключить развивающееся во времени действие белкового ингибитора; чувствительность методов позволяет измерить начальную скорость реакции.

Растворимую митохондриальную АТФазу (сопрягающий фактор  $F_1$ ) выделяли из митохондрий сердца быка по методу Хорстмана и Ракера (8). Скорость АТФазной реакции в интервале значений pH от 6,2 до 6,9 измеряли по накоплению в реакционной среде неорганического фосфата, который количественно определяли по методу (9). Степень превращения субстрата за измеряемое время реакции не превышала 10%. В специальном

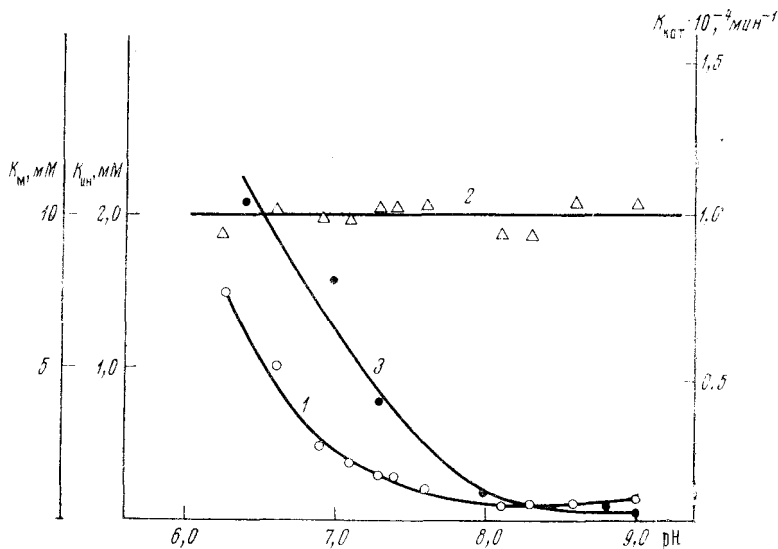


Рис. 1. pH-зависимость параметров АТФазной реакции. 1 —  $K_M$  для Mg-АТФ, 2 —  $K_{кат}$ , 3 —  $K_{ин}$  для Mg-АДФ

эксперименте было показано, что наблюдаемая скорость накопления неорганического фосфата представляет собой начальную скорость АТФазной реакции. Скорость АТФазной реакции в интервале значений pH от 6,9 до 9,2 измеряли по Чансу (10), регистрируя закисление реакционной среды, сопровождающее гидролиз АТФ. За измеряемое время реакции (1,5—2 мин.) pH раствора менялся не более чем на 0,02. Столь малое изменение pH соответствовало линейному участку кривой накопления продуктов АТФазной реакции и позволяло определить начальную скорость ферментативного процесса. При определении скорости ферментативной реакции по сдвигу pH реакционной среды рассчитывали для каждого значения pH отношение числа гидролизующихся молекул АТФ к числу образовавшихся в результате реакции протонов. При расчетах использовали литературные данные по величинам констант ионизации адениновых нуклеотидов и их магниевых комплексов (11). Для проверки правильности проведенных расчетов определяли  $K_{кат}$  и  $K_M$  при pH 6,9 двумя способами: измеряя скорость АТФазной реакции по сдвигу pH реакционной среды и по накоплению неорганического фосфата. В обоих случаях полученные величины различались не более чем на 15%.  $K_M$  и  $K_{кат}$  определяли в координатах Лайнуивера — Берка. Состав реакционной смеси: 0,6—10 мМ Mg-АТФ, 3—30 мкг  $F_1$ , 5 мМ трис-НСl-буфера в общем объеме 8 мл. В опытах по изучению ингибирующей способности Mg-АДФ реакционная смесь содержала избыток 1 мМ  $MgSO_4$ . Концентрацию Mg-АДФ варьировали в пределах от 0,4 мМ до 1,2 мМ.  $K_{ин}$  (константу ингибирования) определяли в координатах Диксона. Экспериментальные кривые для определения  $K_{кат}$ ,

$K_M$  и  $K_{ин}$  строили по методу наименьших квадратов с использованием стандартной программы счетной машины «Seiko». Стандартная ошибка в экспериментально определенных величинах  $K_M$ ,  $K_{ин}$  и  $K_{кат}$  составляла от 10 до 25%. Все кинетические измерения проводили при 25°.

На рис. 1 представлена полученная нами зависимость  $K_{кат}$  и  $K_M$  АТФазной реакции от рН. Выбранный интервал значений рН определялся, с одной стороны, требованиями к устойчивости фермента за измеряемое время гидролиза и, с другой стороны, отсутствием спонтанного неферментативного гидролиза АТФ. Отсутствие изменений в величинах  $K_{кат}$  в интервале значений рН от 6,25 до 9,2 (рис. 1) можно объяснить двумя способами. Во-первых, рК группы, осуществляющей протонирование фосфорильного кислорода, предшествующее отщеплению от АТФ  $\gamma$ -Р, лежит выше 9,0. Во-вторых, отщепление  $\gamma$ -Р от АТФ не лимитирует скорости всего ферментативного процесса. В последнем случае в активном центре может находиться группа с любым значением рК, а стадией, лимитирующей скорость, является связанное с транслокацией протона конформационное изменение фермента. Первый способ объяснения наблюдаемой картины представляется нам более правдоподобным. Действительно, если рК группы, осуществляющей катализ АТФазной реакции, лежит в интервале рН 6,2–9,0, то крайне маловероятно, чтобы увеличение рН выше рК не привело к изменению лимитирующей стадии процесса. В случае справедливости первой точки зрения (рК группы в активном центре лежит выше 9,0) наиболее вероятным кандидатом среди аминокислот на участие в кислотно-основном катализе АТФазной реакции следует признать тирозин. Наличие одного или двух остатков тирозина в активном центре АТФазы установлено недавно в работе (12). Автор, однако, не обсуждает роли тирозина в механизме функционирования активного центра. По нашему мнению, тирозин может принимать участие как в сорбции АТФ, за счет стэкинг-взаимодействий с гетероциклическим основанием, так и в катализе АТФазной реакции за счет образования водородной связи с фосфорильным кислородом  $\gamma$ -Р-АТФ. Подобный механизм хорошо согласуется с предлагаемой в литературе (13) кольцеобразной структурой АТФ, при которой  $\gamma$ -Р сближен с адениновым кольцом. Сопровождающая отщепление  $\gamma$ -Р частичная или полная понизация гидроксильной группы тирозина приводит к нарушению стэкинг-взаимодействий с аденином, что приводит, в свою очередь, к быстрой диссоциации от фермента АДФ. Следует отметить, что участие в активном центре других аминокислотных остатков с рК выше 9,0 (серин, цистеин) представляется маловероятным, поскольку фермент не проявляет высокой чувствительности к соответствующим ингибиторам (ПХМБ, диизопронилфторфосфат).

Характер зависимости  $K_M$  АТФазной реакции и  $K_{ин}$  для Mg-АДФ (расчитанной в предположении, что Mg-АДФ выступает в качестве конкурентного ингибитора (6)) от рН свидетельствует о наличии в активном центре фермента группы, участвующей в сорбции нуклеотидов с рК < 6,5. Ранее было найдено, что свободный  $Mg^{2+}$  связывается в активном центре АТФазы конкурентно с Mg-АТФ;  $K_{ин}$  соответствует  $1 \cdot 10^{-3} M$  (6). Совокупность полученных данных (наличие в активном центре группы, участвующей в связывании Mg-АТФ и Mg-АДФ с рК < 6,5, и конкурентное связывание  $Mg^{2+}$  с  $K_{ин} = 10^{-3} M$ ) позволяет предположить, что сорбция магневых солей нуклеотидов ферментом осуществляется при участии карбоксильной группы. В пользу высказанного предположения свидетельствует также ингибирование АТФазной реакции высокими концентрациями NaCl и отсутствие у фермента высокой специфичности к природе двухвалентного катиона (3, 14) (эффективность  $Me^{2+}$  зависит от радиуса иона и не зависит от поляризуемости его электронных оболочек).

Таким образом, полученные результаты позволили высказать предположение о наличии остатков тирозина и карбоксильной группы в активном центре растворимой митохондриальной АТФазы. В соответствии с

ролью, отведенной обеим функциональным группам, карбоксильная группа участвует в связывании нуклеотидов, а остаток тирозина — как в связывании нуклеотидов, так и в катализе АТФазной реакции.

В связи с полученными нами результатами интересно обсудить данные<sup>(15)</sup> о зависимости скорости АТФазной реакции субмитохондриальных частиц от рН. В соответствии с<sup>(15)</sup>, скорость АТФазной реакции, катализируемой АТФазным комплексом митохондрий, имеет ярко выраженную рН-зависимость. Поскольку  $K_{кат}$  растворимой митохондриальной АТФазы не меняется в том же интервале значений рН (рис. 1), можно заключить, что скорость АТФазной реакции АТФазного комплекса митохондрий лимитируют процессы, не связанные с каталитической стадией гидролиза АТФ. Не исключено, что наблюдаемая Митчеллом рН-зависимость отражает изменение степени протоцирования группы, участвующей в механизме транслокации протонов через митохондриальную мембрану.

Авторы приносят благодарность В. П. Скулачеву за участие в обсуждении работы.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
25 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> P. Mitchell, FEBS Letters, v. 33, 267 (1973). <sup>2</sup> В. П. Скулачев, Усп. совр. биол., т. 77, 211 (1974). <sup>3</sup> В. А. Акименко, И. Б. Минков, А. Д. Виноградов, Биохимия, т. 37, 348 (1972). <sup>4</sup> A. Tzagoloff, D. H. MacLennan, K. H. Byington, J. Biol. Chem., v. 243, 2405 (1968). <sup>5</sup> D. Hilborn, G. Hammes, Biochemistry, v. 12, 983 (1973). <sup>6</sup> И. А. Козлов, В. А. Кононенко, В сб. Биология и научно-технический прогресс, Пушкино, 1974, стр. 160. <sup>7</sup> И. Б. Минков, З. С. Гурова, В сб. Митохондрии, М., 1974, стр. 167. <sup>8</sup> E. Racker, L. L. Horstman, J. Biol. Chem., v. 242, 2547 (1967). <sup>9</sup> H. Weil-Malherbe, B. H. Green, Biochem. J., v. 49, 286 (1951). <sup>10</sup> M. Nishimura, T. Yto, B. Chance, Biochim. et biophys. acta, v. 52, 177 (1962). <sup>11</sup> K. Shikama, Arch. Biochem. and Biophys., v. 147, 311 (1971). <sup>12</sup> A. E. Senior, Biochemistry, v. 12, 3622 (1973). <sup>13</sup> O. Kennard, N. W. Isaacs et al., Proc. Roy. Soc. (London), v. A325, 401 (1971). <sup>14</sup> R. Adolfsen, E. N. Moundrianakis, Biochemistry, v. 12, 2926 (1973). <sup>15</sup> P. Mitchell, J. Moyle, York Meeting of the Biochemical Society, 1974.