

УДК 577.152.3

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ ПРОТОН-ТРАНСЛОЦИРУЮЩЕЙ ЧАСТИ АТФ-СИНТАЗЫ МИТОХОНДРИЙ

Л. Г. Зайцева¹, Т. В. Овчинникова¹, Е. Л. Водовозова¹, Юл. Г. Молотковский¹,
Н. Б. Поляков², С. Е. Есипов¹, В. А. Гринкевич^{2*}

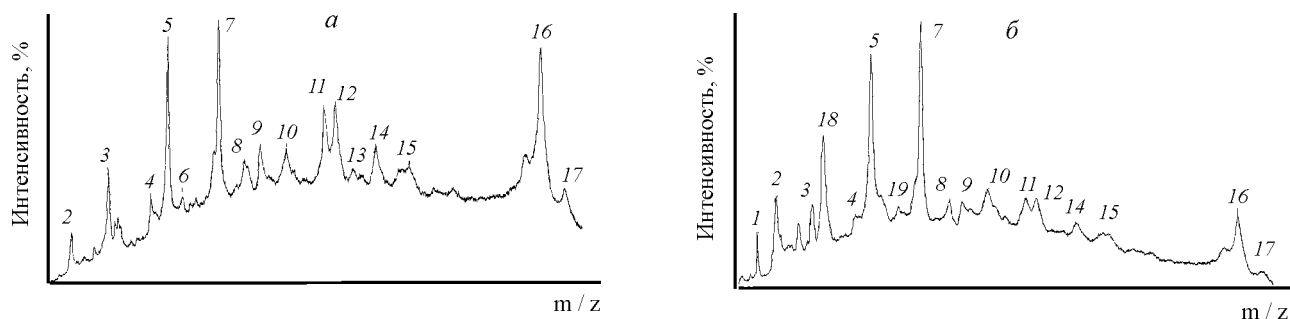
(¹Институт биоорганической химии им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871 ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10, ИБХ РАН; ²кафедра биоорганической химии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; тел.: (095) 939-12-68; факс: (095) 336-43-33; e-mail: grin@soil.msu.ru)

Структурно и функционально митохондриальную АТФ-синтазу подразделяют на два субкомплекса: F_1 -АТФ-азу и F_0 -комплекс. Трехмерная структура F_1 -АТФ-азы митохондрий была определена с помощью рентгеноструктурного анализа. Строение мембранного F_0 -сектора менее изучено. В настоящей работе мы использовали разные липофильные фотоактивируемые метки для идентификации субъединиц F_0 , непосредственно контактирующих с липидами. Протеолипосомы получали методом диализа по Фридли и Шайреру. Идентификацию кросс-сшитых продуктов проводили с помощью либо SDS-электрофореза с последующей авторадиграфией и иммуноблоттингом, либо метода MALDI-масс-спектрометрии. Полученные результаты позволили идентифицировать ряд субъединиц F_0 , контактирующих с липидами.

Митохондриальная H^+ -АТФ-аза (АТФ-синтаза) осуществляет сопряженный с переносом протонов синтез/гидролиз АТФ. Структурно и функционально этот мембранный комплекс может быть разделен на два суб-

комплекса: периферический (F_1 -АТФ-аза), несущий центры синтеза и гидролиза АТФ, и мембранный (F_0), осуществляющий трансмембранный перенос протонов. Каждый из них имеет сложный полипептидный состав [1]. Наиболее

*Адресат для переписки.



Масс-спектр белкового осадка немодифицированного (а) и модифицированного Dcp-AD-PC/Dcp-OU-PC (б) F_0F_1 -комплекса в матрице ДНВ. Мощность лазера 75% (а) и 84% (б); количество лазерных ударов 160 (а) и 174 (б). Цифрами обозначены пики, соответствующие следующим субъединицам: 1 – с (двухзарядный ион) (m/z 3846); 2 – е (m/z 5679); 3 – с (кластерный ион с калием) (m/z 7649); 4 – f (m/z 10 355); 5 – g (m/z 11 333); 6 – b (двухзарядный ион) (m/z 12 403); 7 – d (m/z 15 110); 8 – b (трехзарядный ион) (m/z 17360); 9 – d (m/z 18 731); 10 – OSCP (m/z 20 992); 11 – а (m/z 24 773); 12 – b (двухзарядный ион) (m/z 27 628); 13 – а (двухзарядный ион) (m/z 25 871); 14 – g (m/z 30 382); 15 – неидентифицированный пик; 16 – b (m/z 51 497); 17 – а (m/z 55 199); 18 – модифицированная Dcp-AD-PC/Dcp-OU-PC субъединица с (m/z 8305); 19 – модифицированная Dcp-AD-PC/Dcp-OU-PC субъединица b (двухзарядный ион) (m/z около 14 000)

изучена F_1 -АТФ-аза митохондрий. С помощью рентген-структурного анализа была определена ее трехмерная структура [2]. Строение мембранного сектора F_0 менее изучено. В настоящее время считается, что F_0 митохондрий сердца быка может состоять примерно из 11 субъединиц (а, b, с, d, f, g, h, e, OSCP, F_6 и А6L), стехиометрия и топография которых не совсем ясны. В данной работе нами были использованы различные липофильные фотоактивируемые метки для идентификации субъединиц F_0 , непосредственно контактирующих с липидами.

Материалы и методы

Митохондрии получали из сердечной мышцы быка по методу Крейна и Грина [3]. *Субмитохондриальные частицы* получали по методу Сениора [4]. *Выделение F_0F_1 -комплекса* из субмитохондриальных частиц проводилось по методике Серрано и др. [5]. *Выделение F_1 -комплекса* из митохондрий проводилось по методике Хорстмана и Ракера [6].

Получение моноклональных антител проводили, как в работе Белоградова с соавт. [7].

Модификацию F_0F_1 -комплекса 3-(трифторметил)-3-(m[125 I]иодфенил)диазирином ([125 I]-TID) проводили так же, как в работе [8].

Синтез фотоактивируемых гидрофобных зондов. 1-ацил-2-[12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)-[12- 14 C]-додеканойл]-sn-глицеро-3-фосфохолин ([14 C]-Dcp-AD-PC), 1-ацил-2-[11-([125 I]-2-диазоциклопентадиенкарбонилокси)-ундеканойл]-sn-глицеро-3-фосфохолин ([125 I]-Dcp-OU-PC), 1-ацил-2-[12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)-додеканойл]-sn-глицеро-3-фосфохолин (Dcp-AD-PC) и 1-ацил-2-[11-(2-диазоциклопентадиенкарбонилокси)-ундеканойл]-sn-глицеро-3-фосфохолин (Dcp-OU-PC) проводили так же, как в работах [9, 10].

Модификация F_0F_1 комплекса фотоактивируемым [14 C]-Dcp-AD-PC либо [125 I]-Dcp-OU-PC. Для получения протеолипосом, содержащих H^+ -АТФ-азный комплекс из митохондрий сердца быка и фотоактивируемый фосфолипидный зонд использовали модифицированный метод Фридла и Шайрера [11]. Полученные протеолипосомы облучали в течение 15 мин ртутной лампой с максимумом эмиссии 330 нм в кювете с мешалкой в атмосфере аргона. Затем для удаления липидов образцы обрабатывали смесью хлороформ : метанол (1 : 2). Белковый осадок растворяли в буфере для нанесения и анализировали при помощи электрофореза на ПААГ в присутствии SDS. Далее высушенную пластину ПААГ экспонировали с рентгеновской пленкой при -70° в течение 5–7 сут.

Приготовление образцов F_0F_1 -комплекса для масс-спектрометрического анализа. F_0F_1 -комплекс, выделенный как описано выше обессоливали на колонке (1×8 см) с носителем «Sephadex G-25» (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенной 75%-й муравьиной кислотой. Элюцию белка с колонки проводили тем же раствором кислоты, скорость элюции составляла 15 мл/ч. Контроль за выходом белка осуществляли с помощью детектора Holochrome (Gilson, Франция) при 280 нм. Далее раствор концентрировали на Speed-Vac Concentrator (Savant, Англия) до концентрации белка приблизительно 1 мг/мл.

Приготовление образцов модифицированного Dcp-AD-PC и Dcp-OU-PC F_0F_1 -комплекса для масс-спектрометрического анализа. Для получения протеолипосом, содержащих H^+ -АТФ-азный комплекс из митохондрий сердца быка и Dcp-AD-PC и Dcp-OU-PC использовали модифицированный метод Фридла и Шайрера [11]. Активацию образования кросс-сшивок и делипидизацию проводили так же как с случае использования [14 C]-Dcp-AD-PC или [125 I]-Dcp-OU-PC (см. выше). Далее осадок модифицированного

Модификация субъединиц АТР-азы митохондрий сердца быка липофильными фотоактивируемыми метками, содержащими радиоизотопы

Субкомплекс АТР-азы	Субъединицы АТР-азы митохондрий сердца быка	Модификация [¹⁴ C]-Dcp-AD-PC	Модификация [¹²⁵ I]-Dcp-OU-PC	Модификация [¹²⁵ I]-TID	Использование антител для идентификации положения субъединицы
F ₁	α				да
	β			–	да
	γ	–		–	да
	δ				нет
	ε	?	?	?	нет
F ₀	OSCP				да
	a	+	+	+	нет
	b	–	–	+	нет
	c	+	+	+	нет
	d	–	–		нет
	e				нет
	f	?	?	?	нет
	g	?	?	?	нет
	F6	?	?	?	нет
A6L	–	–	–	нет	

Примечание. (+) – модификация, (±) – вероятная модификация, (–) – отсутствие модификации, (?) – затруднено точное определение положения на радиоавтографе полосы, соответствующей данной субъединице.

F₀F₁-комплекса отделяли на центрифуге *Biofuga B* (*Heraeus, Sepatech*, Германия) 10 мин при 11 000 об/мин и сушили на воздухе до исчезновения запаха хлороформа. Гидрофобный супернатант высушивали досуха. Сухой остаток каждой из фракций растворяли в 250 мкл 75%-й муравьиной кислоты. Соли и не кросс-сшитые липиды в обеих фракциях удаляли с помощью гель-фильтрации в тех же условиях, как описано выше для приготовления образцов F₀F₁-комплекса для масс-спектрометрического анализа.

Приготовление образцов немодифицированного фотоактивируемым фосфолипидом F₀F₁-комплекса для масс-спектрометрического анализа. Образцы немодифицированного фотоактивируемым фосфолипидом F₀F₁-комплекса готовили аналогично образцам модифицированного фермента (см. выше), но при приготовлении липосом к смеси липидов не добавляли фотоактивируемый гидрофобный зонд.

Проведение масс-спектрометрического анализа

Приготовление матрицы DHB (2,5-дигидроксибензойной кислоты). Навеску DHB (около 25 мг) растворяли в 1 мл 25%-го метанола в 0,1%-й трифторуксусной кислоте.

Приготовление матрицы THAP (2,4,6-тригидроксиацетофенона). Навеску THAP (около 25 мг) растворяли в 1 мл 50%-го этанола. Непосредственно перед нанесением

на мишень 10 мкл раствора THAP смешивали с 10 мкл 0,1 М аммиачно-цитратного буфера (pH 5,5), приготовленного ранее.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре «VISION 2000» фирмы «Thermo BioAnalysis» (Англия). Положительно заряженные ионы детектировали в отраженном режиме. Образец облучали УФ-лазером с длиной волны 337 нм.

Масс-спектрометрический анализ белков 0,25 мкл раствора DHB наносили на мишень и в образовавшуюся каплю немедленно добавляли 0,25 мкл исследуемого обессоленного образца, концентрация белка в котором составляла приблизительно 1 мг/мл. Мишень оставляли при комнатной температуре до полного испарения растворителей.

Масс-спектрометрический анализ липидов. Для анализа липидов использовался модифицированный двустадийный метод нанесения на мишень [12].

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [13], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS проводили по методу Лэммли [14].

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы в качестве фотоактивируемых гидрофобных зондов нами были синтезированы

$[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC и $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC. Выделенный из митохондрий F_0F_1 -комплекс встраивали в липосомы, содержащие наравне с другими липидами $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC или $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC, а затем облучали протеолипосомы УФ-светом. Авторадиографический анализ кросс-сшитых продуктов с $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC, разделенных SDS-электрофорезом в ПААГ, показал, что с липидами контактируют а-, b- и с-субъединицы, а также, возможно, d и A6L (таблица). Наблюдалась также слабая модификация γ -субъединицы F_1 -АТР-азы. Более мелкие субъединицы идентифицировать не удалось, так как липидный зонд содержал метку $[^{14}\text{C}]$ с относительно низкой удельной радиоактивностью. Наблюдавшаяся модификация субъединиц d и γ противоречила наиболее популярным моделям строения АТР-азы [15, 16], подтвержденным экспериментальными данными. Чтобы повысить удельную радиоактивность зонда, нами был разработан новый метод синтеза зонда с включением не $[^{14}\text{C}]$ -, а $[^{125}\text{I}]$ -изотопов. Результаты, полученные с $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC, оказались сходными с полученными в экспериментах с $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC, но включения метки в субъединицы F_1 -АТР-азы не наблюдалось (см. таблицу).

Определенные трудности возникли при определении на радиоавтографе местоположения полос, соответствующих кросс-сшитым продуктам, так как присоединение $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC или $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC непредсказуемо влияло на электрофоретическую подвижность меченой субъединицы из-за изменения ее молекулярной массы и гидрофобности (иногда увеличивая, а иногда уменьшая кажущуюся молекулярную массу). Поэтому в качестве липофильной метки был также использован фотоактивируемый реагент $[^{125}\text{I}]$ -TID, имеющий гораздо меньшую молекулярную массу и почти не влияющий на подвижность кросс-сшитых продуктов при электрофорезе в ПААГ. В липосомы из фосфолипидов бобов сои встраивался F_0F_1 -комплекс. Затем протеолипосомы инкубировали с $[^{125}\text{I}]$ -TID и облучали УФ-светом. Основное включение метки приходилось на субъединицы а, с и b (см. таблицу). Вероятно, что $[^{125}\text{I}]$ -TID включается также в субъединицу A6L. Таким образом, видимость модификации d-субъединицы $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC либо $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC, вероятнее всего, может объясняться изменением электрофоретической подвижности модифицированной а-субъединицы и ее частичным смещением вверх на радиоавтографе. При данной концентрации $[^{125}\text{I}]$ -TID модифицировал также γ -субъединицу F_1 -АТР-азы, а при более высокой – даже β -субъединицу (см. таблицу). Это указывает на то, что $[^{125}\text{I}]$ -TID является неспецифичной меткой и способен включаться не только в липидный бислой, но и в гидрофобные карманы субъединиц F_0F_1 -комплекса.

Возникшие осложнения при анализе кросс-сшитых продуктов (субъединиц F_0 меченых $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC или $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC) после их разделения SDS-электрофорезом в ПААГ, а также трудности при идентификации субъединиц в хлороформ-метанольной фракции после делипидизации, связанные с маскирующим эффектом липид-липидных кросс-сшивков, заставили нас прибегнуть к новой методологии с применением MALDI-масс-спектрометрии. Однако на масс-спектрометре невозможно работать с радиоактивной меткой, поэтому мы использовали не $[^{14}\text{C}]$ -Dcp-AD-PC и $[^{125}\text{I}]$ -Dcp-OU-PC, а их нерадиоактивные аналоги (Dcp-AD-PC и Dcp-OU-PC). Чистота и строение Dcp-AD-PC и Dcp-OU-PC наряду с обычными методами были подтверждены также методом MALDI-масс-спектрометрии.

С целью выяснения эффективности использования масс-спектрометрии был предварительно проведен масс-спектральный анализ F_0F_1 -комплекса. В масс-спектре F_0F_1 -комплекса (стандарта) (не приводится) практически все субъединицы, входящие в его состав, присутствуют в виде молекулярных ионов (ϵ (5659)*, A6L (7969), F6 (8950), f (10 210), g (11 255), δ (15 062), d (18 564), α CP (20 830), a (24 615), γ (30066), β (51 513), α (55 149)). Кроме того, некоторые субъединицы в условиях получения данного масс-спектра образуют двузарядные ионы, соответствующие пикам с m/z 27628 (α -субъединица), 25719 (β -субъединица), 12326 (b-субъединица). Необходимо подчеркнуть, что субъединица b фиксируется в масс-спектре только в виде двузарядного иона. Пик с m/z 17179 соответствует трехзарядному иону β -субъединицы. Субъединица c в масс-спектре присутствует в виде кластерного иона $[M + K]^+$. Определенные затруднения возникли при соотношении пиков с m/z 14 630 и 22 893. При соотношении масс-спектров F_0F_1 -комплекса и изолированного F_1 -комплекса (не приводится) был сделан вывод о том, что пик с m/z 14 630 является, по всей видимости, продуктом распада молекулярного иона, соответствующего δ -субъединице (пик с m/z 15064). В пользу этого предположения говорит тот факт, что данный пик присутствует в обоих спектрах и, следовательно, имеет отношение только к субъединицам F_1 -комплекса.

Образцы для масс-спектрометрического анализа немодифицированного F_0F_1 -комплекса готовили аналогично образцам модифицированного фермента, но при приготовлении липосом к смеси липидов не добавляли фотоактивируемого гидрофобного зонда. После делипидизации протеолипосом смесью хлороформ – метанол и последующего осаждения белкового осадка в масс-спектре последнего (рис. 1, a) идентифицируются пики, соответствующие молекулярным ионам следующих субъединиц

* Здесь и далее в скобках указано отношение молекулярная масса/заряд (m/z).

фермента: ϵ (5679), f (10 355), g (11 333), δ (15 110), d (18731), $оср$ (20 992), a (24 773), γ (30 382), β (51 497), α (55 199). Кроме того, как и в случае стандарта, α - и β -субъединицы в условиях получения данного масс-спектра, образуют двузарядные ионы (пики с m/z 27 628 (α -субъединица), 25 871 (β -субъединица)). b -Субъединица присутствует в масс-спектре только в форме двузарядного иона (пик с m/z 12403). Пик с m/z 17 360 соответствует трехзарядному иону β -субъединицы. Субъединица с (7628) в масс-спектре присутствует в виде кластерного иона $[M + Na]^+$. При сравнении масс-спектров стандарта и фракции белкового осадка после делипидизации отмечено отсутствие в последнем пиков с m/z 8964 (соответствует субъединице F6), m/z 7969 8964 (соответствует субъединице A6L) и неидентифицированного нами пика с m/z 22 893. В масс-спектре гидрофобного супернатанта (не приводится) идентифицированы пики, соответствующие молекулярному (24 725) и двузарядному (12 503) ионам a -субъединицы, c -субъединица в данном масс-спектре образует кластерный ион $[M + K]^+$ (7650) и двузарядный ион (3843). Пик с m/z 15 353 соответствует молекулярному иону δ -субъединицы.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ этой фракции показал, что при делипидизации смесью хлороформ – метанол (1:2) в гидрофобный супернатант частично экстрагируются субъединицы a и c , а также субъединица δ .

Для анализа модифицированного фермента был использован F_0F_1 -комплекс, встроенный в липосомы, содержащие Dcp-OU-PC и Dcp-AD-PC наряду с другими липидами. В масс-спектре фракции белкового осадка модифицированного фермента присутствует полный набор пиков, характерных для аналогичной фракции немодифицированного F_0F_1 -комплекса (рисунок, б). Необходимо отметить отсутствие пиков, соответствующих двузарядным ионам

α - и b -субъединиц, которые присутствовали в спектрах стандарта и белкового осадка немодифицированного F_0F_1 -комплекса (рисунок, а). Субъединица с (7649) в масс-спектре присутствует в виде кластерного иона $[M + K]^+$.

Наряду с пиками, описанными выше, в масс-спектре белкового осадка модифицированного фермента отмечено появление пиков, которые отсутствовали в контрольных экспериментах (рисунок, б). Так появление пика с m/z 8305 можно объяснить присоединением одной молекулы липида (Dcp-OU-PC или Dcp-AD-PC) к c -субъединице (m/z 7649), что является доказательством непосредственного контакта олигомера c -субъединиц в составе F_0 с мембранным бислоем, это подтверждает модель, поддерживаемая рядом исследователей [15, 16]. Появление плохо разрешенного пика в районе 14 000 m/z , а также отсутствие пика, соответствующего двузарядному иону b -субъединицы, позволило сделать вывод о модификации фотоактивируемым липидным зондом b -субъединицы F_0F_1 -комплекса и, следовательно, о ее непосредственном контакте с липидами, что также подтверждает эту модель строения АТФ-азы, в которой субъединицы a и b помещены снаружи c_{12} -олигомера. Отсутствие модификаций низкомолекулярных субъединиц, например A6L, а также a -субъединицы можно объяснить либо недостаточной концентрацией продуктов кросс-сшивок, либо затруднениями при их анализе методом MALDI- масс-спектрометрии.

В масс-спектре гидрофобного супернатанта модифицированного F_0F_1 -комплекса (не приводится) также отмечено появление пиков, которые отсутствовали в контрольных экспериментах. Наличие пика с m/z 8095 можно объяснить присоединением одной молекулы фотоактивируемого зонда к c -субъединице (m/z 7642), что также является подтверждением непосредственного контакта c -субъединицы в составе F_0 с мембранным бислоем.

Работу проводили при поддержке фонда INTAS (грант INTAS96-1633)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boyer P.D. // Annu. Rev. Biochem. 1997. **66**. P. 717.
2. Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R., Walker J.E. // Nature. 1994. **370**. P. 621.
3. Crane G., Green D. // Biochim. Biophys. Acta. 1956. **22**. P. 1087.
4. Senior A.E. // J. Bioenergetics. 1971. **2**. P. 141.
5. Serrano R., Kanner B.J., Raker E.J. // J. Biol. Chem. 1976. **251**. P. 2453.
6. Horstman, G., Racker E. // J. Biol. Chem. 1970. **245**. P. 1336.
7. Белогрудов Г.И., Кан Е.Ф., Ильина Т.И., Муравьева Т.И., Гринкевич В.А. // Биол. мембраны. 1990. **7**. С. 213.
8. Белогрудов Г.И., Ильина Е.Ф., Гринкевич В.А., Модянов И.Н. // Биол. мембраны. 1988. **5**. С. 677.
9. Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G. // Tetrahedron Lett. 1994. **35**. P. 1933; **44**. P. 8062 (correction).
10. Водовозова Е.Л., Цибизова Е.В., Молотковский Ю. Г. // Био-орган. химия. 1998. **24**. С. 316.
11. Friedl P., Schairer H.U. // Meth. Enzymol. 1986. **126**. P. 579.
12. Manniate M., Lesieur C., Vescey-Semjen B., Buckley J.T., Pattus F., Goot F.J. van der, Dorsselaer A. van // International mass-spectrometry and Ion processes. 1997. **160–170**. P. 179.
13. Hess H.H., Lees M.B., Derr J.E. // Anal. Biochem. 1978. **85**. P. 295.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. **227**. P. 680.
15. Engelbrecht S., Junge W. // FEBS Lett. 1997. **414**. P. 485.
16. Groth G., Walker J.E. // FEBS Lett. 1997. **410**. P. 117.