

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ НЕБИСЛОЙНЫХ СТРУКТУР В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АТФ-СИНТАЗЫ В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ

© 2016 г. С.Э. Гасанов, А.А. Ким, Р.К. Дагда*

Филиал Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
100060, Ташкент, просп. А. Тимура, 22а, Узбекистан

E-mail: sardargasnov61@gmail.com

*Департамент фармакологии, Школа медицины университета Невады,
ул. Норд Виржиния, 1664, Рино, Невада 89557, США

E-mail: rdagda@medicine.nevada.edu

Поступила в редакцию 24.06.15 г.

Методом ^{31}P -ЯМР исследовано влияние температуры и действия мембрано-активного белка СТИ на полиморфные превращения фосфолипидов в мембранах митохондрий. Впервые показано, что образование в мембранах митохондрий небислоино упакованных фосфолипидов с иммобилизованной подвижностью молекул сопровождается ростом активности АТФ-синтазы. Также методом компьютерного моделирования исследовано взаимодействие важных фосфолипидов, найденных в мембранах митохондрий, с молекулярной поверхностью белка СТИ, поведение которого в липидной фазе похоже на поведение дициклогексилкарбодимидсвязывающего белка группы F_0 . Предлагается существование в мембранах митохондрий тороидных пор протонной проводимости, образованных из небислоино упакованных фосфолипидов, подвижность которых иммобилизована взаимодействием с дициклогексилкарбодимидсвязывающим белком. Предполагается, что транспорт протонов по градиенту концентрации через транзитные тороидные поры проводимости может индуцировать конформационные изменения субъединиц комплекса F_0 - F_1 , необходимые для каталитической активности АТФ-синтазы.

Ключевые слова: ^{31}P -ЯМР, фосфолипиды мембран митохондрий, АТФ-синтаза.

Молекулярный механизм синтеза АТФ в митохондриальных мембранах активно исследуется в течение последних 30 лет [1]. Структура субъединиц группы F_1 АТФ-синтазного комплекса достаточно хорошо изучена, в то время как организация субъединиц группы F_0 , которая локализуется во внутренней мембране митохондрий, не выяснена в полной мере [2]. Неясными остаются структурные аспекты транспорта протонов H^+ из межмембранного пространства в матрикс митохондрий, индуцирующие структурные изменения субъединиц группы F_0 , которые приводят во вращение «ротор» АТФ-синтазного комплекса [3]. В настоящей работе исследуется связь между АТФ-синтазной активностью митохондрий и изменениями в упаковке фосфолипидов в мембранах митохондрий, которые вызываются либо изменением температуры или действием мембраноактивного белка яда кобры (СТИ), который, находясь в липидной фазе, взаимодействует с фос-

фолипидами таким же образом, как и дициклогексилкарбодимидсвязывающий белок (ДЦКД-СБ) группы F_0 [4]. Также в данной работе методом компьютерного моделирования исследуется взаимодействие найденных в мембранах митохондрий липидов – фосфатидилхолина, кардиолипина, фосфатидной кислоты и фосфатидилсерина – с молекулярной поверхностью СТИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии сердца быка и белок СТИ яда кобры получали, как описано ранее [5]. Дициклогексилкарбодимидсвязывающий белок, который входит в состав группы F_0 и вовлечен в транспорт протонов [6], выделяли из митохондрий по методике, описанной в работе [7]. Связывание ДЦКД-СБ с дициклогексилкарбодимидом определяли по методике [8]. АТФ-синтазную активность митохондрий определяли по методике [9]. Чувствительность активности АТФ-синтазы к олигомицину определяли добавлением в митохондрии 5 нМ олигомицина из *Streptomyces diastatochromogenes*

Сокращения: СТИ – мембраноактивный белок яда кобры, ДЦКД-СБ – дициклогексилкарбодимидсвязывающий белок, МЛЛ – мультиламеллярные липосомы.

(Sigma-Aldrich, США, степень очистки $\geq 95\%$ по данным HPLC). Образцы мультиламеллярных липосом (МЛЛ), содержащих природные фосфолипиды (65 мол.% фосфатидилхолина, 6 мол.% фосфатидной кислоты, 4 мол.% фосфатидилсерина и 25 мол.% кардиолипина, Sigma Chemical Co, США), готовили по методике [10]. Встраивание ДЦКД-СБ и СТП в МЛЛ осуществляли высушиванием липидов и белков в водно-метанольной фазе в вакууме, после чего высушенную пленку гидратировали по методике [10]. ^{31}P -ЯМР-спектры митохондрий и МЛЛ регистрировали, как описано ранее [5]. Координаты пространственной структуры СТП получили из PDB-банка (PDB ID# 1CB9), минимизацию энергии структуры СТП проводили, как описано ранее [11]. PDB-координаты кардиолипина были извлечены из кристаллической структуры оксиредуктазы из бычьего сердца, связанной с кардиолипином (PDB ID# 1V54). PDB-координаты фосфатидилхолина извлечены из кристаллической структуры белка PIP (phosphatidylinositol transfer protein), связанного с фосфатидилхолином (PDB ID# 1T27). PDB координаты фосфатидилсерина извлечены из кристаллической структуры белка Tim-4 (T-cell immunoglobulin mucin protein 4), связанного с фосфатидилсеринем (PDB ID# 3BIB). Координаты пространственной структуры фосфатидной кислоты были любезно предоставлены доктором И.Х. Шриваставой (Dr. I. N. Shrivastava) из Департамента вычислительной и системной биологии Питсбургского университета (Пенсильвания, США). Стыковку молекулярных поверхностей фосфолипидов с СТП проводили при помощи программы AutoDockVina Version 4.2, как описано ранее [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

^{31}P -ЯМР-спектр митохондрий при 5°C свидетельствует о бислойной упаковке фосфолипидов в митохондриальных мембранах (рис. 1). Увеличение температуры до 15°C привело как к образованию двух «небислойных» сигналов (сигнала А при 0 м.д. и сигнала В, чуть смещенного от сигнала А в сильное поле), так и к трехкратному увеличению АТФ-синтазной активности. Добавление 9×10^{-4} М СТП в митохондрии при 15°C привело к увеличению интенсивности ^{31}P -ЯМР-сигналов А и В (в большей степени сигнала В) и к последующему двукратному увеличению АТФ-синтазной активности. Добавление 9×10^{-4} М ДЦКД-СБ в митохондрии при 15°C не вызвало изменений ^{31}P -ЯМР-спектра и не повлияло на значение активности АТФ-синтазы (рисунок не приводится). Увеличение температу-

ры в митохондриях, не содержащих СТП или ДЦКД-СБ, от 15 до 37°C сопровождалось увеличением интенсивности «небислойных» сигналов и ростом активности АТФ-синтазы (рис. 1). При 43°C наблюдалось заметное увеличение сигнала А и уменьшение активности АТФ-синтазы. Добавление 5 нМ олигомицина в образцы митохондрий, содержащих и не содержащих ДЦКД-СБ или СТП, полностью ингибировало синтез АТФ. Подавление высокопольного ^{31}P -ЯМР-сигнала ламеллярной фазы при помощи импульсной последовательности DANTE [12] привело к исчезновению как сигнала ламеллярной фазы, так и сигнала А, но не к исчезновению сигнала В (спектры не приводятся). Это указывает на то, что фосфолипиды, отвечающие за сигнал В, не обмениваются с фосфолипидами ламеллярной фазы [5]. В митохондриях без СТП интегральная интенсивность сигнала В, сохранившегося после применения импульсной последовательности DANTE, увеличилась при 20°C по сравнению с 15°C в 1,7 раза, при 37°C – в 2,35 раза и при 43°C – в 2,33 раза. При 15°C интегральная интенсивность сигнала В увеличилась в митохондриях, содержащих СТП, по сравнению с митохондриями без СТП в два раза. Увеличение интегральной интенсивности сигнала В при повышении температуры от 15°C до 37°C в митохондриях с и без СТП очень близко соответствует увеличению активности АТФ-синтазы в тех же образцах митохондрий. Встраивание как СТП, так и ДЦКД-СБ в мембраны МЛЛ, которые сравнимы по фосфолипидному составу с внутренней мембраной митохондрий [13], привело к появлению «небислойных» ^{31}P -ЯМР-сигналов А и В (рис. 2). При этом интегральные интенсивности сигналов В в спектрах образца МЛЛ с СТП и образца МЛЛ с ДЦКД-СБ, сохранившиеся после применения импульсной последовательности DANTE, были практически идентичными. Стыковка поверхностей фосфатидилхолина, фосфатидной кислоты, фосфатидилсерина и кардиолипина с поверхностью СТП методом AutoDockVina выявила девять наиболее энергетически оптимальных конформаций связывания, в которых фосфолипиды взаимодействуют с белком посредством ионных, ион-дипольных, водородных и гидрофобных взаимодействий. В случае с кислыми фосфолипидами были выявлены неожиданные конформации (наиболее преобладающие с фосфатидной кислотой), в которых преобладали силы связывания алкильных цепей липидов с гидрофобными участками поверхности СТП. При этом полярные группы головок липидов ориентировались перпендикулярно длинной оси молекулы СТП и в сторону от поверхности СТП (рис. 3).

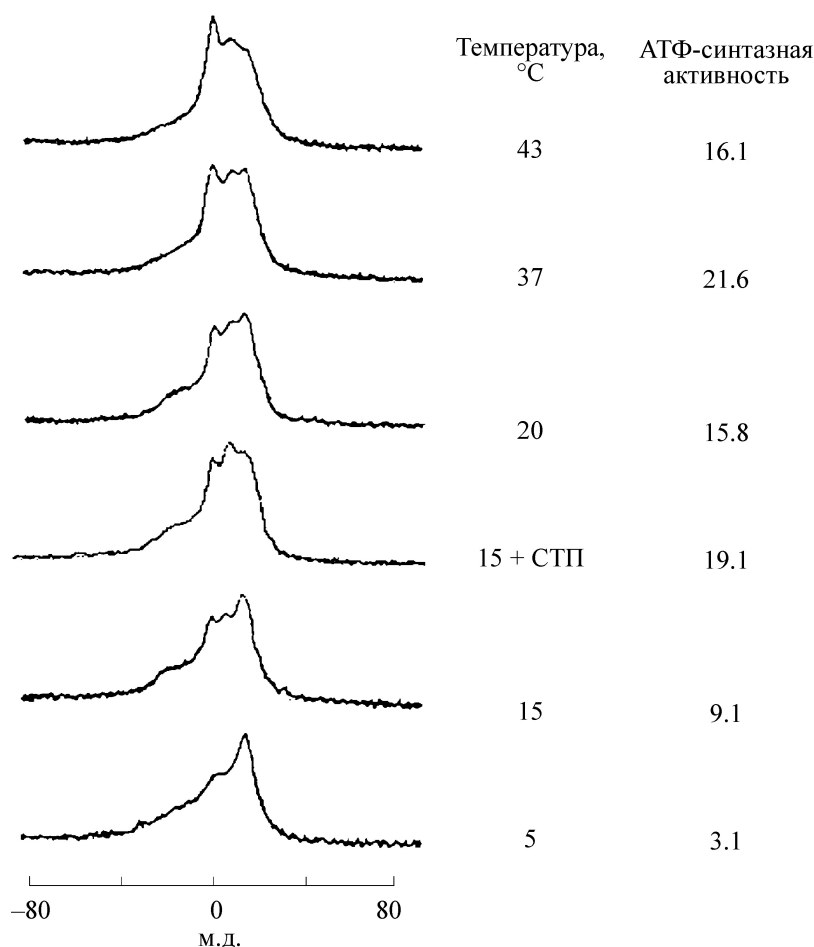


Рис. 1. Полиморфные превращения упаковки фосфолипидов митохондрий и активность АТФ-синтазы как функция температуры и действия 9×10^{-4} М СТП. Концентрация фосфолипидов в митохондриях, которую определяли сравнением интегральных интенсивностей ^{31}P -ЯМР-сигналов митохондрий и контрольного образца МЛЛ, составляла $6,3 \times 10^{-2}$ М. Вариация в концентрации фосфолипидов между образцами митохондрий не превышала 8%. ^{31}P -ЯМР-сигналы органических фосфатов нелипидной природы в митохондриях подавляли при помощи импульсной последовательности DANTE [12], что не влияло на ^{31}P -ЯМР-сигналы фосфатных групп фосфолипидов мембран митохондрий. Активность АТФ-синтазы выражена в мкМ синтезированного АТФ в минуту на мг белка. Каждое значение активности АТФ-синтазы представляет среднее арифметическое, полученное из трех независимых образцов митохондрий с отклонением от среднего не более 4% для всех значений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что фосфолипиды с быстрой во временной шкале ЯМР изотропной подвижностью отвечают за ^{31}P -ЯМР-сигнал А, в то время как фосфолипиды с иммобилизованным движением и изотропной ориентацией осей фосфатной группы отвечают за ^{31}P -ЯМР-сигнал В [4,5]. Сигнал В наблюдается как в митохондриях при 15°C и при большей температуре (рис. 1), так и в МЛЛ со встроенным ДЦКД-СБ (рис. 2). Это позволяет предположить, что как в митохондриях, так и в МЛЛ с ДЦКД-СБ движение изотропно ориентированных фосфолипидов, отвечающих за сигнал В, иммобилизовано взаимодействием с ДЦКД-СБ – белком группы F_0 , вовлеченным в транс-

порт протонов. Также сигнал В при 37°C свидетельствует, что небислойные структуры, отвечающие за этот сигнал, являются физиологической нормой мембран митохондрий. Увеличение температуры в митохондриях приводит к росту активности АТФ-синтазы и к увеличению в ^{31}P -ЯМР-спектрах митохондрий интегральной интенсивности сигнала В, что, очевидно, обусловлено взаимодействием большего числа фосфолипидов с ДЦКД-СБ группы F_0 . При 43°C наблюдается значительный рост ^{31}P -ЯМР-сигнала А (рис. 1), свидетельствующий об увеличении популяции фосфолипидов с быстрой изотропной подвижностью. Это, очевидно, нарушает барьерные свойства мембран митохондрий и приводит к падению активности АТФ-синтазы. Интересным фактом является то,

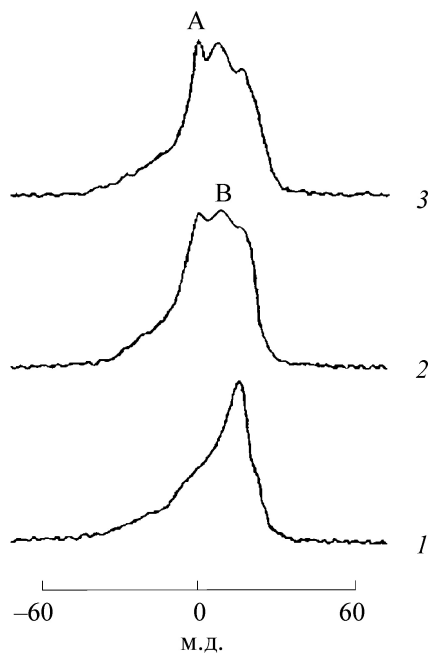


Рис. 2. ^{31}P -ЯМР-спектры мультислойных липосом при 15°C : 1 – ^{31}P -ЯМР-спектр контрольного образца МЛЛ; 2 – ^{31}P -ЯМР-спектр МЛЛ со встроенным ДЦКД-СБ; 3 – ^{31}P -ЯМР-спектр МЛЛ со встроенным СТИ. Липосомы содержали фосфатидилхолин, фосфатидную кислоту, фосфатидилсерин и кардиолипин в молярном отношении 6,5; 0,6; 0,4 и 2,5 соответственно. Общая концентрация фосфолипидов в МЛЛ составляла 65 мМ. Молярное отношение белок:липид в образцах МЛЛ (2 и 3) составляло 0,005, что рассчитано из учета молекулярной массы ДЦКД-СБ в 8 кДа и СТИ – 7 кДа.

что СТИ – амфифильный белок со способностью проникать в межмембранное пространство митохондрий [4,5] – вызывает рост интенсивности «небислойного» сигнала В, что сопровождается ростом АТФ-синтазной активности (рис. 1). По всей видимости, эти эффекты связаны со взаимодействием СТИ с кислыми фосфолипидами, непосредственно контактирующими с белками группы F_0 [14]. При добавлении ДЦКД-СБ в митохондрии подобные эффекты не наблюдаются, видимо, потому, что гидрофобный ДЦКД-СБ, находясь в водном растворе, не способен взаимодействовать с мембранами митохондрий. Однако ^{31}P -ЯМР-спектр МЛЛ, в мембраны которых встроен ДЦКД-СБ из водно-метанольного раствора, очень схож со ^{31}P -ЯМР-спектром МЛЛ, в мембраны которых встроен СТИ (рис. 2). Интегральные интенсивности сигналов В как образца МЛЛ с ДЦКД-СБ, так и образца МЛЛ с СТИ были практически идентичными. Это позволяет предположить, что, находясь в мембране, ДЦКД-СБ и СТИ имеют схожие области на их молекулярной поверхности, которые связывают фосфолипиды,

образуя популяцию небислойно упакованных фосфолипидов с иммобилизованной подвижностью. Ранее было установлено, что СТИ локализуется в бислое с ориентацией длинной молекулярной оси СТИ параллельно алкильным цепям липидов и перпендикулярно поверхности мембраны [4]. Предложенные при помощи программы AutoDockVina гипотетические конформации взаимодействия кислых фосфолипидов с СТИ, в которых длинные оси полярных головок липидов ориентируются перпендикулярно длинной оси СТИ в сторону от поверхности СТИ (это наиболее наглядно видно в случае с фосфатидной кислотой на рис. 3), должны дестабилизировать бислойную упаковку липидов и стимулировать образование тороидальных пор проводимости [5,15]. Структура тороидальных пор с небислойной упаковкой липидов, подвижность которых иммобилизована взаимодействием с СТИ [5], полностью согласуется с ^{31}P -ЯМР-сигналом В как в митохондриях, так и МЛЛ. Наличие сигнала В также и в ^{31}P -ЯМР-спектре МЛЛ со встроенным ДЦКД-СБ предполагает, что ДЦКД-СБ тоже способен индуцировать образование тороидальных пор, которые во внутренних мембранах митохондрий могут служить каналами протонной проводимости. Транспорт протонов из межмембранного пространства в матрикс митохондрий через тороидальные поры, образованные липидами, непосредственно связанными с ДЦКД-СБ группы F_0 , может индуцировать конформационные изменения белков группы F_0 , приводящие во вращения «ротатор» F_0 - F_1 -комплекса, что необходимо для освобождения АТФ из активных центров в комплексе F_1 [2]. Возможно, что уменьшение значений рН в межмембранном пространстве за счет работы электрон-транспортной цепи внутренней мембраны митохондрий способствует образованию/открыванию тороидальных пор, которые в открытом состоянии пропускают H^+ обратно в матрикс, восстанавливая исходное значение рН в межмембранном пространстве и бислойную упаковку внутренней мембраны митохондрий, т.е. закрывая тороидальные поры. Таким образом, циклы открывания/закрывания тороидальных пор представляют собой циклы полиморфных превращений бислойной/небислойной упаковки фосфолипидов, что индуцируют циклы конформационных изменений белков группы F_0 , объясняя циклический характер работы АТФ-синтазы. Вероятно, образованию тороидальных пор способствует как наличие в мембране таких белков, как ДЦКД-СБ и СТИ, так и градиент концентрации протонов по обе стороны мембраны. Необходимо отметить, что СТИ только при

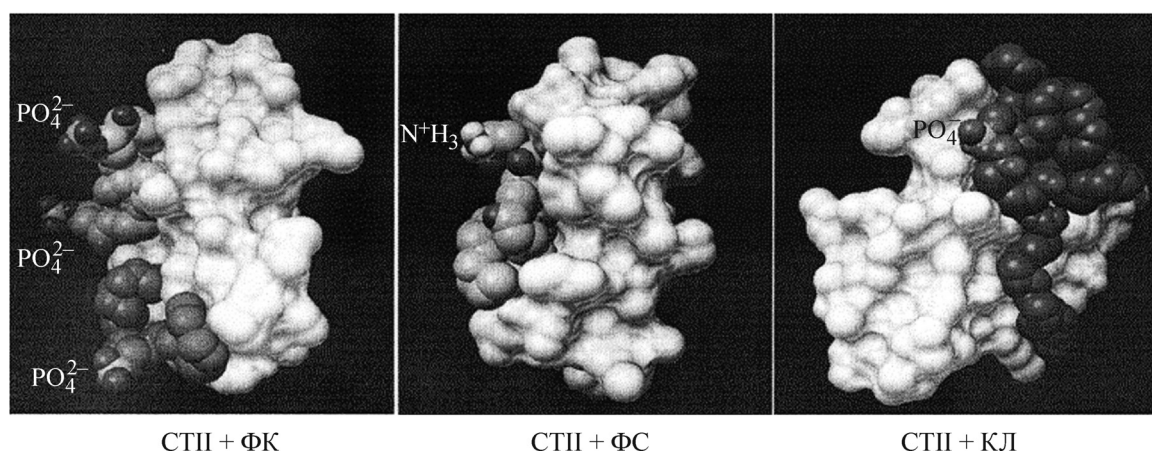


Рис. 3. Модели взаимодействия фосфолипидов фосфатидной кислоты, фосфатидилсерина и кардиолипина с молекулярной поверхностью мембрано-активного белка СТП, полученные при помощи программы AutoDock-Vina. На рисунке справа показано взаимодействие трех молекул фосфатидной кислоты с СТП, в центре – взаимодействие одной молекулы фосфатидилсерина с СТП, слева – взаимодействие одной молекулы кардиолипина с СТП. Молекулярная поверхность СТП показана белым цветом.

низких концентрациях и низкой температуре (15°C) способствует образованию пор проводимости, сопряженных с синтезом АТФ, по-видимому, за счет дополнительной индукции полиморфных превращений липидов, непосредственно связанных с белками группы F_0 . При высоких концентрациях и высокой температуре (37°C) СТП вызывает лизис мембран и падение активности АТФ-синтазы [4]. Факт существования в мембранах митохондрий транзитных тороидальных пор протонной проводимости, регулирующих синтез АТФ, безусловно требует прямого экспериментального подтверждения. Однако предлагаемые в данной работе транзитные поры, образованные липидами, а не белками, могут объяснить факт того, что многочисленные кристаллографические, ЯМР-, люминесцентные и другие исследования сфокусированные на белковых субъединицах фермента, до сих пор не выявили убедительную и полную картину структурных деталей протонного канала АТФ-синтазы [1,2]. Представляется логичным, что необходимо сконцентрировать больше усилий на исследовании структурных аспектов липидной фазы мембран митохондрий, непосредственно связанной с белками группы F_0 .

ВЫВОДЫ

В настоящей работе впервые показано, что образование в мембранах митохондрий небислойных структур с иммобилизованной подвижностью фосфолипидов сопровождается ростом активности АТФ-синтазы. Предполагается, что небислойно упакованные фосфолипиды, связанные силами гидрофобного взаимодействия с

белком/белками группы F_0 во внутренней мембране митохондрий, могут служить структурными элементами транспорта протонов, способствующими работе АТФ-синтазы.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Университета Невады в Рино, США (грант International Activities Grant IAG-2014) и Национального института здоровья США (грант NIH GM103554).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Kocherginski, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **99**, 20 (2009).
2. R. K. Nakamoto, J.A.B. Scanlon, and M. K. Al-Shawi, *Arch. Biochem. Biophys.* **476** (1), 43 (2008). doi:10.1016/j.abb.2008.05.004.
3. J. Weber, *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1162 (2006).
4. S. E. Gasanov, R. K. Dagda, and E. D. Rael, *J. Clin. Toxicol.* **4**, 181 (2014). doi:10.4172/2161-0495.1000181.
5. S. E. Gasanov, I. H. Shrivastava, F. S. Israilov, et al., *PLoS ONE* **10** (6): e0129248 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0129248.
6. R. H. Fillingame, *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1079 (1980).
7. Н. К. Сегаль, С. Э. Гасанов, Л. А. Паламарчук и др., *Биохимия* **58** (11), 1812 (1993).
8. W. Sebald, T. Graf, and H. B. Lukins, *Eur. J. Biochem.* **93**, 587 (1979).
9. K. Y. Hara and H. Mori, *J. Biomol. Screen.* **11** (3), 310 (2006).
10. S. E. Gasanov, L. P. Vernon, and T. F. Aripov, *Arch. Biochem. Biophys.* **301** (2), 367 (1993).
11. R. K. Dagda, S. E. Gasanov, B. Zhang, et al., *J. Biol. Phys.* **40** (2):193 (2014). doi:10.1007/s10867-013-9339-3.

12. B. De Kruijff, G. A. Morris, and P. R. Culliss, *Biochim. Biophys. Acta* **598**, 206 (1980). 14. S. E. Gasanov, M. A. Alsarraj, N. E. Gasanov, et al., *J. Membrane Biol.* **150**, 132 (1997).
13. H. A. Schwertner and J. B. Biale, *J. Lipid Res.* **14** (2), 235 (1973). 15. S. Wi and C. Kim., *J. Phys. Chem. B* **112** (36), 1140 (2008).

Possible Role of Nonbilayer Structures for Regulating Activity of ATP Synthase in Mitochondrial Membranes

S.E. Gasanov*, A.A. Kim*, and R.K. Dagda**

**Moscow State University Branch, prosp. A. Timura 22a, Tashkent, 100060 Uzbekistan*

***Department of Pharmacology, University of Nevada, School of Medicine, 1664 North Virginia St., Reno, Nevada, 89557 USA*

In this work the influence of temperature and action of membrane-active protein CTII on formation of nonbilayer structures in mitochondrial membranes is studied by ^{31}P -NMR. It is shown for the first time that formation in mitochondrial membranes of nonbilayer packed phospholipids with immobilized molecular mobility is accompanied by an increase in ATP synthase activity. The interaction of important phospholipids found in mitochondrial membranes with the molecular surface of CTII, a protein which behaves in a lipid phase like the DCCD-binding protein of F_0 group, is also studied by the means of computer modeling. An existence in mitochondrial membranes of the proton permeability toroidal pores formed from nonbilayer packed phospholipids, mobility of which is immobilized by interaction with the DCCD-binding protein, has been suggested. It is assumed that proton transport by concentration gradient through the transit toroidal permeability pores may induce conformational changes in the subunits of F_0 - F_1 complex necessary for catalytic activity of ATP synthase.

Key words: ^{31}P -NMR, phospholipids of mitochondrial membranes, ATP synthase