

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ F_1 -АТФазы ХЛОРОПЛАСТОВ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ТИОЛ-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИЕЙ И $MgADP$ -ЗАВИСИМОЙ ИНАКТИВАЦИЕЙ

© 2018 г. А.Н. Мальян, В.К. Опанасенко

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2

E-mail: alexander.malyan@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.18 г.

Методом спектрофотометрического титрования исследовано состояние тирозиновых остатков сопрягающего фактора хлоропластов CF_1 . Показано, что часть тирозиновых остатков CF_1 депротонируется при значениях рН среды значительно ниже рК свободного тирозина. Доля таких остатков зависит от состояния фермента и состава реакционной среды. CF_1 , γ -субъединица которого содержит дисульфидный мостик, характеризуется максимальным количеством таких остатков. Восстановление мостика приводит к снижению их количества и соответствующему возрастанию остатков, депротонируемых при рН выше рК тирозина. Минимальное количество остатков, диссоциирующих в интервале рН 6,0–9,0, наблюдается, когда в реакционной среде присутствуют Mg^{2+} или $MgADP$. Предполагается, что изменения рК тирозиновых остатков являются следствием появления в их окружении или удалением из него положительно заряженных аминокислотных остатков, что в свою очередь указывает на изменения третичной структуры фермента. Депротонирование значительной части тирозиновых остатков в присутствии Mg^{2+} или $MgADP$ происходит в необычно узком интервале рН и свидетельствует о кооперативном переходе в новое состояние фермента. Сопоставление с проведенными ранее кинетическими исследованиями приводит к выводу, что характер титрования и соответствующая структура CF_1 -АТФазы, проявляющиеся в присутствии Mg^{2+} или $MgADP$, вызываются обратимой инактивацией в результате связывания $MgADP$ с одним каталитическим и одним «некаталитическим» центрами.

Ключевые слова: сопрягающий фактор хлоропластов CF_1 , тиол-зависимая активация, $MgADP$ -зависимая инактивация.

DOI: 10.1134/S0006302918050083

Сопрягающий фактор хлоропластов (CF_1) является водорастворимой частью интегрированного в мембрану АТФ-синтазного комплекса, осуществляющего фотофосфорилирование АДФ. Будучи изолирован в водную фазу, CF_1 катализирует гидролиз АТФ. Структура CF_1 включает три α, β -гетеродимера, окружающих двойную N-, C-концевую спираль γ -субъединицы, δ -субъединицу, соединяющую CF_1 с мембранной частью комплекса, и ϵ -субъединицу, выполняющую роль ингибитора. На границах раздела α - и β -субъединиц расположены три каталитических и три «некаталитических» нуклеотидсвязывающих центра. По современным представлениям, F_1 -АТФазы хлоропластов, митохондрий и бактерий могут рассматриваться как трехфазные роторные двигатели, поскольку последовательный гидролиз трех молекул АТФ

на трех каталитических центрах связан с вращением γ -субъединицы на 360° [1,2]. Наряду с каталитическим механизмом в рамках CF_1 реализуются два механизма, регулирующих АТФ-азную и АТФ-синтазную активность комплекса. Оба механизма предназначены для подавления его каталитической активности в условиях, когда низкая величина индуцированного светом электронного транспорта не создает трансмембранный потенциал протонов, достаточный для синтеза АТФ. В этих условиях происходит образование дисульфидного мостика из двух соседних тиоловых групп глобулярной части γ -субъединицы, которое вызывает изменение конформации ϵ -субъединицы и тем самым подавляет активность фермента [3].

Второй механизм реализуется, если на одном из каталитических центров во время функционирования фермента остается АДФ в отсутствие фосфата. При низкой величине трансмембранного градиента протонов или в его отсутствие (в случае CF_1) начинается процесс

Сокращения: CF_1 – сопрягающий фактор хлоропластов, ДТТ – дитиотрейтол.

инактивации фермента. Анализ кинетики инактивации показал, что наряду с прочным связыванием АДФ с одним из каталитических центров происходит увеличение сродства АТФ ко второму центру и потеря сродства нуклеотидов к третьему центру [4]. В результате образуется структура с двумя каталитическими центрами, связывающими соответственно АДФ и АТФ, и одним вакантным центром. Образование подобной структуры применительно к митохондриальному F₁ в условиях, способствующих инактивации, позднее было показано с помощью рентгеноструктурного анализа [5]. Пригодные для такого анализа кристаллы CF₁ получить не удалось. Процесс инактивации CF₁ специфичен к ионам Mg²⁺ [6], зависит от соотношения АДФ и АТФ на «некаталитических» центрах [7,8] и обращается при связывании на этих центрах оксианионов [9,10].

Основной объем исследований структурных изменений CF₁, выполненных к настоящему времени, связан с изучением эффектов активации фермента, вызываемой градиентом электрохимического потенциала протонов и теплом [11]. Изменениям структуры, связанным с восстановлением/окислением дисульфидного мостика и MgАДФ-зависимой инактивацией, посвящено ограниченное количество работ. В частности, показано изменение доступности α- и γ-субъединиц трипсину при восстановлении дисульфидного мостика (12–14). В работе, выполненной методом потенциометрического титрования, в отсутствие Mg²⁺ удалось зафиксировать индуцированные АДФ изменения констант диссоциации аминокислотных остатков аспаргиновой и глутаминовой кислоты [15]. Учитывая, что обратимая инактивация CF₁ требует присутствия как магния, так и АДФ, в указанных исследованиях не удалось выявить специфические изменения структуры, соответствующие взаимопревращениям высоко- и низкоактивных состояний фермента.

В настоящей работе для оценки изменений структуры фермента, вызываемых его взаимодействием с различными лигандами, использовали изменение оптической плотности остатков тирозина при депротонировании его гидроксильных групп в результате защелачивания реакционной среды [16]. Целесообразность такого подхода определяется значительным количеством тирозиновых остатков (102 Туг/моль CF₁ [11]), основная часть которых расположена в нуклеотидсвязывающих доменах α- и β-субъединиц. Ранее с помощью такого подхода было показано, что тирозиновые остатки фермента могут быть разделены на несколько групп, различающихся доступностью водной среде [16].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хлоропласты получали из свежих листьев шпината. Сопрягающий фактор CF₁ изолиро-

вали по методу Биндера с соавт. [17]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [18]. Фермент освобождали от сульфата аммония и избытка нуклеотидов форсированной гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 Fine. После выдерживания при рН 6,0 в течение 15 мин проводили титрование растворами КОН при температуре 25°C в реакционной среде объемом 3 мл с использованием рН-метра рН-262. В состав среды входили трис-НСl (4 мМ), морфолиноэтансульфоновая кислота (1 мМ), КСl (10 мМ), а также, в зависимости от цели эксперимента, MgCl₂, CaCl₂, АДФ или АТФ – как описано в подписях к рисункам. Содержание белка в среде составляло 110–180 мкг/мл. Восстановление дисульфидного мостика в γ-субъединице CF₁ (тиоловую активацию) проводили инкубацией фермента в присутствии 50 мМ дитиотреитола (ДТТ) в течение 2 ч при комнатной температуре [19]. Ca²⁺-зависимая АТФазная активность ДТТ-активированного фермента при 37°C составляла 2,5 мкмоль мин⁻¹·мг⁻¹, Mg²⁺-зависимая активность в отсутствие стимуляторов – 0,27, а в присутствии 50 мМ K₂SO₃ и 10% C₂H₅ОН – 28 мкмоль мин⁻¹·мг⁻¹. О диссоциации тирозиновых остатков судили по изменению оптической плотности реакционной среды при длине волны 294 нм, характерной для депротонированной ОН-группы тирозина [16]. Определение проводили с помощью спектрофотометра Shimadzu 1201, принимая за нулевую отметку оптическую плотность при рН 6,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как следует из расчетов, при рН 12 тирозин на 99% находится в диссоциированной форме (рK' = 10,07 [20]), поэтому по достижении рН 12 титрование считали законченным, принимая оптическую плотность растворов белка при 294 нм равной 0,99. Как видно на рис. 1 (кривые 1 и 2), профили кривых титрования тирозиновых остатков ДТТ-активированного белка и свободного тирозина существенно отличаются. Принимая во внимание различия в доступности тирозиновых остатков CF₁ водной среде [16], исследовали влияние скорости титрования на характер получаемых кривых. При быстром титровании (продолжительность титрования 52 мин) в области рН 7,0–9,0 титруются около 10% тирозиновых остатков, что значительно больше титруемых в этом интервале гидроксильных групп свободного тирозина. Основная часть остатков титруется при значениях рН примерно на 0,5 выше, чем для остатков свободного тирозина. При медленном титровании (135 мин) количество тирозиновых остатков белка, титруемых при рН ниже 9, увеличивается. В широком интервале рН (7,0–11,7) кривая титрования возрастает плавно, без перегибов, достигая насыщения при рН 12. Такой характер

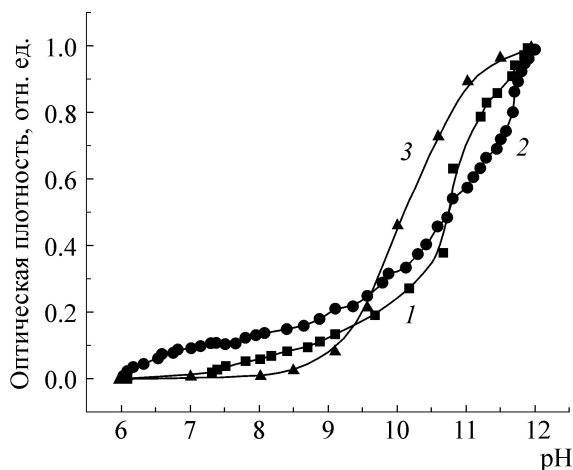


Рис. 1. Влияние скорости титрования на характер кривых, отражающих диссоциацию тирозиновых остатков ДТТ-активированного CF_1 . 1 – продолжительность титрования 52 мин; 2 – продолжительность титрования 135 мин; 3 – свободный тирозин.

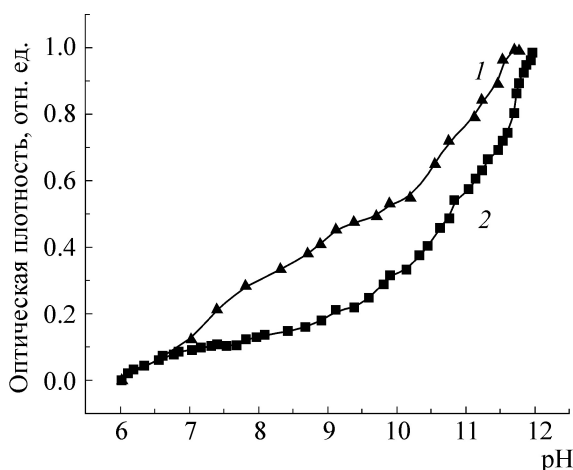


Рис. 2. Влияние окислительно/восстановительного состояния γ -субъединицы CF_1 на характер кривых титрования. 1 – исходный CF_1 ; 2 – ДТТ-активированный CF_1 .

титрования позволяет предполагать, что его скорость не лимитируется доступностью остатков. Этот режим титрования использовали в последующих опытах. Профиль кривой титрования оказался весьма чувствительным к окислительно/восстановительному состоянию γ -субъединицы фермента: как видно из рис. 2, восстановление дисульфидного мостика в результате преинкубации фермента с ДТТ сопровождается значительным увеличением кажущегося значения pK большинства тирозиновых остатков.

Чтобы выяснить взаимосвязь $MgADP$ -зависимой инактивации фермента с изменениями его структуры, мы сопоставили кривые титро-

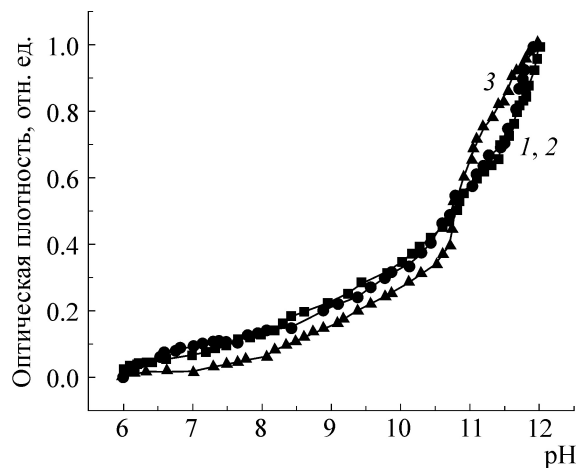


Рис. 3. Влияние Ca^{2+} или Mg^{2+} на характер титрования ДТТ-активированного CF_1 . 1 – в отсутствие Me^{2+} ; 2 – в присутствии 0,5 мМ $CaCl_2$; 3 – в присутствии 0,5 мМ $MgCl_2$.

вания CF_1 в присутствии ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , $MgADP$, $MgATP$ и свободного нуклеотида. Ранее было показано, что в присутствии Ca^{2+} и свободных нуклеотидов имеет место активная форма CF_1 -АТФазы, тогда как в присутствии Mg^{2+} и $MgADP$ – низкоактивная [6,21]. Как следует из рис. 3, характер кривых титрования в присутствии $CaCl_2$ и $MgCl_2$ существенно различается. Введение ионов Ca^{2+} практически не влияет на титрование белка (кривые 1 и 2). В присутствии ионов Mg^{2+} кривая титрования становится неоднородной (кривая 3). Количество остатков, диссоциирующих при pH менее 10,7, уменьшается, тогда как при pH более 10,7 – возрастает, причем в узком интервале значений pH 10,7–11,0 диссоциирует около 30% остатков тирозина (в случае свободного тирозина титруется лишь 15% остатков). Доля диссоциирующих в этом интервале остатков возрастает до 60% при одновременном присутствии 50 мкМ АДФ и 0,5 мМ $MgCl_2$ (рис. 4, кривые 1, 2). В присутствии АДФ, но в отсутствие магния этот эффект не наблюдается (кривая 3). Представлялось интересным выяснить насколько наблюдаемый эффект специфичен к нуклеотиду. На рис. 5 представлено титрование CF_1 в присутствии 0,5 мМ Mg^{2+} и 50 мкМ или 0,5 мМ АТФ (кривые 1 и 2 соответственно). Первая кривая напоминает кривую, полученную в присутствии магния и АДФ, отличаясь несколько меньшим количеством остатков, титруемых в интервале pH 10,7–11,1 (37%). При увеличении АТФ до 0,5 мМ такой участок отсутствует. Проведенное параллельно определение содержания нуклеотидов показало, что уже к середине опыта при низком содержании АТФ более 90% превращается в АДФ, тогда как при высоком содержании основная часть нуклеотида сохраняется в виде АТФ. Принимая во внимание высокую величину константы комплексо-

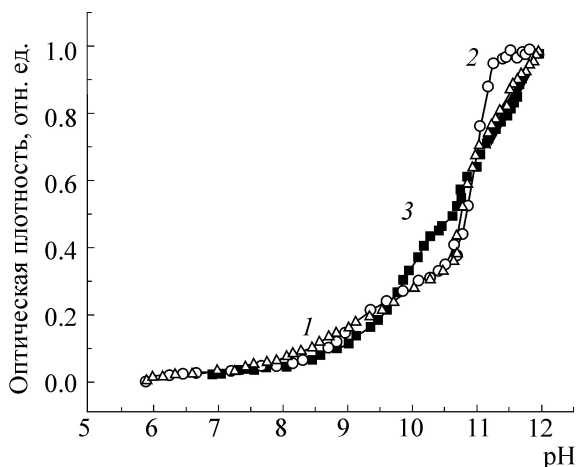


Рис. 4. Влияние MgАДФ и свободного АДФ на характер титрования ДТТ-активированного CF₁. 1 – 0,5 мМ MgCl₂; 2 – 50 мкМ АДФ и 0,5 мМ MgCl₂; 3 – 50 мкМ АДФ.

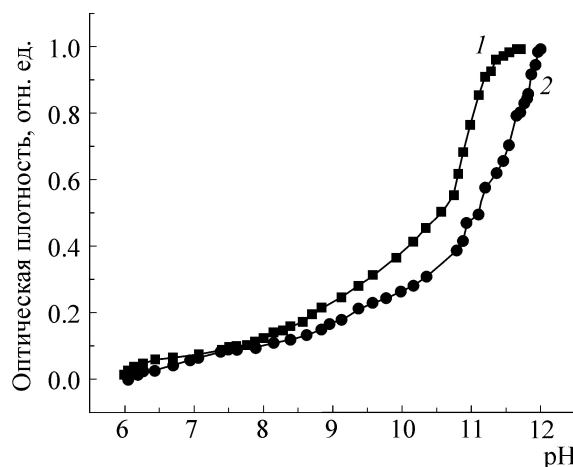


Рис. 5. Титрование ДТТ-активированного CF₁ в присутствии 50 мкМ АДФ и 0,5 мМ MgCl₂ (1), или 0,5 мМ АДФ и 0,5 мМ MgCl₂ (2).

образования Mg²⁺ и АДФ, можно допустить, что агентом, непосредственно вызывающим инактивацию фермента в присутствии этих реагентов, очевидно, является MgАДФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что определенная часть тирозиновых остатков CF₁ характеризуется аномально низкими значениями рК. Такое снижение рК может вызываться расположением этих остатков в областях с высокой плотностью положительных зарядов, т.е. в областях, включающих остатки лизина (К) и аргинина (R) [22]. В аминокислотных последовательностях 3α и 3β субъединиц имеются 12 участков, в которых тирозиновый (Y) остаток соседствует с лизиновыми или аргининовыми остатками (α251YR, α270YR, β161RR, β397RYK). Следует, однако, отметить, что количество остатков тирозина, диссоциирующих в интервале рН 6,0–9,0, сильно зависит от состава реакционной среды. Максимальное количество остатков, характеризующихся низкими значениями рК, наблюдается в случае неактивного фермента, содержащего γ-субъединицу, тиольные группы С199 и С205 которой образуют дисульфидный мостик (рис. 2, кривая 1). Восстановление мостика с переходом фермента в активное состояние в результате его инкубации с дитиотрептолом приводит к снижению количества диссоциирующих остатков (рис. 2, кривая 2). Минимальное количество таких остатков остается при введении в состав среды ионов Mg²⁺ или MgАДФ. Изменения рК тирозина, вызываемые появлением в его окружении или удалением из него положительно заряженных аминокислотных остатков, очевидно, являются следствием струк-

турных перестроек фермента. Судя по количеству остатков с измененным рК, эти перестройки значительны. Такой вывод согласуется с данными, полученными методом направленного мутагенеза при изучении окислительно-восстановительных переходов γ-субъединицы [23]. В то же время приведенные выше результаты, в отличие от данных работы [23], указывают на существенные различия в конформациях ингибированного окислением тиолов и MgАДФ-ингибированного фермента (рис. 2 и 4).

Другой особенностью титрования фермента в присутствии Mg²⁺ и MgАДФ является появление остатков, которые диссоциируют в необычно узком, по сравнению со свободным тирозином, интервале рН. Как указано выше, доля таких остатков достигает 30% в присутствии Mg²⁺ и 60% в присутствии MgАДФ (рис. 4). Можно предположить, что диссоциация таких остатков отражает кооперативный переход от одной конформации фермента к другой по достижении критического рН, величина которого в экспериментах, представленных на рис. 3 и 4, составляет 10,7. Сравнение с результатами кинетических исследований свидетельствует о четкой корреляции между условиями, приводящими к обратимой инактивации CF₁-АТФазы, и условиями, вызывающими кооперативные перестройки. Последние не наблюдаются в отсутствие Me²⁺ или в присутствии Ca²⁺ или свободных нуклеотидов, и так же, как и процесс инактивации, проявляются только в присутствии Mg²⁺ или MgАДФ. Различия в характере кривых, получаемых в двух последних случаях (рис. 4, кривые 1 и 2), особенно заметные в интервале рН 11,0–12,0, указывают на различия в конформациях фермента. Эти различия можно объяснить следующим образом. После отделения свободных нуклеотидов гель-фильтрацией CF₁ содержит АДФ, прочно связанный с одним из каталитических цен-

тров [24]. Инкубация в присутствии Mg^{2+} приводит к образованию на этом центре $MgADP$ [25]. Введение в среду 50 мкМ АДФ вызывает связывание еще одного моля АДФ на «некаталитическом» центре [7,26]. Таким образом, появление кооперативно диссоциирующих остатков тирозина при введении в среду Mg^{2+} коррелирует с образованием комплекса магния с прочно связанным АДФ на каталитическом центре, а дальнейшее увеличение их доли – со связыванием АДФ с «некаталитическим» центром.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinoshita, *Nature* **386**, 299 (1997).
2. M. Futai, M. Nakanishi-Matsui, H. Okamoto, et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1711 (2012).
3. Schmidt, V. Beilsten-Edmands, S. Mohammed, and C. V. Robinson, *Scientific Reports* **7**, Article number: 44068 (2017).
4. A. N. Malyan and O. I. Vitseva, *Photosynthetica* **24** (4), 613 (1990).
5. J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker, *Nature* **370**, 621 (1994).
6. A. N. Mal'yan, *Photosynthetica* **15** (4), 474 (1981).
7. A. N. Malyan and W. S. Allison, *Biochim. Biophys. Acta* **1554**, 153 (2002).
8. A. N. Malyan, *Photosynth. Res.* **105**, (2010).
9. А. Н. Мальян и Е. А. Акулова, *Биохимия* **43** (7), 1206 (1978).
10. A. N. Malyan, *Biochim. Biophys. Acta* **1607**, 161 (2003).
11. N. Nelson, *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 314 (1976).
12. J. Schumann, M. L. Richter, and R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.* **260**, 11817 (1985).
13. K. E. Hightower and R. E. McCarty, *Biochemistry* **35**, 4846 (1996).
14. A. N. Malyan, *Photosynth. Res.* **61**, 1 (1999).
15. О. Н. Губанова, В. К. Опанасенко и А. Н. Мальян, *Биохимия* **59** (3), 410 (1994).
16. S. Lien, R. Berzborn, and E. Racker, *J. Biol. Chem.* **247**, 3520 (1972).
17. A. Binder, A. Jagendorf, and E. Ngo, *J. Biol. Chem.* **253**, 3094 (1978).
18. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
19. A. N. Malyan and O. I. Vitseva, *Biochemistry (Moscow)* **66** (4), 505 (2001).
20. Ф. Л. Калинин, В. П. Лобов и В. А. Жидков, *Справочник по биохимии* (Наук. думка, Киев, 1971).
21. А. Н. Мальян и О. И. Вицева, *Биохимия* **48** (5), 718 (1983).
22. С. Бернхард, *Структура и функция ферментов* (Мир, М., 1971).
23. F. Buchert, H. Konno, and T. Hisabori, *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 441 (2015).
24. Z. Xue, and P. D. Boyer, *Eur. J. Biochem.* **179**, 677 (1989).
25. R. I. Feldman, and P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **260** (24), 13088 (1985).
26. А. Н. Мальян, *Успехи биол. химии* **53**, 297 (2013).

Conformational Changes of Chloroplast F₁-ATPase Caused by Thiol-Dependent Activation and MgADP-Dependent Inactivation

A.N. Malyan and V.K. Opanasenko

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The state of tyrosine residues of the chloroplast coupling factor CF_1 was studied by spectrophotometric titration. It was shown that some tyrosine residues of CF_1 undergo deprotonation at medium pH values that are much lower than pK of free tyrosine. The number of such residues depends on both the enzyme conformational state and the medium composition. They are abundant in CF_1 whose γ -subunit contains a disulfide bridge. Reduction of this bridge results in a decrease of their number and, accordingly, an increase of the number of residues that undergo deprotonation at pH exceeding tyrosine pK . The minimal number of residues dissociating within the 6.0–9.0 pH range was observed in a reaction mixture containing Mg^{2+} or $MgADP$. It is assumed that changes in the pK values for tyrosine residues are the result of the presence or absence in close vicinity of positively charged amino acid residues, leading to an alteration in the tertiary structure of the enzyme. Deprotonation of a considerable portion of tyrosine residues in the presence of Mg^{2+} or $MgADP$ occurs within an unusually narrow range of pH, which is evidence for a cooperative transition to a new conformational state of the enzyme. When comparing data obtained and our previous kinetics data, it can be concluded that the titration characteristics and the corresponding structure of CF_1 -ATPase observed in the presence of Mg^{2+} or $MgADP$ are the result of reversible inactivation caused by $MgADP$ binding to one catalytic site and one non-catalytic site.

Keywords: chloroplast coupling factor CF_1 , thiol-dependent activation, $MgADP$ -dependent inactivation