

УДК 576.311.342.6

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ РАСТВОРОВ ТРЕГАЛОЗЫ НА ГИДРОЛИЗ АТФ F_1 -АТФазой ХЛОРОПЛАСТОВ

© 2019 г. Н.С. Новичкова, А.Н. Мальян

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2*

E-mail: alexander.malyan@gmail.com

Поступила в редакцию 12.08.2019 г.

Поступила в редакцию 12.08.2019 г.

После доработки 12.08.2019 г.

Принята к публикации 06.09.2019 г.

Исследовано влияние вязкости растворов трегалозы на кинетику гидролиза АТФ CF_1 -АТФазой (F_1 -АТФазой хлоропластов гороха). Включение трегалозы в реакционную среду вызывает двоякий эффект: стимуляцию Mg-зависимой активности фермента при концентрациях до 20 вес. % и подавление активности – при более высоких. Ca^{2+} -зависимая активность CF_1 с увеличением концентрации трегалозы убывает монотонно. Показано, что стимуляция Mg-зависимой активности фермента обусловлена ослаблением MgАДФ-зависимой инактивации фермента. В условиях, когда инактивацией можно пренебречь, увеличение концентрации трегалозы вызывает снижение максимальной скорости гидролиза АТФ и возрастание кажущейся константы Михаэлиса. Увеличение значения константы Михаэлиса и снижение активности фермента показывают, что доставка субстратов реакции и конформационные изменения молекулы CF_1 -АТФазы, сопровождающие гидролиз, тормозятся вязкостью среды, причем чем выше вязкость, тем сильнее ее влияние. Согласно теории Крамера, потери энергии на взаимодействие со средой позволяют сделать вывод, что энергетическая эффективность CF_1 -АТФазы в реакции гидролиза АТФ не достигает 100%.

Ключевые слова: сопрягающий фактор хлоропластов CF_1 , F_1 -АТФаза хлоропластов, гидролиз АТФ, MgАДФ-зависимая инактивация, вязкость.

DOI: 10.1134/S0006302919060024

F_1 -АТФаза хлоропластов (сопрягающий фактор CF_1) является экспонированной в строму каталитической частью АТФ-синтазы, ответственной за производство энергетической валюты фотосинтезирующей клетки – АТФ. Подобно F_1 -АТФазам бактерий и митохондрий она состоит из чередующихся 3α - и 3β -субъединиц, расположенных вокруг двойной спирали γ -субъединицы [1,2], а также одной δ - и одной ϵ -субъединицы. На границах раздела α - и β -субъединиц расположены три каталитических и три регуляторных («некаталитических») нуклеотидсвязывающих центра [3]. Каталитические центры функционируют согласованно и последовательно: на одном из них происходит связывание АТФ, на другом – гидролиз, а на третьем – диссоциация продуктов реакции [4]. В водных растворах CF_1 -АТФаза проявляет Ca^{2+} -зависимую активность. Изначально более высокая Mg $^{2+}$ -зависимая активность CF_1 -

АТФазы быстро ($\sim 10 \text{ мин}^{-1}$) подавляется в результате образования прочного комплекса MgАДФ с одним из каталитических центров, сопровождающегося возрастанием сродства к АТФ второго центра и диссоциацией нуклеотида с третьего центра [5]. Прочность комплекса и соответственно его степень инактивации ослабляются в результате связывания оксианионов и нуклеотидов с «некаталитическими» центрами [6], а также введения в реакционную среду полярных растворителей или некоторых детергентов [7,8]. Превращение трех молекул АТФ вызывает вращение γ - и ϵ -субъединиц относительно α , β -гетеротримера на 360° [9]. Таким образом, F_1 -АТФазы могут рассматриваться как роторные двигатели, преобразующие химическую энергию АТФ в механическую энергию вращения γ - и ϵ -субъединиц. В АТФ-синтазах описанный выше этап дополняется следующим этапом преобразования энергии – превращением энергии вращения γ -, ϵ - и c -субъединиц в трансмембранный потенциал протонов – при гидролизе АТФ или же превращением транс-

Сокращения: CF_1 – сопрягающий фактор хлоропластов.

мембранного потенциала в энергию вращения — при фотофосфорилировании.

В последние годы интенсивно обсуждается энергетическая эффективность преобразования энергии АТР-синтазами и, в частности, F_1 -АТФазами. Ряд исследователей утверждают, что энергетическая эффективность достигает 100% [10–12]. Другие авторы, основываясь на деталях механизма вращения γ -, ϵ - и c -субъединиц, оспаривают это утверждение [13–15]. В настоящей работе для оценки эффективности превращения энергии на этапе гидролиза АТФ CF_1 -АТФазой мы использовали вискозиметрический анализ. Анализ основан на теоретических подходах Крамерса, который указал на возможные потери энергии при конформационных изменениях белковой молекулы в результате трения со средой [16]. Позднее для качественной оценки этих потерь было предложено соотношение, учитывающее возрастание потерь с увеличением вязкости среды:

$$k \sim (\eta/\eta_0)^{-n}, \quad (1)$$

где k — константа скорости реакции, η и η_0 — вязкость реакционной среды в присутствии и в отсутствие вискозогена, $0 < n < 1$ [17]. Чем больше n , тем сильнее влияние вязкости среды на конформационные изменения фермента в ходе реакции. В качестве вискозогенов используют такие соединения, как сахароза, глицерин, трегалоза и некоторые другие [18]. Помимо влияния на активность фермента, вискозиметрический анализ позволяет оценить диффузионное торможение реакции на стадиях связывания субстратов, которое приводит к возрастанию кажущейся константы Михаэлиса (K_m). Возрастание K_m было обнаружено в реакции циклического фотофосфорилирования при введении в реакционную среду полиэтиленгликоля, декстрана или сахарозы [19] и в катализируемой CF_1 -АТФазой реакции гидролиза АТФ в присутствии сахарозы или альбумина. В описываемом ниже исследовании в качестве вискозогена мы использовали трегалозу. Известно, что трегалоза синтезируется различными организмами для стабилизации белков и мембран в стрессовых условиях и быстро гидролизуетея по окончании стресса [20]. В частности, трегалоза увеличивает устойчивость растений к действию тяжелых металлов, влиянию засухи и засоленности почвы. Недавно было показано, что трегалоза стимулирует выделение кислорода препаратами фотосистемы II и защищает от фотоингибирования лишённые Mn препараты этой системы [21,22].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сопрягающий фактор хлоропластов гороха получали по методу Биндера с соавт. [23]. Концентрацию белка определяли по методу Бред-

форд [24]. Фермент освобождали от сульфата аммония и избытка нуклеотидов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 Fine. Тиоловую активацию проводили инкубацией фермента в присутствии 50 мМ дитиотреитола в течение 2 ч при температуре 20°C. Реакцию проводили в термостатированном сосуде при той же температуре и перемешивании магнитной мешалкой в среде объемом 0,5 мл, содержащей 50 мМ трицина—KOH, 0,25 мМ $MgCl_2$, 75 мМ K_2SO_3 , 10 об. % C_2H_5OH , 1,5–3,0 мкг/мл CF_1 , MgАТФ или Са-АТФ и трегалозу. Продолжительность инкубации (10–20 мин) и концентрацию белка подбирали таким образом, чтобы превращение АТФ не превышало 10%. В качестве субстрата реакции использовали эквимолекулярную смесь $MgCl_2$ или $CaCl_2$ и АТФ. Для демаскирования Mg-зависимой АТФазной активности CF_1 в среду включали оптимальные концентрации стимуляторов — K_2SO_3 и этанола [25]. Скорость гидролиза АТФ определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. С этой целью 15 мкл реакционной среды наносили на колонку DEAE 5PW размерами 0,5 × 7,5 см, уравновешенную 120 мМ NaCl и 80 мМ KH_2PO_4 (pH 4,0), и определяли содержание АДФ и АТФ по площади соответствующих пиков. Значения вязкости растворов трегалозы определяли интерполяцией данных [26]. Аппроксимацию получаемых зависимостей и расчет кинетических параметров реакции проводили с помощью компьютерной программы Origin 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Варьирование концентрации трегалозы проводили в пределах 0–35 вес. %, что соответствовало вязкости 1–5 сП [26]. При концентрации MgАТФ, равной 3,5 мМ, увеличение концентрации трегалозы первоначально вызывало возрастание скорости гидролиза АТФ и только при концентрациях более 20 вес. % скорость реакции снижалась (рис. 1, кривая 1). В том же интервале концентраций трегалозы Ca^{2+} -зависимая активность снижалась монотонно (рис. 1, кривая 3). Поскольку продукт гидролиза СаАДФ, в отличие от MgАДФ, не вызывает инактивации, можно было предположить, что стимулирующее действие трегалозы вызвано снижением прочности неактивного комплекса MgАДФ с ферментом, дополнительно к действию сульфита и этанола (см. введение). С целью проверки этого предположения мы сравнили ингибирующее действие ионов магния на Ca^{2+} -зависимую активность CF_1 -АТФазы в присутствии и в отсутствие 20% трегалозы. Как видно на рис. 2, в присутствии трегалозы ингибирование магнием снижается, что указывает на

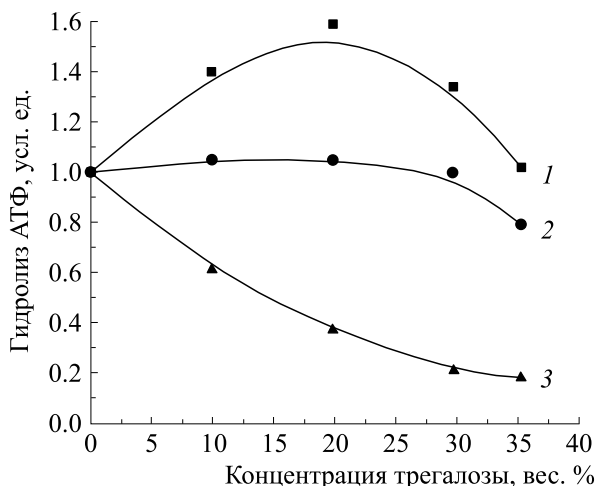


Рис. 1. Влияние концентрации трегалозы на скорость гидролиза АТФ: 1 – 3,5 мМ MgАТФ; 2 – 0,5 мМ MgАТФ; 3 – 4 мМ СаАТФ. За единицу принята скорость реакции, равная $6,5 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ (1), $3,5 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ (2) и $0,4 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ (3).

ослабление MgАДФ-зависимой инактивации фермента. Следует отметить, что выбранные нами для преодоления MgАДФ-зависимой инактивации концентрации сульфита и этанола являются оптимальными, так как дальнейшее их увеличение в случае сульфита ведет к ингибированию, а в случае этанола – к необратимой инактивации фермента [25]. Расчеты показывают, что при уменьшении концентрации MgАТФ в реакционной среде концентрации свободного магния, а следовательно, и концентрации MgАДФ должны

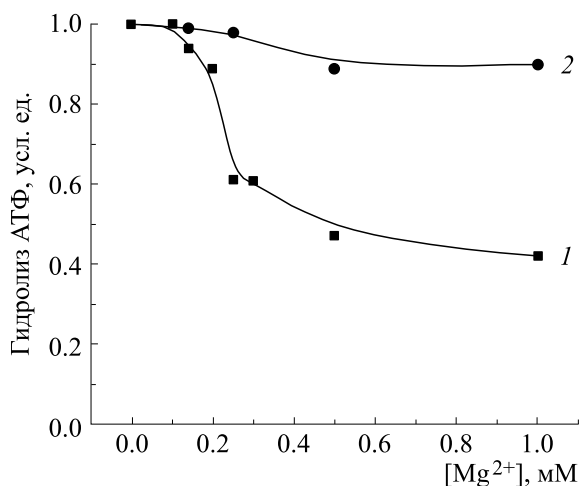


Рис. 2. Влияние 20 вес. % трегалозы на ингибирование Са-зависимого гидролиза АТФ ионами Mg^{2+} : 1 – в отсутствие трегалозы; 2 – в присутствии 20% трегалозы. За единицу принята скорость реакции, равная $0,36 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ (1) и $0,11 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ (2) при концентрации СаАТФ, равной 4 мМ.

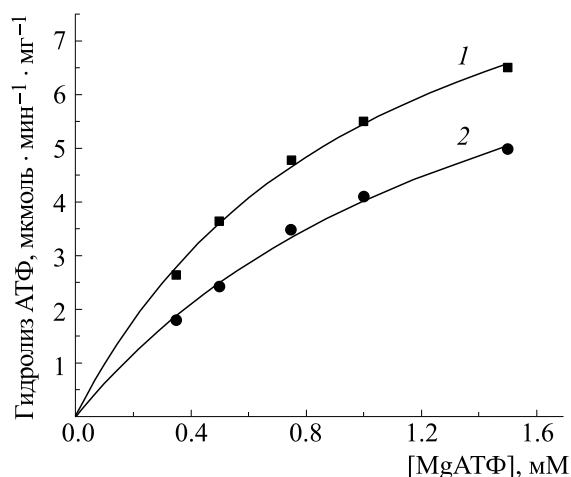


Рис. 3. Зависимости скорости гидролиза АТФ от концентрации MgАТФ в отсутствие (1) и в присутствии (2) 35% трегалозы.

снижаться [27]. В согласии со сделанным предположением при низких концентрациях MgАТФ заметной стимуляции гидролиза не наблюдается (рис. 1, кривая 2). Поэтому при определении кинетических параметров гидролиза АТФ для снижения концентрации свободного магния мы ограничивались концентрацией MgАТФ, равной 1,8 мМ. Зависимости скорости реакции от концентрации MgАТФ в отсутствие и в присутствии 35% трегалозы описываются уравнением Михаэлиса–Ментен при максимальной скорости реакции $V_{\text{max}} = 11,3 \pm 0,9 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ и $V_{\text{max}} = 9,3 \pm 0,5 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ соответственно (рис. 3). Как следует из рис. 4, максимальные скорости реакции с увеличением концентраций трегалозы монотонно снижаются, что указывает на влияние вязкости среды на активность фермента. В координатах « $\ln V_{\text{max}} - \ln \eta$ » эта зависимость описывается соотношением (1) при значении $n = 0,13$ (рис. 5). Показанное на рис. 4 (кривая 2) возрастание кажущейся константы Михаэлиса с увеличением концентрации трегалозы указывает на диффузионное торможение реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показывают результаты исследования, включение трегалозы в реакционную среду вызывает двойкий эффект: стимуляцию активности фермента при низких ее концентрациях и подавление активности – при высоких. Эффект стимуляции трегалозой согласуется с ослаблением ингибирования CF₁-АТФазы MgАДФ. Ранее было обнаружено, что аналогичным образом стимулируется Mg-зависимая АТФазная активность CF₁

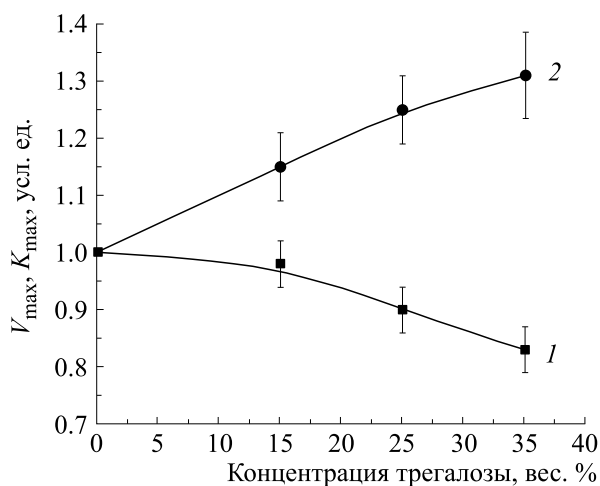


Рис. 4. Зависимости максимальной скорости гидролиза АТФ (V_{\max}) и кажущейся константы Михаэлиса (K_m) реакции от концентрации трегалозы. За единицу принята максимальная скорость, равная $11,2 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ (1), и константа Михаэлиса, равная $1,03 \text{ мМ}$ (2).

при введении в реакционную среду содержащих ОН-группы соединений – спиртов и флавонолов [25,28]. Трегалоза содержит несколько таких групп, поэтому ее стимулирующий эффект не является неожиданным. Он может вызываться взаимодействием ОН-групп с полярными аминокислотными остатками молекулы фермента. Аналогичным образом, по-видимому, объясняется более слабо выраженный стимулирующий эффект сахарозы, обнаруженный ранее [29].

Снижение сродства АТФ к ферменту (увеличение кажущегося значения K_m), так же как и снижение его активности, показывает, что доставка субстратов реакции и конформационные изменения молекулы CF_1 -АТФазы, сопровождающие гидролиз, тормозятся вязкостью среды, причем чем выше вязкость, тем ее влияние сильнее. В соответствии с современными представлениями о молекулярном механизме функционирования F_1 -АТФаз, наиболее выраженные конформационные изменения связаны с вращением γ - и ε -субъединиц, поступательно-возвратным движением С-концевой части β -субъединицы и, возможно, движением С-концевого участка ε -субъединицы [2,30].

Представлялось интересным сопоставить использованные в опытах значения вязкости с вязкостью стромы хлоропластов. Литературные данные о вязкости стромы весьма противоречивы. Согласно работе [31], она в 65 раз превышает вязкость воды. Эта величина согласуется с данными о высокой концентрации белка в строме. Ряд авторов сообщает, что она составляет от 100 до 300 мг/мл при содержании свободных белков около 40% от общего количества [32–35]. С другой стороны, коэффициент диффузии матрикса

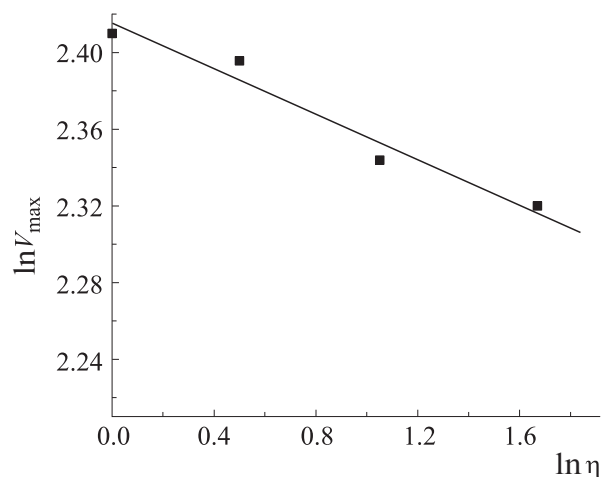


Рис. 5. Зависимость скорости гидролиза АТФ от вязкости реакционной среды в логарифмических координатах.

митохондрий – органелл, выполняющих ту же функцию, что и хлоропласты – лишь в три-четыре раза меньше, чем в воде [36]. Многочисленные данные о вязкостях жидкостей, принадлежащих другим органеллам, находятся в пределах 2–11 сП [18]. Несмотря на отмеченные противоречия, эти данные указывают, что вязкость стромы хлоропластов существенно выше вязкости воды.

Принимая во внимание результаты настоящего исследования, функционирование CF_1 -АТФазы со 100%-й эффективностью представляется маловероятным. Формальным показателем этого служит значение $n = 0,13 > 0$ в соотношении (1). Еще более высокое значение n получено при изучении кинетики гидролиза АТФ в растворах сахарозы [37]. Представляется, что завышенная оценка энергетической эффективности функционирования F_1 -АТФаз авторами работы [12], несмотря на методическое совершенство их исследования, обусловлена тем, что измерения проводились в условиях термодинамического равновесия реакции, т. е. в условиях, когда изменение свободной энергии гидролиза АТФ равно нулю.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания №АААА-А17-117030110135-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, and M. Futai, *Biochim. Biophys. Acta* **1857** (2016) 129.
2. A. Hahn, J. Vonck, D. J. Mills, et al., *Science* **360** (6389), eaat4318 (2018).
3. J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker, *Nature* **370**, 621 (1994).
4. P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **277**, 39045 (2002).
5. А. Н. Мальян и О. И. Вицева, *Биохимия* **48**, 718 (1983).
6. A. N. Malyan and W. S. Allison, *Biochim. Biophys. Acta* **1554**, 153 (2002).
7. А. Н. Мальян, *Биохимия* **45**, 1731 (1980).
8. U. Pick and S. Bassilian, *Biochemistry* **21**, 6144 (1982).
9. H. Noji, R. Yasuda, and K. Kinosita, *Nature* **386**, 299 (1997).
10. H. Itoh, A. Takahashi, K. Adachi, et al., *Nature* **427**, 465 (2004).
11. S. Toyabe, T. Watanabe-Nakayama, T. Okamoto, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 17951 (2011).
12. N. Soga, K. Kimura, K. Kinosita, Jr., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114** (19), 4960 (2017).
13. J. L. Martin, R. Ishmukhametov, T. Hornung, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **111**, 3715 (2014).
14. B. Chapman and D. Loisel, *R. Soc. Open Sci.* **3**, 150379 (2016).
15. O. Kulish, A. D. Wright, and E. M. Terentjev, *Sci. Rep.* **6**, 28180 (2016).
16. H. A. Kramers, *Physica* **7**, 284 (1940).
17. A. E. Sitnitsky, *Biophys. Struct. Mech.* **4**, 37 (2010).
18. E. O. Puchkov, *Biochemistry (Moscow), Suppl. ser. A: Membrane and Cell Biology* **7**, 270 (2013).
19. И. М. Карташев, В. К. Опанасенко и А. Н. Мальян, *Биофизика* **60**, 481 (2015).
20. J. E. Lunn, I. Delorge, C. M. Figueroa, et al., *Plant J.* **79**, 544 (2014).
21. М. Д. Мамедов, И. О. Петрова, Д. В. Яныкин и др., *Биохимия* **80**, 79 (2015).
22. D. V. Yanykin, A. A. Khorobrykh, M. D. Mamedov and V. V. Klimov, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **164**, 236 (2016). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.027.
23. A. Binder, A. Jagendorf, and E. Ngo, *J. Biol. Chem.* **253**, 3094 (1978).
24. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
25. A. N. Malyan, *Photosynthetica* **15**, 474 (1981).
26. W. C. Parker, N. Chakraborty, R. Vrikkis, et al., *Optic Express* **18**, 16607 (2010).
27. А. Н. Мальян и А. Д. Макаров, *Биохимия* **41**, 1087 (1976).
28. А. Н. Мальян, Е. А. Акулова и Е. Н. Музафаров, *Биоорганическая химия* **3**, 639 (1977).
29. A. N. Malyan, *Photosynth. Res.* **128**, 163 (2016).
30. I. Yamato, Y. Kakinuma, and T. Murata, *Biophys. Physicobiol.* **13**, 37 (2016).
31. K. Asada, in *Photosynthesis and the Environment*, Ed. by N. R. Baker (Kluwer Acad. Publ., Dordrecht–Boston–London, 2004), pp. 123–150.
32. F. Menke and G. Menke, *Protoplasma* **46**, 536 (1956).
33. J. T. O. Kirk, *The plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance* (London–San Francisco, 1967).
34. R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **4**, 241 (1979).
35. R. O. Wayne, *Plant Cell Biology: from astronomy to zoology* (Elsevier, 2009).
36. A. S. Verkman, *Trends Biochem. Sci.* **27**, 27 (2002).
37. A. N. Malyan, *Photosynthetica* **56**, 1365 (2018).

Effect of Trehalose Solution Viscosity on ATP Hydrolysis by Chloroplast F₁-ATPase

N.S. Novichkova, and A.N. Malyan

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

The effect of trehalose solution viscosity on ATP hydrolysis kinetics by CF₁-ATPase (pea chloroplast F₁-ATPase) was studied. Trehalose added to the reaction mixture had a double effect: Mg-dependent enzyme activity was stimulated when the trehalose content was less than 20% and suppressed at higher trehalose levels. Ca-dependent activity of CF₁ decreases monotonically with increasing trehalose content. It was shown that stimulation of the Mg-dependent enzyme activity was a result of diminution of MgADP-dependent enzyme inactivation. In case of negligible inactivation, the elevated trehalose content caused a decrease in the maximum rate of ATP hydrolysis and the value of the apparent Michaelis constant increased. Changes in the value of Michaelis constant and in the enzyme activity indicate that the delivery of reaction substrates and hydrolysis-accompanying conformational changes in CF₁-ATPase are hampered by medium viscosity. According to Cramer's rule, energy loss via interaction with the medium, it can be concluded that the efficiency of energy conversion by CF₁-ATPase never reaches 100%.

Keywords: chloroplast coupling factor CF₁, chloroplast F₁-ATPase, ATP hydrolysis, MgADP-dependent inactivation, viscosity