АТРазы F1Fo-ТИПА ИЗ МИТОХОНДРИЙ, ХЛОРОПЛАСТОВ И БАКТЕРИИ

Большинство бактерии, а также митохондрии и хлоропласты содержат родственные АТРазы FiFo-типа, которые используют трансмембранный протонный электрохимический градиент для синтеза АТР из ADP и неорганического фосфата. В физиологических условиях эти ферменты являются АТР-синтазами. Они содержат от 8 (*E. coli)* до 13 (митохондрии сердца быка) различных субъединиц и, таким образом, являются гораздо более сложными структурами, чем АТРазы E1E2-типа из плазматических мембран. АТРазы F1Fo-типа состоят из двух частей: 1) гидрофильного глобулярного F1-комплекса, содержащего места связывания нуклеотидов и функционирующего в качестве АТРазы, и 2) мембраносвязанного Fo-комплекса, который функционирует как H^+-проводящий канал. F1- и Fo-комплексы могут отсоединяться друг от друга, а после очистки их можно реконструировать с восстановлением функциональной активности.

Fi-комплекс из *E. coli* содержит пять субъединиц в стехиометрии (альфа3-вета3-гамма-сигма-эпсилон. Между тремя парами альфа-бета в составе Fi наблюдается асимметрия, возникающая, по всей вероятности, в результате асимметричных взаимодействий с другими субъединицами. В составе каждого комплекса имеется по три каталитических центра, и для быстрого оборота фермента необходимо, чтобы АТР был связан более чем с одним местом связывания. Для объяснения механизма катализа были построены различные модели с чередованием мест связывания, в частности модель, согласно которой в ходе катализа происходит физическое вращение частей фермента. Возможно, в связывании Fi- и Fo-компонентов фермента в мембране участвуют сигма- и эпсилон-субъединицы.

Fo-комплекс из фермента *E. coli* устроен достаточно просто, он содержит только три субъединицы в стехиометрии a1-b2-c10. Все эти субъединицы необходимы для формирования H^+-проводящего канала. Результаты, полученные с помощью генетических методов, согласуются с предположением, согласно которому погруженные в мембрану части всех трех субъединиц играют важную роль в обеспечении протонной проводимости.

Рассмотрим результаты, полученные к настоящему времени для FiFo-АТРазы из *E. coli.*

1. Наличие многочисленных мутантных по е-субъединице форм позволяет идентифицировать участок, являющийся, по всей вероятности, каталитическим нуклеотидсвязывающим доменом. Исследование мутантных форм показало также, что между альфа и бета-субъединицами имеется конформационное сопряжение.

2. Показано, что мутантные по эпсилон-субъединице формы неспособны к сопряжению транспорта H^+ с катализируемой комплексом F1 АТРазной активностью, а также к связыванию комплексов F1 и Fo.

3. Показано, что определенные аминокислотные остатки в субъединицах *a*, b и с опосредуют протонную проницаемость; имеющиеся генетические данные позволяют предположить, что субъединица *b* непосредственно контактирует в мембране с субъединицами *a* и с.

Связаны ли все эти явления с локальными или глобальными конформационными изменениями, покажут дальнейшие исследования. Пока же мы не может сказать определенно, как происходит сопряжение гидролиза АТР и транспорта H^+ при работе АТРазы F1Fo-типа, а также с чем связана протонная проводимость.

ТРИ ДРУГИХ КЛАССА ПЕРЕНОСЧИКОВ

Помимо АТР-зависимых активных переносчиков E1E2- и F1Fo-типов есть еще три класса активных переносчиков, использующих свободную энергию гидролиза макроэргических фосфатных связей. О реальных механизмах транспорта или сопряжения в этих системах известно немного. Отметим несколько интересных их особенностей.

1. *Бактериальные фосфотрансферазы*. Этот комплекс был обнаружен только в бактериях; он катализирует транспорт сахаров, таких, как глюкоза и маннитол. Уникальной особенностью этой системы является то, что транспорт сахара сопровождается его фосфорилированием. Получаемое фосфатное производное сахара уже не может служить субстратом для переносчика в бактериальной мембране, и таким образом предотвращается обратный поток сахара через эту систему. Вспомним, что в переносчиках E1E2-типа фосфорилирование переносчика стабилизирует форму с низким сродством к переносимому веществу (например, Ca^2 или Na^+), что также препятствует обратному переносу

транспортируемых веществ.

Конечным донором фосфата в фосфотрансферазной системе является фосфоенолпируват. Фосфат переносится специфической последовательностью растворимых фосфорилированных интермедиа-тов в цитоплазму к мембраносвязанному транспортному белку, называемому фермент II или Е II. Существует группа ферментов Е II-типа, специфичных к разным сахарам, но обладающих сходной первичной структурой. По всей вероятности, внутри мембраны ферменты Е II-типа образуют димеры. Высказывалось предположение, что они формируют каналы. Эти белки чувствительны к реагентам, действующим на сульфгидрильные группы, и к окислению, что может играть важную роль в условиях in vivo. Немного известно о том, каким образом фосфорилированные ферменты Ell-типа осуществляют транспорт и фосфорилирование сахаров. Разумной представляется модифицированная модель с чередованием конформаций и единственным местом связывания.

2. *Бактериальные периплазматические транспортные системы*. В дополнение к системам симпорта (катион — сахар) и фосфотрансферазной системе бактерии имеют еще одну систему активного транспорта растворимых веществ, которая используется для различных аминокислот и Сахаров. Так, охарактеризованы системы, специфичные к гистидину *(S. typhimurium)* и мальтозе *(E.* co/;). К сожалению, биохимические данные, которые могли бы дополнить интенсивные генетические исследования мембраносвязанных компонентов этих систем, весьма немногочисленны. Уникальной особенностью этих систем является то, что они содержат субстратспеци-фичные связывающие белки, локализованные в периплазматиче-ском пространстве. Роль этих белков заключается в связывании переносимого вещества и последующей передаче его собственно транспортирующей системе цитоплазматической мембраны. Специфичность системы определяется как связывающими белками, так и мембраносвязанными компонентами. Цитоплазматический мембранный компонент содержит три субъединицы, две из которых являются трансмембранными белками, а третья, по всей вероятности, прочно связана с цитоплазматической стороной мембраны. Как оказалось, этот третий компонент транспортного комплекса содержит место связывания нуклеотидов, где, как предполагается, происходит гидролиз АТР — реакция, являющаяся движущей силой активного транспорта. Однако прямые данные, подтверждающие эту гипотезу, отсутствуют. Практически ничего не известно о механизме транспорта, за исключением того, что для него необходим растворимый связывающий белок.

По всей вероятности, эта система аналогична транспортной системе млекопитающих, которая используется ими для выведения из клетки нежелательных лекарственных веществ и обеспечивает множественную лекарственную устойчивость. По-видимому, транспорт разных лекарственных веществ единственной транспортной системой опосредуется группой немембранных связывающих белков. Сходное предположение высказывалось относительно кодируемой плазмидой бактериальной транспортной системе, которая выводит из клеток арсенаты. Предполагается, что эти системы также используют гидролиз АТР в качестве источника энергии, однако это не было прямо продемонстрировано.

3. *Вакуолярные Н -АТРазы*. В эукариотических клетках имеются H^+ -АТРазы, локализованные в мембранах различных внутренних органелл (кроме митохондрий). Эти АТРазы отличаются от АТРаз как F1Fo-, так и E1E2-типов. В некоторых случаях функцией H^+ -АТРазы является транспорт протонов внутрь той или иной органеллы для закисления ее содержимого. Например, известно, что низкий pH в эндоцитозных пузырьках необходим для отсоединения лигандов от их рецепторов, происходящего вслед за эндоцитозом. Хотя достоверные данные о структурном родстве этих Н -АТРаз пока не получены, известно, что все они 1) содержат более одной субъединицы; 2) не образуют фосфорилированного интермедиата; 3) нечувствительны к ванадату;
4) транспортируют H^+ . Однако все эти вопросы требуют дополнительных биохимических и структурных исследований.

Активные транспортные системы, сопряженные с процессом переноса электронов или поглощением света

Имеется несколько интересных примеров активных транспортных систем, которые используют для своей работы изменение окислительно-восстановительного состояния

связанной с белком просте-тической группы (например, гема) или энергию света, поглощаемого простетической группой (ретиналем). В целом транспорт и в этом случае подчиняется закономерностям, обсуждавшимся ранее. Для его осуществления нужно стабилизировать некую нестабильную форму белка, которая является необходимым промежуточным соединением в транспортном цикле. Способы стабилизации могут быть различными: фосфорилирование белка или даже связывание АТР, о чем мы уже говорили. В этом разделе мы остановимся на двух других способах.

ЦИТОХРОМ с-ОКСИДАЗА: ПРОТОННЫЙ РЕДОКС-НАСОС

Этот белок является наиболее ярким примером фермента, который, функционируя как ионный насос, сопрягает ионный транспорт (H^+) и реакции переноса электронов. Оксидаза катализирует окисление цитохрома с, локализованного в межмембранном пространстве митохондрий, и восстановление кислорода (O2) до воды. В этой реакции участвуют четыре иона H^+ на каждую молекулу O2; протоны поступают из матрикса митохондрий. Соотвтетственно на каждый электрон, проходящий через систему, через внутреннюю митохон-дриальную мембрану переносится по меньшей мере один протон. Фермент содержит две простетические группы гема *a,* а также два или три атома меди и один атом цинка. Цитохром *c*-оксидаза — очень консервативный фермент, мало изменившийся в ходе эволюции. Ферменты, сходные с митохондриальной цитохром с-оксидазой, обнаруживаются во многих бактериях. Субъединичный состав комплекса сильно варьирует: он содержит от двух субъединиц у некоторых бактерий до 12 в оксидазе митохондрий сердца быка. По всей вероятности, в переносе Н непосредственно участвует одна субъединица (III), но окончательно этот вопрос еще не выяснен. Согласно данным электронной микроскопии, оксидаза не только пронизывает бислой, но и выходит на внешнюю поверхность мембраны. К сожалению, до сих пор окончательно не установлен не только механизм ионного транспорта, но и расположение простетических групп в ферменте.

Для описания работы оксидазы можно использовать очень простую модель четырех состояний. В этой модели постулируется, что место связывания H^+ доступно с одной стороны мембраны, когда ион металла в составе простетической группы восстановлен, и обращено к противоположной стороне мембраны, когда он окислен. Значения *pK* (т. е. константы связывания H^+) в окисленном и восстановленном состояниях также могут различаться. Существенно, что в ходе реакций переноса электронов происходит поочередная стабилизация двух конформаций фермента, в которых место связывания H^+ обращено к разным сторонам мембраны. Однако механизм этого явления на молекулярном уровне не установлен.

В заключение следует отметить, что существует по меньшей мере один пример редокс-зависимого транспорта Na^+ . Это означает, что такого рода системы не ограничиваются переносом только ионов H^+.

БАКТЕРИОРОДОПСИН: H^+-НАСОС, ИСПОЛЬЗУЮЩИЙ ЭНЕРГИЮ СВЕТА

Структура бактериородопсина:

Бактериородопсин — это наиболее исследованный мембранный белок; установление его структуры оказало большое влияние на наши представления о строении других интегральных мембранных белков. Бактериородопсин обнаружен в морской архебактерии *Halobacterium halobium.* Он присутствует в специализированных бляшках бактериальной цитоплазматической мембраны, называемой пурпурной мембраной, образуя там высокоупорядоченные двумерные структуры. Мол. масса бактериородопсина 27 000 (248 ами-нокислотных остатков). Он содержит единственную ковалентно связанную простетическую группу ретиналь, которая к лизину-216. Этот белок выполняет функцию фотохимического протонного насоса, создающегоразность электрохимического потенциала протонов, которая затем используется клеткой для транспорта растворимых веществ и синте-за АТР. При поглощении ретиналем одного протона индуцируется ряд превращений, в том числе транс-цис-изомеризация по связи С13—С14 ретиналя и депротонирование азота; это приводит к электрогенному переносу одного или двух протонов из клетки наружу.

Поскольку in situ этот белок образует высокоупорядоченную двумерную кристаллическую

решетку, для установления его трехмерной структуры можно использовать методы реконструкции изображения. Белок имеет относительно малые размеры и выполняет весьма важную функцию протонного насоса, а за всеми превращениями ретиналя можно следить оптическими методами. Все это стимулировало детальные исследования механизма функционирования бактерио-родопсина. Фотохимические свойства шиффова основания ретиналя изучены довольно хорошо, однако как они влияют на белок и что вызывает перемещение протонов — неизвестно. Структурные данные тоже не пролили свет на механизм функционирования белка, хотя и были предложены модели протонной «эстафеты» или цепочки трансмембранных водородных связей. С другой стороны, функционально-механистические исследования тоже не дали никаких указаний, которые помогли бы в интерпретации структурных данных.

Белок состоит из тримеров, при этом каждый полипептид предстает в виде образования из семи цилиндров, пронизывающих мембрану и примерно перпендикулярных ее плоскости. Обычно считают, что эти цилиндры представляют собой альфа-спиральные участки белковой молекулы. Большая часть белковой молекулы находится в а-спиральной конфигурации, хотя имеются также участки, образующие бета-слои.

Все построенные модели сходны в интерпретации общей укладки и топологии молекулы. НА РИСУНКЕ представлена модель, аналогичная предложенной Энгелманом и др. Установлено, что Для пересечения неполярной части бислоя (33 А) спираль должна содержать 21 аминокислотный остаток, и в белковой молекуле действительно имеется семь участков примерно такой длины с преобладающим содержанием неполярных аминокислот. Полагают, что они и образуют семь а-спиралей, наблюдаемых на карте электронной плотности. Эти а-спирали обычно обозначаются буквами A, B, C, D, E, F, G, начиная с N-конца. Каково соответствие между ними и семью спиралями, выявленными с помощью электронно-микроскопических исследований (трехмерный рисунок), — неизвестно. Этот вопрос неоднократно обсуждался, и здесь существуют разные мнения. Почти не вызывает сомнений, что общая топология, представленная на рисунке, адекватна. Разные модели, описанные в литературе, в каких-то отношениях могут существенно различаться. Это касается, в частности, длины нескольких спиралей, расположенных внутри бислоя, которая варьирует в разных моделях в пределах 10 остатков. Несмотря на эти разногласия, по главным особенностям достигнут консенсус, хотя говорить о единодушии нельзя.

Функция этого белка состоит в активном транспорте протонов через бактериальную цитоплазматическую мембрану. Поглощение света связанной простетической группой ретиналя запускает последовательность событий, которые поддаются регистрации оптическими методами. Эти реакции сопряжены с переносом двух H^+ на каждый цикл работы комплекса. Галородопсин, белок из той же бактерии, использует аналогичный механизм для активного транспорта Cl^- . По всей вероятности, мономерная форма бактериородопсина является самостоятельной функциональной единицей, хотя внутри мембраны он находится в виде тримера. Показано, что ретиналь локализован примерно в середине бислоя. Предполагается, что для него характерен прямой механизм сопряжения. Структура белка с семью параллельными а-спиралями, пронизывающими мембрану, не дает ответа на вопрос о существовании какого бы то ни было канала. Как ион H^+ достигает ретиналя — неизвестно, но, без сомнения, это один из вопросов, который можно будет решить, используя методы сайт-специфического мутагенеза.