



УДК 577.352.332.577.112

© 1993 Г. Э. Дубачев, А. В. Лунев,
А. Н. Барнаков, Г. И. Белогрудов, В. А. Гринкевич,
В. В. Демин

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АТР-СИНТЕТАЗЫ ИЗ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА БЫКА

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: АТР-синтетаза; двумерный кристалл; электронная микроскопия; фурье-фильтрация.

Двумерные кристаллы митохондриальной АТР-синтетазы были получены из детергент-липидно-белковых мицелл диализом от детергента. Максимальный линейный размер таких кристаллов составляет около 0,4 мкм. Методом цифровой фурье-фильтрации электронно-микроскопических изображений получена проекционная карта негативно контрастированного двумерного кристалла АТР-синтетазы с разрешением около 2,8 нм. Элементарная ячейка имеет следующие кристаллографические параметры: a 13,0 нм, b 25,6 нм, γ 86°. На одну элементарную ячейку кристалла приходится не более двух молекул АТР-синтетазы. В соответствии с этим предложены две альтернативные модели структурной организации двумерного кристалла: с одной или двумя белковыми молекулами на одну элементарную ячейку. Первая модель предполагает асимметричное встраивание молекул АТР-синтетазы в липидный бислой: все периферические части F_1 расположены по одну сторону мембраны, образующей двумерный кристалл. Согласно второй модели, встраивание происходит с обеих сторон липидного бислоя: на каждую элементарную ячейку кристалла приходится две противоположно ориентированные в мембране молекулы АТР-синтетазы. На основании отсутствия другого типа проекционных изображений кристаллов (вид с обратной стороны мембраны), наличие которого предполагает первая модель, предпочтение отдано второй модели.

АТР-синтетазы осуществляют реакцию синтеза (гидролиза) АТР, сопряженно с трансмембранным переносом протонов. Сравнение АТР-синтетаз из различных источников (митохондрий, хлоропластов, бактерий) свидетельствует о сходстве их структурной организации. Они состоят из двух компонентов: внутримембранной части F_0 , образующей, как полагают, протонный канал, и периферической части F_1 (F_1 -АТР-аза), несущей все каталитические и нуклеотидсвязывающие центры (см. обзоры [1, 2]). Периферическая часть F_1 АТР-синтетазы митохондрий содержит пять типов субъединиц в стехиометрии:

3а, 3б, γ, δ, ε [3], а внутримембранная часть F_0 — по крайней мере семь: *a, b, c, d, OSCP* (белок, придающий чувствительность к олигомицину), F_6 и A_6L [4].

По данным электронной микроскопии, митохондриальная F_1 -АТФ-аза имеет вид сплюсненной треугольной антипризмы [5], причем шесть ее больших субъединиц расположены в двух слоях: в одном — 3а, в другом — 3б [6]. В гексагональной проекции малые субъединицы γ, δ, ε на электронных микрофотографиях, по данным некоторых исследователей, выявляются в виде седьмого белкового максимума, смещенного к одной из α — β -пар [7]. Рентгеноструктурные исследования кристаллов F_1 -АТФ-азы из митохондрий печени крысы [8] подтвердили двухуровневую организацию этой макромолекулы и позволили определить ее трехмерную структуру с разрешением 0,36 нм. Было установлено, что F_1 -АТФ-аза представляет собой эллипсоидальную глобулу (12×12×7,4 нм), обладающую поворотной осью симметрии 3-го порядка относительно трех копий от каждой из двух больших субъединиц, α и β . Локализация же малых субъединиц не была окончательно определена.

Структура полного комплекса F_0F_1 менее изучена. По данным электронной микроскопии, митохондриальная F_1 -АТФ-аза присоединяется к F_0 с помощью ножки, имеющей длину около 4,2 нм и ширину 3—3,5 нм и практически целиком находящейся вне мембраны [9]. Погруженный в мембрану гидрофобный компонент F_0 имеет форму глобулы с размерами 6—9 нм вдоль разных направлений [9, 10], так что некоторая его часть выходит за границы липидного бислоя (несколько большие размеры F_0 (6×12 нм) приведены в работе [11]).

Поскольку детальные механизмы функционирования АТФ-синтетаз все еще остаются неизвестными, важное значение приобретает исследование всех уровней структурной организации как отдельных компонентов, так и всего комплекса в целом. Наиболее удобны для структурного исследования упорядоченные образования, такие, как двумерные кристаллы. Использование специальных методов компьютерного анализа, в основе которых лежит цифровая фурье-фильтрация электронно-микроскопического изображения двумерного кристалла, позволяет не только получать фильтрованные проекционные изображения, но и осуществлять реконструкцию трехмерной структуры белка по достаточному набору таких проекций. Даже при сравнительно низких разрешениях (около 2 нм) такой подход дает важную информацию об особенностях структуры макромолекулы непосредственно в мембране (см., например, [12]).

Данная работа посвящена электронно-микроскопическому исследованию мембранной организации АТФ-синтетазы с использованием таких методов.

Как было установлено нами ранее [13], образование двумерных кристаллов АТФ-синтетазы происходит в узком диапазоне рН (4,5—5,0) и оптимальными условиями для их получения являются следующие: концентрация F_0F_1 3 мг/мл; фосфатидилхолин из соевых бобов/Ν,Ν-диметилдодециламино-Ν-оксид/ F_0F_1 (1 : 1 : 1 по массе); состав буфера для диализа: 50 мМ CH_3COONa (рН 4,5), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ $NaCl$, 5 мМ NaH_2PO_4 ; время диализа 24 ч; 20° С.

Удельная активность реконструированной АТФ-синтетазы составляет в среднем 5—6 мкмоль гидролизованного АТФ на 1 мг белка в 1 мин и ингибируется олигомицином на 70—80%, что свидетельствует об интактности мультисубъединичного ферментного комплекса.

Типичная электронная микрофотография двумерного кристалла АТФ-синтетазы представлена на рис. 1. Максимальный линейный размер кристаллов — около 0,4 мкм.

По данным оптической дифракции и фурье-анализа, разрешение на изображениях двумерных кристаллов АТФ-синтетазы составляет около 2,8 нм. Элементарная ячейка имеет следующие кристаллографические параметры: *a* 13,0 нм, *b* 25,6 нм, γ 86°. В таблице приведены амплитуды и фазы рефлексов, использованных в фурье-синтезе. Фильтрованное от статистических шумов изображение негативно контрастированного двумерного кристалла АТФ-синтетазы (проекция на плоскость мембраны) представлено на рис. 2. Видно, что не заполненные

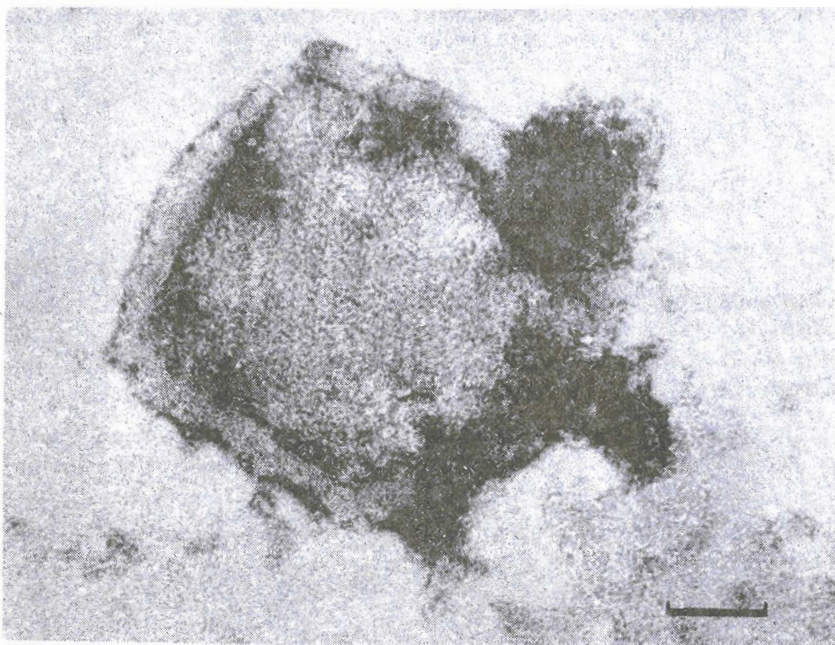


Рис. 1. Электронная микрофотография негативно контрастированного двумерного кристалла АТФ-синтетазы. Длина отрезка соответствует 0,1 мкм

контрастером области, соответствующие белковым молекулам (негативное контрастирование белка), образуют характерные полосы в направлении вектора \vec{a} . Известно, что одна из проекций F_1 -АТФ-азы, называемая фронтальной, имеет гексагональную форму с поперечником около 12 нм [7, 8], а боковые проекции — форму прямоугольника или параллелограмма с шириной в пределах 7,4—8 нм [5, 8]. Следовательно, каждая полоса состоит из выстроенных в один ряд молекул АТФ-синтетазы, причем периферические части F_1 плотно прилегают друг к другу и ориентированы своими фронтальными сторонами параллельно поверхности мембраны.

Таким образом, молекуле АТФ-синтетазы в проекции на плоскость мембраны соответствует область в виде круга диаметром около 12 нм, содержащая шесть максимумов белковой плотности вокруг полости, заполненной контрастером. При этом вклад в два из них (имеются в виду максимумы между соседними белковыми молекулами) вносится как одной молекулой АТФ-синтетазы, так и соседней с ней (см. рис. 2). Отсутствие гексагональной симметрии, по-видимому, связано с вкладом в изображение как малых субъединиц γ , δ , ϵ части F_1 , так и субъединиц внутримембранной части F_0 . Не исключен и небольшой наклон фронтальной стороны F_1 относительно плоскости мембраны, вносящий свой вклад в искажение гексагональной симметрии.

Из сопоставления размеров элементарной ячейки кристалла (13×25,3 нм) с размерами фронтальной проекции F_1 -АТФ-азы (12×12 нм) можно заключить, что на одну элементарную ячейку приходится одна или две молекулы АТФ-синтетазы. В первом случае непрокрашенная область двумерного кристалла между соседними рядами из молекул АТФ-синтетазы соответствует липидному окружению, а во втором — внутримембранной части F_0 другой белковой молекулы, имеющей противоположную ориентацию в мембране. В соответствии с этим можно предложить две альтернативные модели структурной организации двумерного кристалла: с одной или двумя молекулами АТФ-синтетазы на одну элементарную ячейку (см. рис. 3). Первая модель предполагает асимметричное встраивание белковых молекул в липидный бислой: все периферические части F_1 расположены по одну сторону мембраны, образующей двумерный кристалл. Со-

Амплитуды и фазы рефлексов, использованные в фурье-синтезе проекционного изображения
двумерного кристалла АТР-синтетазы

h	k	Амплитуда	Фаза, град	Отношение амплитуды к фону
0	-8	21,34	60	17,35
0	-4	382,22	70	63,02
0	-3	216,37	180	79,23
0	-2	86,86	90	61,74
0	-1	652,87	-150	87,87
1	-9	12,37	-30	8,44
1	-5	136,55	150	35,20
1	-2	448,50	-80	64,07
1	-1	390,82	60	90,76
1	0	239,12	60	81,68
1	1	419,42	0	94,95
1	2	802,64	10	100,56
1	4	370,96	-50	69,03
1	6	180,12	0	30,38
1	7	52,44	80	18,89
1	8	39,79	-50	14,07
1	9	41,78	-80	8,81
2	-7	42,65	80	10,53
2	-2	125,92	0	45,80
2	0	235,24	80	55,01
2	7	80,26	180	20,75
3	-7	8,32	140	7,09
3	-6	18,41	-80	8,70
3	-3	68,53	-80	24,26
3	-2	100,84	-30	24,33
3	1	55,45	-80	41,35
3	2	35,37	0	30,49
3	4	31,54	170	26,80
3	5	73,17	130	19,01
4	-3	16,70	-170	8,72
4	-2	17,83	-10	11,42
4	-1	18,53	-170	14,48
4	0	18,44	-150	10,36
4	3	23,80	-150	13,09

гласно второй модели, встраивание происходит с обеих сторон липидного бислоя: на каждую элементарную ячейку кристалла приходится две противоположно ориентированные в мембране молекулы АТР-синтетазы.

Следует отметить, что, согласно первой модели (см. рис. 3 *a*), должны существовать два типа проекционных изображений: вид двумерного кристалла со стороны периферических частей F_1 , приведенный на рис. 2, и совершенно отличный от него вид с противоположной стороны мембраны. Поскольку изображения, соответствующие последнему типу, обнаружить не удалось, предпочтение следует отдать второй модели. В ее пользу свидетельствует и тот факт, что только эта модель предполагает, что в двумерном кристалле АТР-синтетазы упорядоченное расположение белковых молекул в липидном бислое обеспечивается их взаимодействием друг с другом как внутри белкового ряда, так и между рядами. Первое осуществляется за счет периферических частей F_1 соседних молекул, а второе — за счет внутримембранных частей F_0 . Последнее взаимодействие может иметь место только в случае второй модели, для которой расстояние между соседними белковыми рядами в 2 раза меньше по сравнению с первой моделью и составляет около 12,8 нм, что хорошо соответствует максимальному продольному размеру F_0 (12 нм, см. [11]). Что касается первой модели, то, согласно ей, взаимодействие

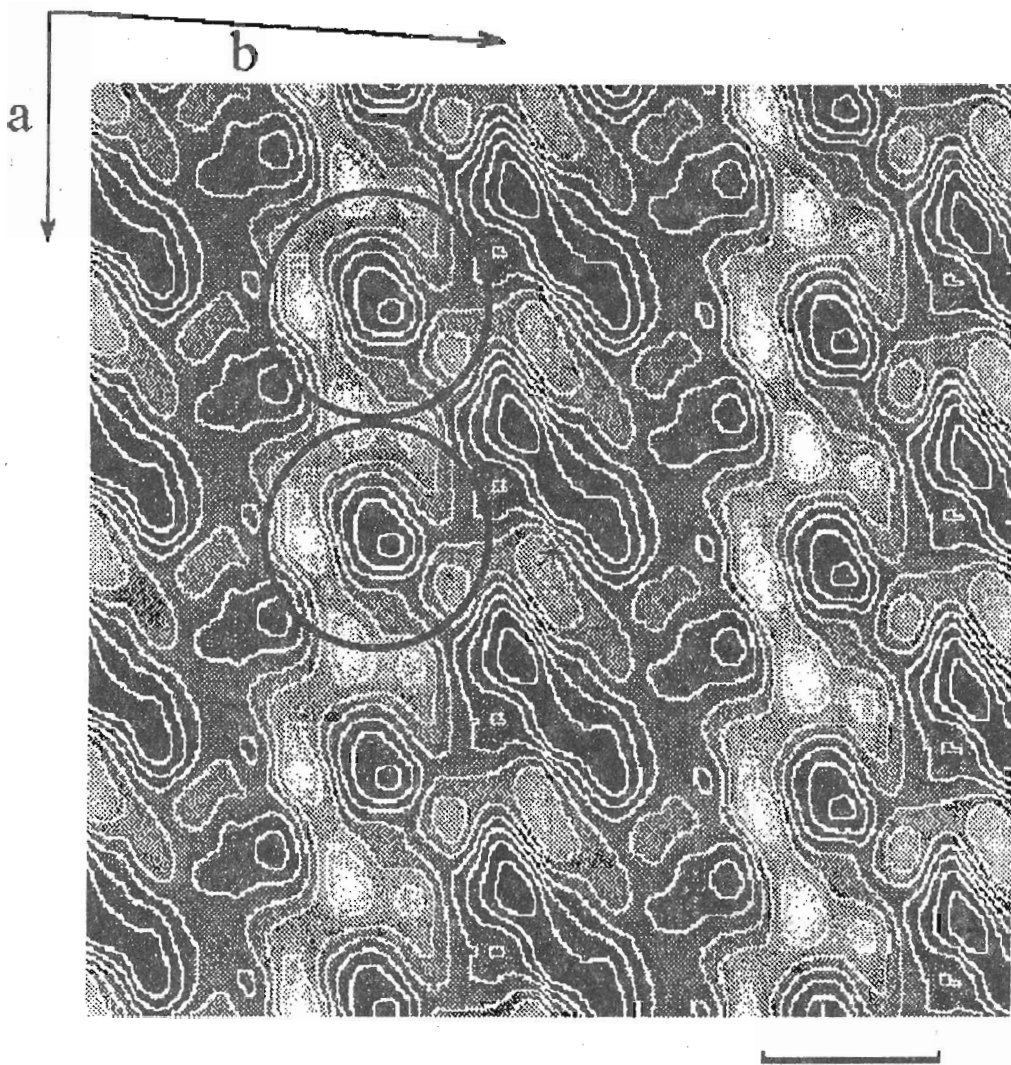


Рис. 2. Изображение негативно контрастированного двумерного кристалла АТФ-синтетазы после фурье-фильтрации (проекция на плоскость мембраны). Светлые участки изображения соответствуют не прокрашенным контрастером областям кристалла (белок), темные — прокрашенным (липид). Окружностями выделены области, соответствующие молекулам АТФ-синтетазы, видимым со стороны периферических частей F_1 . Базисные векторы \vec{a} и \vec{b} элементарной ячейки кристалла представлены стрелками. Длина отрезка соответствует 10 нм

между соседними белковыми рядами осуществляется за счет липидного окружения. Маловероятно, что такие взаимодействия могут стабилизировать упорядоченное образование типа двумерного кристалла.

Для окончательного определения структуры двумерных кристаллов АТФ-синтетазы необходима трехмерная реконструкция молекулы этого белка в липидном бислое, что является целью работы, проводимой в настоящее время.

Экспериментальная часть

Митохондрии сердечной мышцы быка выделяли по методу [14]. Субмитохондриальные частицы получали согласно [15]. АТФ-синтетазу солибилизировали из субмитохондриальных частиц холатом натрия с последу-

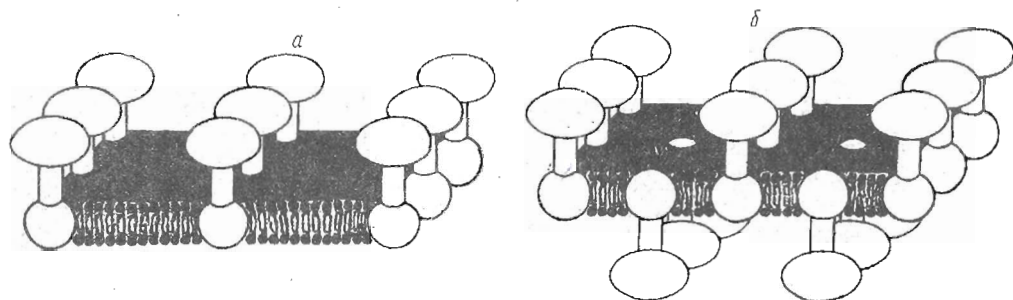


Рис. 3. Две альтернативные модели структурной организации двумерного кристалла АТФ-синтетазы: с одной (а) и двумя (б) молекулами комплекса на одну элементарную ячейку кристалла

ющим фракционированием сульфатом аммония как описано в работе [16]. Концентрации белка определяли согласно [17]. АТФ-азную активность измеряли как описано в работе [18]. Двумерные кристаллы АТФ-синтетазы были получены из детергент-липидно-белковых мицелл диализом от детергента как описано в [13].

Негативное контрастирование препаратов проводили 2% водным раствором уранилацетата. Образцы исследовали в электронном микроскопе JEM 100CX-2 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для калибровки увеличения микрофотографий использовали кристаллы каталазы (Balzers, Лихтенштейн).

Предварительный анализ и отбор электронных микрофотографий проводили с использованием лазерного дифрактометра (Spectra Physics, США), как описано в [19]. Изображения денситометрировали на автоматическом микроденситометре MDM-6 (Южсе-Loebl, Великобритания). Размер сканирующей апертуры составлял 30×30 мкм, площадь сканирования — 256×256 точек (при увеличении микрофотографий $31000 \times$). Анализ изображений двумерных кристаллов АТФ-синтетазы проводили на ПЭВМ IBM/AT 286 с использованием комплекса математических программ, описанных в работе [20].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Senior A. E. // *Physiol. Rev.* 1988. V. 68. № 2. P. 177—231.
2. Futai M., Noumi T., Maeda M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1989. V. 58. № 1. P. 111—136.
3. Walker J. E., Fearnly I. M., Gay N. J., Gibson B. W., Northop F. D., Powell S. J., Runswick M. J., Saraste M., Tytuliewicz V. L. J. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 184. № 5. P. 677—701.
4. Walker J. E., Runswick M. J., Poulter L. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 197. № 1. P. 89—96.
5. Tsuprun V. L., Mesyanzhina I. V., Kozlov I. A., Orlova E. V. // *FEBS Lett.* 1984. V. 167. № 2. P. 285—290.
6. Lunsdorf H., Ehrig K., Priedl P., Schraier H. U. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 173. № 1. P. 131—136.
7. Boekema E. J., Berden J. A., van Heel M. G. // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. V. 851. № 3. P. 353—360.
8. Bianchet M., Ysern X., Hullihen J., Pedersen P. L., Amzel L. M. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 31. P. 21197—21201.
9. Tsuprun V. L., Mesyanzhina I. V., Orlova E. V. // *FEBS Lett.* 1989. V. 244. № 2. P. 279—282.
10. Boekema E. J., Schmidt G., Graber P., Berden J. A. // *Z. Naturforsch.* 1988. B. 43c. S. 219—225.
11. Soper J. W., Decker G. L., Pedersen P. L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 21. P. 11170—11176.
12. Ovchinnikov Yu. A., Demin V. V., Barnakov A. N., Lunev A. V., Kuzin A. P., Modyanov N. N., Dzhandzhugazyan K. N. // *FEBS Lett.* 1985. V. 190. № 1. P. 73—76.
13. Дубачев Г. Э., Лунев А. В., Барнаков А. Н., Белогрудов Г. И., Гринкевич В. А., Демин В. В. // *Биол. мембраны.* 1993. Т. 10. № 4. С. 410—419.
14. Crane G., Green D. // *Biochim. et biophys. acta.* 1959. V. 22. № 3. P. 475—481.
15. Racker E., Fessenden R. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. № 7. P. 2482—2487.

16. Serrano R., Kanner B. I., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 8. P. 2453—2461.
17. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.
18. Glaser E., Norling B., Ernster L. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 110. № 2. P. 225—235.
19. Klug A., Berger J. E. // *J. Mol. Biol.* 1964. V. 10. № 3. P. 565—569.
20. Amos L. A., Henderson R., Unwin P. N. T. // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* 1982. V. 39. № 1. P. 183—231.

Поступила в редакцию
24.VI.1993

*G. E. Dubachev, A. V. Lunev, A. N. Barnakov,
G. I. Belogrudov, V. A. Grinkevich, V. V. Demin*

ELECTRON MICROSCOPY OF BEEF HEART MITOCHONDRIAL ATP SYNTHASE

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Two-dimensional crystals of the mitochondrial ATP synthase up to 0.4 μm in size were obtained from the detergent-lipid-protein micelles by detergent dialysis. A projected map of the negatively stained crystal was calculated from electron microscopical images by the Fourier-filtering procedure at ca. 2.8 nm resolution. The unit cell (with not more than two ATP synthase molecules) has the following parameters: a 13.0 nm, b 25.6 nm and γ 86°. In line with this conclusion, two alternative models for the crystal structural organization are plausible, viz., with one or two protein molecules per unit cell. The first model suggests an asymmetric incorporation of ATP synthase molecules into the lipid bilayer: extramembranous portions F_1 are located on one side of the crystal membrane plane. According to the second model, the incorporation occurs on each side of the lipid bilayer, the unit cell containing the two oppositely oriented protein molecules. Based on the absence of another type of the projected crystal images (a rear view of the membrane), unique to the first model, preference is given to the second model.