



УДК 577.15.07:543.422

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТВОРИМОЙ АТР-АЗЫ  
МИТОХОНДРИЙ*Сухомудренко А. Г., Киладзе А. А., Щипакин В. Н.,  
Евтодиев Ю. В.**Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино*

Описаны выделение и очистка АТР-азы из митохондрий сердца быка. Вторичная структура выделенного фермента изучена методами КД и ИК-спектроскопии. Согласно полученным данным, 80% пептидных групп молекулы фермента образуют  $\alpha$ -спираль.

Для изучения молекулярного механизма синтеза АТР при окислительном фосфорилировании необходима информация о структуре  $H^+$ -АТР-азы митохондрий — фермента, который непосредственно осуществляет синтез и гидролиз АТР в митохондриях. В настоящее время в ряде лабораторий получены гомогенные препараты растворимой АТР-азы митохондрий [1], однако тщательные исследования вторичной структуры АТР-азы не проводились.

В связи с этим в настоящей работе методами кругового дихроизма и ИК-спектроскопии была изучена вторичная структура растворимой  $H^+$ -АТР-азы — лиофилизированного препарата, выделенного из митохондрий сердца быка. Для оценки содержания белка и нуклеотидов в ферменте был изучен УФ-спектр поглощения и определены коэффициенты экстинкции в диапазоне 185—300 нм.

УФ-спектр АТР-азы (КФ 3.6.1.3) приведен на рис. 1. Для очищенного от нуклеотидов фермента коэффициент экстинкции в максимуме поглощения ароматических аминокислотных остатков на длине волны 278 нм равен 0,43 л/(г·см). В табл. 1 даны значения экстинкции в диапазоне 185—200 нм. Отношение  $D_{278}/D_{256}$  составляет 1,5 и свидетельствует о наличии некоторого количества АТР, связанной с ферментом, так как для хорошо очищенных белков это отношение равно 1,8—2,2.

Чтобы оценить содержание АТР в препарате АТР-азы, мы осадили белок с помощью  $HCuO_4$  (общая концентрация 6%). Осадок удаляли центрифугированием и записывали УФ-спектр надосадочной жидкости, содержащей экстрагированные кислотой адениновые нуклеотиды. Из спектра поглощения АТР-азы вычитали спектр поглощения нуклеотидов в надосадочной жидкости. На рис. 1, 2 приведен спектр, полученный вычитанием из спектра поглощения исходного препарата (1) спектра поглощения адениновых нуклеотидов в надосадочной жидкости (2). Из рисунка видно, что для АТР-азы отношение  $D_{278}/D_{256}$  равно 2.

Находящаяся в ферменте АТР вносит аддитивный вклад в экспериментально наблюдаемый спектр поглощения АТР-азы в области длин волн 250—300 нм. Для проверки аддитивности мы регистрировали УФ-спектр

АТР-азы с различным содержанием АТР. В кювету сравнения добавляли столько АТР, чтобы отношение  $D_{278}/D_{256}$  в разностном спектре было равно 2. При различном содержании АТР в препарате разностный спектр всегда имел одну и ту же форму. УФ-спектр АТР, содержащейся в АТР-азе, совпадает со спектром поглощения свободной АТР. Следовательно, если АТР и связана с ферментом, то это состояние спектрально не отличается от состояния АТР в свободном состоянии в пределах погрешности эксперимента (10—20%, в зависимости от содержания адениновых нуклеотидов в АТР-азе).

Результаты эксперимента систематизированы в табл. 2. В этой таблице приведена зависимость отношения  $D_{278}/D_{256}$  от числа молекул АТР, приходящихся на одну молекулу АТР-азы. В третьем столбце таблицы приведено значение поправки к  $D_{278}$  для препарата АТР-азы с различным содержанием АТР, выраженное в процентах. Приведенные поправки могут быть использованы для вычисления истинного поглощения АТР-азы при  $D_{278}$ . Так, например, если измеренное значение  $D_{278}$  равно 1 при отношении  $D_{278}/D_{256} = 1,5$ , то истинное поглощение фермента при этой длине волны равно  $1 - 0,22 = 0,88$  (см. табл. 2).

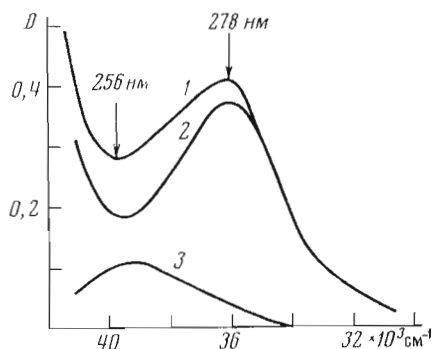


Рис. 1. УФ-спектр АТР-азы в водном растворе (фосфатный буфер 0,02 М, рН 7,4). 1 — АТР-азы после очистки на колонке с сефадексом G-50, в кювете сравнения фосфатный буфер, концентрация белка 1 мг/мл; 2 — вычисленный УФ-спектр АТР-азы без АТР; 3 — спектр поглощения АТР в надосажденной жидкости после осаждения фермента 6%  $\text{HClO}_4$ .

Таблица 1

Значения экстинкции АТР-азы в области 185—200 нм

Длина волны, нм	Экстинкция, л/(г·см)	Длина волны, нм	Экстинкция, л/(г·см)
185	123	204	44
188,5	114	208	30
192,5	100	212	20
196	84	217	13
200	63	222	7,1

Таблица 2

Зависимость отношения  $D_{278}/D_{256}$  от числа молекул АТР, приходящихся на одну молекулу АТР-азы

$D_{278}/D_{256}$	Число молекул АТР, приходящихся на одну молекулу фермента	Поправка к $D_{278}$ для определения истинного поглощения АТР-азы, %
1,0	13	84
1,1	11	67
1,2	8	47
1,3	6	36
1,4	5	30
1,5	4	22
1,6	3	17
1,7	2	14
1,9	1	5
2,0	0	0

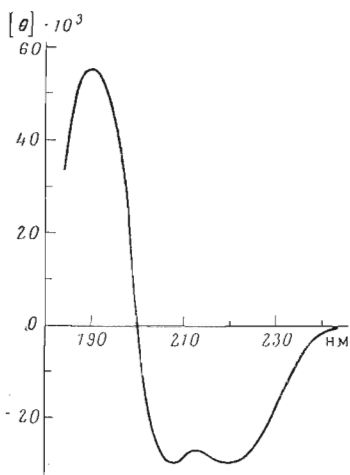


Рис. 2

Рис. 2. Спектр кругового дихроизма АТР-азы в 0,02 М фосфатном буфере, рН 7,4

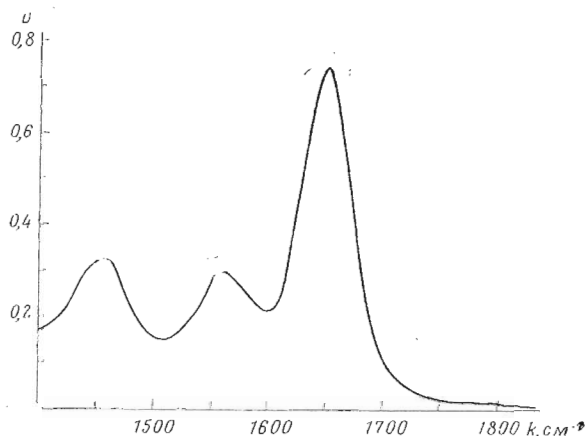


Рис. 3

Рис. 3. ИК-спектр АТР-азы в пленке при 100% влажности  $D_2O$

Данные УФ-спектра АТР-азы (табл. 1) имеют ту особенность, что максимум поглощения пептидных групп при 190 нм ( $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ -электронный переход) сдвинут в коротковолновую область по сравнению с обычным поглощением белков в этом спектральном диапазоне [2].

Процентное содержание  $\alpha$ -спирали в АТР-азе вычисляли из значения эллиптичности при 209 нм по той причине, что вклад в наблюдаемую эллиптичность, вносимый оптической активностью  $\beta$ -структуры и неупорядоченной конформацией, при этой длине волны наименьший [3]. На рис. 2 приведен спектр КД АТР-азы в водном растворе. По форме кривой КД можно заключить, что фермент содержит большое количество пептидных групп, образующих  $\alpha$ -спираль. Расчет показал, что в АТР-азе 80% пептидных групп находятся в  $\alpha$ -спиральной конформации. В качестве стандарта принят КД  $\alpha$ -спирали poly(L)-лизина [3]. КД  $\alpha$ -спирали белков и синтетических полипептидов в спектральном диапазоне 185—250 нм существенно не различается.

Чтобы оценить содержание  $\beta$ -структуры в АТР-азе, был изучен ИК-спектр этого фермента в области колебаний амид I и амид II пептидной группы (рис. 3). Наличие  $\beta$ -структуры в белках сопровождается появлением в ИК-спектре интенсивных сравнительно узких полос с максимумом поглощения при 1520 и 1690  $cm^{-1}$  [4]. Минимальное количество  $\beta$ -структуры, которое можно обнаружить по общему виду спектра без его детального анализа, составляет  $\sim 7\%$ . В спектре рис. 3 при этих значениях волновых чисел поглощение, обусловленное наличием  $\beta$ -структуры, не просматривается.

Считается [5], что АТР-аза — глобулярный белок. Для образования полипептидной цепи глобулы необходимо резервировать часть пептидных групп на изгибы, неизбежно возникающие при плотной упаковке в глобуле. Поэтому трудно предполагать наличие  $\beta$ -структуры в белке при столь высоком содержании  $\alpha$ -спирали.

Таким образом, в исследованном препарате растворимой АТР-азы митохондрий  $\sim 80\%$  пептидных групп полипептидных цепей образуют  $\alpha$ -спираль и  $\sim 20\%$  общего количества пептидных групп образуют неупорядоченную конформацию.

## Экспериментальная часть

Получение первичного экстракта АТФ-азы из митохондрий сердца быка с помощью ультразвука проводили по методике, описанной ранее [6]. К экстракту АТФ-азы добавляли насыщенный раствор сульфата аммония до концентрации 40%. Осажденные белки отделяли центрифугированием. К супернатанту снова добавляли сульфат аммония до концентрации 55%, при этом в осадок выпадает фракция белков, содержащая до 90% активности АТФ-азы. Эту фракцию также отделяли центрифугированием. Осадок суспендировали в небольшом объеме среды, содержащей 6 мМ АТФ и 0,5 мМ EDTA, pH 7,6. Концентрация белка составляла 3—5 г/л. Полученный раствор нагревали до 65° и выдерживали 3 мин при этой температуре, затем быстро охлаждали до 20—25° и центрифугировали. В осадок переходит большое количество денатурированных «балластных» белков, тогда как АТФ-аза остается в растворе и не изменяет своей активности. Последний этап очистки — пропускание препарата через колонку с сефадексом G-200, уравновешенную 1 мМ АТФ и 0,5 мМ EDTA, pH 7,5. Выходящую с колонки в «свободном» объеме АТФ-азу собирали отдельной порцией. Раствор быстро (в течение 10—15 с) замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученный порошок очень гигроскопичен, и его необходимо хранить в герметично закрытой посуде при 20°. В таких условиях фермент может храниться несколько месяцев без изменения активности. Сухой препарат содержит ~ 40% АТФ-азы, остальное — примеси натриевых солей АТФ и EDTA. Он легко растворяется в воде. При концентрации белка выше 4—5 г/л раствор опалесцирует. Для проведения спектральных исследований раствор порошка в воде пропускали через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную 0,02 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4. Очищенная АТФ-аза стабильна в растворе несколько часов при 20°, имеет удельную активность 20—40 мкмоль/мин·мг. Фермент представлен гомогенным белком, что показано методами гель-фильтрации и электрофореза в полиакриламидном геле. Вторичная структура фермента, по данным КД, не изменяется при лиофилизации.

Активность АТФ-азы определяли потенциометрическим методом [7], основанным на измерении активности ионов водорода, освобождающихся при гидролизе АТФ.

Круговой дихроизм регистрировали на спектрополяриметре J-20 (JASCO, Япония), ИК-спектры записывали на спектрофотометре UR-20 (Carl Zeiss, ГДР). УФ-спектры измеряли на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР). Спектральные измерения в области 184—200 нм проводили при интенсивной продувке монохроматора азотом особой чистоты (содержание кислорода не более 0,001%, расход газа 10 л/мин). Все спектры записывали для двух-трех различных концентраций АТФ-азы в растворе. Кривые КД, измеренные при значении концентрации фермента 1,4 и 0,7 г/л в кювете с длиной оптического пути 0,1 мм, коррелировали друг с другом в области 185—200 нм с погрешностью, не превышающей 10%. Эта погрешность не превышала 5% в области 200—215 нм и практически отсутствовала в диапазоне длин волн 215—240 нм. Эффекты, наблюдаемые в работе [8], имеют место, по-видимому, в случае небольших значений эллиптичности при существенном поглощении раствора в исследуемом спектральном диапазоне. Концентрацию белка определяли по методу Кьельдаля [9].

Авторы признательны В. Т. Иванову за полезное обсуждение этой работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов И. А., Проханов О. А., Ягужинский Л. С. (1975) Биоорг. химия, **1**, 539—545.
2. Barnes E. E., Simpson W. T. (1963) J. Chem. Phys., **39**, 670—675.
3. Greenfield N., Fasman C. D. (1969) Biochemistry, **8**, 4108—4116.
4. Chirgadze Yu. N., Shestopalov B. V., Venyaminov S. Yu. (1973) Biopolymers, **12**, 1337—1351.
5. Pedersen P. L. (1975) Bioenergetics, **6**, 243—275.
6. Щипакин В. Н., Азарашвили Т. С., Фролова Е. П., Евтодьянко Ю. В. (1974) в сб. Биофизика живой клетки. Мембраны, т. 5, с. 12—24, Пуцшно.
7. Nishimura M., Ito T., Chance B. (1962) Biochim. et biophys. acta, **59**, 177—182.
8. Sjöholm I., Ekman B. (1975) Anal. Biochem., **65**, 596—599.
9. Lang C. A. (1958) Anal. Chem., **30**, 1692—1694.

Поступила в редакцию  
10.II.1977

## SPECTROSCOPIC STUDIES OF SOLUBLE ATR-ASE FROM MITOCHONDRIA

SUKHOMUDRENKO A. G., KILADSE A. A., SHCHIPAKIN V. N.,  
EVTODIENKO Yu. V.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

A procedure was described for purification and preparation of freeze-dried form of ATP-ase (EC 3.6.1.3) isolated from bovine heart mitochondria. Lyophilization was found to be without effect as regards the enzymatic activity and spectral characteristics. The information on the enzyme secondary structure was inferred from the CD and IR measurements which gave 80% estimates for  $\alpha$ -helix and provided no evidence of  $\beta$ -structure.

---